

---

**Technische Universität München**  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

**Klonierung und Charakterisierung von Genen der  
Flavonoidbiosynthese aus Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)  
und der Einfluss von Prohexadion-Ca und Milsana<sup>®</sup> auf die  
Flavan 3-ol Biosynthese**

**Bettina E. Deiml**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D.R. Treutter  
Prüfer der Dissertation:  
1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann  
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 20.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.09.2007 angenommen.

---

## **Pilgrim**

Pilgrim, how you journey on the road you chose  
to find out where the winds die and where the stories go.  
All days come from one day that much you must know,  
you cannot change what's over but only where you go.

One way leads to diamonds, one way leads to gold,  
Another leads you only to everything you're told.  
In your heart you wonder which of these is true;  
the road that leads to nowhere, the road that leads to you.

Will you find the answer in all you say and do?  
Will you find the answer in you?

Each heart is a pilgrim, each one wants to know  
the reason why the winds die and where the stories go.  
Pilgrim, in your journey you may travel far,  
for pilgrim it's a long way to find out who you are.

**(Enya)**

---

**Aus der vorliegenden Arbeit ging folgende Veröffentlichung im Rahmen einer Forschungs Kooperation hervor:**

ALMEIDA JRM, D'AMICO E, PREUSS A, CARBONE F, DE VOS CHR, DEIML B, MOURGUES F, PERROTTA G, FISCHER TC, BOVY AG, MARTENS S und ROSATI C (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* submitted.

**Ein Beitrag zum Thema der vorliegenden Arbeit wurde von mir bei folgendem Fachkongress in Form eines Posters präsentiert:**

„Induktion von Polyphenol-Resistenzfaktoren bei Erdbeere“,

43. Gartenbauwissenschaftliche Tagung“, Potsdam, Deutschland, 22. - 24.02.2006

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VII</b>
<b>A Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>A.1 Flavonoide und Proanthocyanidine – Biosynthese und Funktionen</b>	<b>1</b>
A.1.1 Allgemeine Flavonoidbiosynthese.....	1
A.1.2 Proanthocyanidinbiosynthese – Stand des Wissens.....	4
A.1.2.1 Struktur der Proanthocyanidine.....	4
A.1.2.2 Bildung von (+)-Catechin- und (-)-Epicatechinmonomeren.....	5
A.1.2.3 Bildung von B-Typ Proanthocyanidin-Oligomeren und -Polymeren.....	5
A.1.2.4 Bildung von A-Typ Proanthocyanidinen.....	6
A.1.3 Funktionen von Flavonoiden und Proanthocyanidinen.....	7
A.1.4 Subzelluläre Organisation von Flavonoiden und Proanthocyanidinen.....	8
A.1.5 Intrazellulärer Transport von Flavan 3-olen .....	9
<b>A.2 Resistenzmechanismen der Pflanze</b>	<b>10</b>
A.2.1 Induzierte Resistenz durch biotische und abiotische Faktoren.....	10
A.2.2 Phenolische Inhaltsstoffe und Pathogenabwehr .....	11
<b>A.3 Wachstumsregulatoren und Pflanzenstärkungsmittel</b>	<b>13</b>
A.3.1 Prohexadion-Ca <sup>®</sup> .....	13
A.3.2 Milsana <sup>®</sup> .....	14
<b>A.4 Die Erdbeere (<i>Fragaria x ananassa</i>)</b>	<b>15</b>
A.4.1 Botanik, Herkunft und wirtschaftliche Bedeutung der Erdbeere .....	15
A.4.2 Erdbeerzüchtung.....	16
<b>A.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>B Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>B.1 Material</b>	<b>19</b>
B.1.1 Erdbeer-Pflanzenmaterial .....	19
B.1.1.1 Erdbeerversuch 2004.....	19
B.1.1.2 Erdbeerversuch 2005.....	20
B.1.2 Pflanzenstärkungsmittel und Wachstumsregulatoren.....	21
B.1.2.1 Prohexadion-Ca .....	21
B.1.2.2 Milsana <sup>®</sup> .....	21
B.1.3 Geräte .....	21
B.1.4 Firmen .....	22
B.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	22
B.1.6 Reaktionssysteme und Kits.....	24
B.1.7 Enzyme und Proteine .....	25
B.1.8 Puffer und sonstige Lösungen .....	25
B.1.9 Bakterien- und Hefemedien .....	26
B.1.10 Bakterien- und Hefestämme.....	27
B.1.11 Vektoren.....	28
B.1.12 Substrate, Cosubstrate und Radiochemikalien.....	29
<b>B.2 Methoden</b>	<b>29</b>
B.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	29
B.2.1.1 Präparation von Gesamt-RNA und mRNA .....	29
B.2.1.1.1 Concert <sup>™</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen).....	29

B.2.1.1.2	Extraktion von Gesamt-RNA nach Manning (1991).....	29
B.2.1.2	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren .....	30
B.2.1.3	Northern Blot Analyse .....	31
B.2.1.3.1	Vorbereitung und Blotten.....	31
B.2.1.3.2	Markierung der Hybridisierungssonde .....	31
B.2.1.3.3	Hybridisierung und Signalgenerierung .....	31
B.2.1.3.4	Signaldetektion und Auswertung.....	31
B.2.1.4	Reverse Transkription .....	32
B.2.1.5	Polymerase Chain Reaction – Methoden (PCR) .....	32
B.2.1.5.1	Synthetische Oligonukleotide .....	32
B.2.1.5.2	Standard PCR.....	32
B.2.1.5.3	Colony-PCR .....	33
B.2.1.5.4	RACE-PCR .....	33
B.2.1.6	Präparation von Plasmid-DNA .....	35
B.2.1.7	DNA-Sequenzierung .....	35
B.2.1.8	Klonierungen in Vektoren.....	36
B.2.1.9	Transformation von Mikroorganismen .....	36
B.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	36
B.2.2.1	Heterologe Expression in Hefe .....	36
B.2.2.2	Enzymaufarbeitung.....	37
B.2.2.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts.....	37
B.2.2.4	Synthese von radioaktiv markierten Flavonoiden .....	37
B.2.2.5	Standardenzymtest .....	39
B.2.2.5.1	Photometrisch gemessene Enzymtests .....	39
B.2.2.5.2	Enzymtests mit [ <sup>14</sup> C]-markierten Substraten.....	39
B.2.2.5.3	Enzymtests mit nicht radioaktiv markierten Substraten.....	41
B.2.2.6	Radioaktivitätsmessung .....	41
B.2.3	Chemische Methoden.....	42
B.2.4	Histochemische Untersuchungsmethoden.....	42
B.2.5	Computergestützte Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen .....	43
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>C.1</b>	<b>Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus Erdbeere</b>	
	<b>(<i>Fragaria x ananassa</i>)</b>	<b>44</b>
C.1.1	Allgemeines Vorgehen.....	44
C.1.2	Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) .....	45
C.1.2.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> DFR cDNA-Klons .....	45
C.1.2.2	Sequenzanalyse des DFR Klons ‚U1-1‘.....	45
C.1.2.2.1	Analyse von Sequenzmotiven .....	45
C.1.2.2.2	Homologieanalyse verschiedener DFR Sequenzen der Familie <i>Rosaceae</i> .....	45
C.1.2.2.3	Phylogenetische Analyse verschiedener DFR Sequenzen der .....	
	Familie <i>Rosaceae</i> .....	47
C.1.2.3	Heterologe Expression des putativen DFR cDNA-Klons .....	47
C.1.3	Flavonolsynthase (FLS) .....	48
C.1.3.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> FLS cDNA-Klons.....	48
C.1.3.2	Sequenzanalyse des FLS Klons.....	49
C.1.3.2.1	Analyse von Sequenzmotiven .....	49
C.1.3.2.2	Homologieanalyse verschiedener FLS-Sequenzen .....	49
C.1.3.2.3	Phylogenetische Analyse verschiedener FLS Sequenzen.....	52
C.1.3.3	Heterologe Expression des putativen FLS cDNA-Klons .....	52
C.1.4	Leukoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR).....	53

C.1.4.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> LAR cDNA-Klons .....	53
C.1.4.2	Sequenzanalyse des LAR Klons .....	54
C.1.4.2.1	Analyse von Sequenzmotiven .....	54
C.1.4.2.2	Homologieanalyse verschiedener LAR Sequenzen.....	54
C.1.4.2.3	Phylogenetische Analyse verschiedener LAR Sequenzen .....	57
C.1.4.3	Heterologe Expression des putativen LAR cDNA-Klons.....	57
C.1.5	Anthocyanidinreduktase (ANR) .....	59
C.1.5.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> ANR cDNA-Klons .....	59
C.1.5.2	Sequenzanalyse des ANR Klons .....	60
C.1.5.2.1	Analyse von Sequenzmotiven .....	60
C.1.5.2.2	Homologieanalyse verschiedener ANR Sequenzen.....	60
C.1.5.2.3	Phylogenetische Analyse verschiedener ANR Sequenzen .....	62
C.1.5.3	Heterologe Expression des putativen ANR cDNA-Klons.....	62
<b>C.2</b>	<b>Untersuchung der Flavan 3-ol Biosynthese in unbehandelten Erdbeerblüten und -früchten</b>	<b>64</b>
C.2.1	Genexpressionsstudie der ANR mittels Northern Blot Analyse.....	64
C.2.2	Enzymologische Untersuchung der LAR in Blüten- und Fruchtreifestadien.....	65
C.2.3	Lokalisierung der Flavan 3-ole mit DMAZA-Färbereaktionen.....	66
<b>C.3</b>	<b>Behandlung mit Pflanzenstärkungsmitteln und Wachstumsregulatoren</b>	<b>67</b>
C.3.1	Expression des ANR-Gens .....	67
C.3.2	Enzymologische Untersuchung der LAR.....	69
C.3.3	Wirkungen der Prohexadion-Ca-Behandlung auf die Pflanzen- und Fruchtentwicklung.....	70
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>D.1</b>	<b>Flavonoidbiosynthese in der unbehandelten Erdbeerfrucht</b>	<b>71</b>
D.1.1	Klonierung von Flavonoidgenen der Erdbeere.....	71
D.1.2	Funktion und Substratspezifität.....	73
D.1.2.1	Dihydroflavonol 4-Reduktase .....	73
D.1.2.2	Flavonolsynthase .....	76
D.1.2.3	Leukoanthocyanidin 4-Reduktase .....	77
D.1.2.4	Anthocyanidinreduktase.....	77
D.1.2.5	Weitere Flavonoidenzyme .....	78
D.1.3	Flavonoidbiosyntheseweg in Erdbeerfrüchten .....	78
D.1.3.1	Flavonoid- und Proanthocyanidinverbindungen in Erdbeerfrüchten .....	78
D.1.3.2	Lokalisierung von Flavan 3-olen und Anthocyanen in der reifenden Erdbeerfrucht.....	80
D.1.3.3	Klonierungen .....	80
D.1.3.4	Entwicklungsspezifische Regulation der Flavonoidbiosynthese in Erdbeerfrüchten .....	84
<b>D.2</b>	<b>Einfluss von Wachstumsregulatoren und Pflanzenstärkungsmitteln auf die Flavonoidbiosynthese von Erdbeerpflanzen und -früchten</b>	<b>88</b>
D.2.1	Einfluss auf die Genexpression der ANR .....	88
D.2.2	Einfluss auf die Enzymaktivität der LAR .....	89
D.2.3	Einfluss auf das Pflanzenwachstum und Bedeutung für den Anbau .....	90
<b>D.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>92</b>
D.3.1	Nutzung molekularbiologischer Ansätze für die klassische Züchtung .....	92
D.3.2	Ansätze mit Phytohormonen und Wachstumsregulatoren .....	93
D.3.3	Ungeklärte Fragen der Flavonoid- bzw. der Proanthocyanidin-Biosynthese .....	94
D.3.3.1	Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) und Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H) ..	94
D.3.3.2	Entstehung der Proanthocyanidine .....	94

---

<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>E</b>	<b>Summary</b>	<b>99</b>
<b>F</b>	<b>Literatur</b>	<b>101</b>
<b>G</b>	<b>Anhang</b>	<b>116</b>
<b>G.1</b>	<b>BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien der Erdbeere nach MEIER et al. (1994)</b>	<b>116</b>
<b>G.2</b>	<b>Partiell degenerierte, genspezifische und genunspezifische Primer</b>	<b>117</b>
<b>G.3</b>	<b>Nukleotidsequenzen und offene Leserahmen der <i>full-length</i> cDNA-Klone</b>	<b>119</b>
G.3.1	Dihydroflavonol 4-Reduktase .....	119
G.3.2	Flavonolsynthase .....	120
G.3.3	Leukoanthocyanidin 4-Reduktase .....	121
G.3.4	Anthocyanidinreduktase.....	122
<b>G.4</b>	<b>Verwendete Sequenzen</b>	<b>123</b>
<b>G.5</b>	<b>Sequenzmotive</b>	<b>125</b>
G.5.1	Dihydroflavonol 4-Reduktase .....	125
G.5.2	Flavonolsynthase .....	127
G.5.3	Leukoanthocyanidin 4-Reduktase .....	131
G.5.4	Anthocyanidinreduktase.....	135

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grundstruktur von Flavonoiden	1
Abb. 2: Schema der einzelnen Schritte der Flavonoidbiosynthese hin zu den wichtigsten Flavonoidklassen	4
Abb. 3: Hypothetisches Schema zur Polymerisation bei der Bildung von Proanthocyanidinen	6
Abb. 4: Schematisches Modell eines möglichen, als Metabolon organisierten, Seitenwegs des Phenylpropanoidstoffwechsels	9
Abb. 5: Effekt von Prohexadion-Ca auf den Flavonoidmetabolismus in Apfellaub	14
Abb. 6: Blüten- und Fruchtreifestadien nach der BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien	19
Abb. 7: PCR-Klonierungsvektor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> und Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>	28
Abb. 8: Klonierungsschema des DFR cDNA-Klons	45
Abb. 9: Phylogenetische Analyse der Dihydroflavonol 4-Reduktase Vertreter der Familie <i>Rosaceae</i> , basierend auf Aminosäuresequenzen	47
Abb. 10: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons U1-1	48
Abb. 11: Klonierungsschema des FLS cDNA-Klons	49
Abb. 12: Phylogenetische Analyse verschiedener Flavonolsynthasen, basierend auf Aminosäuresequenzen	52
Abb. 13: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten FLS cDNA-Klons	53
Abb. 14: Klonierungsschema des LAR cDNA-Klons	54
Abb. 15: Phylogenetische Analyse verschiedener Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen, basierend auf Aminosäuresequenzen	57
Abb. 16: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten LAR cDNA-Klons	58
Abb. 17: Gekoppelte Enzymreaktion für die Luteoliflavansynthese über Luteoforol, zur Überprüfung der Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten LAR cDNA-Klons	58
Abb. 18: Klonierungsschema des ANR cDNA-Klons	59
Abb. 19: Phylogenetische Analyse verschiedener Anthocyanidinreduktasen, basierend auf Aminosäuresequenzen	62
Abb. 20: Enzymtests des heterolog in Hefe exprimierten ANR cDNA-Klons und verschieden hydroxylierten Anthocyanidinsubstraten	63
Abb. 21: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien	64
Abb. 22: LAR-Aktivität verschiedener Blüten- und Fruchtstadien	65
Abb. 23: DMAZA-Färbung bei Früchten der verschiedenen Entwicklungsstadien	66
Abb. 24: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung	67
Abb. 25: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien nach einer Prohexadion-Ca- und Milsana <sup>®</sup> -Kombinationsbehandlung	68
Abb. 26: Vergleich der relativen Genexpressionen der Erdbeer-ANR aus ‚Elsanta‘, nach unterschiedlichen Behandlungen mit Wachstumsregulatoren bzw. Pflanzenstärkungsmitteln	68
Abb. 27: Vergleich der LAR-Aktivität unbehandelter und Prohexadion-Ca-behandelter Blüten	69
Abb. 28: Einfluss von Prohexadion-Ca auf das Pflanzenwachstum	70
Abb. 29: Einfluss von Prohexadion-Ca auf die Fruchtentwicklung	70
Abb. 30: Alignment der ‚substrate specificity determining region‘ von DFRs aus verschiedenen Vertretern der <i>Rosaceae</i>	75
Abb. 31: Flavonoidbiosyntheschema der Erdbeerfrucht	83

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: PCR-Klonierungsvektor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> und Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>	28
Tab. 2: Reaktionsansatz der Standard-PCR	33
Tab. 3: Versuchsbedingungen der Enzymtests mit [ <sup>14</sup> C]-markierten Substraten	40
Tab. 4: Zusammensetzung der unterschiedlichen Laufmittel	42
Tab. 5: Homologiematrix in Prozent der verschiedenen DFR Klone der Familie <i>Rosaceae</i>	46
Tab. 6: Homologiematrix in Prozent verschiedener FLS Sequenzen	51
Tab. 7: Homologiematrix in Prozent verschiedener LAR Sequenzen	56
Tab. 8: Homologiematrix in Prozent verschiedener ANR Sequenzen	61
Tab. 9: Detektierte Flavonoid- und Proanthocyanidinstoffklassen in <i>Fragaria x ananassa</i>	79

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.No	Zugangsnummer (accession number)
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
Ap	Apigenin
AS	Aminosäure
BAW	n-Butanol-Eisessig-Wasser
BBCH	Skala zur einheitlichen Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
Cat	Catechin
CAW	Chloroform-Eisessig-Wasser
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
Cy	Cyanidin
dATP	Deoxyadenosin 5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Deoxycytidin 5'-triphosphat
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokämpferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DMAZA	p-Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
Dp	Delphinidin
dpm	Zerfälle pro Minute
dT	Deoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERI	Eriodictyol
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
F3GT	UDP Glukose:Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase
F5GT	UDP Glukose:Flavonoid 5-O-Glukosyltransferase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS I, II	Flavonsynthase I, II
GSP	genspezifischer Primer
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Km	Kämpferol
Lu	Luteolin
LCy	Leukocyanidin
LDp	Leukodelphinidin
LPg	Leukopelargonidin

---

MeOH	Methanol
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure
My	Myricetin
NAA	Naphtylelessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP <sup>+</sup>
NAR	Naringenin
ORF	Open Reading Frame = offener Leserahmen
PA	Proanthocyanidine
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
ppm	Parts per Million
ProCa <sup>®</sup>	Prohexadion-Calcium
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Qu	Quercetin
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolution per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
U Unit	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$ Substratumsatz/min)

## A Einleitung

### A.1 Flavonoide und Proanthocyanidine – Biosynthese und Funktionen

Flavonoide sind eine wichtige Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Sie erfüllen eine Vielzahl von biologischen Funktionen in der Pflanzen- und Tierwelt und spielen eine bedeutende Rolle in der menschlichen Ernährung und Gesundheit (WINKEL-SHIRLEY, 2001; HARBORNE und WILLIAMS, 2001; FORKMANN und HELLER, 1999; TREUTTER, 2005; CROZIER, 2006). HARBORNE und BAXTER (1999) charakterisieren in ihrem „Handbook of Natural Flavonoids“ über 6000 Flavonoidstrukturen. Die allgemeine Flavonoidbiosynthese ist chemisch, biochemisch und molekularbiologisch weitgehend charakterisiert. Gentechnische Ansätze wurden vorgenommen, um fundierte Kenntnisse über die Synthese von Flavonoiden und deren Regulierung zu gewinnen (DAVIES und SCHWINN, 2003; KOES et al., 2005).

#### A.1.1 Allgemeine Flavonoidbiosynthese

Die wesentlichen Schritte der allgemeinen Flavonoidbiosynthese sind heute genetisch und biochemisch charakterisiert (Abb. 2; FORKMANN 1994; FORKMANN und HELLER, 1999). Inzwischen sind die meisten wichtigen Strukturgene und einige Regulatorgene kloniert und heterolog exprimiert worden (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Flavonoide besitzen eine C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> Grundstruktur, die aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem heterozyklischen Pyranring (C) bestehen (Abb. 1).

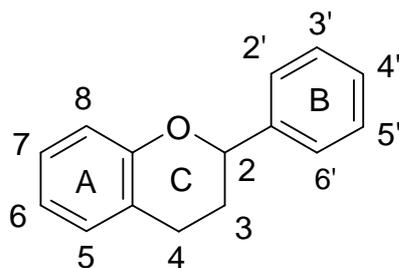
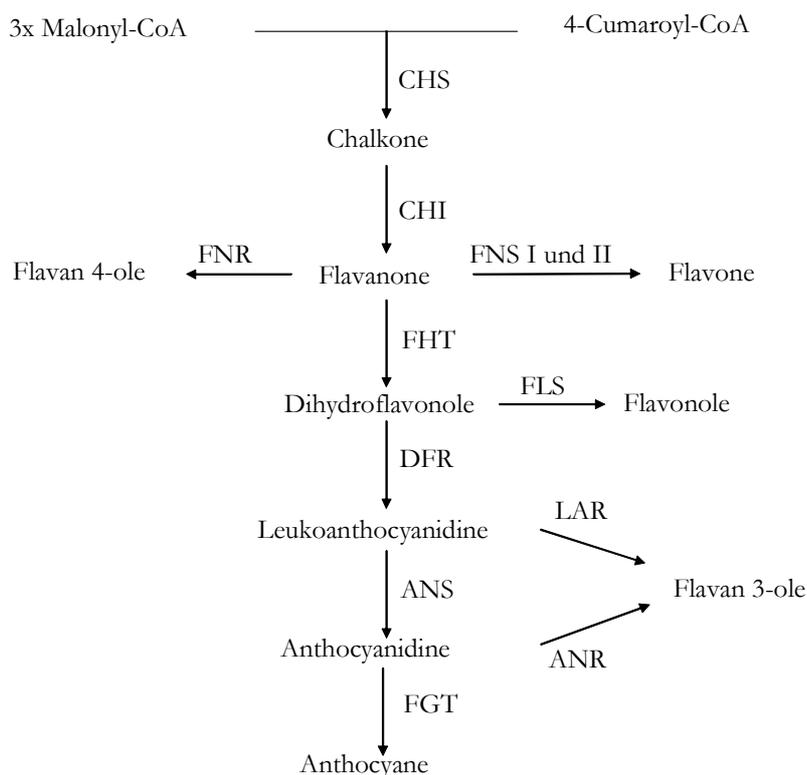


Abb. 1: Grundstruktur von Flavonoiden

Die Vorstufen für die Synthese aller Flavonoide sind Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA. Letzteres leitet sich von Phenylalanin her und entsteht durch die Wirkung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und der 4-Cumarsäure:CoA Ligase. Chalkonsynthase (CHS) katalysiert die schrittweise Kondensation von drei Acetateinheiten von Malonyl-CoA mit 4-Cumaroyl-CoA zur Bildung von Tetrahydroxychalkon. Die CHS wurde erstmals aus Petersilie von KREUZALER et al. (1983) isoliert. *Differential screening* wurde verwendet, um einen cDNA Klon zu identifizieren. Chalkonisomerase (CHI) katalysiert die stereospezifische

Umsetzung der gelben Chalkone zu den entsprechenden farblosen Flavanonen mit 2*S*-Konfiguration. Die erste CHI wurde aus *Phaseolus vulgaris* isoliert (MEHDY UND LAMB, 1987). Die Einführung einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 bei Flavanonen führt zur Bildung von Flavonen. Zwei unterschiedliche Enzyme können diese Reaktion katalysieren: Flavonsynthase I (FNS I), eine 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase und Flavonsynthase II (FNS II), ein NADPH-abhängiges Cytochrom P450 Enzym. Durch Einsatz der *Differential Display PCR* konnte die erste FNS II aus *Gerbera hybrida* kloniert werden (MARTENS UND FORKMANN, 1999). Eine FNS I wurde aus *Petroselinum crispum* kloniert und in Hefe exprimiert (MARTENS et al., 2001). Die Hydroxylierung von Flavanonen in Position drei führt zu Dihydroflavonolen. Durchgeführt wird diese Hydroxylierung von der Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT), einer 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenase. Die Methoden *Differential Screening* und *Genetic mapping* wurden verwendet, um einen cDNA Klon von *Anthirrinum majus* zu isolieren, der mit dem *incolorata* Locus korrespondiert (MARTIN et al., 1991). Dihydroflavonole sind Substrate für die Flavonol- und Flavan-3,4-diol Synthese. Letztere sind die direkten Zwischenprodukte in der Catechin-, Proanthocyanidin- und Anthocyanidinsynthese. Flavonolsynthase (FLS), eine weitere 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase, bildet aus Dihydroflavonolen Flavonole, indem sie eine Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 einführt. Die FLS wurde zuerst aus *Petunia* isoliert. Dabei wurde die Dioxygenase-Homologie genutzt (HOLTON et al., 1993b). Die Reduktion der Carbonylgruppe von Dihydroflavonolen in Position vier führt zu Flavan-3,4-diolen, auch Leukoanthocyanidine genannt. Die Reaktion wird von der Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) katalysiert. Sie benötigt NADPH als Kofaktor und gehört zur 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dihydrogenase / DFR Superfamilie. Das Gen wurde zuerst aus *Zea mays* und *Anthirrinum majus* durch *Transposon Tagging* isoliert (MARTIN et al., 1985; O'REILLY et al., 1985). Ein *Anthirrinum majus* DFR Klon wurde genutzt, um ein homologes Gen aus *Petunia* zu isolieren (BELD et al., 1989). Die DFR kann auch eine zusätzliche Flavanon 4-Reduktase Aktivität (FNR) besitzen. Die FNR katalysiert die Reduktion von Naringenin zu Apiforol und von Eriodictyol zu Luteoforol (FORKMANN UND HELLER, 1999). Sie benötigt ebenfalls NADPH als Kofaktor. Ebenso die Leukoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR), die die Reduktion von Leukoanthocyanidinen in Position 4 zu Catechinen katalysiert. Dazu wird NADPH als Kofaktor benötigt. Das LAR-Gen wurde erstmals aus *Desmodium uncinatum* kloniert und der Isoflavonreduktase ähnlichen Gruppe der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase (RED) Superfamilie zugeordnet (TANNER et al., 2003). Leukoanthocyanidine werden auch von der 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenase Anthocyanidinsynthase (ANS) benutzt, um Anthocyanidine zu bilden. In *Zea mays* wurde das A2 Gen und in *Anthirrinum majus* das Candica Gen kloniert. Beide können Leukoanthocyanidin in Anthocyanidin umsetzen (MENSSEN et al., 1990; MARTIN et al., 1991). Anthocyanidine dienen als Substrate für die Antho-

cyanidinreduktase (ANR), die die Bildung von 2,3-*cis*-Flavan 3-olen unter Verbrauch von NADPH katalysiert (XIE et al., 2003). Die ANR wird ebenfalls der Isoflavonreduktase ähnlichen Gruppe der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase (RED) Superfamilie zugeordnet. Ein Glykosylierungsschritt setzt Anthocyanidine zu Anthocyanidin 3-Glykosiden um. Dieser wird von der UDP Glykosid:Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase durchgeführt (F3GT). Dieses Gen wurde erstmals durch *Transposon Tagging* in Mais isoliert (FEDOROFF et al., 1984). Anthocyane können ebenso eine Glukosegruppe an der Position fünf besitzen, die von der UDP Glukose:Flavonoid 5-O-Glukosyltransferase eingeführt wird (F5GT). Spezifische Flavonoid B-Ring Hydroxylasen (F3'H und F3'5'H) katalysieren das Einfügen von Hydroxylgruppen in den Positionen 3' und 5'. Diese beiden Enzyme gehören zur gleichen Cytochrom P450 Familie (HOLTON et al., 1993a). Beide sind Schlüsselenzyme in der Bestimmung der Blütenfarbe, da sie die Hydroxylierungsmuster des B-Rings kontrollieren und damit Einfluss auf die Absorptionsspektren ausüben (HOLTON UND TANAKA, 1994). In Blütenextrakten definierter Genotypen von *Petunia* wurde eine Enzymaktivität bestimmt, die für die Hydroxylierung von Naringenin und Dihydrokämpferol in der 3' Position verantwortlich waren (STOTZ et al., 1985). Ein Cytochrom P450 cDNA Klon mit F3'H Aktivität wurde erstmals aus *Petunia* isoliert. Konservierte Sequenzbereiche verschiedener Cytochrom P450 Mitglieder wurden genutzt, um degenerierte Oligonukleotidprimer abzuleiten. Damit wurden Cytochrom P450 Sequenzen aus *Petunia* mittels PCR Amplifikation isoliert. Klone von zwei unterschiedlichen P450 Genen mit F3'5'H Aktivität wurden kloniert und in Hefe exprimiert (HOLTON et al., 1993a). Durch eine Vielzahl weiterer glykosylierender, methylierender, acylierender und anderer Enzyme entsteht aus den Grundstrukturen eine Vielfalt an Flavonoiden.



**Abb. 2: Schema der einzelnen Schritte der Flavonoidbiosynthese hin zu den wichtigsten Flavonoidklassen**  
 CHS – Chalkonsynthase, CHI – Chalkonisomerase, FHT – Flavanon 3-Hydroxylase, DFR – Dihydroflavonol 4-Reduktase, ANS – Anthocyanidinsynthase, FGT – Flavonoid 3-O-Glykosyltransferase, FNS – Flavonsynthase, FNR – Flavanon 4-Reduktase, FLS – Flavonolsynthase, LAR – Leukoanthocyanidin 4-Reduktase, ANR – Anthocyanidinreduktase

## A.1.2 Proanthocyanidinbiosynthese – Stand des Wissens

### A.1.2.1 Struktur der Proanthocyanidine

Die Grundgerüste der Proanthocyanidine bilden die Flavan 3-ole (+)-Catechin (2,3-*trans*-Stereochemie) und (-)-Epicatechin (2,3-*cis*-Stereochemie). Die Proanthocyanidinstrukturen variieren je nach Stereochemie und Hydroxylierung der Flavan-3-ol-Starter- und Extensionseinheiten. Weiteren Einfluss hat der Grad der Polymerisierung und das Vorhandensein von Modifizierungen wie Veresterungen der 3-Hydroxyl-Gruppe. Homo-oligomere Proanthocyanidine mit 2 (3'4') B-Ring-Hydroxylgruppen werden Procyanidine genannt. Generell ist die Verbindung der Monomereinheiten der Proanthocyanidine zwischen der 4-Position der *upper unit* und der 8-Position der *lower unit*. Es können aber auch alternative Bindungen zwischen C-4 der *upper unit* und C-6 der *lower unit* entstehen. Häufig ist die 3-Hydroxylgruppe der Flavan-3-ol-Einheiten mit Gallussäure verestert. (DIXON, 2005)

### A.1.2.2 Bildung von (+)-Catechin- und (-)-Epicatechinmonomeren

Die *in vitro* Biosynthese von 2,3-*trans*-(+)-Catechin wurde von STAFFORD und LESTER (1984) bei Zell- und Gewebekulturen von *Ginkgo biloba* und *Pseudotsuga menziesii* nachgewiesen. Die Dihydroflavonole im Anthocyaninbiosyntheseweg besitzen bereits die 2,3-*trans*-Stereochemie, die durch die Chalkonisomerase- und Flavanon 3-Hydroxylase-Reaktion eingeführt wird. Es wurde angenommen, dass Catechin aus Dihydroquercetin über eine Dihydroflavonol 4-Reduktase-Reaktion (DFR) und anschließende Leukoanthocyanidin 4-Reduktase-Reaktion (LAR) gebildet wird (TANNER et al., 2003). Das *BANYULS* Gen aus *Arabidopsis thaliana* codiert ein Enzym, die Anthocyanidinreduktase (ANR), das Cyanidin zu 2,3-*cis*-(-)-Epicatechin umsetzt (XIE et al., 2003). Es wird ebenfalls der Isoflavonreduktase ähnlichen Gruppe der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase (RED) Superfamilie zugeordnet.

### A.1.2.3 Bildung von B-Typ Proanthocyanidin-Oligomeren und -Polymeren

Es ist noch immer ungeklärt, ob der Kondensationsmechanismus zur Proanthocyanidinbildung enzymatisch oder nichtenzymatisch abläuft. Abbildung 3 zeigt verschiedene spekulative Bildungsmechanismen von Proanthocyanidinen. Chinonmethide oder Carbokationen, die sich aus Leukoanthocyanidinderivaten bilden, werden als Vorstufen der Extensionseinheiten der Proanthocyanidine angenommen. Anthocyanidine werden auch als potenzielle Substrate für die Proanthocyanidinpolymerisation betrachtet. Unter sauren Bedingungen sind Anthocyanidine hauptsächlich als Flavylumionen vorhanden. Diese werden durch die Polyphenoloxidase (PPO) zu Chinonmethiden und dann zu Carbokationen umgewandelt. Das nukleophile Epicatechin oder Catechin kann theoretisch das Carbokationenderivat angreifen, um Proanthocyanidine zu bilden. (+)-Catechin wird als die Hauptstartereinheit der Proanthocyanidine betrachtet. 2,3-*cis*-(-)-Epicatechin ist die vorherrschende Extensionseinheit von oligomeren Proanthocyanidinen aber auch eine gängige Startereinheit. Spezies, die hohe Konzentrationen an Proanthocyanidinen aufweisen, haben alle auch eine starke ANR-Aktivität, was ein indirekter Beweis sein könnte, dass die ANR die notwendigen Monomere für die Proanthocyanidinproduktion liefern könnte (DIXON, 2005). Es wird angenommen, dass Flav-3-en-3-ole Zwischenprodukte der enzymatischen ANR Reaktion von Anthocyanidinen zu Flavan 3-olen sein könnten. Alternativ könnte das Flav-3-en-3-ol, das bei der Kondensation beteiligt ist, das Zwischenprodukt der ANR-Reaktion sein, das Anthocyanidin zu Flavan-3-ol konvertiert (XIE et al., 2004).



### A.1.3 Funktionen von Flavonoiden und Proanthocyanidinen

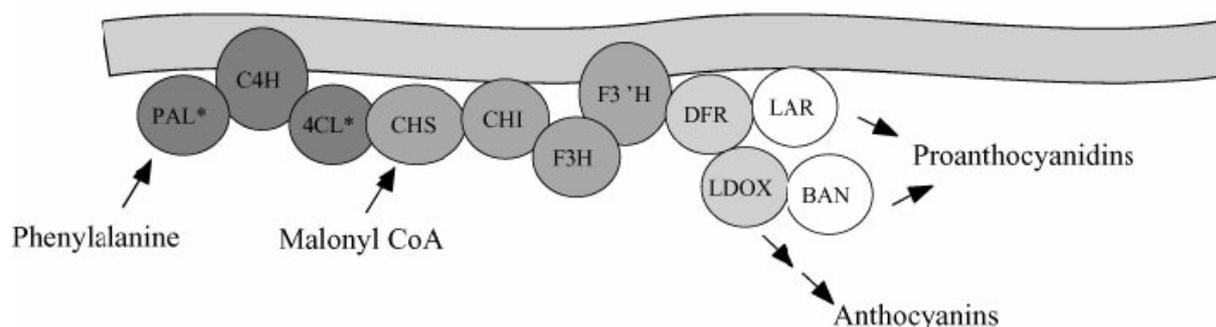
Flavonoide besitzen eine Vielfalt von Funktionen in der Natur. Die wichtigste Aufgabe übernehmen Flavonoide in ihrer Rolle als Pigmente. Sie sind für die Farbausprägung in Pflanzenorganen, vor allem in Blüten und Früchten verantwortlich. Mit ihren verschiedenen Stoffklassen ermöglichen sie die Bildung einer Farbpalette von gelb, rot, violett bis blau. Die Ausprägung der Farbe ist aber auch von anderen Faktoren abhängig, wie Art, Modifikation, Konzentration und Mischung der unterschiedlichen Verbindungen. Ebenso entscheidend ist der pH-Wert in der Vakuole, die Copigmentierung mit Zimtsäuren, Flavonoiden, Metallen und Anthocyanen. Auch das Vorkommen von Stoffen anderer Pigmentklassen, wie zum Beispiel den Carotinoiden oder Chlorophyll, ist ausschlaggebend für die Farbausprägung (HARBORNE, 1995; DAVIES und SCHWINN, 1997; BROUILLARD und DANGLES, 1994). Die Blütenpigmente sind für das Anlocken von Bestäubern und die Verbreitung von Samen bei Blütenpflanzen von großer Bedeutung. Die Abwehr von abiotischen und biotischen Stressfaktoren ist eine weitere wichtige Aufgabe der Flavonoide (WINKEL, 1996). Die schützende Wirkung gegenüber erhöhter UV-B Strahlung (MERZLYAK et al., 2002), bei mikrobiellen Attacken auf die Pflanze (MAYR et al., 1997) oder bei Angriffen durch Fraßfeinde konnte nachgewiesen werden. Flavonoide besitzen die Fähigkeit, Oxidationsprozesse aufzuhalten, indem sie das Pflanzengewebe effektiv vor Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies schützen (HARBORNE und WILLIAMS, 2000). Ferner üben sie im menschlichen Körper verschiedene Schutzfunktionen aus. Als Antioxidantien besitzen sie entzündungshemmende, anti-allergene, antivirale und krebsvorbeugende Eigenschaften (NIJVELDT et al., 2001). Viele von ihnen besitzen vaskuläre, östrogene oder zytotoxische tumorhemmende Aktivitäten (HARBORNE und WILLIAMS, 2000).

Proanthocyanidine und monomere Flavan 3-ole sind in Früchten, Rinden, Blättern und Samen verschiedener Pflanzen zu finden. Ihre Hauptaufgabe ist die Abwehr von mikrobiellen Pathogenen, Insekten und anderen Fraßfeinden (HARBORNE und GRAYER, 1993). Sie wirken antimikrobiell, indem sie extrazelluläre mikrobielle Enzyme hemmen, benötigte Substrate für das mikrobielle Wachstum entziehen oder direkt, durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, in den mikrobiellen Stoffwechsel eingreifen (SCALBERT, 1991). Proanthocyanidine können Metalle durch Komplexbildung binden. Die verringerte Bioverfügbarkeit von Spurenelementen, insbesondere Zink und Eisen, scheint eine antibakterielle Abwehrstrategie der Pflanze darzustellen (DIXON et al., 2005). Ferner verleihen Proanthocyanidine u.a. dem Fruchtfleisch, Fruchtsäften, Tee und Wein Aroma und adstringierenden Geschmack (TAKOS et al., 2006). Sie können Wiederkäuer vor Blähungen beim Verzehr von Futterpflanzen schützen, indem sie an Futtereweisse binden und diese ausfällen (TANNER et al., 1995). Als Antioxidantien dienen sie der menschlichen Gesundheit, indem

sie vor Schädigungen durch freie Radikale und dadurch letztlich vor arteriosklerotischen Herz-Kreislaufkrankungen bewahren. Klinische Studien belegen die Schutzwirkung von Catechin, Epicatechin und Gallocatechin gegen Magenkrebs (XIE et al., 2004). Die antikanzerogene Wirkung wurde auch in verschiedenen weiteren Studien geprüft (DIXON et al., 2005). Proanthocyanidine weisen entzündungshemmende, schmerzlindernde und krampflösende Wirkung auf den menschlichen Organismus auf (DIXON et al., 2005). Weiterhin dienen die Proanthocyanidine aus Trauben als Sonnenschutzagenzien (BAGCHI et al., 2000). Der Wissensstand über die Bioverfügbarkeit und das Verstoffwecheln von Proanthocyanidinen im menschlichen Körper ist allerdings noch nicht hinreichend. Hier liegt ein wichtiger Ansatzpunkt zukünftiger Studien.

#### **A.1.4 Subzelluläre Organisation von Flavonoiden und Proanthocyanidinen**

Die Enzyme des Phenylpropanoid- und des Flavonoidbiosynthesewegs scheinen als Multienzymkomplex (Metabolon) angeordnet zu sein, der den Stofffluss in spezifische Nebenwege kanalisiert (Abb. 4). So sind CHS, CHI, FHT und DFR in *Arabidopsis* an das Endoplasmatische Retikulum verankert. Membrangebundene P450 Proteine wie F3'H, C4H und IFS fixieren dabei vermutlich Multienzymkomplexe an das Endoplasmatische Retikulum (WINKEL-SHIRLEY, 2004). Für die Proanthocyanidinbiosynthese könnte auch ein anderes Modell denkbar sein, bei dem alle Enzyme, bis hin zur Bildung der Flavan 3-ole, auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums oder der Vakuolmembran angesiedelt sind. Es wurde noch nicht bestätigt, ob sich die LAR oder die ANR auch auf diesen Membranen befinden. Allerdings konnte bewiesen werden, dass die Polymerisation von Proanthocyanidinen intakte Membranen voraussetzt (LEPINIEC et al., 2006 und enthaltene Referenzen). Obwohl Flavonoide an verschiedenen Stellen inner- und außerhalb der Zelle gefunden wurden, wurde lange Zeit angenommen, dass die Flavonoidbiosynthese ausschließlich im Zytoplasma stattfindet. Neuere Studien belegen das Vorhandensein von Flavonoiden im Nukleus. In *Arabidopsis* konnten zwei Flavonoidenzyme im Nukleus lokalisiert werden. Das ist eventuell ein weiterer Hinweis, dass eine unterschiedliche Kanalisierung des Biosyntheseapparates stattfindet und die Bildung und die Deponierung von Sekundärprodukten innerhalb der Zelle reguliert (SASLOWSKY et al., 2005).



**Abb. 4: Schematisches Modell eines möglichen, als Metabolon organisierten, Seitenwegs des Phenylpropanoidstoffwechsels**

Aus Winkel-Shirley (2004): Enzyme aus verschiedenen Seitenzweigen sind in gleichen Grautönen dargestellt; Enzyme die nur in diesem Seitenweg vorkommen weiß. Die Enzyme, die als multiple Isoformen vorkommen, sind mit einem Sternchen versehen. Die P450 Hydroxylasen C4H und F3'H sind integrierte Membranproteine.

### A.1.5 Intrazellulärer Transport von Flavan 3-olen

Flavonoide können in unterschiedlichen Zellbereichen gebildet und gelagert werden. In der Vakuole werden Anthocyane, glykosylierte Flavonole und Proanthocyanidine gelagert. In der Zellwand polymere Phlobaphene und methylierte Flavonole (LEPINIEC et al., 2006). In *Arabidopsis* vermutet man drei Gene, die am Transport von Flavan 3-olen in die Vakuole beteiligt sind. Das *TT12* Gen codiert einen Transporter, der eine hohe Homologie mit putativen „Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Sekundärstoffwechseltransportern“ aufweist. *AHA10* codiert eine  $H^+$ -ATPase, die ebenfalls an dem Proanthocyanidinstoffwechsel beteiligt ist. *TT19* codiert ein Glutathion S-Transferase (GST) ähnliches Protein. Die GST könnte am zytoplasmatischen Transport der Proanthocyanidine beteiligt sein, bevor diese dann durch ein Tonoplast-Protein in die Vakuole eingeschleust werden. GST Aktivität ist immer mit dem Transport durch MRPs (Transporter auf dem Tonoplasten) gekoppelt, was vermuten lässt, dass beide Transportmechanismen in *Arabidopsis* stattfinden. In Tomaten wurden ein ähnlicher MATE Transporter und GST Gene identifiziert. In Mais liegt ein System mit MRP und GST Genen vor (LEPINIEC et al., 2006; DIXON et al., 2005).

## A.2 Resistenzmechanismen der Pflanze

### A.2.1 Induzierte Resistenz durch biotische und abiotische Faktoren

Die Resistenz von Pflanzen bezeichnet die Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten und Schädlingen. Resistenzreaktionen von Pflanzen gegenüber Schadorganismen werden in verschiedene Typen eingeteilt. Bei Nichtwirtsresistenz sind alle Sorten und Genotypen einer Pflanzenart resistent gegenüber allen Rassen eines Pathogens. Dennoch kann es Pathogenen gelingen, die Nichtwirtsresistenz zu durchbrechen. Dabei wird zwischen einer kompatiblen und einer inkompatiblen Interaktion unterschieden. Bei der kompatiblen Interaktion werden anfällige Pflanzen von virulenten Pathogenen infiziert. Die Pflanze stellt einen Wirt für das Pathogen dar. Bei der inkompatiblen Interaktion können Kultivare einer Pflanzenspezies gegenüber bestimmten Rassen eines Pathogens resistent sein. Man spricht in diesem Fall von einer Wirtsresistenz. Dabei kann zwischen einer rassenspezifischen und einer rassenunspezifischen Resistenz unterschieden werden. Einzelne Wirtsgenotypen können gegenüber bestimmten Stämmen oder Rassen des Pathogens resistent sein. Rassenspezifische Resistenzen beruhen meist auf nur einem oder sehr wenigen Genen. Bei der rassenunspezifischen Resistenz wird zwar Befall zugelassen, aber das Infektionsgeschehen stark verlangsamt. Solche Resistenzreaktionen beruhen auf einer Vielzahl polygen gesteuerter Resistenzmechanismen, die weitgehend unabhängig von den Pathogenrassen ausgelöst werden (PRELL, 1996). Bei allen Resistenzmechanismen werden Abwehrreaktionen im Pflanzengewebe aktiviert. Dazu zählen die Hypersensitive Reaktion, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Verstärkung der Zellwand, Bildung von Benzoe- und Salicylsäure, Akkumulation von Pathogenabhängigen PR-Proteinen, Lipoxygenasen und Phytoalexinen, sowie die Genaktivierung von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels (HAMMOND-KOSACK UND JONES, 1996). Die Resistenzinduktion ist folglich ein Mechanismus bei dem endogene, genetisch festgelegte Abwehrmechanismen durch exogene Faktoren aktiviert werden. Die Pflanze startet ihre Pathogenabwehr noch vor der erfolgreichen Infektion. Exogene Stimulantien können sowohl abiotische, als auch biotische Stressoren sein, wie zum Beispiel UV-Licht, Ozon, Schwermetalle, Extremtemperaturen, Schadstoffe, mechanische Beschädigungen der Pflanzenorgane oder nichtpathogene Mikroorganismen (TREUTTER, 2000). Die Abwehrreaktion der Pflanze und somit induzierte Resistenz, wird in zwei Kategorien unterteilt (HAMMERSCHMIDT, 1999; PIETERSE UND VAN LOON, 1999). Die systemisch erworbene Resistenz (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) kann durch Chemikalien oder nekrotisierende Mikroorganismen ausgelöst werden. Die induzierte systemische Resistenz (ISR) wird durch die Kolonialisierung der Rhizosphäre mit sogenannten wachstumsfördernden Rhizobakterien oder arbuskulärer Mykorrhiza ausgelöst. Da die induzierte Resistenzreaktion die gesamte Pflanze schützt und somit systemisch wirkt, muss eine Signalübertragung stattfinden (NAKASHITA

et al., 2002; VERBENE, 2003). In den Modellorganismen *Arabidopsis*, Tabak oder Tomate finden bei einer SAR-Reaktion die Signalübertragung unter Beteiligung von Salicylsäure statt. Bei einer ISR-Reaktion dagegen vermutlich über Jasmonsäure oder Ethylen (CONRATH et al., 2002). Die in den letzten Jahren gewonnenen Informationen über Resistenzmechanismen der Pflanzen können in einem modernen, zukunftsorientierten Pflanzenschutzkonzept intensiv genutzt werden. Ziel ist die Stärkung der Widerstandskräfte der Kulturpflanze und ein ausgewogenes Zusammenspiel zwischen kurativem und präventivem Pflanzenschutz. Die induzierte Resistenz ist Teil eines Pflanzenschutzkonzeptes, das die pflanzeigenen Abwehrmechanismen anfälliger Pflanzen gegenüber bakteriellen, pilzlichen und viralen Pathogenen unspezifisch steuert (LUCAS, 1999). Parallel zu den Forschungsarbeiten wurden von der Industrie verschiedene Pflanzenstärkungsmittel auf den Markt gebracht. Dazu zählen Bion<sup>®</sup> der Firma Syngenta, sowie eine Reihe weiterer Produkte, deren Wirkung auf Inhaltsstoffe von Pflanzenextrakten (Milsana<sup>®</sup>), Pilzen oder Bakterien beruht.

### **A.2.2 Phenolische Inhaltsstoffe und Pathogenabwehr**

Flavonoide, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind, können in zwei Gruppen unterteilt werden: bereits in der Pflanze präformierte Verbindungen und induzierte Abwehrstoffe. Induzierte Substanzen sind die direkte Antwort der Pflanze auf Beschädigungen, Infektionen und Stress. Manche werden auch konstitutiv gebildet, aber verstärkt nach Stressreaktionen. Präformierte Flavonoide werden während der normalen Pflanzenentwicklung gebildet. Sie sind oft in strategisch wichtigen Geweben gelagert, wo sie als Signal- oder Abwehrstoff eingesetzt werden können (TREUTTER, 2005). TERRY et al. (2004) listen eine Reihe von konstitutiven oder induzierbaren Stoffen mit fungizider Wirkung in verschiedenen Erdbeergeweben auf. Darunter Proanthocyanidine und Catechine als konstitutive Stoffe in Früchten verschiedener Reifestadien, die der Botrytisabwehr dienen sollen. Catechin soll bei Erdbeerblättern den *Alternaria alternata*-Befall hemmen. Die Flavan 3-ole Catechin und Epicatechin können schon vor einer Infektion in hohen Konzentrationen in verschiedenen Pflanzengeweben vorkommen. Sie sind in der Lage eine Vielzahl von Enzymen zu binden und somit zu inaktivieren. Die Inhibition von Lipoxygenasen ist besonders interessant. In befallenen Geweben konnte die Lipidperoxidation begrenzt, und dadurch die Bildung freier Sauerstoffspezies reduziert werden. Proanthocyanidine reagieren ebenso mit Proteinen. Aufgrund ihrer Bindung und der dadurch entstandenen irreversiblen Inaktivierung von Pflanzenviren, können sie diese mechanisch an der Virusweiterleitung in proanthocyanidinhaltigen Geweben hindern. Dabei scheint der Polymerisationsgrad für die Fähigkeit zur Enzymhemmung entscheidend zu sein. Monomere zeigen nur schwache Effekte, während Tri- bis Pentamere den stärksten hemmenden Effekt auf

Pflanzenviren besitzen. Weiterhin können Proanthocyanidine Enzyme wie Cellulasen, Pektinmethylesterasen, Polygalakturonasen und Cellulasen von pflanzenpathogenen Pilzen hemmen. Neben dem enzymhemmenden Effekt scheinen sie auch direkten Einfluss auf Pathogene auszuüben. *Botrytis cinerea* dringt in die Erdbeerblüte ein und bildet sein Mycelium im Blütenboden aus, wo es bis zur Fruchtreife quieszent bleibt. Die latente Hemmung des Pilzwachstums korreliert mit dem Proanthocyanidingehalt. Extrazelluläre Hydrolasen sind für die Pathogenese von *Botrytis cinerea* notwendig. Ihre Bindung an Proanthocyanidine und somit ihre Inaktivierung würde die Quieszenz erklären (SCHLÖSSER, 1993). JERSCH et al. (1989) zeigten, dass Proanthocyanidine *in vitro* die von *Botrytis cinerea* gebildeten Polygalakturonasen hemmen. Er konnte eine negative Korrelation zwischen dem Proanthocyanidingehalt und dem Mycelwachstum von *Botrytis cinerea* in ‚Senga Sengana‘ Früchten in weißen Fruchtstadien feststellen. In reifen Früchten sind noch immer Proanthocyanidine enthalten, jedoch verlieren sie ihren inhibitorischen Effekt – vermutlich aufgrund höherer Polymerisation. Die pilzlichen Hydrolasen werden nicht länger inaktiviert und können sich nun ungehemmt im Pflanzengewebe ausbreiten.

Auch HÉBERT et al. (2002) zeigten, dass Erdbeersorten mit höheren Konzentrationen freier oder gebundener Catechine, Epicatechine und Gallussäuren resistenter gegen *Botrytis* waren. TREUTTER et al. (1991) wiesen bei der Erdbeersorte ‚Hummi grandiosa‘, die mit der Weißfleckenkrankheit (*Mycosphaerella fragariae*) infiziert war, knapp dreimal mehr Gesamt-Flavan 3-ol nach als die gesunde Kontrolle. Dabei ließ sich im kranken Gewebe und im Abgrenzungsgewebe eine höhere Anzahl an Flavanolen detektieren. Weiterhin hemmen Flavanole den Schorferreger *Venturia inaequalis*. MAYR et al. (1997) hemmten mit der Verbindung AOPP (L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid) die PAL Aktivität in Pflanzen der schorffresistenten Apfelsorte ‚Sir Prize‘, die daraufhin nach erfolgter Inokulation starke Schorfläsionen zeigte. Die Aufgabe von monomeren Flavonoiden, insbesondere Dihydroquercetin, bei der Abwehr von *Fusarium* in Gerste liegt in verschiedenen Mechanismen wie Crosslinking mikrobieller Enzyme, Hemmung von mikrobiellen Cellulasen, Xylanasen und Pektinasen und Chelatbildung von Metallen, die für die Enzymaktivität notwendig wären. Die Bildung harter, kristalliner Strukturen, die eine physikalische Barriere für Pathogene darstellen, zählt dabei als weitere Abwehrreaktion (SKADHAUGE et al., 1997). BECKMANN (2000) beschrieb die Rolle von Flavonoiden verschiedener Pflanzen bei der Bildung von Periderm im Zusammenhang mit der Resistenz gegen die Welkekrankheit. Flavonoide sind neben anderen Abwehrstoffen in spezialisierten Zellen gelagert, aus denen sie ins befallene Gewebe, wie das Xylem, transportiert werden können. Dieses Entsenden ist wahrscheinlich auch an der Hypersensitiven Abwehrreaktion beteiligt und am programmierten Zelltod.

## A.3 Wachstumsregulatoren und Pflanzenstärkungsmittel

### A.3.1 Prohexadion-Ca

Der in Deutschland unter der Handelsbezeichnung Regalis<sup>®</sup> vertriebene Wirkstoff Prohexadion-Calcium ist im Kernobstanbau und Zierpflanzenbau zugelassen (BBA). Die chemische Bezeichnung dieses Wirkstoffes ist Calcium-3,5-dioxo-4-propionyl-cyclohexan-carboxylat (RADEMACHER, 2005). Er wird den Acylcyclohexandionen zugeteilt. Prohexadion-Ca ist ein Strukturanalogon der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen im Biosyntheseweg der Gibberelline. Es wird damit in die Biosyntheseschritte von GA<sub>20</sub> zu GA<sub>1</sub> (3 $\beta$ -Hydroxylase) und von GA<sub>1</sub> zu GA<sub>8</sub> (2 $\beta$ -Hydroxylase) eingegriffen (GRIGGS et al., 1991; RADEMACHER, 2000). Somit wird die Bildung des aktiven GA<sub>1</sub> verhindert, was zu einer Wachstumshemmung führt (BROWN et al., 1998). Die Behandlung mit dem Wachstumshemmstoff zieht weit reichende Konsequenzen in der Kulturführung nach sich. So können durch den Einsatz von Regalis<sup>®</sup> im Obstbau Schnittmaßnahmen deutlich reduziert werden. Pflanzenschutzmitteleinsätze können vermindert werden, da ein offeneres Kronenbild entsteht. Durch ein schnelleres Abtrocknen des Bestandes können Pilzinfektionen reduziert werden. Erhöhter Lichteinfall ermöglicht eine bessere Fruchtqualität. Weiterhin führt Prohexadion-Ca zu einer Hemmung der Ethylenbiosynthese, was auf die Strukturähnlichkeit mit der Ascorbinsäure zurückzuführen ist (GROSSMANN et al., 1994). Durch die Hemmung der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen kommt es auch zu Blockierungen und Umsteuerungen im Flavonoidbiosyntheseweg. In neueren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Prohexadion-Ca-Behandlungen und reduziertem Befall durch Schadinsekten (PAULSON et al., 2005) und Pathogenen (BAZZI et al., 2003) festgestellt. Prohexadion-Ca verfügt jedoch über keine direkte fungizide, bakterizide oder insektizide Wirkung. Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass die resistenzfördernde Wirkung eine Folge des veränderten Flavonoidbiosynthesewegs ist (BUBÁN et al., 2003; RÖMMELT et al., 1999). Untersuchungen fokussieren in erster Linie die Bekämpfung von Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). Durch die Applikation von Prohexadion-Ca können Sekundärinfektionen nach der Blüte reduziert werden (RADEMACHER, 2003; RÖMMELT et al., 1999). Weiterhin wurden unterschiedliche Untersuchungen zur Resistenzförderung gegen Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) durchgeführt. Eine experimentelle Reduzierung des Befalls wurde an Apfelsämlingen erzielt. Temperatur und Aufwandmenge von Prohexadion-Ca hatten direkten Einfluss auf die Resistenzwirkung (BAZZI et al., 2003; COSTA et al., 2004). Erste Untersuchungen von behandelten Apfel- und Birnenblättern zeigten, dass Eriodictyol nicht mehr von der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase FHT in Dihydroquercetin umgewandelt werden kann (Abb. 5). Stattdessen wird es durch die DFR, die eine

zusätzliche FNR-Aktivität besitzt, zu dem instabilen und hochreaktiven Stoff Luteoforol (HALBWIRTH et al., 2002; FISCHER et al., 2003) und über eine Leukoanthocyanidin 4-Reduktase zu Luteoliflavan umgebaut (vgl. Abb. 5; PFEIFFER et al., 2006). GOSCH et al. (2003) bestätigten den Wirkmechanismus ebenfalls an weiteren Obstarten, wie Erdbeere, Weinrebe und Cranberry. RÖMMELT et al. (2003) konnten Luteoforol als antimikrobiellen Wirkstoff der Pathogenabwehr identifizieren. SPINELLI et al. (2005) bewiesen die hochaktive Wirkung von Luteoforol bei Kernobst gegen verschiedene Stämme von *Erwinia amylovora*, dem Feuerbranderreger bei Apfel, in Folge einer Prohexadion-Ca-Behandlung. Vermutlich wird Luteoforol während des Pathogenbefalls ausgeschüttet und hemmt die weitere Krankheitsentwicklung, indem es Pathogenzellen zerstört und eine hypersensitive Abwehrreaktion im befallenen Pflanzengewebe induziert.

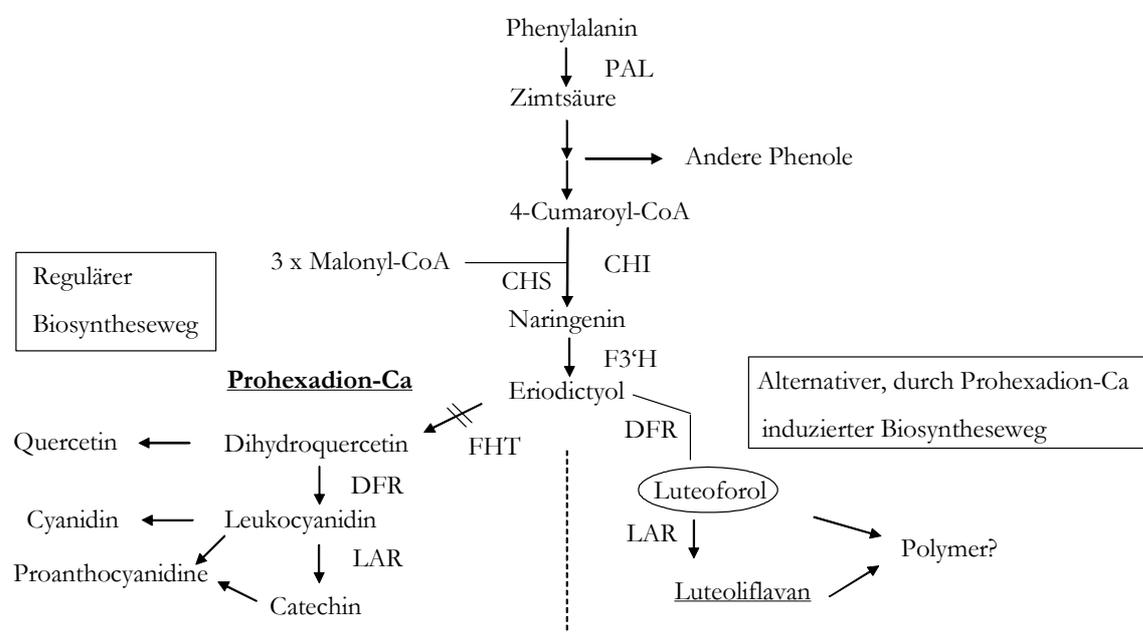


Abb. 5: Effekt von Prohexadion-Ca auf den Flavonoidmetabolismus in Apfelaub (nach HALBWIRTH et al., 2002)

### A.3.2 Milsana®

Milsana® wird aus dem Sacchalin-Staudenknöterich (*Reynoutria sacchalinensis*) hergestellt. Es ist ein registriertes Pflanzenstärkungsmittel der Firma Schaette, das zur Vorbeugung gegen Echten Mehltau und zur „Vitalitätssteigerung“ eingesetzt wird (Produktinfo BIOFA [www.biofa-farming.de](http://www.biofa-farming.de)). Die resistenzinduzierende Wirkung von Milsana® wurde besonders intensiv bei Cucurbitaceen untersucht. DAAYF et al. (1995 und 1996) demonstrierten, dass Milsana® die Produktion phenolischer Verbindungen in glykosylierter Form stimuliert. Die Akkumulation dieser Stoffe wurde mit

der Resistenz von Gurken gegen den Mehltauerreger *Sphaerotheca fuliginea* in Verbindung gebracht. Das bestätigt ihre Rolle als Phytoalexine, wenn sie in die aktive deglykolisierte Form überführt werden. FOFANA et al. (2002) zeigten, dass Milsana<sup>®</sup>-behandelte Gurkenpflanzen signifikant weniger durch den oben genannten Mehltauerreger infiziert wurden als unbehandelte Kontrollen. Die induzierte Resistenz korrelierte mit erhöhten mRNA-Werten und Enzymaktivitäten der Chalkonsynthase (CHS) und Chalkonisomerase (CHI) sowie der Akkumulation verschiedener Flavonoidverbindungen in behandelten Pflanzen. ISEBAERT et al. (2002) erzielten eine starke Reduktion von Mehltau bei Tomaten, verursacht durch *Oidium lycopersicum*. Erste positive Ergebnisse mit Milsana<sup>®</sup> konnten auch bei der Bekämpfung von Rosenmehltau (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) erzielt werden (PASINI et al., 1997).

## A.4 Die Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)

### A.4.1 Botanik, Herkunft und wirtschaftliche Bedeutung der Erdbeere

Die Erdbeere zählt mit zu den wichtigsten Obstkulturen, deren Attraktivität am steigenden Pro-Kopf-Verbrauch und der zunehmenden Anbaufläche in den letzten Jahren ersichtlich wird. Nach Äpfeln sind Erdbeeren das Obst mit der zweitgrößten Anbaufläche in Deutschland im Jahr 2005. Mit 13.400 Hektar hat die im Ertrag stehende Erdbeerfläche seit 1995 um 83% zugenommen. Die Erntemenge der Erdbeeren stieg sowohl wegen der stark vergrößerten Anbauflächen, als auch auf Grund der deutlich verbesserten Ernteerträge auf nahezu 147.000 Tonnen pro Jahr. Damit wurde 2005 die bislang größte Erdbeerernte erzielt, mehr als doppelt so viel wie 1995 (<http://www.destatis.de>). In Deutschland beträgt der jährliche Verbrauch an Erdbeeren etwa 240.000 Tonnen, was einem Pro-Kopf-Verbrauch von 1,7 kg entspricht ([http://www.wzw.tum.de/ob/buga\\_sommer](http://www.wzw.tum.de/ob/buga_sommer)). Die Erdbeere (*Fragaria*) ist eine Gattung der Unterfamilie der Rosoideae innerhalb der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Entgegen ihres Namens zählt die Erdbeere, aus botanischer Sicht, nicht zu den Beeren, sondern zu den Sammelnussfrüchten. Was allgemein als Erdbeerfrucht bezeichnet wird, ist ein angeschwollener Blütenboden. Die eigentlichen Erdbeerfrüchte sind die Achänen, die in die äußere Schicht des Blütenbodens eingebettet sind. Um 1750 entstand die sogenannte Kulturerdbeere (*Fragaria x ananassa*) durch Kreuzungen der kleinfruchtigen Scharlacherdbeere aus Amerika (*Fragaria virginia*) mit der großfruchtigen Chileerdbeere (*Fragaria chiloensis*). Sie ist genau wie ihre Stammarten oktaploid ( $2n=56$ ). Im Erwerbsanbau werden einmaltragende, kurztagabhängige Sorten mit verschiedenen gestaffelten Reifezeiten angebaut, um

möglichst lange den Frischmarkt beliefern zu können. Außerdem gibt es mehrmal tragende, sogenannte remontierende Erdbeersorten.

#### **A.4.2 Erdbeerzüchtung**

Die Züchtung zur Verbesserung von Erdbeersorten ist schwierig. Viele Merkmale, wie Ertrag, Fruchtqualität, Pflanzengesundheit, insbesondere hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber pilzlichen Schaderregern, leichte Pflückbarkeit, Eignung für die Konservierung und vor allem der Geschmack, müssen in die Selektion einer erfolgreichen Erdbeersorte mit in Betracht gezogen werden. Als Züchtungsmethodik wird auch heute noch die Kombinationskreuzung eingesetzt. Es soll eine hohe Variabilität geschaffen werden, um aus dieser Vielfalt geeignete Individuen zu selektieren, vegetativ weiter zu vermehren und auf festgelegte Sortenmerkmale hin zu prüfen. Dabei ist die genetische Variation des *Fragaria × ananassa* Genpools sehr begrenzt. Eine weitere Erschwernis stellt die Oktoploidie der Hybridspezies dar. Pilzliche Pathogene verursachen die größten Schäden in der Erdbeerkultur. Aufgrund verstärkter Restriktionen bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln hat die Resistenzzüchtung höchsten Stellenwert. Widerstandsfähigkeiten, die die momentan aktuellen Sorten nicht oder nur vermindert besitzen, können zum Beispiel durch Einkreuzung von Arten oder alten Sorten erreicht werden. Vor allem Resistenzen gegen die Bodenpilze Rote Wurzelfäule (*Phytophthora fragariae*), Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*) und Verticillium-Welke (*Verticillium dahliae* bzw. *albo-atrum*), gegen pilzliche Blattkrankheiten wie Mehltau (*Sphaerotheca macularis*), Weiss- und Rottfleckenkrankheit (*Mycosphaerella fragariae* und *Diplocarpon earliana*) und dem Grauschimmel (*Botrytis cinerea*), die im Erwerbsanbau große Schäden verursachen, stehen im Vordergrund der Züchtungsarbeit. Da bei der Kreuzung mit Arten oft wichtige Sorteneigenschaften (Fruchtgröße, Ertrag, Festigkeit der Früchte etc.) in der Nachkommenschaft verloren gehen, sind langwierige Rückkreuzungen notwendig, um gewünschte Sortenmerkmale wieder zu erlangen. Die Entstehung einer neuen Erdbeersorte dauert deshalb mindestens zehn Jahre. Das Selektionsprogramm gliedert sich in folgende Bereiche: Resistenztests unter kontrollierten Bedingungen, Tests zur Krankheitsanfälligkeit unter Freilandbedingungen, Beurteilung der Qualität und des Ertrages. Selektierte Zuchtklone für den Erwerbsanbau müssen bezüglich ihrer Fruchtqualität folgende Kriterien erfüllen: attraktive, gleichmäßige Fruchtform, Fruchtgröße wie "Elsanta" und größer, Fruchtfarbe mittleres bis helles Rot, Festigkeit wie "Elsanta", gute Lagerfähigkeit, guter Geschmack (Zuckergehalt in BRIX > 9,0; pH-Wert 3,2 bis 3,6), Nüsschen tiefsitzend und Klone mit sehr früher beziehungsweise sehr später Reifezeit (<http://www.bafz.de>). Das Einbeziehen moderner molekularbiologischer Verfahren in die Erdbeerzüchtung erfolgt nur zögerlich. Erst kürzlich wurden die

ersten Ergebnisse zur Erstellung einer Genkartei von Erdbeeren veröffentlicht (HAYMES et al., 2000; LERCETEAU-KOHLER et al., 2003). Zudem werden verlässliche Methoden zum Screenen von Bibliotheken von Krankheitsresistenzgenen erarbeitet. Theoretisch können bestehende Erdbeersorten durch genetische Modifikation, zum Beispiel durch das Einbringen von Resistenzgenen, schneller verbessert werden. Jedoch ist die Verfügbarkeit von entsprechenden Genen und regulatorischen Sequenzen zur Verbesserung im Moment sehr begrenzt und das Erarbeiten dieser Informationen ist zeit- und kostenintensiv. Für viele Pflanzenarten, auch die Erdbeere, wurden Transformationsprotokolle entwickelt, die die Einführung neuer Gensequenzen in das Pflanzen-genom ermöglichen. PUNJA (2001) gibt einen Überblick über bereits etablierte gentechnische Modifikationen an verschiedenen Pflanzenarten, auch an Pflanzen mit verbesserter Krankheitsresistenz, die durch Einführung entsprechender Fremdgene erreicht wurden. Möglicherweise könnten neue Strategien, die die Einführung von Resistenzgenen und die Nutzung spezifischer Promotoren einbeziehen, in eine brauchbare Krankheitsresistenzstrategie für die kommerzielle Nutzung münden. Solange jedoch die öffentliche Haltung in Europa gegenüber genetisch veränderten Pflanzen skeptisch ist, wird die Einführung gentechnisch veränderter Erdbeeren erschwert sein.

## A.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Erdbeere zählt zu den wichtigsten Obstkulturen in Deutschland. Allerdings sind viele Standardsorten stark anfällig für Pilzkrankheiten. Da klassische Züchtungsmethoden sehr zeitintensiv sind, besteht Interesse, molekularbiologische Ansätze wie den Einsatz von Markertechnik in Züchtungsprogramme zu übernehmen. Gentechnische Modifikationen der Flavonoidbiosynthese bieten die Möglichkeit der gezielten Veränderung des Inhaltsstoffspektrums. Sie setzen detaillierte biochemische und molekularbiologische Kenntnisse des zu verändernden Flavonoidmusters voraus.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Erweiterung der bisherigen Kenntnisse über die Flavonoidbiosynthese in Erdbeere (*Fragaria × ananassa*). Im Vordergrund stehen dabei Enzyme (FLS, LAR und ANR), die entscheidend an Mechanismen zur Bildung von Verbindungen (Flavonole, Flavan 3-ole, Proanthocyanidine) beteiligt sind, die der Abwehr von abiotischen und biotischen Stressoren dienen und die gesundheitlich wichtige Inhaltsstoffe in der Erdbeere darstellen. Von ihnen sollten vollständige cDNA-Klone erstellt und heterolog in Hefe exprimiert werden. Die rekombinanten Proteine sollten auf ihre Aktivität und Substratspezifität hin getestet werden.

Der zeitliche Verlauf der Flavan 3-ol Biosynthese sollte verfolgt und dabei der Einfluss des Wachstumsregulators Prohexadion-Ca und des Pflanzenstärkungsmittels Milsana<sup>®</sup> untersucht werden. Dies wurde im Fall der ANR über Northern Blot Analysen erreicht, im Fall der LAR über die

Untersuchung der Enzymaktivitäten. Prohexadion-Ca führt in anderen Kulturpflanzen (wie z.B. *Malus*) zu Änderungen der Flavonoidbiosynthese und zur Erhöhung des Abwehrpotenzials gegen verschiedene Pathogene (siehe Kapitel A.3.1). Milsana<sup>®</sup> stimuliert die Synthese phenolischer Stoffe, die bei induzierten Resistenzmechanismen beteiligt sind (Kapitel A.3.2).

Weiterhin stand die Lokalisierung der Flavan 3-ole im Erdbeerfruchtgewebe über den gesamten zeitlichen Verlauf der Fruchtreife im Blickpunkt. Dazu wurden Färbereaktionen mit dem selektiv Flavan 3-ol färbenden p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse können für molekularbiologische Verfahren zur Optimierung der Flavonol- und Flavan 3-ol-Gehalte und zur Züchtung von Erdbeersorten mit gesteigerten Gehalten an wertgebenden gesundheitsfördernden, ernährungsphysiologisch wichtigen, Inhaltsstoffen genutzt werden.

## B Material und Methoden

### B.1 Material

#### B.1.1 Erdbeer-Pflanzenmaterial

Für die Etablierung und Durchführung der Klonierungen wurden Blüten- und Fruchtproben der Sorte ‚Korona‘ verwendet, da diese eine Hauptsorte im Erwerbsanbau darstellt und anfällig für *Botrytis cinerea* ist. Auf einer Selbstpflückanlage wurde das Material gesammelt, als Mischproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Abbildung 6 zeigt die verschiedenen Blüten- und Fruchtstadien nach der BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien (G.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Stadien der weiterentwickelten Blütenböden inklusive der Achänen als Frucht bezeichnet.

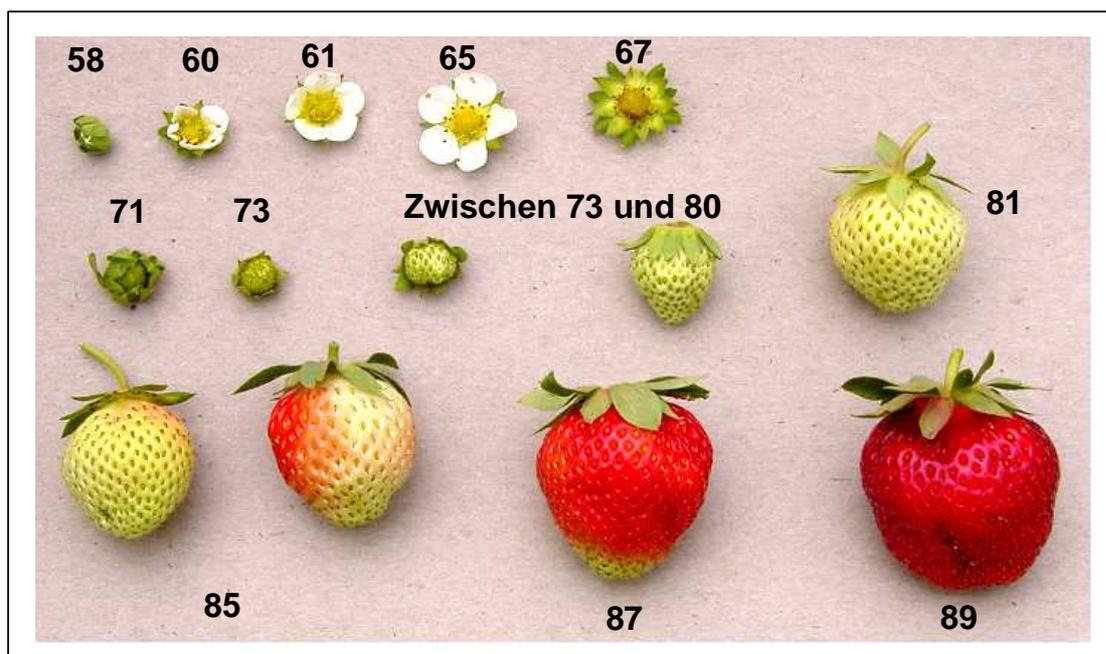


Abb. 6: Blüten- und Fruchtstadien nach der BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien

##### B.1.1.1 Erdbeerversuch 2004

Zwischen Mai und August 2004 wurde der erste Erdbeerversuch durchgeführt. In der Versuchsanlage sollte dabei Grauschimmel - Befall vermieden werden. Deshalb wurden wöchentlich Pflanzenschutzmaßnahmen (Rovral 1,0 ‰, Euparen 2,5 ‰) vorgenommen. Um Infektionsbedingungen zu vermeiden, wurde eine Tropfbewässerung installiert. Für den Versuch wurden insgesamt 114

Pflanzen der stark für *Botrytis* anfälligen Sorte ‚Elsanta‘ im 13er Topf kultiviert. Es wurden drei Versuchsvarianten gewählt: Kontrolle (Wasserbehandlung, 57 Pflanzen), Prohexadion-Ca-Behandlung (200 ppm, 32 Pflanzen) und zusätzlich eine Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca (200 ppm) und Milsana<sup>®</sup> (1,8 %, 25 Pflanzen). Im Vorfeld des Versuches wurden verschiedene phänologische Blüten- bzw. Fruchtentwicklungsstadien nach der BBCH-Codierung festgelegt, bei deren Erreichen der Mehrzahl der Blüten beziehungsweise der Früchte die Behandlungen durchgeführt wurden. Dies war im Einzelnen im Makrostadium 6 „Blüte“ (BBCH 65), im Makrostadium 7 „Fruchtentwicklung“ (BBCH 71 und 73) und im Makrostadium 8 „Fruchtreife“ (BBCH 81, 85 und 87). Es wurden zwei Prohexadion-Ca-Behandlungen, mit je einem Tag Wartezeit zwischen den Applikationen, ausgeführt. Zwei bis drei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Probenahme. Genauso wurde bei der Kontrollvariante mit der Wasserbehandlung verfahren. Bei der Kombinationsbehandlung wurde am Tag nach der zweiten Prohexadion-Ca-Behandlung Milsana<sup>®</sup> appliziert. Die Probenahme erfolgte auch in diesem Fall zwei Tage nach der letzten Behandlung. Bei den verschiedenen Probenahmeterminen wurden die einzelnen Blüten und Früchte den jeweiligen Entwicklungsstadien zugeordnet und gleiche Stadien als Mischprobe analysiert. Das geerntete Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **B.1.1.2 Erdbeerversuch 2005**

Aus den Inhaltsstoffanalysen der Erdbeerproben des Versuches 2004 durch PUHL (persönliche Mitteilung, 2006) war erkennbar, dass die Flavonoidbiosynthese insgesamt erst nach dem Ballonstadium (BBCH 58) einsetzt. So konnten in Einzelproben des Ballonstadiums (BBCH 58) keinerlei Flavonoidverbindungen nachgewiesen werden. Deshalb wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem Blüten der Sorte ‚Elsanta‘ zu unterschiedlichen Zeitpunkten (BBCH 59 und 61) mit Prohexadion-Ca behandelt wurden.

Jeweils 20 Blüten wurden im Ballonstadium (BBCH 59) bzw. bei vollständig geöffneten Blüten (BBCH 61) zweimal mit Prohexadion-Ca (200 ppm) in einem Abstand von zwei Tagen behandelt. Die Probenahme erfolgte, als die Blüten voll geöffnet waren bzw. sich in der Abblüte befanden (BBCH 65). Eine Kontrollvariante wurde genauso mit Wasser behandelt. Die Blüten der verschiedenen Varianten wurden als Mischproben gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## B.1.2 Pflanzenstärkungsmittel und Wachstumsregulatoren

### B.1.2.1 Prohexadion-Ca

Prohexadion-Ca wurde von der Firma BASF bezogen. In allen Versuchen wurde eine Konzentration von 200 ppm (0,2 g/l) verwendet. Die Spritzlösung wurde mit einer handelsüblichen Handspritze appliziert.

### B.1.2.2 Milsana<sup>®</sup>

Milsana<sup>®</sup> wurde von der Firma Schaette direkt bezogen und als 1,8 prozentige Spritzlösung (180 ml/l) eingesetzt.

## B.1.3 Geräte

Bio Imaging Analyzer BAS 1000	Fuji Photo (Tokyo, J)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, D)
Brutschrank 3033	GFL mbH (Burgwedel, D)
Brutschrank BE500	Memmert (Schwabach, D)
Brutschrank IncuShake INCUCELL 111	MMM Medcenter (Hanau, D)
Elektrophorese-System Mini-Sub Cell GT	BIORAD (Hercules, CA)
Elektrophorese Spannungsquelle EPS 3500	Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
PCR Express	Hybaid (Ashford, UK)
PhosphoImager Storm II	Molecular Dynamics (USA)
Reinstwassersystem HP 6UV / UF	UF TKA-GmbH (Niederelbert, D)
Thermoblock QBT2	Grant Instr. Ltd. (Cambridgeshire, UK)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
UV Transilluminator IL-350-K (254 nm)	Bachofer (Reutlingen, D)
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, D)
Werkbank Laminair Typ LB8C	Heraeus Instruments (Newtown, USA)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments (Newtown, USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)
Zentrifuge Sigma 3K30C	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Zentrifuge Speedvac Vacuum Concentrator	Bachofer (Reutlingen, D)

### B.1.4 Firmen

Die für die Arbeit benötigten Chemikalien, Enzyme, Kits u.a. wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences (USA)	<a href="http://www1.amershambiosciences.com">http://www1.amershambiosciences.com</a>
Biorad (USA)	<a href="http://www.bio-rad.com">http://www.bio-rad.com</a>
Duchefa (NL)	<a href="http://www.duchefa.com">http://www.duchefa.com</a>
Eppendorf (Köln, D)	<a href="http://www.eppendorf.com">http://www.eppendorf.com</a>
Fluka (Neu-Ulm, D)	<a href="http://www.fluka.de">http://www.fluka.de</a>
FMC Bioproducts (USA)	<a href="http://www.bioproducts.com">http://www.bioproducts.com</a>
Invitrogen (UK)	<a href="http://www.invitrogen.com">http://www.invitrogen.com</a>
Roth (Karlsruhe, D)	<a href="http://www.carl.roth.de">http://www.carl.roth.de</a>
MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Lit)	<a href="http://www.fermentas.com">http://www.fermentas.com</a>
Merck (Darmstadt, D)	<a href="http://www.merck.de">http://www.merck.de</a>
Peqlab (Erlangen, D)	<a href="http://www.peqlab.de">http://www.peqlab.de</a>
Promega (Mannheim, D)	<a href="http://www.promega.de">http://www.promega.de</a>
Roche (CH)	<a href="http://www.roche.com">http://www.roche.com</a>
Qiagen (Hilden, D)	<a href="http://www.qiagen.com">http://www.qiagen.com</a>
Sigma-Aldrich (Deisendorf, D)	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
T.J. Baker (Deveneter, USA)	
Zefa Laborservice (München, D)	<a href="http://www.zefa-laborservice.de">http://www.zefa-laborservice.de</a>

### B.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2-Butoxyethanol	Sigma Aldrich
2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfon-säure (HEPES)	Roth
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D galacto-pyranosid (X-Gal)	Sigma Aldrich
Agarose	FMC Bioproducts
Ampicillin	Sigma Aldrich
Tetrabromophenolsulfonphthalein Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Chloroform	Fluka
D-Galaktose	Roth

---

D-Glukose	Duchefa
p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas
Ethanol	T.J. Baker
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)	Merck
Ethylacetat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Eisessig	Merck
Formaldehyd	Sigma Aldrich
Glasperlen (425-600 µm)	Sigma Aldrich
Glycerin	Sigma Aldrich
HCl	Roth
Hefeextrakt	Fluka
Isoamylalkohol	Sigma Aldrich
Isopropanol	Fluka
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Kanamycin	Duchefa
Lithiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
MOPS	Sigma Aldrich
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumascorbat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumhydroxid	Fluka
Pepton	Fluka
Phenol Sigma P-4682 gesättigt mit 0,1 M Citratpuffer, pH 4,3	Sigma Aldrich

---

Polyethylenglykol PEG 4000	Fluka
PVPP	Sigma Aldrich
PVP 10	Sigma Aldrich
PVP 40	Sigma Aldrich
PVP 90	Fluka
Rinderserum Albumin Fraktion V	Fluka
Saccharose	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka
Seesand, gegläht	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Fluka
Tryptophan	Fluka
Urea	Fluka

### B.1.6 Reaktionssysteme und Kits

Concert™ Plant RNA Reagent	Invitrogen (UK)
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche (CH)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep - Kit	Peqlab (Erlangen, D)
Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System	Amersham Biosciences (USA)
High Pure PCR Purification - Kit	Qiagen (Hilden, D)
μMACS mRNA Isolation - Kit	Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch Gladbach, D)
NucleoSpin® PCR clean up Gel extraction - Kit	Macherey-Nagel (Düren, D)
TOPO TA Cloning - Kit	Invitrogen (UK)
pYes2.1 TOPO TA Cloning - Kit	Invitrogen (UK)
S.c. EasyComp™ Transformation - Kit	Invitrogen (UK)

### B.1.7 Enzyme und Proteine

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNAse A	Promega
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase	Promega
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas

### B.1.8 Puffer und sonstige Lösungen

Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 69,9 % Wasser
50bp DNA marker	10 % DNA Ladder (GeneRuler 50bp DNA Ladder, MBI Fermentas), 20 % Blaumarker, 70 % Wasser
Lambda marker	10 % DNA Ladder (Lambda DNA/Eco47I, MBI Fermentas), 20 % Blaumarker, 70 % Wasser
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml
Kanamycin Stammlösung	50 mg/ml
TAE-Puffer (1 %)	40 mM Tris, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	
TBE-Puffer (1 %)	1 M Tris, 0,83 M Borsäure, 10 mM EDTA
Tris-Borsäure-EDTA-Puffer	
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10 mM Tris, 1 mM EDTA
Tris-HCl (pH 7,5)	121,1 g/l Tris-base, 70 ml/l HCl
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal Lösung)	40 mg/ml N,N-Dimethylformamid
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	23,8 mg/ml deionisiertes Wasser
TEK	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 100 mM KCl
TES-B*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol 2 mM DTT
TEG*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 20% Glycerin

Hybridisierungspuffer für Northern Blot Analyse	Hybridisierungspuffer aus AlkPhos Direct Labelling and Detection System der Firma Amersham Biosciences (USA) 0,5 M NaCl, 4 % (w/v) Blocking reagent aus AlkPhos Direct Labelling and Detection System der Firma Amersham Biosciences (USA)
Primary Wash Puffer für Northern Blot Analyse	2 M Harnstoff, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 % (w/v) Blocking reagent aus AlkPhos Direct Labelling and Detection System der Firma Amersham Biosciences (USA)
Secondary Wash Puffer für Northern Blot Analyse	1 M Tris, 2 M NaCl
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat, pH 7,0
5 x MOPS Puffer	0,1 M MOPS pH 7,0, 40 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA pH 7,0
DMAZA-Lösung	6 N HCl und EtOH im Verhältnis 1:1 mit 0,1 % DMAZA
Natriumborhydrid	100 mg NaBH <sub>4</sub> in 1 ml H <sub>2</sub> O, 9 ml Isopropanol

### B.1.9 Bakterien- und Hefemedien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei 121°C und 2 bar Druck autoklaviert. Für Festmedien erfolgte eine Zugabe von 15 g Agar pro Liter. Antibiotika wurde bedarfsgerecht nach dem Abkühlen der Medien zugegeben.

#### Medien für *E. coli*

LB- Medium (pH 7)	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l Natriumchlorid Zur Selektion: 1 µl/ml Ampicillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) Zum Blau-Weiß-Screening: 1 µl/ml X-Gal Zur Induktion des lac-Promoters: 1 µl/ml IPTG
SOC	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Kaliumchlorid, 1 g/l Magnesiumchlorid, 3,5 g/l Glukose

**Medien für *S. cerevisiae***

SGI	1 g/l Pepton, 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base, 0,02 g/l Tryptophan, 20 g/l Glukose
YPGA	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, 0,2 g/l Adenin
YPGE	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 5 g/l Glukose, 3 % Ethanol
YPD	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Glukose

**B.1.10 Bakterien- und Hefestämme*****Escherichia coli***

Für die Transformationen wurden die *E. coli* Stämme TOP10 und TOP10F<sup>3</sup> der Firma Invitrogen verwendet. Diese Stämme werden in Kombination mit dem Vektorsystem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> oder pYES2.1 TOPO<sup>®</sup> geliefert. Beide Stämme besitzen keine Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin. Eine Deletion im  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) ermöglicht eine Selektion durch  $\alpha$ -Komplementation (Blau-Weiß-Screening). Bei dem TOP10F<sup>3</sup>-Stamm ist weiterhin der Lac Repressor überexprimiert, so dass die Zugabe von IPTG zur Selektion erforderlich ist.

***Saccharomyces cerevisiae***

Zur heterologen Expression von Genen wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 der Firma Invitrogen verwendet. Er wird in Kombination mit dem Vektorsystem pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> geliefert. Der Stamm besitzt eine endogene Cytochrom P450-Reduktase-Aktivität. Zur Selektion kann seine Auxotrophie für die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan sowie die Base Uracil genutzt werden.

### B.1.11 Vektoren

Tab. 1: PCR-Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> und Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>

Plasmid	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>
Hersteller	Invitrogen	Invitrogen
Größe	3900 bp	5900 bp
Promotor	Plac	PGal1
Replikationsursprung	f1	f1, 2μ
Art	high copy	high copy
Selektionsmarker	Ampicillin, Kanamycin	Ampicillin
Transformation	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Klonierungstechnik	Topoisomerase / TA cloning	Topoisomerase / TA cloning
Angestrebter Verwendungszweck der PCR Produkte	Klonierung, Sequenzierung	Expressionsstudien

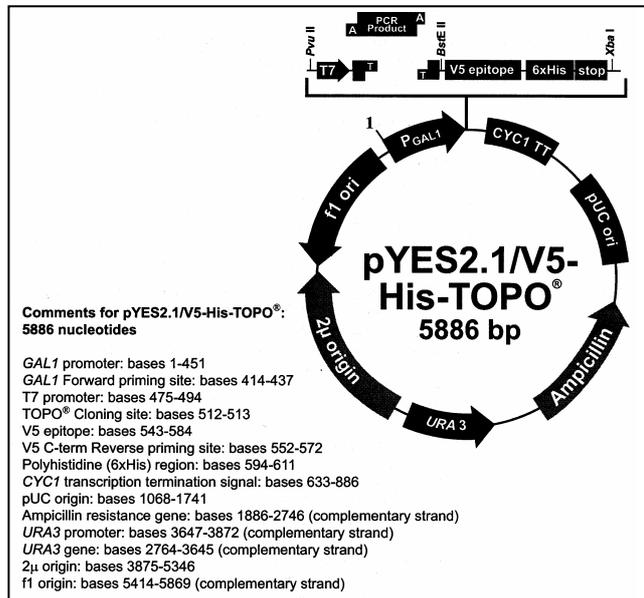
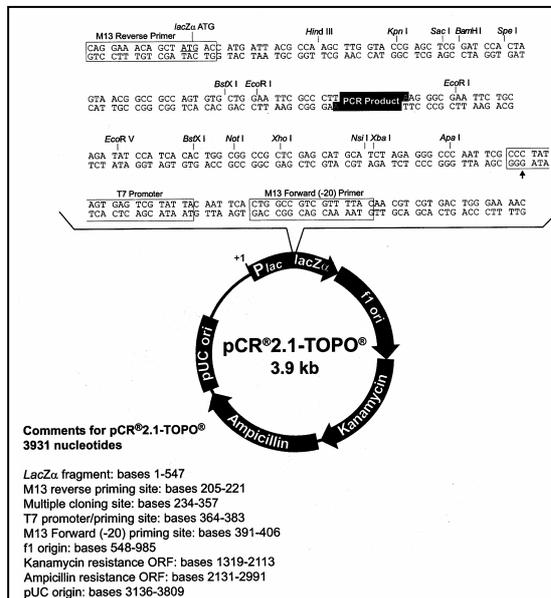


Abb. 7: PCR-Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> und Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>  
Abbildung aus <http://www.invitrogen.com>

### B.1.12 Substrate, Cosubstrate und Radiochemikalien

4-Cumaroyl-CoA	W. Heller, GSF (Neuherberg, D)
Kaffeoyl-CoA	W. Heller, GSF (Neuherberg, D)
[ <sup>14</sup> C]- Dihydrokämpferol	Eigensynthese am Lehrstuhl (Freising, D)
[ <sup>14</sup> C]- Dihydroquercetin	Eigensynthese am Lehrstuhl (Freising, D)
[ <sup>14</sup> C]-Eriodictyol	Eigensynthese am Lehrstuhl (Freising, D)
[ <sup>14</sup> C]-2-Malonyl-CoA	American Radiolabeled (Bowling Green, USA)
[ <sup>14</sup> C]- Naringenin	Eigensynthese am Lehrstuhl (Freising, D)
2-Oxoglutarat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Eisensulfat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
β-NADPH-Na <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

## B.2 Methoden

### B.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### B.2.1.1 Präparation von Gesamt-RNA und mRNA

##### B.2.1.1.1 Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)

Für Klonierungen von Erdbeer cDNAs wurde das Concert™ Plant RNA Reagent der Firma Invitrogen verwendet. Damit konnte Gesamt-RNA in ausreichender Menge und Qualität isoliert werden.

##### B.2.1.1.2 Extraktion von Gesamt-RNA nach Manning (1991)

Die mit dem Concert™ Plant RNA Reagent erzielte Gesamt-RNA konnte für Northern Blot Analysen nicht verwendet werden, da sie noch zu viele Polyphenole und Zucker enthielt, die die Northern Blot Hybridisierung oder Detektion störten. Deshalb wurde für diesen Zweck Gesamt-RNA nach einem modifizierten Protokoll von MANNING (1991) isoliert.

Dazu wurden 500 mg gemörseretes Pflanzenmaterial mit 2,5 ml des Extraktionspuffers des Protokolls in einem Zentrifugationsröhrchen homogenisiert und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden 2,5 ml Phenol-Chloroform zugegeben und das Gemisch geschüttelt. Es folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 20°C und 4000 x g. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und diese nochmal wie vorher mit 2,5 ml Phenol-Chloroform extrahiert. Die

abgenommene Oberphase wurde dann mit 3 Volumen 100 mM Natriumacetat pH 4,5 versetzt. Zum Fällen der Polysaccharide wurden 0,4 Volumen 2-Butoxyethanol zugegeben. Es wurde eine 30-minütige Inkubation auf Eis angeschlossen, gefolgt von einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 0°C und 4000 x g. Die Oberphase wurde abgenommen, ohne das gelartige Polysaccharid-Pellet zu verletzen. Um die Nukleinsäuren auszufällen, wurde noch einmal 1 Volumen 2-Butoxyethanol zugegeben und das Gemisch 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach zehn Minuten bei 0°C und 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Nukleinsäure-Pellet drei Waschschritten unterzogen. Beim ersten Waschschrift wurde ein Puffer aus 0,2 M Tris, 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA (pH 7,6) und einem gleichen Volumenanteil 2-Butoxyethanol verwendet. Zum Pellet wurden 5 ml dieses Puffergemisches zugegeben und es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 0°C und 4000 x g. Der Überstand wurde abgenommen. Der zweite Waschschrift wurde mit 5 ml Puffer aus 70 % Ethanol und 0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) genauso durchgeführt. Der dritte Waschschrift erfolgte mit 5 ml 80 prozentigem Ethanol. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend mit 500 µl Reinstwasser gelöst. Ab diesem Schritt wurden als Reaktionsgefäße 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verwendet. Zur Trennung der RNA von DNA erfolgte eine Lithiumchloridfällung. Dazu wurde 1/3 Volumen 12 M Lithiumchlorid zugegeben, das Gemisch anschließend eine Stunde auf Eis inkubiert und zehn Minuten bei 4°C und 11600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 3 M Lithiumchlorid gewaschen. Dazu wurde jeweils fünf Minuten bei 4°C und 11600 x g zentrifugiert. Ein dritter Waschschrift wurde mit einem Puffer aus 70 % Ethanol und 0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) durchgeführt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit reinem Ethanol. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in 50 µl Reinstwasser rückgelöst. Es folgte sowohl eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung als auch eine elektrophoretische Überprüfung.

### **B.2.1.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren**

PCR Produkte und Plasmide wurden mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen gereinigt und bei Bedarf konzentriert. Gesamt-RNA wurde bei Bedarf mit einer EtOH-Fällung nach dem Standardprotokoll (SAMBROOK et al., 1989) konzentriert.

### **B.2.1.3 Northern Blot Analyse**

#### **B.2.1.3.1 Vorbereitung und Blotten**

Bei Northern Blot-Analysen wurden 5 bis 10 µg mRNA eingesetzt und in einem einprozentigen, 6,6 Prozent Formaldehyd enthaltenden, Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen bei 40 V für 3 bis 6 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde RNA-Marker (MBI Fermentas) verwendet. Die RNA wurde im modifizierten Standard-Blottingverfahren in 20 x SSC (SAMBROOK et al., 1989) auf positiv geladene Nylonmembranen Hybond-N+ (Amersham Biosciences) transferiert und nach dem Trocknen der Membran durch Inkubation bei 80°C für 1 h fixiert. Marker- sowie 18S und 25S rRNA-Banden konnten, aufgrund des Ethidiumbromids, im Probenpuffer sowohl im Gel als auch auf der Membran im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### **B.2.1.3.2 Markierung der Hybridisierungssonde**

Vor dem Markieren der Hybridisierungssonden wurden diese 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend nach Herstellerangaben mit dem AlkPhos Direct Labelling and Detection System der Firma Amersham Biosciences markiert.

#### **B.2.1.3.3 Hybridisierung und Signalgenerierung**

Die Hybridisierung und Signalgenerierung wurde ebenfalls mit dem Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System der Firma Amersham Biosciences nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **B.2.1.3.4 Signaldetektion und Auswertung**

Die Detektion wurde mit dem PhosphoImager Storm II der Firma Molecular Dynamics und dem Programm Image Quant 5.0 ausgeführt. Die gescannten Northern Blots wurden anschließend mit dem Programm Quantity One der Firma Bio Rad quantitativ ausgewertet.

#### **B.2.1.4 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription wurde mit der M-MLV Reversen Transkriptase der Firma Promega durchgeführt. Als Primer dienten der Oligo(dT) Primer oder der Adapter Primer (AP). Ersterer verfügt neben dem dT17-Bereich noch über einen zusätzlichen Adapterbereich, der für anschließende PCR-Verfahren genutzt werden kann. Für die reverse Transkription und für das 3'-RACE-Verfahren wurde entweder der oligo(dT) oder der AP-Primer verwendet, beim 5'-RACE-Verfahren ein genspezifischer Primer. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 1 - 5 µg Gesamt-RNA bei einem 25 µl Gesamtansatz verwendet. Die RNA wurde vor der cDNA-Synthese 10 Minuten bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Die Synthese selbst wurde bei 42°C durchgeführt.

#### **B.2.1.5 Polymerase Chain Reaction – Methoden (PCR)**

##### **B.2.1.5.1 Synthetische Oligonukleotide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (<http://www.metabion.com>) oder MWG Biotech (<http://www.ecom.mwgdna.com>) bezogen. Sie sind im Anhang G.2 aufgelistet.

##### **B.2.1.5.2 Standard PCR**

Für die PCR-Reaktionen wurden die *Taq* Polymerase (MBI Fermentas) und die im Anhang aufgelisteten Primer verwendet. Alle Komponenten der PCR-Ansätze sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die PCRs wurden mit dem Gradiententhermozykler Hybaid Express (Hybaid) durchgeführt. Die PCR ist in drei Schritte unterteilt: Denaturierung (94°C, 1 Minute), Annealing (45 - 60°C, 0,5 - 1 Minute) und Extension (72°C, 1 - 2 Minuten). Diese drei Schritte werden 30 bis 35-mal wiederholt, mit einer anfänglichen einminütigen Denaturierung bei 94°C und einer abschließenden zehninütigen Extension bei 72°C. Optimierungen wurden bezüglich der Annealingtemperatur oder -dauer, der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und der Template-Menge vorgenommen. Für Proofreading PCRs wurde die High Fidelity Polymerase der Firma Roche verwendet. Dabei wurde das Standardprotokoll den Herstellerangaben angepasst.

**Tab. 2: Reaktionsansatz der Standard-PCR**

Konzentration	Substanz	Volumen
	Steriles Wasser	Ad 20 $\mu\text{l}$
10 x	Reaktionspuffer (ohne $\text{MgCl}_2$ )	2 $\mu\text{l}$
25 mM	$\text{MgCl}_2$	1,2 $\mu\text{l}$
10 mM	dNTP-Mix	0,4 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$	Primer	Je 0,4 $\mu\text{l}$
	Template cDNA	0,5 $\mu\text{l}$
1 U/ $\mu\text{l}$	<i>Taq</i> Polymerase	0,25 $\mu\text{l}$
	Gesamtvolumen	20 $\mu\text{l}$

### B.2.1.5.3 Colony-PCR

Mit der Colony-PCR erfolgte eine schnelle Identifikation von Bakterienklonen, die ein Plasmid mit gewünschtem Insert enthielten. Der Reaktionsansatz entsprach dem der Standard-PCR. Anstelle der cDNA wurden Bakterienzellen der Klonen mit einem sterilen Zahnstocher in den Reaktionsansatz überführt. Die Lyse der Bakterienzelle und somit die Freisetzung des Plasmids erfolgte bei einem anfänglichem dreiminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C. 25 Zyklen waren für die Colony-PCR ausreichend.

### B.2.1.5.4 RACE-PCR

*Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) ist ein Verfahren zur Amplifikation fehlender 3'- oder 5'-Enden aus cDNA-Fragmenten. Dabei handelt es sich um eine spezielle RT-PCR-Technik. Mithilfe von genspezifischen Primern, die anhand der bereits bekannten Sequenz konstruiert werden, können die fehlenden 5'- und 3'-Enden des Fragmentes durch PCR amplifiziert werden. Je nachdem, ob das 5'- oder das 3'-Ende gesucht wird, unterscheidet man zwischen dem 5'- und dem 3'-RACE.

#### 3'-RACE

Zur Generierung von 3'-Enden nutzt das 3' RACE während der PCR den poly(A)-Schwanz der mRNA als Primer-Bindungsstelle. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Gibco BRL 3'-RACE Protokoll. Bei diesem Verfahren wird ein oligo(dT) Adapter Primer (AP) für die Reverse

Transkription verwendet. Dieser Primer besitzt ein dT17-Ende, das sich an das Oligo(dA)-Ende anlagert und damit einen über- bzw. abstehenden 20 bp großen Adapteranteil. Spezifische cDNA wird mit einem genspezifischen Primer (GSP), der an eine bereits bekannte Region der Sequenz bindet, und einem an den poly(A)-Schwanz bindenden Adapterprimer amplifiziert. Falls notwendig wurde in einer zweiten Amplifikationsreaktion ein *nested* GSP verwendet, der etwas näher am 3'-Ende liegt, und mit einem AUAP oder UAP Primer kombiniert. Somit wurde dem 3' RACE die Spezifität eines zweiten Primers gegeben.

### **5'-RACE**

Für das 5'-RACE wurde das Protokoll 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Version 2.0) von Gibco BRL verwendet. Das 5'-RACE nutzte einen genspezifischen Primer für die Synthese spezifischer cDNA durch Reverse Transkriptase. Danach wurde die cDNA mithilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen) von restlichen dNTP's, Primern und Proteinen gereinigt. Ein homopolymeres A- oder C-*tail* wurde dann mit dem Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) am 3'-Ende der cDNA synthetisiert. In der Regel erzeugt dieses Enzym längere Oligo(dA)-, als Oligo(dC)-Enden (KATO et al., 1967), was sich bei der nachfolgenden PCR nachteilig auswirken kann. Daher sollte im Regelfall das C-*tailing* dem A-*tailing* vorgezogen werden. Die *tailing*-Reaktion fand in einem PCR-kompatiblen Puffer statt. So konnte eine sofortige PCR-Amplifikation mit einem weiteren, weiter *upstream* liegenden, genspezifischen, Primer und einem Anchor Primer (AP) bei A-*tailing* oder einem Abridged Anchor Primer (AAP) bei C-*tailing* anschließen. Das an das Oligo(dC)-Ende der cDNA bindende Ende dieses Primers besteht aus 16 Nukleotiden mit zehn Deoxyguanidinen und sechs Deoxyinosinen. Die Verwendung von Deoxyinosinen liegt darin begründet, dass ein ausschließlich aus Deoxyguanidinen bestehender Bindungsbereich gegenüber dem zweiten genspezifischen Primer (GSP 2) aus der ersten PCR, eine wesentlich höhere Schmelztemperatur besitzen würde. Daher könnte seine Verwendung vermehrt zu unspezifischen Amplifikationen führen. Außer der bindenden Region besitzt AAP den gleichen - 20 Basenpaar großen - Adapteranteil wie AP. Falls notwendig, wurde nach einem Aufreinigungsschritt mit einem PCR Purification Kit eine weitere *nested* PCR angeschlossen. Diese wurde mit einem dritten genspezifischen Primer und dem AUAP oder UAP Primer durchgeführt. Die Sequenz des AUAP oder UAP Primers entsprach dem Adapter von AAP oder AP. Die über 5' RACE generierten cDNA Sequenzen waren maximal 600 bp lang. Für die Amplifikation längerer Fragmente war ein schrittweises Vorgehen notwendig. Die RACE-PCRs entsprachen den Standard-PCRs, abgesehen von höheren Primerkonzentrationen (0,4 µM) und Zyklenzahlen (35 - 40).

### **RLM-RACE**

Das RLM-RACE wurde mit dem Gene Racer Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. RLM-RACE (*RNA Ligase-Mediated Rapid Amplification of 5' and 3' cDNA ends*) ist eine RACE-Technik, die sich grundlegend von den anderen RACE-Techniken unterscheidet. Notwendige Modifikationen werden bei der mRNA vorgenommen und nicht nach der cDNA-Synthese durch *tailing* oder Ligation eines Adapters. mRNA-Moleküle mit einem vollständigen und undegradierten 5'-Ende besitzen eine 7-Methylguanosingruppe. Diese ermöglicht, dass ausschließlich *full-length* mRNA, bzw. daraus synthetisierte cDNA, im weiteren Verlauf amplifiziert wird. Die 7-Methylguanosingruppe wurde im Verlauf der posttranskriptionalen Modifikation eukaryontischer mRNA (*Processing*) über eine Triphosphatbrücke an das 5'-Ende angehängt (*Capping*). Beim RLM-RACE wird die eingesetzte mRNA zunächst mit einer alkalischen Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt. Dieses Enzym entfernt frei zugängliche Phosphatgruppen am 5'-Ende von Nucleinsäuren. Da die 7-Methylguanosingruppe das 5'-Ende vor Dephosphorylierung schützt, werden nur 5'-Enden von bereits degradierter mRNA dephosphoryliert. Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion werden die CIP entfernt. Anschließend werden die 7-Methylguanosingruppen durch die Tabaksäure-Pyrophosphatase (Tobacco Acid Pyrophosphatase, TAP) entfernt. So blieben frei zugängliche Monophosphatgruppen an den 5'-Enden der mRNA zurück. An diese Phosphatgruppen wird, mithilfe der T4-RNA-Ligase, ein 44 Nucleotide langer RNA-Adapter ligiert. Da die T4-RNA-Ligase nur 5'-Enden mit einer Monophosphatgruppe mit der Hydroxylgruppe des RNA-Adapters verbinden kann, werden nur *full-length* mRNAs mit einem Adapter versehen. Nach der Ligation des Adapters erfolgt die cDNA-Synthese mit einem genspezifischen Primer (GSP 1). Anschließend wird die cDNA mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP 2) und einem 23 Nucleotide großen Primer, dessen Sequenz homolog zu der Sequenz der äußeren 23 Nucleotide des RNA-Adapters ist, durch PCR amplifiziert. Falls notwendig kann eine *nested* PCR durchgeführt werden.

#### **B.2.1.6 Präparation von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep - Kit der Firma Peqlab nach Herstellerangaben präpariert.

#### **B.2.1.7 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden von MWG Biotech (<http://www.ecom.mwgdna.com>) vorgenommen.

### **B.2.1.8 Klonierungen in Vektoren**

Ligationen mit dem Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1TOPO<sup>®</sup> und dem Hefetransformationsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (vgl. Kapitel B.1.11) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **B.2.1.9 Transformation von Mikroorganismen**

#### ***E. coli*-Transformation**

Die verwendeten kompetenten TOP10F und TOP10F<sup>2</sup>-Zellen der Firma Invitrogen wurden nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock transformiert.

#### ***S. cerevisiae*-Transformation**

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und deren Transformation wurde mit dem S.c. Easy Comp<sup>™</sup> Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **B.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **B.2.2.1 Heterologe Expression in Hefe**

Die Anzucht, Induktion und der Aufschluss der Hefezellen erfolgte nach einem Protokoll von POMPON et al. (1996). Dabei wurde je eine Kolonie einer transformierten Hefe in 25 ml SGI-Medium angezogen und nach 16 Stunden in 250 ml YPGE überimpft. Bei einer Dichte von OD<sub>600</sub> 0,8 bis 1,2 ( $8 \times 10^7$  Zellen/ml) erfolgte die Induktion durch die Zugabe von 27 ml 20 prozentiger Galaktose Lösung. Nach einer 12 bis 16 stündigen Inkubation wurden die Hefen geerntet. Die Hefezellen wurden 10 Minuten bei 5.000 x g zentrifugiert, nach kurzem Abtropfen in 27 ml TEK-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4.000 x g. Der Überstand wurde verworfen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde vollständig in 2,5 ml eiskaltem TES-B\* Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 7,5 g Glasperlen wurden die Hefezellen durch kräftiges Schütteln aufgeschlossen. Dies erfolgte in 20 Zyklen von 30 Sekunden Schütteln und 30 Sekunden Inkubation auf Eis. Eine Kontrolle des erfolgreichen Aufschlusses erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops. Nach dem kompletten Aufschluss wurden drei Waschschrte mit 5 ml TES-B\* durchgeführt und die jeweiligen Überstände in einem frischen Falcon vereinigt. Zum Entfernen letzter Zellbruchstücke und Glasperlen, wurde ein weiterer zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 16.000 x g durchgeführt. Der klare Überstand wurde in einen 25 ml Messzylinder umgefüllt und falls erforderlich mit 20 Prozent Glycerin versetzt. Die

Probe wurde anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **B.2.2.2 Enzymaufarbeitung**

Die Enzymextrakte für die Enzymtests wurden mit einer abgewandelten Aufarbeitungsmethode nach DELLUS et al. (1997) hergestellt.

Für den Extraktionspuffer wurde 0,1 M HEPES pH 7,5 bis zum Sieden erhitzt und danach unter Stickstoffdurchströmung abgekühlt. Unter ständigem Rühren wurden 1,5 % PEG 1500, 10 % Saccharose, 100 mM Na-Ascorbat und 25 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. 400 mg Pflanzenmaterial wurden mit 400 mg PVPP in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden 4 ml Extraktionspuffer zugegeben. Nach vollständigem Auftauen wurde das Homogenat für 20 Minuten bei 20.000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 400 mg Dowex 1x2 pH 7,5 versetzt und 15 Minuten auf Eis gerührt. Es folgte ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 15.000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand diente als Enzymquelle und wurde direkt für die Enzymtests verwendet oder als Aliquots bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **B.2.2.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach BRADFORD (1976) wurde mit Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA) als Eichsubstanz durchgeführt.

#### **B.2.2.4 Synthese von radioaktiv markierten Flavonoiden**

$[^{14}\text{C}]$ -markierte Flavonoide, die als Substrate für Enzymtests dienen, wurden nach Protokollen von BRITSCH und GRIESBACH (1985) und BRITSCH et al. (1992) synthetisiert. Rekombinante Proteine der Chalkonsynthase, Chalkonisomerase, Flavanon 3-Hydroxylase wurden aus entsprechenden Expressionsklonen hergestellt.

#### **Herstellung von $[^{14}\text{C}]$ -Naringenin und von $[^{14}\text{C}]$ -Eriodictyol**

Die Herstellung von  $[^{14}\text{C}]$ -Naringenin und  $[^{14}\text{C}]$ -Eriodictyol erfolgte mit einer abgewandelten Methode nach BRITSCH und GRISEBACH (1985). Ein Ansatz hatte ein Volumen von 250  $\mu\text{l}$ . 50 bis 100 Ansätze wurden für 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  in geschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert.

205  $\mu\text{l}$  0,1 M Tris pH 7,5

20  $\mu\text{l}$  rekombinante CHS-Aufarbeitung

10  $\mu\text{l}$  CHI-Aufarbeitung

3,1  $\mu\text{l}$  0,24 mM Malonyl-CoA (entspricht 0,75 nmol)

1,8  $\mu\text{l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Malonyl-CoA (entspricht 0,75 nmol) mit 110.000 dpm = 1830 Bq

für [ $^{14}\text{C}$ ]-Naringenin: 10 ml 0,1 mM (0,1 nmol/ $\mu\text{l}$ ) 4-Cumaroyl-CoA (entspricht 1 nmol)

für [ $^{14}\text{C}$ ]-Eriodictyol: 10 ml 0,1 mM (0,1 nmol/ $\mu\text{l}$ ) Kaffeoyl-CoA (entspricht 1 nmol)

Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionen mit 200  $\mu\text{l}$  Ethylacetat gestoppt. Die Reaktionsgefäße wurden gut geschüttelt und anschließend für zwei Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die Oberphasen wurden abgenommen und gesammelt. Diese Extraktion wurde nochmals wiederholt und alle Extrakte vereinigt. Zur Mengenbestimmung werden 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$  und 50  $\mu\text{l}$  des Extraktes auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Celluloseschicht aufgetragen und im Laufmittel CAW chromatographiert. Die Quantifizierung ist im Kapitel B.2.2.6 beschrieben.

### **Herstellung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydrokämpferol und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydroquercetin**

[ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydrokämpferol und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydroquercetin wurden mit einer abgewandelten Methode nach BRITSCH et al. (1992) aus [ $^{14}\text{C}$ ]-Naringenin und [ $^{14}\text{C}$ ]-Eriodictyol hergestellt. Zuerst wurde das in Ethylacetat gelöste [ $^{14}\text{C}$ ]-Naringenin oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Eriodictyol im Reaktionsgefäß mit einer Vakuumpzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann wurden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben und 50 bis 100 Ansätze wurden für 60 Minuten bei 37°C in offenen Reaktionsgefäßen inkubiert. Ein Ansatz hatte ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$ .

120 ml 0,1 M Tris pH 7,5

20  $\mu\text{l}$  0,65 mM  $\text{FeSO}_4$  (entspricht 13 nmol)

20  $\mu\text{l}$  0,1 M Na-Ascorbat (entspricht 2  $\mu\text{mol}$ )

20  $\mu\text{l}$  5,1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (entspricht 102 nmol)

20  $\mu\text{l}$  rekombinante FHT-Aufarbeitung

für [ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydrokämpferol : 30.000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ]-Naringenin

für [ $^{14}\text{C}$ ]-Dihydroquercetin : 30.000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ]-Eriodictyol

Die Reaktionen wurden, wie bei der Herstellung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Naringenin und [ $^{14}\text{C}$ ]-Eriodictyol beschrieben, gestoppt und die radioaktiv markierten Substrate ebenso extrahiert.

### **B.2.2.5 Standardenzymtest**

#### **B.2.2.5.1 Photometrisch gemessene Enzymtests**

##### **Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Test (PAL-Test)**

Im PAL-Test nach DANGELMAYR (1982) wurde die Umsetzung der Aminosäure Phenylalanin zur Zimtsäure gemessen. Hierfür wurden 12,5 mg Phenylalanin in 1 ml Puffer gelöst.

Folgende Ansätze wurden in Falconröhrchen pipettiert:

- ad 2,8 ml Puffer: 0,1 M Tris HCl pH 8,8
- 100 µg Gesamtprotein aus dem Enzymextrakt.

Für die Kontrolle ohne Enzym wurde entsprechend mehr Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 38 - 40°C vorgewärmt und durch Zugabe von 200 µl Phenylalanin-Lösung (5 mM im Reaktionsansatz) wurde die Reaktion gestartet. Zur Bestimmung des Nullpunktes der Reaktion wurde sofort 1 ml des Ansatzes in ein Eppendorfgesäß überführt, in dem 50 µl 5 N HCl zum Abstoppen der Reaktion vorgelegt waren. Nach kurzem Schütteln und Überführung in eine Quarzküvette wurde die Extinktion bei 252 nm, 257 nm, 263 nm (Absorptionsmaxima des Phenylalanins) sowie bei 280 nm und 290 nm (Absorptionsmaxima der Zimtsäure) am Photometer gemessen, um die Umsetzung des Phenylalanins zur Zimtsäure genau verfolgen zu können. Der restliche Ansatz wurde 60 Minuten bei 38 - 40°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine weitere Messung wie bei der Messung der Nullpunktproben beschrieben. Zur Auswertung wurden die gemessenen Extinktionen bei 280 nm herangezogen, da bei dieser Wellenlänge nur noch die Zimtsäure absorbiert. Vom jeweiligen Wert, der nach 60 Minuten gemessen wurde, wurde der Wert der entsprechenden Nullprobe subtrahiert. Die Enzymaktivität ist innerhalb des Linearitätsbereichs für Zeit, Enzymmenge und Substratkonzentration proportional der errechneten Differenz.

#### **B.2.2.5.2 Enzymtests mit [<sup>14</sup>C]-markierten Substraten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Enzymtests mit [<sup>14</sup>C]-markierten Substraten durchgeführt:

- 1) Flavonolsynthase-Test (FLS-Test)
- 2) Dihydroflavonol 4-Reduktase-Test (DFR-Test)
- 3) Leukoanthocyanidin 4-Reduktase-Test (LAR-Test).

Da der Ablauf der Enzymtests weitestgehend identisch war, wird er einmal in allgemeiner Form dargestellt. Die unterschiedlichen Komponenten sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Für die Enzymtests wurden [ $^{14}\text{C}$ ]-markierte Substrate (2500 dpm) verwendet. Ein Ansatz hatte folgende Komponenten:

- ad 230  $\mu\text{l}$  (bei 1 Kofaktor) bzw. ad 250  $\mu\text{l}$  (bei 3 Kofaktoren) Puffer
- Kofaktor(en)
- je 25 - 50  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus dem Enzymextrakt oder aus der heterologen Expression.

Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten bei der entsprechenden Temperatur im Thermoblock inkubiert. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit 200  $\mu\text{l}$  EtOAc. Die entstandenen Oberphasen wurden abgenommen, vereinigt, vollständig auf eine Cellulose-DC-Platte aufgetragen und in einem geeigneten Laufmittel chromatographiert. Zur späteren Identifizierung der Banden wurden Standards (500 dpm im Falle radioaktiv markierter Substrate / Produkte), zumeist mögliche Reaktionsprodukte, mit auf die DC-Platte aufgetragen. Die Auswertung und Quantifizierung ist im Kapitel B.2.2.6 beschrieben.

**Tab. 3: Versuchsbedingungen der Enzymtests mit [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Substraten**

Enzym	[ $^{14}\text{C}$ ]-markierte Substrate	Puffer	Kofaktoren und vorgeschaltete Enzyme	Temperatur	Laufmittel	Standards
FLS	Dihydrokämpferol	0,1 M Tris HCl pH 7,25	10 $\mu\text{l}$ FeSO <sub>4</sub> (10 nmol) 10 $\mu\text{l}$ Na-Ascorbat (1 nmol) 10 $\mu\text{l}$ $\alpha$ -Ketoglutarat (50 nmol)	25°C	Forestal	Kämpferol
FLS	Dihydroquercetin	0,1 M Tris HCl pH 7,25	10 $\mu\text{l}$ FeSO <sub>4</sub> (10 nmol) 10 $\mu\text{l}$ Na-Ascorbat (1 nmol) 10 $\mu\text{l}$ $\alpha$ -Ketoglutarat (50 nmol)	25°C	Forestal	Quercetin
DFR	Dihydrokämpferol	0,1 M Tris HCl pH 7,5	10 $\mu\text{l}$ NADPH (0,1 mmol)	25°C	CAW	Leukopelargonidin
DFR	Dihydroquercetin	0,1 M Tris HCl pH 7,5	10 $\mu\text{l}$ NADPH (0,1 mmol)	25°C	CAW	Leukocyanidin
LAR (+DFR)	Dihydroquercetin	0,1 M Tris HCl pH 7,5	10 $\mu\text{l}$ NADPH (0,1 mmol) DFR	25°C	BAW	Catechin
LAR (+DFR)	Eriodictyol	0,1 M Tris HCl pH 7,5	10 $\mu\text{l}$ NADPH (0,1 mmol) DFR	25°C	BAW	

### **B.2.2.5.3 Enzymtests mit nicht radioaktiv markierten Substraten**

#### **Anthocyanidinreduktase (ANR)-Test**

Im ANR-Test, verändert nach PUNYASIRI et al. (2004), wurde die Umsetzung von Pelargonidin zu Epiafzelechin bzw. von Cyanidin zu Epicatechin gemessen.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- ad 500 µl Puffer: 0,1 M Kpi pH 5,5
- Kofaktor: 50 µl 20 mM NADPH
- Substrat: 50 µl Pelargonidinchlorid bzw. Cyanidinchlorid (jeweils 1 mg/ml EGME)
- 100 µg Gesamtprotein aus dem Enzymextrakt oder aus heterologer Expression.

Der Enzymtest wurde bei 45°C für 60 Minuten im Thermoblock inkubiert. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit 500 µl EtOAc, wie in Kapitel B.2.2.4 beschrieben. Die vereinten Oberphasen wurden vollständig eingedampft, der Rückstand mit 30 µl MeOH wieder aufgenommen und mit Glaskapillaren auf die Cellulose-DC-Platten aufgetragen. Zur späteren Identifizierung der Produkt-Banden wurde Epicatechin (1 mg/ml in MeOH gelöst) als Standard auf die DC-Platte aufgetragen. Die DC-Platten wurden im Laufmittel BAW chromatographiert. Zur Auswertung wurden die nach dem Lauf getrockneten Cellulose-DC-Platten mit 0,1 prozentiger DMAZA-Lösung besprüht. DMAZA bildet zusammen mit den Flavan 3-olen einen blau-türkisen Farbstoff. Die Platten wurden gescannt und das digitale Bild mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 optimiert. Mit dieser Methode ließen sich jedoch nur qualitative und halbquantitative Aussagen zur Enzymaktivität machen.

#### **B.2.2.6 Radioaktivitätsmessung**

Zur späteren Identifizierung der Banden wurden Standards (jeweils 500 dpm), zumeist mögliche Reaktionsprodukte, mit auf die DC-Platte aufgetragen. Zur Auswertung und Quantifizierung der radioaktiven Signale wurden die chromatographierten Dünnschichtplatten nach dem Trocknen auf Expositionsplatten (Phospho-Imager-Screen, Fujix) gelegt. Die Expositionsplatten wurden mit dem *Bio Imaging Analyser Fujix BAS 1000* eingelesen und mit den Softwareprogrammen *BAS Reader 2.21* und *TINA 2.0* ausgewertet.

### B.2.3 Chemische Methoden

#### Dünnschichtchromatographie

Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden mit Cellulose beschichtete Glasplatten der Firma Merck in folgenden Laufmittelsystemen benutzt:

**Tab. 4: Zusammensetzung der unterschiedlichen Laufmittel**

Laufmittel	Komponenten (ml)		
CAW	Chloroform	Eisessig	Wasser
	50	45	5
BAW	n-Butanol	Eisessig	Wasser
	60	10	20
Forestal	Eisessig	Salzsäure	Wasser
	90	9	30

### B.2.4 Histochemische Untersuchungsmethoden

#### DMAZA-Färbereaktion auf Flavan 3-ole

Flavan 3-ole (Afzelechin, Epiafzelechin, Catechin, Epicatechin) gehen mit dem aromatischen Aldehyd, dem p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) eine äußerst empfindliche Reaktion ein, die auch als histologische Feucht-Reaktion bezeichnet wird. Die normalerweise ungefärbten Flavan 3-ole werden in einen intensiv blau gefärbten Farbkomplex umgewandelt. So können sie im Pflanzengewebe lokalisiert oder auch im methanolischen Pflanzenextrakt nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf DC-Platten sichtbar gemacht werden. Hierfür werden die DC-Platten mit DMAZA-Lösung (6 N HCl und EtOH im Verhältnis 1:1 mit 0,1 % DMAZA) besprüht. Flavan 3-ole sind anschließend als blau-türkise Banden identifizierbar.

Bei der Untersuchung der Verteilung der Flavan 3-ole in Erdbeerfrüchten verschiedener Reifestadien, wurden Früchte längs und quer ihrer Mittelachse mit einem Skalpell aufgeschnitten. Anschließend wurden sie mit oben genannter DMAZA-Lösung besprüht. Nach fünfminütiger Reaktionszeit wurden die Schnitte fotografisch festgehalten.

### **B.2.5 Computergestützte Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen**

Die Analyse von Sequenzierergebnissen erfolgte mit dem Programm ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Sequenzrecherchen in der GenBank wurden mit den Programmen Blastn, Blastx und Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Programme zum Erstellen von revers komplementären DNA-Sequenzen, zur Translation von DNA, zum Finden von Restriktionsstellen innerhalb von Sequenzen und Ähnlichem wurden über die Internetseite „A Pack of molecular Analysis Tools“ (<http://www.mbs.adelaide.edu.au/bioinf/tools/>) geladen und ausgeführt. Für DNA- und AS-Sequenzvergleiche wurden die Programme MultAlign (Version 5.4.1; <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) und ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) verwendet. Phylogenetische Untersuchungen wurden mit dem Programm Clustal X (Version 1.8) durchgeführt.

## C Ergebnisse

### C.1 Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)

#### C.1.1 Allgemeines Vorgehen

Im Mittelpunkt des Interesses standen die Sequenzen der FLS, DFR, LAR und ANR aus der Sorte ‚Korona‘, die eine für *Botrytis cinerea* anfällige Hauptsorte im Erwerbsanbau ist. Die DFR wurde schon in einer Vorarbeit aus der Erdbeersorte ‚Thetis‘ am Lehrstuhl kloniert (GOSCH, 2003). Die vorhandenen Sequenzinformationen konnten für die Klonierung der DFR aus der Sorte ‚Korona‘ verwendet werden. Die Sequenzen der FLS, LAR und ANR waren zu diesem Zeitpunkt aus der Erdbeere noch nicht veröffentlicht. Für die Klonierung dieser Gene wurden degenerierte Primer anhand bekannter Gensequenzen und ESTs anderer Vertreter der *Rosaceae* entworfen. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus Blütenböden und Früchten verschiedener Reifestadien. cDNA wurde mit dem, an den Poly(A)-Schwanz der mRNA bindenden, oligo(dT)-Primer hergestellt. Die erzielten Fragmente wurden in den PCR-Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> inseriert, positive Klone detektiert, isoliert und anschließend sequenziert. Homologien der erhaltenen Sequenzen wurden durch einen Blastn und Blastx-Vergleich mit in der GenBank veröffentlichten Sequenzen ermittelt. Ausgehend von den klonierten Fragmenten wurden die FLS, LAR und ANR mittels RACE-PCR-Methoden um die noch fehlenden cDNA-Enden komplettiert. Anhand der neu erzielten und bereits bekannten Sequenzinformationen wurden den ganzen ORF umfassende *end-to-end*-Primer entworfen. Die vollständigen putativen cDNAs von DFR, FLS, LAR und ANR aus der Sorte ‚Korona‘ wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig amplifiziert und in den Hefektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Positive Klone mit *sense*-Orientierung des Inserts bezüglich des Vektor-Promotors, wurden detektiert, isoliert und anschließend sequenziert. Eine Überprüfung auf DNA- und Aminosäureebene erfolgte über Blast und der Kontrolle des ORF. Nach heterologer Expression in Hefe wurde die Analyse der Funktionalität und der Substratspezifität des jeweiligen rekombinanten Proteins mit Enzymtests durchgeführt.

## C.1.2 Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)

### C.1.2.1 Klonierung eines putativen *full-length* DFR cDNA-Klons

Ausgangspunkt war cDNA, die aus Früchten bei beginnender Rotfärbung gewonnen wurde. Mit den *end-to-end*-Primern 5FraDFR und 3.2FraDFR konnte ein *full-length* cDNA-Klon mit 1082 Basenpaaren und einem 342 AS langen ORF amplifiziert werden.

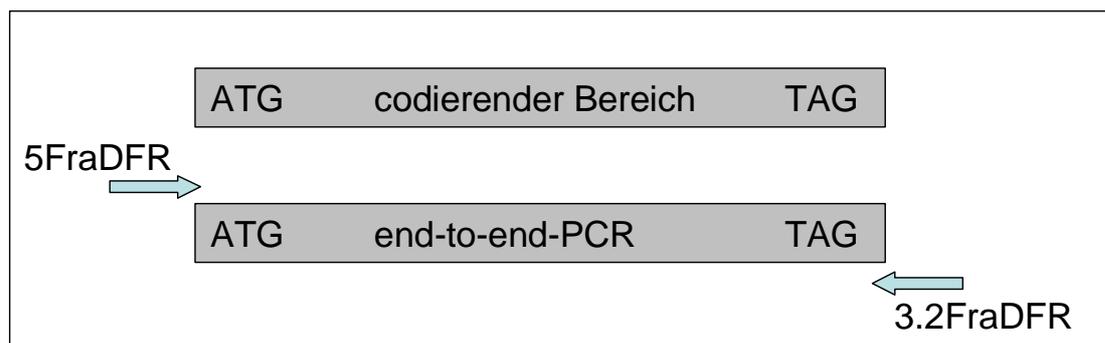


Abb. 8: Klonierungsschema des DFR cDNA-Klons

### C.1.2.2 Sequenzanalyse des DFR Klons ‚U1-1‘

#### C.1.2.2.1 Analyse von Sequenzmotiven

Die DFR Aminosäuresequenz aus der Sorte ‚Korona‘ zeigt die von Rossmann definierte Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle GXXGXXG/A, beginnend bei G-14 (XIE et al., 2004) (Kap. G.5.1).

#### C.1.2.2.2 Homologieanalyse verschiedener DFR Sequenzen der Familie *Rosaceae*

Die Sequenzidentität, der in der GenBank veröffentlichten DFR-Aminosäuresequenzen ist, wie zu erwarten, innerhalb der Familie der Rosaceen mit 77 bis 100 Prozent sehr hoch. Die aus der Erdbeersorte ‚Korona‘ klonierte DFR zeigt auf Aminosäureebene höchste Sequenzidentität zu drei bereits, beziehungsweise zwischenzeitlich veröffentlichten, DFR-Sequenzen aus *Fragaria x ananassa* (AccNo. AF029685, AY695812, AB201759) mit 97 beziehungsweise 98 Prozent (Tab. 5).

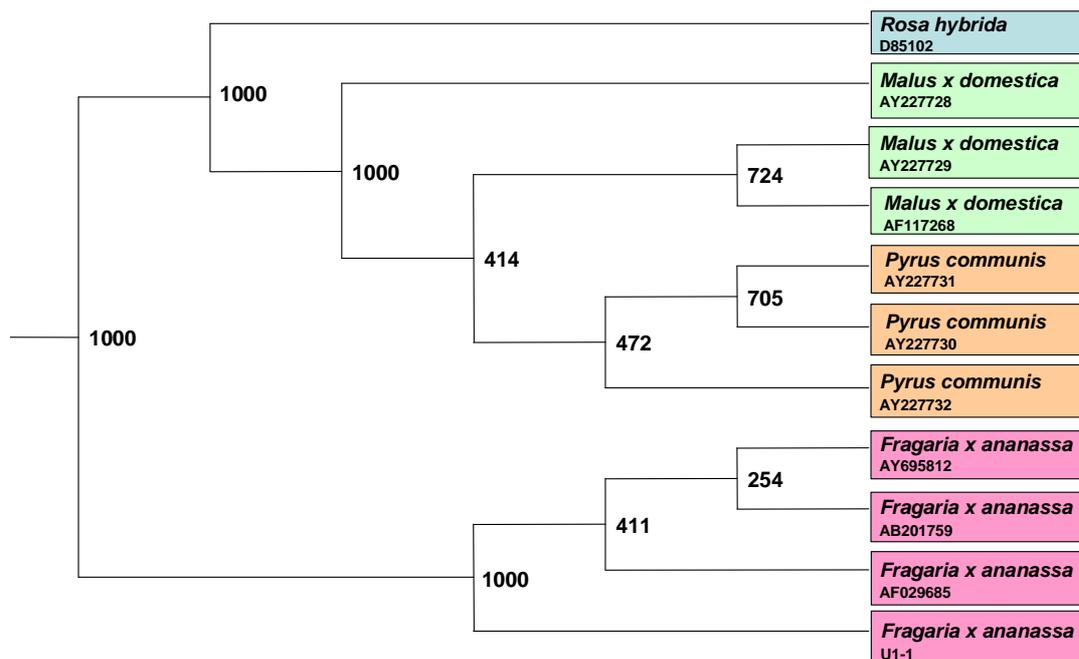
**Tab. 5: Homologiematrix in Prozent der verschiedenen DFR Klone der Familie *Rosaceae***

AB201759 (*Fragaria × ananassa*), AY695812 (*Fragaria × ananassa*), AY227732 (*Pyrus communis* ‚Abbe Fetel‘), AY227729 (*Malus × domestica* ‚Weirouge‘), AF029685 (*Fragaria × ananassa*), D85102 (*Rosa hybrida*), U1-1 (*Fragaria × ananassa* ‚Korona‘), AF117268 (*Malus × domestica*), AY227731 (*Pyrus communis* ‚Conference‘), AY227730 (*Pyrus communis* ‚Pyrodwarf‘), AY227728 (*Malus × domestica* ‚M9‘). In der oberen rechten Seite sind die Homologien basierend auf den Nukleotidsequenzen (GenBank) dargestellt, in der linken unteren Hälfte die Homologien basierend auf den Aminosäuresequenzen.

	AB201759 <i>Fragaria</i>	AY695812 <i>Fragaria</i>	AY227732 <i>Pyrus</i>	AY227729 <i>Malus</i>	AF029685 <i>Fragaria</i>	D85102 <i>Rosa</i>	U1-1 <i>Fragaria</i>	AF117268 <i>Malus</i>	AY227731 <i>Pyrus</i>	AY227730 <i>Pyrus</i>	AY227728 <i>Malus</i>
AB201759 <i>Fragaria</i>		98	76	76	98	77	97	62	76	76	76
AY695812 <i>Fragaria</i>	98		78	77	99	83	99	77	78	78	77
AY227732 <i>Pyrus</i>	78	78		97	76	79	76	97	99	99	97
AY227729 <i>Malus</i>	78	78	99		76	78	76	99	97	97	99
AF029685 <i>Fragaria</i>	97	99	78	78		73	99	60	76	76	76
D85102 <i>Rosa</i>	79	80	82	82	80		80	64	80	79	78
U1-1 <i>Fragaria</i>	97	98	77	78	97	80		73	76	76	76
AF117268 <i>Malus</i>	78	78	99	100	78	82	78		97	97	99
AY227731 <i>Pyrus</i>	78	78	99	99	78	82	77	99		99	97
AY227730 <i>Pyrus</i>	78	78	99	99	78	82	77	99	100		97
AY227728 <i>Malus</i>	78	78	98	99	78	83	78	99	99	99	

### C.1.2.2.3 Phylogenetische Analyse verschiedener DFR Sequenzen der Familie *Rosaceae*

Abbildung 9 zeigt die enge Verwandtschaft der verschiedenen bereits veröffentlichten DFR Aminosäuresequenzen aus *Fragaria*. Dabei bilden die Vertreter einer Gattung jeweils separate Cluster. Die AS-Sequenz des *Malus x domestica* M9 Klons mit der AccNo. AY227728 unterscheidet sich von denen der anderen beiden *Malus*-Klone. Ein Grund könnte in der generativen Vermehrung der M9 Unterlagen zu finden sein.

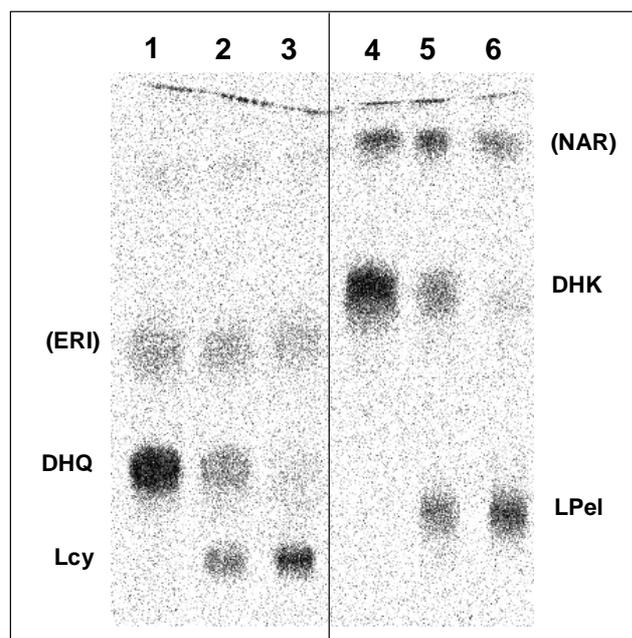


**Abb. 9: Phylogenetische Analyse der Dihydroflavonol 4-Reduktase Vertreter der Familie *Rosaceae*, basierend auf Aminosäuresequenzen**

D85102 (*Rosa hybrida*), AY227728 (*Malus x domestica* ‚M9‘), AY227729 (*Malus x domestica* ‚Weirouge‘), AF117268 (*Malus x domestica*), AY227731 (*Pyrus communis* ‚Conference‘), AY227730 (*Pyrus communis* ‚Pyrodwarf‘), AY227732 (*Pyrus communis* ‚Abbe Fetel‘), AY695812 (*Fragaria x ananassa*), AB201759 (*Fragaria x ananassa*), AF029685 (*Fragaria x ananassa*), U1-1 (*Fragaria x ananassa* ‚Korona‘). Die Zahlen an den Verzweigungen zeigen die Anzahl der positiven Bootstrap Zyklen (total 1000).

### C.1.2.2.3 Heterologe Expression des putativen DFR cDNA-Klons

Das Protein des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons U1-1 aus der Erdbeersorte ‚Korona‘ zeigte eindeutig DFR-Aktivität (Abb. 10). Im Test wurde es mit dem, in einer früheren Arbeit klonierten, DFR-Klon aus der Erdbeersorte ‚Thetis‘ verglichen. Die beiden Erdbeerkclone setzten sowohl Dihydrokämpferol, als auch Dihydroquercetin als Substrat um und bildeten Leukopelargonidin beziehungsweise Leukocyanidin. Der Klon U1-1 zeigte mehr Aktivität als der Klon aus der Sorte ‚Thetis‘.



**Abb. 10: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons U1-1**

Die Ansätze enthielten 50 µl Protein, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 25°C. Die Auftrennung erfolgte in CAW. 1 = Substrat [<sup>14</sup>C]-DHQ, 2 = Ansatz mit DFR aus ‚Thetis‘ und [<sup>14</sup>C]-DHQ, 3 = Ansatz mit DFR U1-1 und [<sup>14</sup>C]-DHQ, 4 = Substrat [<sup>14</sup>C]-DHK, 5 = Ansatz mit DFR aus ‚Thetis‘ und [<sup>14</sup>C]-DHK, 6 = Ansatz mit DFR U1-1 und [<sup>14</sup>C]-DHK. (NAR und ERI) = Nicht umgesetzte Vorläufersubstrate aus der Substratsynthese.

### C.1.3 Flavonolsynthese (FLS)

#### C.1.3.1 Klonierung eines putativen *full-length* FLS cDNA-Klons

Mithilfe der rosenspezifischen FLS-Primer FLSRoVo und 3RoFLS1 konnten zwei Fragmente mit jeweils 1050 Basenpaaren Länge aus cDNA reifer Früchte kloniert werden. Sie besaßen einen offenen Leserahmen von 334 Aminosäuren bis zum Stopp-Codon. Die beiden Sequenzen unterschieden sich in vier Basenpaaren; auf Aminosäureebene gab es zwei Substitutionen. Der Vergleich mit der bereits bekannten Rosensequenz der Sorte ‚Kardinal‘ (AccNo. AB038247) ergab das Fehlen von nur circa zehn Basen am 5'-Ende. Vom Fragment ausgehend wurden drei Primer für das 5'-RACE (3FLSRACE, 3FLSRACE1, 3FLSRACE2) entworfen. 5'-RACE über *C-tailing* und die Primer 3FLSRACE1 und 3FLSRACE2 erbrachte ein Fragment der gewünschten Länge, das das Start-ATG enthielt und darüber hinaus einen 6 bp langen *leader*-Bereich. Die gesamte Sequenz war 1257 bp lang. Die nach dieser Sequenzinformation entworfenen *end-to-end*-Primer 5FLS und 3FLS brachten einen *full-length* cDNA-Klon. Er war 1049 bp lang und hatte einen ORF von 336 AS.

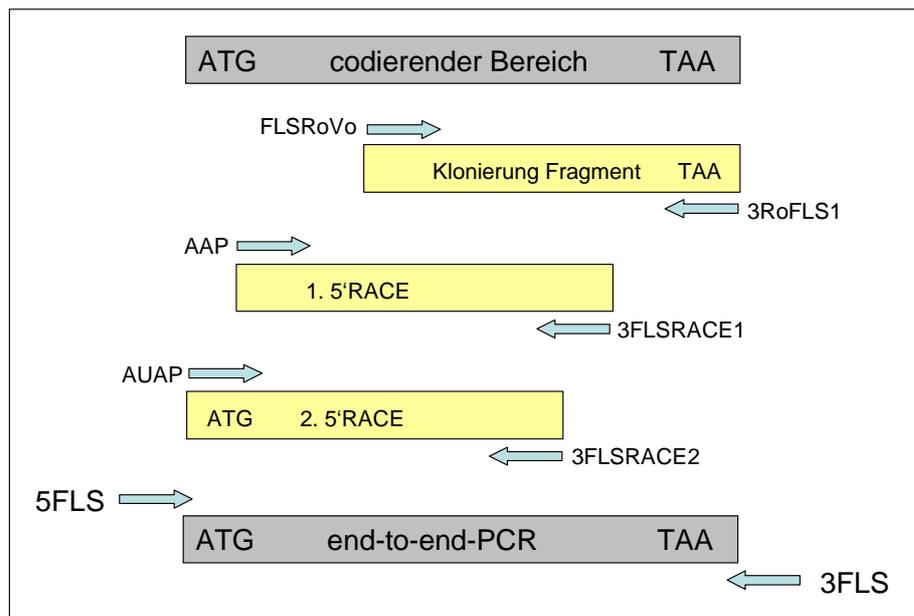


Abb. 11: Klonierungsschema des FLS cDNA-Klons

### C.1.3.2 Sequenzanalyse des FLS Klons

#### C.1.3.2.1 Analyse von Sequenzmotiven

Die Erdbeer FLS Sequenz wurde mit anderen in der GenBank veröffentlichten FLS Sequenzen und am Lehrstuhl vorliegenden FLS Sequenzen mit dem Programm ClustalW verglichen. Die genannten Positionen beziehen sich auf die Erdbeersequenz und sind im Anhang (Kap. G.5.2) aufgeführt. Das von LUKAČIN et al. (2000) beschriebene konservierte Motiv, das zur Eisenbindung benötigt wird (H X D), befindet sich zwischen Position H-228 und D-230. Das zweite dazu benötigte Histidin ist bei Position H-284. Das 2-Oxoglutarat bindende Motiv ist zwischen den Aminosäuren auf Position R-294 und S-296 zu finden (MARTENS et al., 2003). Die beiden Motive klassifizieren die amplifizierte Sequenz als 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase.

#### C.1.3.2.2 Homologieanalyse verschiedener FLS-Sequenzen

Im folgenden Kapitel wurden die genannten (Kap. C.1.3.2.1) FLS Sequenzen einer Homologieprüfung unterzogen. Die Zuordnung der verschiedenen Flavonolsynthesen zu den 2-ODD wurde von PRESCOTT UND JOHN (1996) veröffentlicht. Ein Multialignment wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt (Kap. G.5.2). Basierend auf diesem Alignment, konnten die charakteristischen 2-ODD Sequenzbereiche auf der Erdbeer FLS-Sequenz bestimmt werden. Die Ergebnisse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche sind in folgender Homologiematrix

dargestellt (Tab. 6). Die Homologierate der verschiedenen Flavonolsynthesen liegt zwischen 40 und 100 Prozent auf Aminosäureebene. Die Erdbeer FLS zeigt auf AS-Ebene höchste Homologie zu den FLS-Sequenzen von *Rosa hybrida* (AccNo. AB038247) mit 93 Prozent und zu *Malus x domestica* (AccNo. AY965343, AF119095) mit 77 Prozent, die geringste Homologie zur FLS von *Arabidopsis thaliana* (AccNo. NM\_148158) mit 41 Prozent.

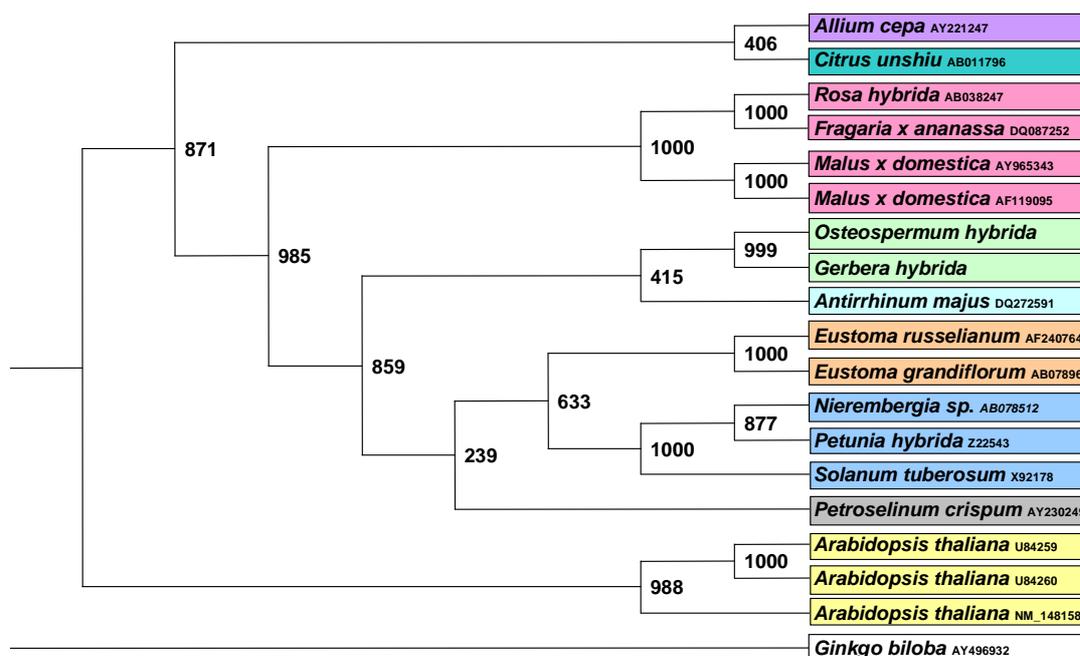
**Tab. 6: Homologiematrix in Prozent verschiedener FLS Sequenzen**

NM\_148158 (*Arabidopsis thaliana*), AY230249 (*Petroselinum crispum*), AB038247 (*Rosa × hybrida*), AY965343 (*Malus × domestica*), AY221247 (*Allium cepa*), AB011796 (*Citrus unshiu*), AF240764 (*Eustoma russelianum*), AB078512 (*Nierembergia sp.*), X92178 (*Solanum tuberosum*), Z22543 (*Petunia hybrida*), Osteck (*Osteospermum hybrida*), Gerhyb (*Gerbera × hybrida*), DQ272591 (*Antirrhinum majus*), AB078965 (*Eustoma grandiflorum*), AY496932 (*Ginkgo biloba*), AF119095 (*Malus × domestica*), U84259 (*Arabidopsis thaliana*), U84260 (*Arabidopsis thaliana*), DQ087252 (*Fragaria × ananassa*). In der oberen rechten Seite sind die Homologien basierend auf den Nukleotidsequenzen (GenBank) dargestellt, in der linken unteren Hälfte die Homologien basierend auf den Aminosäuresequenzen.

	NM_148158	AY230249	AB038247	AY965343	AY221247	AB011796	AF240764	AB078512	X92178	Z22543	Osteck	Gerhyb	DQ272591	AB078965	AY496932	AF119095	U84259	U84260	DQ087252
NM_1481	48	38	45	43	48	49	49	49	49	47	46	41	48	44	46	64	61	39	
AY230249	46	60	66	56	58	63	63	61	65	67	70	60	72	41	56	55	58	68	
AB038247	40	68	76	64	55	57	53	50	60	57	67	58	70	40	62	52	57	92	
AY965343	43	66	77	67	65	66	65	63	67	66	67	65	66	50	99	58	58	78	
AY221247	41	67	65	64	55	55	55	55	57	64	63	56	68	41	55	51	55	64	
AB011796	48	70	68	67	71	57	56	54	60	55	65	57	69	41	53	57	62	67	
AF240764	48	75	71	69	69	69	59	58	63	62	71	60	98	49	53	55	60	69	
AB078512	41	74	68	67	68	70	77	61	73	61	68	61	73	39	50	54	60	68	
X92178	41	74	65	66	65	67	76	80	74	60	67	60	72	38	48	50	55	65	
Z22543	46	76	67	67	67	70	79	87	83	61	70	62	73	42	57	55	57	69	
Osteck	46	74	67	65	65	69	73	71	68	69	81	60	73	42	57	52	56	65	
Gerhyb	43	74	64	66	66	70	73	70	69	70	81	70	74	45	64	61	61	66	
DQ272591	46	73	69	60	67	69	74	76	74	77	74	74	72	43	54	52	56	68	
AB078965	48	74	70	69	67	68	98	77	75	78	72	72	73	47	66	64	64	70	
AY496932	37	48	47	49	51	51	46	47	45	46	49	48	47	45	39	38	42	48	
AF119095	43	66	77	99	64	67	69	67	66	67	65	66	66	69	48	51	56	76	
U84259	56	62	59	56	60	66	64	60	62	62	63	63	62	63	46	56	99	61	
U84260	56	62	59	56	60	66	64	60	62	62	63	63	62	63	46	56	100	61	
DQ087252	41	67	93	77	64	69	71	67	64	65	63	62	68	69	46	77	58	58	

### C.1.3.2.3 Phylogenetische Analyse verschiedener FLS Sequenzen

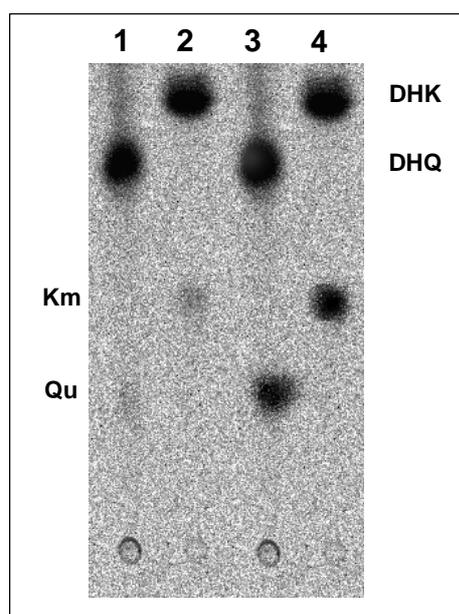
Abbildung 12 zeigt die phylogenetische Analyse der verschiedenen Flavonolsynthesen. Die enge Verwandtschaft der Flavonolsynthesen zwischen *Fragaria x ananassa* (DQ087252), *Malus x domestica* (AY965343, AF119095) und *Rosa hybrida* (AB038247) ist gut ersichtlich.



**Abb. 12: Phylogenetische Analyse verschiedener Flavonolsynthesen, basierend auf Aminosäuresequenzen**  
Gattungen, die mit der gleichen Farbe dargestellt sind, gehören der gleichen Familie an. Die Zahlen an den Verzweigungen zeigen die Anzahl der positiven Bootstrap Zyklen (total 1000). AY221247 (*Allium cepa*), AB011796 (*Citrus unshiu*), AB038247 (*Rosa hybrida*), DQ087252 (*Fragaria x ananassa*), AY965343 (*Malus x domestica*), AF119095 (*Malus x domestica*), *Osteospermum hybrida*, *Gerbera hybrida*, DQ272591 (*Antirrhinum majus*), AF240764 (*Eustoma russelianum*), AB078965 (*Eustoma grandiflorum*), AB078512 (*Nierembergia sp.*), Z22543 (*Petunia hybrida*), X92178 (*Solanum tuberosum*), AY230249 (*Petroselinum crispum*), U84259 (*Arabidopsis thaliana*), U84260 (*Arabidopsis thaliana*), NM\_148158 (*Arabidopsis thaliana*), AY496932 (*Ginkgo biloba*).

### C.1.3.3 Heterologe Expression des putativen FLS cDNA-Klons

Das rekombinante Protein des in Hefe heterolog exprimierten FLS cDNA-Klons zeigte eine schwache, aber eindeutig nachweisbare FLS-Aktivität. Es wurde sowohl das Substrat Dihydrokämpferol, als auch Dihydroquercetin akzeptiert. Nach der heterologen Expression in Hefe wurde ein Teil der rekombinanten Proteine mit und ein Teil ohne Zugabe von Glycerin, in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Frühere Arbeiten des Lehrstuhls belegen den hemmenden Einfluss des Glycerins auf die Enzymaktivität. Nur das rekombinante Protein, das ohne Zugabe von Glycerin verwendet wurde, zeigte FLS-Aktivität (Abb. 13). Die Enzymtests wurden ansonsten exakt gleich und synchron durchgeführt.



**Abb. 13: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten FLS cDNA-Klons**

Die Ansätze enthielten 30 µg Protein, die Inkubationszeit betrug 30 min bei 25°C. 1 = Ansatz mit FLS und [<sup>14</sup>C]-DHQ, 2 = Ansatz mit FLS und [<sup>14</sup>C]-DHK, 3 = Standards DHQ und Qu, 4 = Standards DHK und Km. Ausschnitt der DC nach Auftrennung in Forestal.

## C.1.4 Leukoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR)

### C.1.4.1 Klonierung eines putativen *full-length* LAR cDNA-Klons

Mit dem partiell degenerierten LAR-spezifischen Primer 5LAR7 in Kombination mit dem oligo(dT)Anchor Primer konnte ein circa 950 bp langes cDNA-Fragment aus großen grünen Früchten isoliert werden. Mit einer folgenden *nested* PCR mit dem partiell degenerierten LAR-Primer 5LAR8 und dem oligo(dT)Anchor Primer wurde ein 839 bp langes Fragment mit einem ORF von 196 AS erzielt. Dieses enthielt das poly(A)<sup>+</sup>-Ende und einen *trailer*-Bereich von 211 bp nach dem Stopp-Codon. Das Fragment zeigte eine 84-prozentige Sequenzidentität zu der *Malus x domestica* LAR1 (AccNo. DQ139836) auf DNA-Ebene. Ausgehend von der gewonnenen Sequenzinformation wurden drei Primer für das 5'-RACE (LAR5'RACE1, LAR5'RACE2 und LAR5'RACE3) konstruiert. Beim ersten 5'-RACE-Ansatz, über *C-tailing* und die RACE-Primer LAR5'RACE2 und LAR5'RACE3, wurde ein 554 bp langes Fragment mit einem durchgehenden ORF von 179 AS gewonnen. Vor dem ATG-Start konnte zusätzlich ein 50 bp langer *leader*-Bereich isoliert werden. Die gesamte zur Verfügung stehende Sequenz hatte nun eine Länge von 1373 bp, inklusive *leader*- und *trailer*-Bereich. Mit den *end-to-end*-Primern 5LARfra und 3LARfra1 wurde ein *full-length* LAR cDNA-Klon erzielt. Er hatte eine Länge von 1286 bp und einen ORF von 358 AS (Abb. 14).

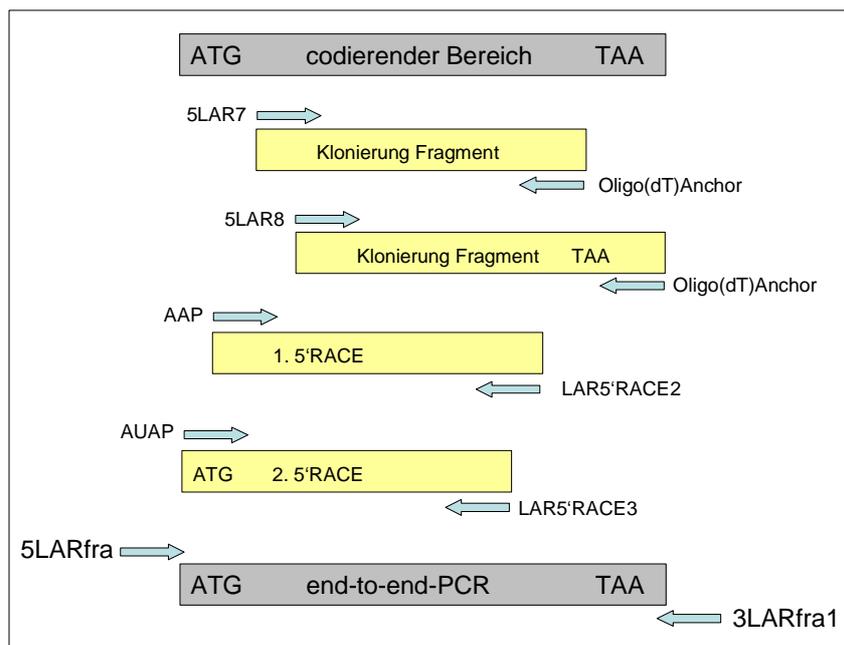


Abb. 14: Klonierungsschema des LAR cDNA-Klons

### C.1.4.2 Sequenzanalyse des LAR Klons

#### C.1.4.2.1 Analyse von Sequenzmotiven

Die Zuordnung der verschiedenen Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen zu der Isoflavonreduktase ähnlichen Gruppe der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase Superfamilie und somit zur Klasse der Oxidoreduktasen, wurde von TANNER et al. (2003) veröffentlicht. Die LAR Aminosäuresequenz aus der Erdbeersorte ‚Korona‘ zeigt die Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle GXXGX-XG/A beginnend bei Position G-20 (XIE et al., 2004). Ebenso das RFLP Motiv (T(v/i)KRFLP-SEFGHD), beginnend bei Position T-119, das ICCN Motiv (ICCN(SIA(g/a/s)WPY), beginnend bei Position I-165 und THD Motive (THDIFI(n/k)GCQ) nach BOGS et al. (2005), beginnend bei Position T-281.

#### C.1.4.2.2 Homologieanalyse verschiedener LAR Sequenzen

Bereits in der GenBank veröffentlichte LAR-Sequenzen wurden, mithilfe eines Multialignments, verglichen, das mit dem Programm ClustalW erstellt wurde (G.5.3). Die Ergebnisse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche sind in folgender Homologiematrix dargestellt (Tab. 7). Die Sequenzidentität der verschiedenen Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen liegt auf Aminosäureebene zwischen 45 und 100 Prozent. Die Erdbeer LAR zeigt auf AS-Ebene mit 76 Prozent höchste

Sequenzidentität zur LAR 2 (AccNo. AY830132) und mit 75 Prozent zur LAR 1 (AccNo. DQ139836, AY830131) von *Malus x domestica*. In folgender Tabelle sind alle bisher veröffentlichten LAR1 und LAR2 Klone aufgeführt. Die für die Klonierung verwendeten degenerierten Primer wurden so konzipiert, dass sowohl LAR1, als auch LAR2 Klone detektiert werden konnten. Da dies nicht erfolgte, gibt es Grund zu der Annahme, dass in der Erdbeere keine zweite LAR expriert wird.

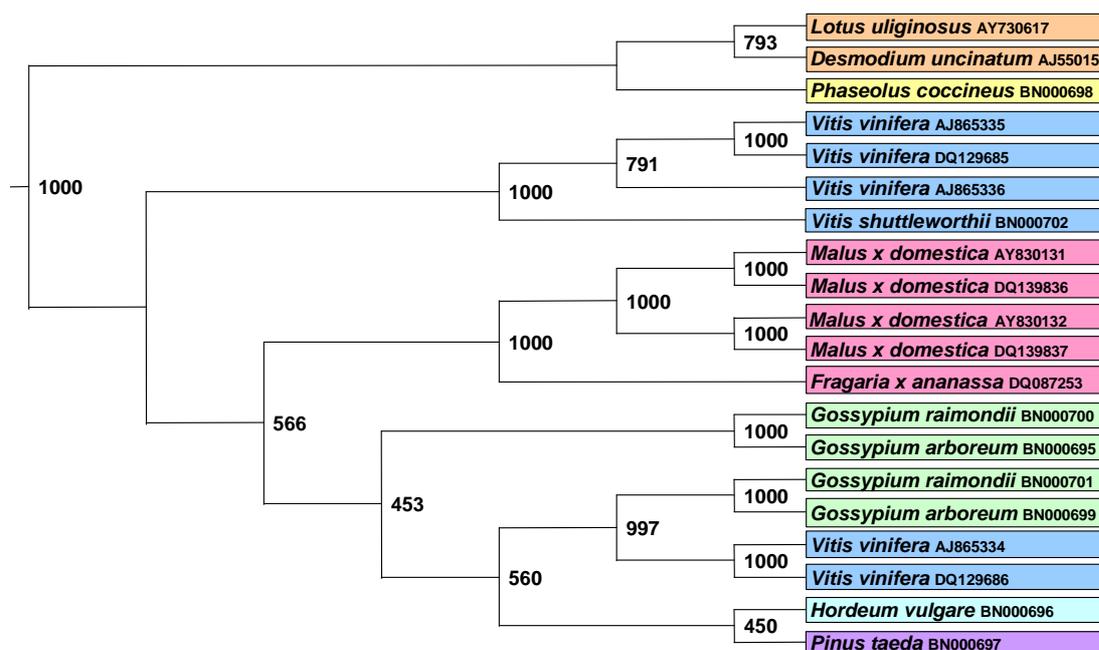
**Tab. 7: Homologiematrix in Prozent verschiedener LAR Sequenzen**

BN000698 (*Phaseolus coccineus*), BN000697 (*Pinus taeda*), BN000696 (*Hordeum vulgare*), AY730617 (*Lotus uliginosus*), AJ550154 (*Desmodium uncinatum*), DQ087253 (*Fragaria x ananassa*), BN000702 (*Vitis shuttleworthii*), BN000700 (*Gossypium raimondii*), BN000695 (*Gossypium arboreum*), AY830131 (*Malus x domestica*), AJ865335 (*Vitis vinifera*), AJ865336 (*Vitis vinifera*), DQ129685 (*Vitis vinifera*), DQ139836 (*Malus x domestica*), BN000701 (*Gossypium raimondii*), BN000699 (*Gossypium arboreum*), AY830132 (*Malus x domestica*), AJ865334 (*Vitis vinifera*), DQ129686 (*Vitis vinifera*), DQ139837 (*Malus x domestica*). In der oberen rechten Seite sind die Homologien, basierend auf den Nukleotidsequenzen (GenBank), dargestellt, in der linken unteren Hälfte die Homologien basierend auf den Aminosäuresequenzen.

	BN000698	BN000697	BN000696	AY730617	AJ550154	DQ087253	BN000702	BN000700	BN000695	AY830131	AJ865335	AJ865336	DQ129685	DQ139836	BN000701	BN000699	AY830132	AJ865334	DQ129686	DQ139837
BN000698		48	45	68	60	58	52	56	56	54	60	52	59	61	49	49	54	49	53	63
BN000697	45		40	38	32	41	44	41	41	37	53	43	52	53	39	40	37	40	50	52
BN000696	50	46		43	38	46	51	44	43	43	56	50	55	56	43	42	47	43	54	61
AY730617	67	49	51		57	50	47	46	45	44	58	47	57	60	46	44	44	43	54	60
AJ550154	70	47	50	72		51	50	47	47	45	60	50	59	59	44	43	47	42	53	60
DQ087253	61	49	55	62	59		51	52	52	61	63	50	61	73	47	46	75	51	59	77
BN000702	62	52	55	59	61	64		52	52	57	98	97	98	66	49	46	59	55	62	66
BN000700	58	52	55	58	57	66	65		97	52	64	52	63	67	49	48	51	45	56	67
BN000695	58	53	55	58	57	66	65	98		51	63	51	62	68	50	48	51	45	56	68
AY830131	62	50	58	61	60	75	68	66	67		67	57	66	100	44	43	85	46	58	92
AJ865335	62	53	55	59	61	64	98	65	65	68		98	100	67	57	56	67	62	62	67
AJ865336	62	53	55	58	61	64	98	65	66	68	99		98	66	45	44	54	54	63	66
DQ129685	62	53	55	59	61	64	98	65	65	68	100	99		66	55	55	69	65	65	66
DQ139836	62	50	58	61	60	75	68	66	67	100	68	68	68		55	54	91	61	61	92
BN000701	50	45	52	54	53	55	57	58	59	56	57	56	57	56		97	48	54	64	57
BN000699	50	46	53	55	53	55	57	58	59	56	57	56	57	56	97		44	52	64	57
AY830132	62	49	61	62	61	76	66	65	66	90	66	66	66	90	58	58		46	58	99
AJ865334	54	48	54	57	56	60	61	62	62	62	61	60	61	62	65	65	64		98	61
DQ129686	54	49	54	57	56	60	61	62	62	62	61	61	61	62	65	65	64	98		61
DQ139837	62	49	61	61	61	75	66	65	66	89	66	66	66	89	57	57	99	63	63	

### C.1.4.2.3 Phylogenetische Analyse verschiedener LAR Sequenzen

Abbildung 15 demonstriert die phylogenetische Analyse der verschiedenen Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen. Die LAR aus *Fragaria x ananassa* zeigt eine enge Verwandtschaft zu den Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen 1 und 2 aus *Malus x domestica*, was aufgrund der Zugehörigkeit zur gleichen botanischen Familie zu erwarten war.



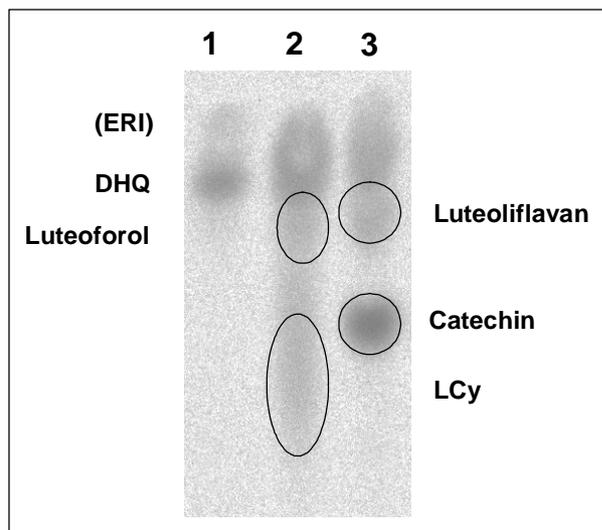
**Abb. 15: Phylogenetische Analyse verschiedener Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen, basierend auf Aminosäuresequenzen**

Gattungen, die mit der gleichen Farbe dargestellt sind, gehören der gleichen Familie an. Die Zahlen an den Verzweigungen zeigen die Anzahl der positiven Bootstrap Zyklen (total 1000). AY730617 (*Lotus uliginosus*), AJ550154 (*Desmodium uncinatum*), BN000698 (*Phaseolus coccineus*), AJ865335 (*Vitis vinifera*), DQ129685 (*Vitis vinifera*), AJ865336 (*Vitis vinifera*), BN000702 (*Vitis shuttleworthii*), AY830131 (*Malus x domestica*), DQ139836 (*Malus x domestica*), AY830132 (*Malus x domestica*), DQ139837 (*Malus x domestica*), DQ087253 (*Fragaria x ananassa*), BN000700 (*Gossypium raimondii*), BN000695 (*Gossypium arboreum*), BN000701 (*Gossypium raimondii*), BN000699 (*Gossypium arboreum*), AJ865334 (*Vitis vinifera*), DQ129686 (*Vitis vinifera*), BN000696 (*Hordeum vulgare*), BN000697 (*Pinus taeda*).

### C.1.4.3 Heterologe Expression des putativen LAR cDNA-Klons

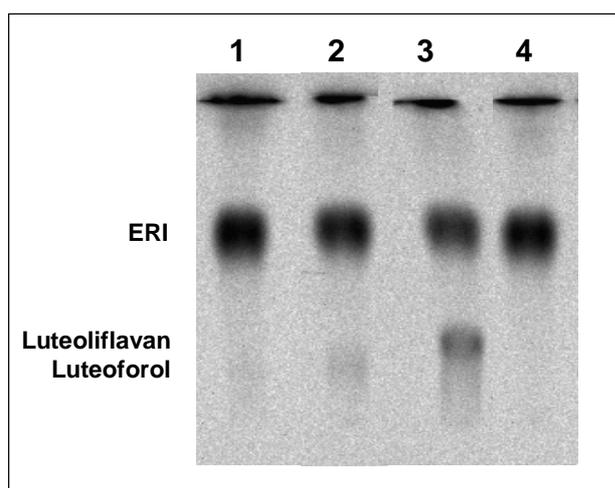
Die rekombinanten Proteine des in Hefe heterolog exprimierten LAR cDNA-Klons zeigten eindeutig LAR-Aktivität. Dabei wurden sowohl Leukocyanidin, als auch das 3-Deoxyflavonoid Luteoforol als mögliche Substrate akzeptiert. Leukopelargonidin wurde geringfügig zu Afzelechin umgesetzt. Durch eine vorgeschaltete DFR-Reaktion mit dem heterolog exprimierten Protein des DFR-Klons U1-1, wurden die für die Enzymtests notwendigen, instabilen Substrate Leukocyanidin und Luteoforol im gleichen Ansatz vorsynthetisiert (Abb. 16). Dass genügend Substrat zur Verfügung stand, ist aus dem Parallelansatz nur mit DFR (Abbildungen 16 und 17), ersichtlich. Dabei wurde jeweils eine Kontroll-DFR-Reaktion, ohne Zugabe von rekombinatem LAR-Protein, durch-

geführt. Da im Dihydroquercetin Eriodictyolreste aus der Synthese vorhanden waren, konnte in diesem Test gleichzeitig über DFR / FNR-Aktivität Luteoforol aus Eriodictyol synthetisiert werden. Dieses dient als Substrat für die LAR, um Luteoliflavan zu bilden. Diese Reaktion wurde anschließend nochmal, wie in Abbildung 17 ersichtlich, nachgeprüft.



**Abb. 16: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten LAR cDNA-Klons**

Die Ansätze enthielten je 40 µl Protein, die Inkubationszeit betrug 30 min bei 25°C. Alle Ansätze mit [<sup>14</sup>C]-DHQ als Substrat. 1 = Substrat DHQ, 2 = Ansatz mit rekombinanten Protein von DFR U1-1, 3 = Ansatz mit rekombinanten Protein von LAR und DFR U1-1. (ERI) = Nicht umgesetzte Vorläufersubstrate aus der Substratsynthese. Die Auftrennung erfolgte in BAW.



**Abb. 17: Gekoppelte Enzymreaktion für die Luteoliflavansynthese über Luteoforol, zur Überprüfung der Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten LAR cDNA-Klons**

Die Ansätze enthielten je 50 µg Protein, die Inkubationszeit betrug 60 min bei 25°C. Alle Ansätze mit [<sup>14</sup>C]-ERI als Substrat. 1 = Substrat [<sup>14</sup>C]-ERI, 2 = Ansatz mit rekombinanten Protein von DFR U1-1, 3 = Ansatz mit rekombinanten Protein von DFR U1-1 und LAR, 4 = Ansatz ohne Proteinzugabe. Die Auftrennung erfolgte in CAW.

## C.1.5 Anthocyanidinreduktase (ANR)

### C.1.5.1 Klonierung eines putativen *full-length* ANR cDNA-Klons

Auf Grundlage bereits veröffentlichter ANR-Sequenzen und am Lehrstuhl klonierter und exprimierter cDNA-Klone aus *Malus x domestica* (TAKOS et al., 2006; HAN et al., 2005; KÜHNEL et al., 2005), *Vitis vinifera* (TANNER et al., 2003; PFEIFFER et al., 2006), *Phaseolus coccineus* (TANNER et al., 2003), *Ginkgo biloba* (SHEN et al., 2006), *Medicago truncatula* und *Gossypium arboreum* (beide TANNER et al., 2003), wurden partiell degenerierte ANR-Primer (5ANR1n, 5ANR2n, 3ANR1n und 3ANR2n) entworfen. Mit den Primern 5ANR2n und 3ANR2n konnte aus gelben Früchten, ein Fragment mit 499 bp Länge und einem offenen Leserahmen von 166 AS erzielt werden. Von der Fragmentsequenz ausgehend, wurden Primer für die RACE-PCR Methode abgeleitet (5'-RACEANR1, 5'-RACEANR2, 5'-RACEANR3, 3'ANRRACE1 und 3'ANRRACE2). Das 3'-RACE mit dem Primer 3ANRRACE1 ergab ein Fragment mit Poly(A)+-Ende. Die gesamte, nun zur Verfügung stehende Sequenz, war 1064 bp lang. Mehrere 5'-RACE-Versuche scheiterten. Deshalb wurde mit dem GeneRacer™ Kit ein 5'RLM-RACE Verfahren mit dem Primer 5ANRRACE1 getestet (Kap. B.2.1.5.4). Mithilfe dieses Verfahrens konnte, nach einer folgenden *nested* PCR, mit dem Primer 5ANRRACE2 ein 206 bp langes Fragment inklusive Start-Codon und einer 97 bp langen *leader*-Sequenz generiert werden. Aufgrund der gewonnenen Sequenzinformation, wurden die *end-to-end*-Primer 5ANR2 und 3ANR1 entworfen, mit denen ein 1097 bp langer, *full-length* ANR-Klon, mit einem ORF von 340 AS, erzielt wurde.

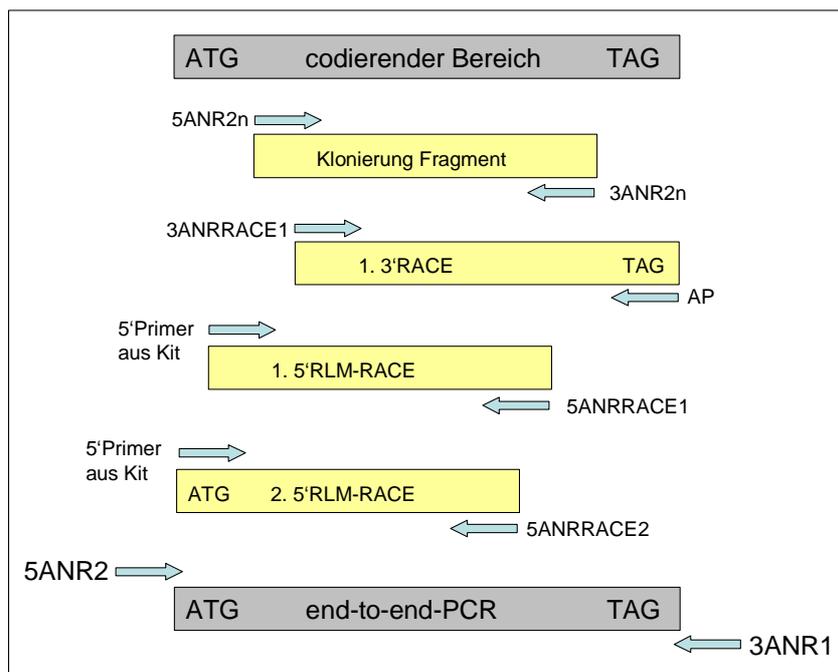


Abb. 18: Klonierungsschema des ANR cDNA-Klons

### C.1.5.2 Sequenzanalyse des ANR Klons

#### C.1.5.2.1 Analyse von Sequenzmotiven

Die Anthocyanidinreduktasen werden, wie von XIE et al. (2003 und 2004) beschrieben, ebenso wie die Leukoanthocyanidin 4-Reduktasen der Isoflavonreduktase ähnlichen Gruppe der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase Superfamilie zugeordnet und gehören somit zur Klasse der Oxidoreduktasen. Die ANR Aminosäuresequenz aus der Sorte ‚Korona‘ zeigt die von Rossmann definierte Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle GXXGXXG/A, beginnend bei G-17 (XIE et al., 2004).

#### C.1.5.2.2 Homologieanalyse verschiedener ANR Sequenzen

Ebenso wie bei der Leukoanthocyanidin 4-Reduktase wurden die bereits in der GenBank veröffentlichten ANR-Sequenzen anderer Pflanzen mit einem Multialignment verglichen. Dieses wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt (Kap. G.5.4). Es wurden die gleichen Sequenzmotive, wie bereits bei der Leukoanthocyanidin 4-Reduktase beschrieben, gefunden. Die charakteristische Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle GXXGXXG/A konnte auch auf der Erdbeer ANR-Sequenz, beginnend bei Position G-17, bestimmt werden. Die Ergebnisse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche sind in folgender Homologiematrix dargestellt (Tab. 8). Die Sequenzidentität der verschiedenen Anthocyanidinreduktasen liegt zwischen 53 und 100 Prozent auf Aminosäureebene. Die Erdbeer ANR zeigt auf AS-Ebene mit 98 bzw. 97 Prozent, höchste Sequenzidentität zu den zwischenzeitlich in der GenBank veröffentlichten *Fragaria x ananassa* ANRs (AccNo. DQ664192, DQ664193) und mit 55 Prozent geringste Homologie zu der ANR von *Ginkgo biloba* (AccNo. AY750963).

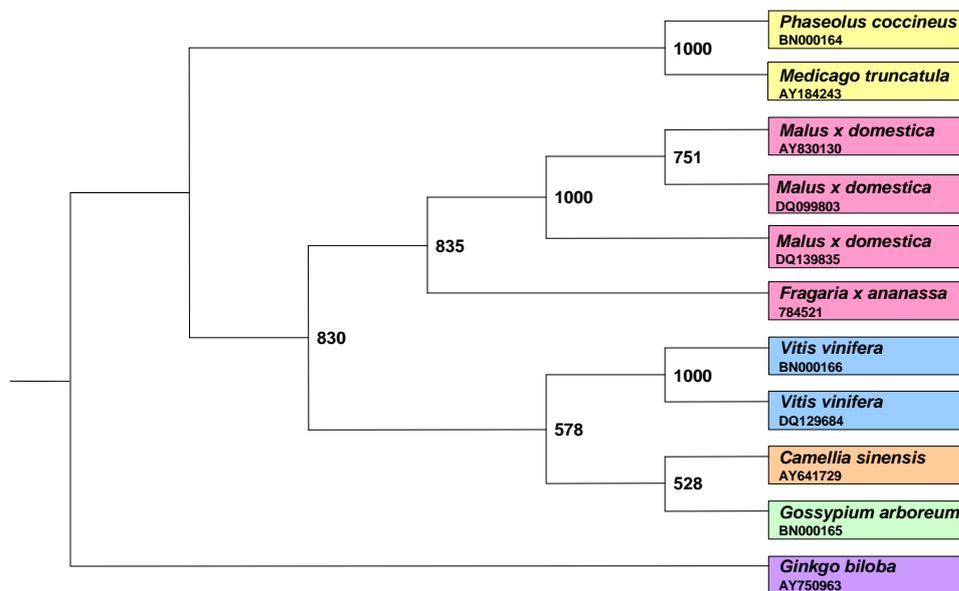
**Tab. 8: Homologiematrix in Prozent verschiedener ANR Sequenzen**

AY641729 (*Camellia sinensis*), BN000166 (*Vitis vinifera*), BN000165 (*Gossypium arboreum*), BN000164 (*Phaseolus coccineus*), AY830130 (*Malus × domestica*), AY750963 (*Ginkgo biloba*), DQ129684 (*Vitis vinifera*), DQ139835 (*Malus × domestica*), DQ099803 (*Malus × domestica*), AY184243 (*Medicago truncatula*), DQ438979 (*Fragaria × ananassa*), DQ664192 (*Fragaria × ananassa*), DQ664193 (*Fragaria × ananassa*). In der oberen rechten Seite sind die Homologien, basierend auf den Nukleotidsequenzen (GenBank) dargestellt, in der linken unteren Hälfte die Homologien, basierend auf den Aminosäuresequenzen.

	AY641729	BN000166	BN000165	BN000164	AY830130	AY750963	DQ129684	DQ139835	DQ099803	AY184243	DQ438979	DQ664192	DQ664193
AY641729		73	63	65	64	48	79	75	63	63	68	64	75
BN000166	82		67	69	67	50	100	79	68	64	70	66	77
BN000165	82	82		62	63	43	77	76	59	62	67	63	74
BN000164	75	75	76		64	50	75	71	64	73	66	65	72
AY830130	79	84	82	74		49	77	99	9864	75	80	83	
AY750963	57	58	59	57	59		57	60	46	48	53	50	58
DQ129684	82	100	82	75	84	58		79	79	71	75	75	77
DQ139835	79	84	82	73	99	59	84		99	70	81	82	83
DQ099803	79	83	82	73	99	59	83	98		63	75	73	83
AY184243	72	73	71	79	74	53	73	74	74		65	64	73
DQ438979	75	76	77	72	81	55	76	81	81	71		94	98
DQ664192	76	78	78	73	82	56	78	82	82	72	98		99
DQ664193	75	77	78	73	82	56	77	82	82	72	97	99	

### C.1.5.2.3 Phylogenetische Analyse verschiedener ANR Sequenzen

In Abbildung 19 ist die phylogenetische Analyse der verschiedenen Anthocyanidinreduktasen dargestellt. Die ANR aus *Fragaria x ananassa* zeigt eine enge Verwandtschaft zu den weiteren Vertretern der Rosaceen (*Malus x domestica*).

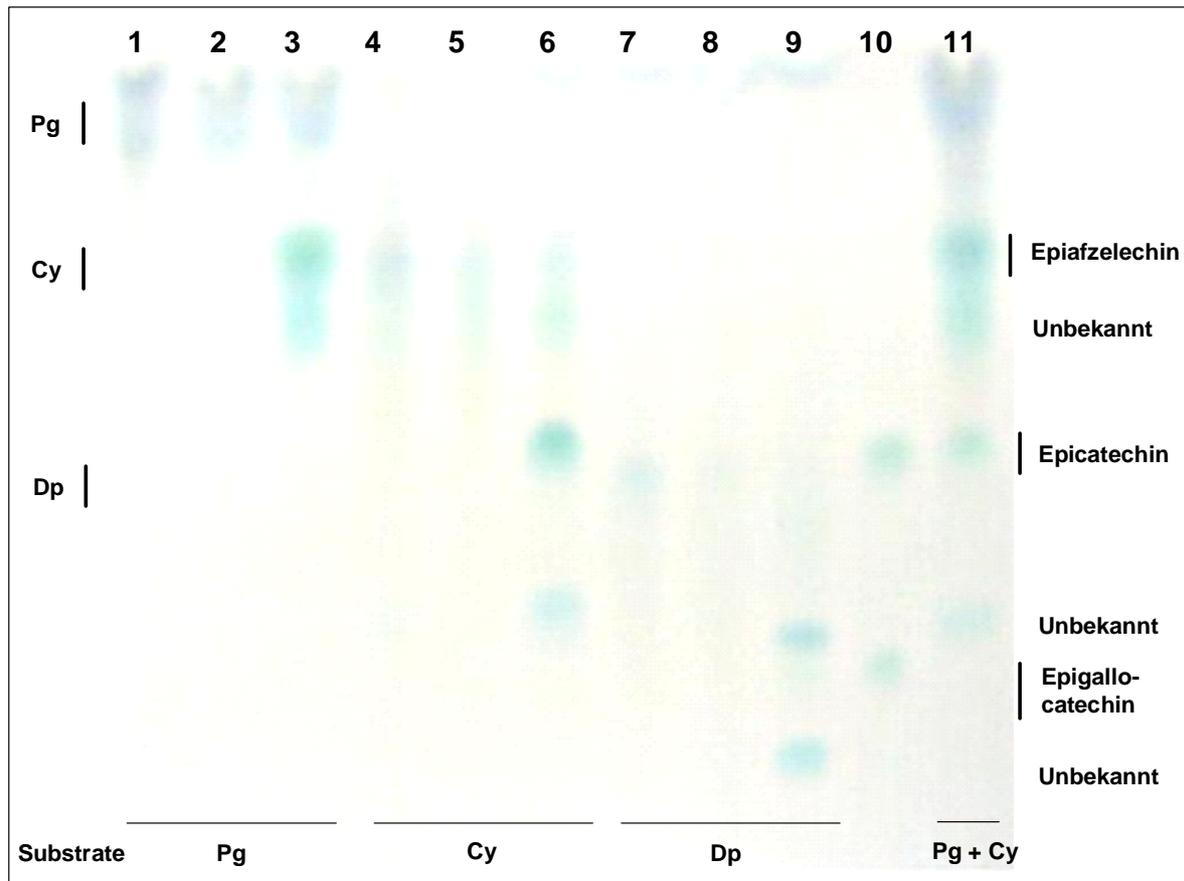


**Abb. 19: Phylogenetische Analyse verschiedener Anthocyanidinreduktasen, basierend auf Aminosäuresequenzen**

Gattungen, die mit der gleichen Farbe dargestellt sind, gehören der gleichen Familie an. Die Zahlen an den Verzweigungen zeigen die Anzahl der positiven Bootstrap Zyklen (total 1000). BN000164 (*Phaseolus coccineus*), AY184243 (*Medicago truncatula*), AY830130 (*Malus x domestica*), DQ099803 (*Malus x domestica*), DQ139835 (*Malus x domestica*), DQ664192 (*Fragaria x ananassa*), DQ438979 (*Fragaria x ananassa*), DQ664193 (*Fragaria x ananassa*), BN000166 (*Vitis vinifera*), DQ129684 (*Vitis vinifera*), AY641729 (*Camellia sinensis*), BN000165 (*Gossypium arboreum*), AY750963 (*Ginkgo biloba*).

### C.1.5.3 Heterologe Expression des putativen ANR cDNA-Klons

Die ANR-Enzymaktivität rekombinanter Proteine, des in Hefe heterolog exprimierten ANR cDNA-Klons, wurde mit den Substraten Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin bestätigt (Abb. 20). Alle drei Substrate wurden von dem cDNA-Klon umgesetzt. Das ANR-Reaktionsprodukt Epicatechin ist, mithilfe der DMAZA-Färbung, als türkisblaue Bande auf der DC-Cellulose-Platte sichtbar gemacht worden.



**Abb. 20: Enzymtests des heterolog in Hefe exprimierten ANR cDNA-Klons und verschiedenen hydroxylierten Anthocyaninsubstraten**

1-3 = Substrat Pelargonidin, 4-6 = Substrat Cyanidin, 7-9 = Substrat Delphinidin. Spuren (1, 4 und 7) = Kontrollreaktionen ohne Enzym. Spuren (2, 5 und 8) = Kontrollreaktionen mit Hefeproteinen, die mit leerem Vektor transformiert wurden. Spuren (3, 6 und 9) = Tests mit rekombinanter *Fragaria* ANR. 10 = Referenzen Epicatechin und Epigallocatechin. 11 = ANR Konkurrenzreaktion mit den Substraten Pelargonidin und Cyanidin. Epiafzelechin könnte evtl. von restlichem Cyanidinsubstrat überlagert sein.

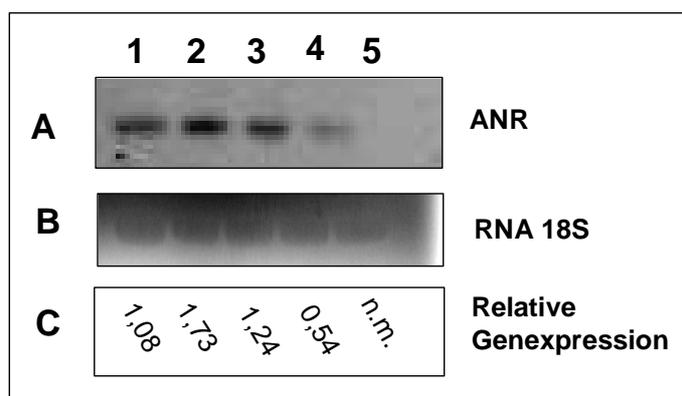
## C.2 Untersuchung der Flavan 3-ol Biosynthese in unbehandelten

### Erdbeerblüten und -früchten

Um den zeitlichen Verlauf der Flavan 3-ol Biosynthese zu bestimmen wurde die ANR mittels Northern Blot Analyse und die LAR über die Quantifizierung der Enzymaktivität untersucht. Dafür wurden unbehandelte Früchte verwendet, um einen Vergleich zu Prohexadion-Ca- und Milsana<sup>®</sup>-behandelten Varianten zu haben. Ferner wurden die Flavan 3-ole mit einer DMAZA-Färbereaktion im Erdbeerfruchtgewebe lokalisiert.

#### C.2.1 Genexpressionsstudie der ANR mittels Northern Blot Analyse

Die ANR Expression in Erdbeerblüten und -früchten der Sorte ‚Elsanta‘ wurde mit Northern Blot Analysen untersucht. Es wurde diese Standardsorte verwendet, da an ihr die gesamte Versuchsdurchführung mit Pflanzenstärkungsmitteln und Wachstumsregulatoren durchgeführt wurde. Die hier dargestellte ANR Genexpression aus unbehandelten Kontrollpflanzen, wird in folgenden Kapiteln mit der behandelten Proben verglichen. Die Hybridisierung erfolgte mit der ANR cDNA der Sorte ‚Korona‘. Wie Abbildung 21 zeigt, begann die ANR-Expression in unbehandelten Kontrollpflanzen bereits in der Blüte und hatte ihren Höhepunkt im BBCH Stadium 71, als der Blütenboden deutlich gewölbt war. Mit zunehmender Fruchtreife nahm die Expression wieder ab. In reifen Früchten war keine ANR-Expression mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen der histologischen DMAZA-Färbereaktionen auf Flavan 3-ole, der verschiedenen Fruchtreifestadien (Kap. C.4).



**Abb. 21: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien**

A. Northern Blot Analyse der Erdbeer ANR, in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien. Jede Spur enthält 7,5 µg RNA. 1 = Blüte (BBCH 65), 2 = Blütenboden weiterentwickelt (BBCH 71), 3 = Kleine grüne Frucht (BBCH 73), 4 = Große grüne Frucht (BBCH 81), 5 = Reife Frucht (BBCH 87).

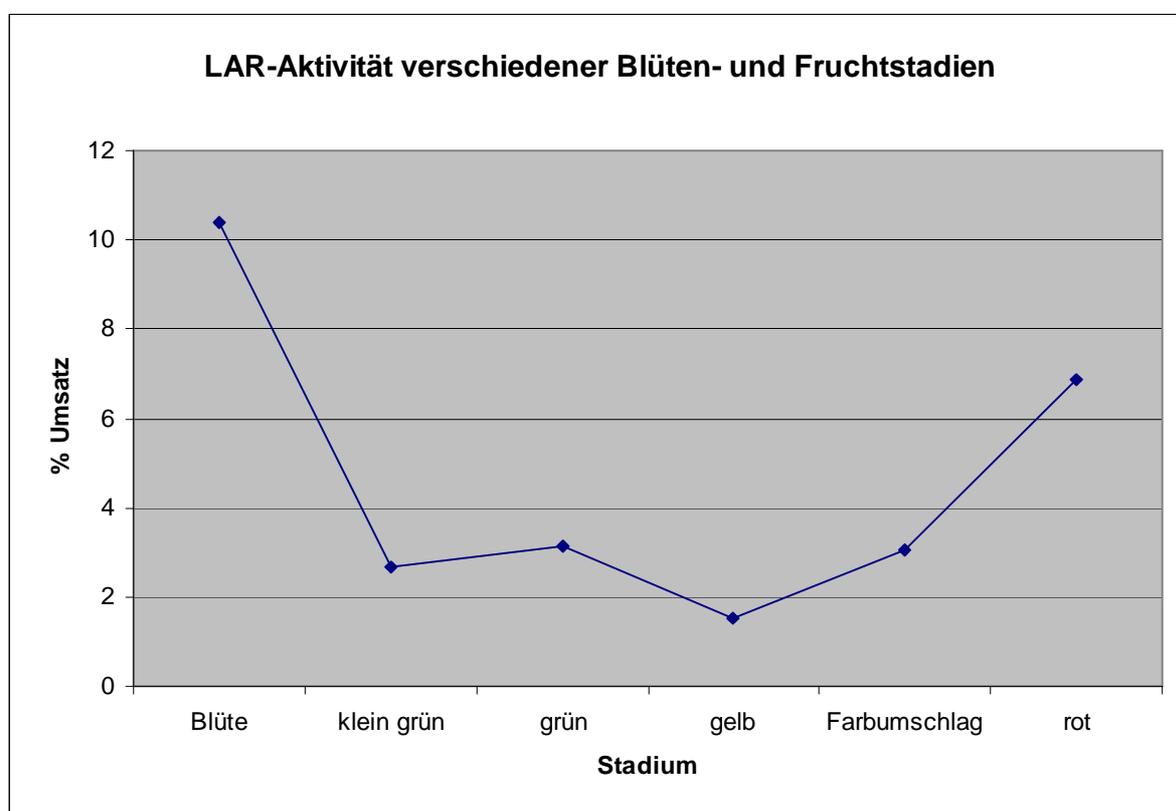
B. 18s RNA auf eine N+-Nylonmembran gebロットet und wie A mit Ethidiumbromid gefärbt.

C. Relative Genexpression der verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien. n.m. = nicht messbar.

## C.2.2 Enzymologische Untersuchung der LAR in Blüten- und Fruchtreifestadien

Erste enzymologische Untersuchungen wurden mit Enzymaufarbeitungen von Blüten und Früchten unterschiedlicher Entwicklungsstufen der Sorte ‚Korona‘ durchgeführt. Im Mittelpunkt des Interesses stand die LAR-Enzymaktivität.

LAR-Tests mussten, aufgrund der Instabilität ihrer Substrate, mit einer vorgeschalteten DFR-Enzymreaktion durchgeführt werden und waren methodisch daher sehr anspruchsvoll. Abbildung 22 zeigt die LAR-Aktivität verschiedener Blüten- und Fruchtstadien. Es gab eine hohe LAR-Aktivität in der Blüte, die mit zunehmender Fruchtentwicklung schnell abnahm. Anders, als bei den, mit der Fruchtentwicklung und –reife abnehmenden Catechin- und Proanthocyanidinkonzentrationen, zeigte die LAR-Enzymaktivität einen unerwarteten Anstieg in späten Fruchtstadien.



**Abb. 22: LAR-Aktivität verschiedener Blüten- und Fruchtstadien**

Die Ansätze enthielten je 15 µg Protein, die Inkubation betrug 30 min bei 25°C. Alle Ansätze mit [<sup>14</sup>C]-DHQ als Substratvorläufer sowie überschüssiger, rekombinanter DFR zur Substratproduktion. 1 = Vollblüte, 2 = Kleine grüne Frucht, 3 = Große grüne Frucht, 4 = Gelbe Frucht, 5 = Frucht beim Farbumschlag von weiß nach rot, 6 = Reife Frucht. Die Auftrennung erfolgte in BAW.

### C.2.3 Lokalisierung der Flavan 3-ole mit DMAZA-Färbereaktionen

Früchte der Stadien 73 bis 87, nach BBCH-Codierung, wurden längs- und quer geschnitten und mit DMAZA-Färbereagenz besprüht. Mit diesem Reagenz konnten die phytopathologisch relevanten Flavan 3-ole blau gefärbt werden (z.B. Catechin, Epicatechin). Nach fünf Minuten Reaktionszeit wurden die Färbungen fotografiert (Abb. 23). Die Schnitte bestätigten die in der Phenolanalytik von PUHL (persönliche Mitteilung, 2006) festgestellten Ergebnisse. Der Gehalt an Flavan 3-olen nahm mit zunehmender Fruchtreife kontinuierlich ab und ist zu der Biosynthese der Anthocyane zeitlich und räumlich komplementär. DMAZA gefärbte Flavan 3-ole fanden sich fast homogen in unreifen, grünen und weißen Früchten. In reifen, roten Früchten waren die Flavan 3-ole auf die Leitbündel und die Epidermis beschränkt.

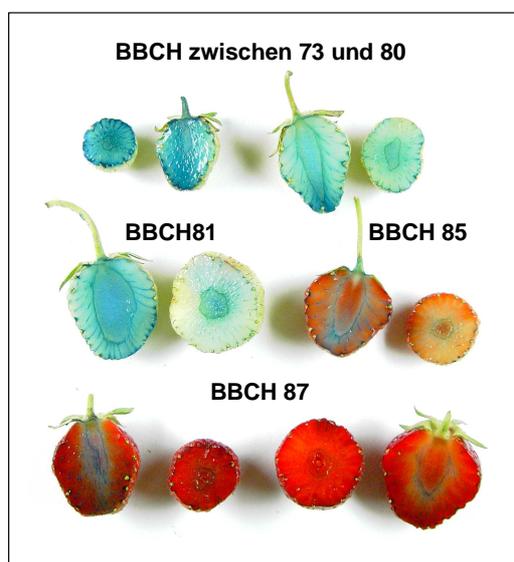
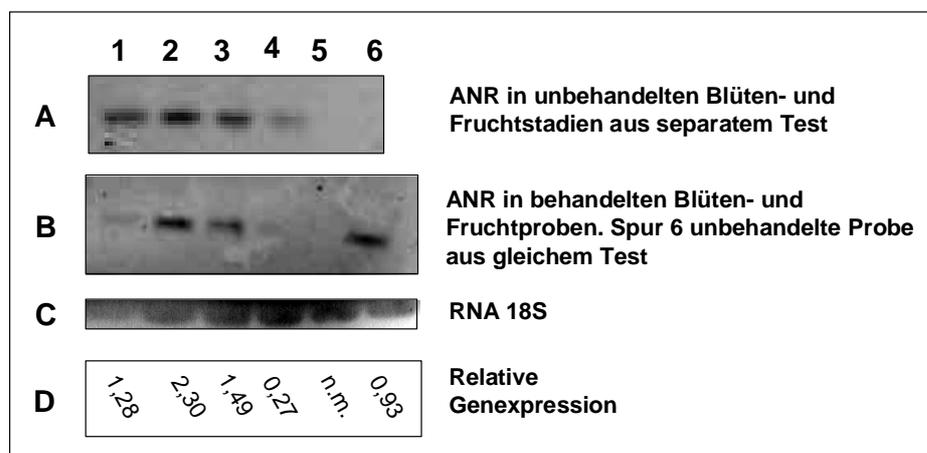


Abb. 23: DMAZA-Färbung bei Früchten der verschiedenen Entwicklungsstadien

### C.3 Behandlung mit Pflanzenstärkungsmitteln und Wachstumsregulatoren

#### C.3.1 Expression des ANR-Gens

Eine Prohexadion-Ca-Behandlung, wie in Kapitel B.1.2.1 beschrieben, bewirkte eine Verzögerung der ANR-Expression in der Blüte (Abb. 24). Dennoch nahm die Expression im Verlauf der Fruchtreife ab. Probe Nummer sechs stellt auf den beiden folgenden Northern Blots die jeweils unbehandelte Kontrolle aus der gleichen Aufarbeitung dar. Sie entspricht damit in den jeweiligen Abbildungen der Spur 1 im Abschnitt A. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf allen Northern Blots aufgetragen, um die Ergebnisse der verschiedenen Blots und Hybridisierungen quantitativ miteinander vergleichen zu können. Nach einer Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca und Milsana<sup>®</sup> zeigte sich eine verfrühte ANR-Expression, die ihren Höhepunkt in der Vollblüte besaß. Schon im Stadium des weiterentwickelten Blütenbodens fiel sie stark ab und nahm, wie bei den anderen Behandlungen, mit zunehmender Fruchtreife weiter ab (Abb. 25). Abbildung 26 zeigt die relative ANR-Expression der unterschiedlichen Behandlungsvarianten. Zu beachten ist, dass die RNA Banden am Rand, aufgrund der verschiedenen Waschgänge, schwächer sind, was aber methodisch nicht verhindert werden kann.



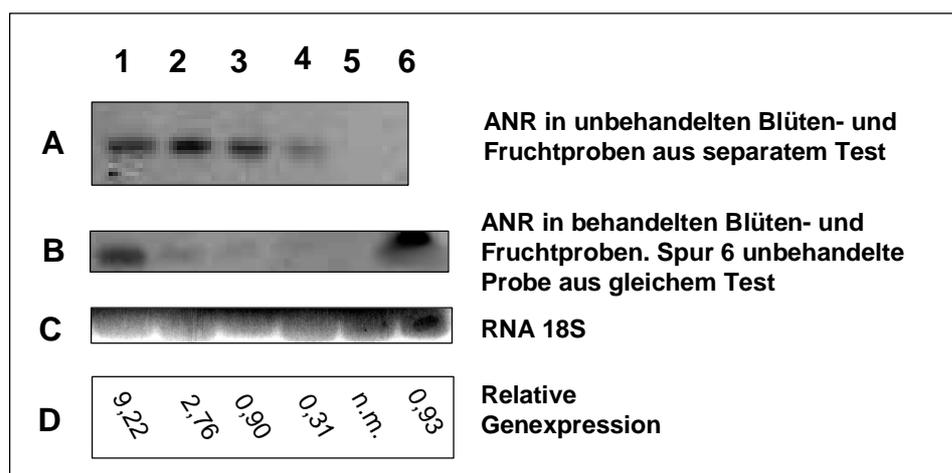
**Abb. 24: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung**

A. Northern Blot Analyse der Erdbeer ANR in verschiedenen unbehandelten Blüten- und Fruchtreifestadien. Jede Spur enthält 7,5 µg RNA. 1 = Blüte (BBCH 65), 2 = Blütenboden weiterentwickelt (BBCH 71), 3 = Kleine grüne Frucht (BBCH 73), 4 = Große grüne Frucht (BBCH 81), 5 = Reife Frucht (BBCH 87).

B. Northern Blot Analyse der Erdbeer ANR in verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung. Jede Spur enthält 7,5 µg RNA. 1 = Blüte (BBCH 65), 2 = Blütenboden weiterentwickelt (BBCH 71), 3 = Kleine grüne Frucht (BBCH 73), 4 = Große grüne Frucht (BBCH 81), 5 = Reife Frucht (BBCH 87), 6 = Hybridisierungskontrolle und entspricht der (Spur 1) Blüte unbehandelt (BBCH 65) aus A.

C. Auf N<sup>+</sup>-Nylonmembran geblottete 18S RNA, wie A mit Ethidiumbromid gefärbt.

D. Relative Genexpression der verschiedenen Blüten- und Fruchtreifestadien. n.m. = nicht messbar.



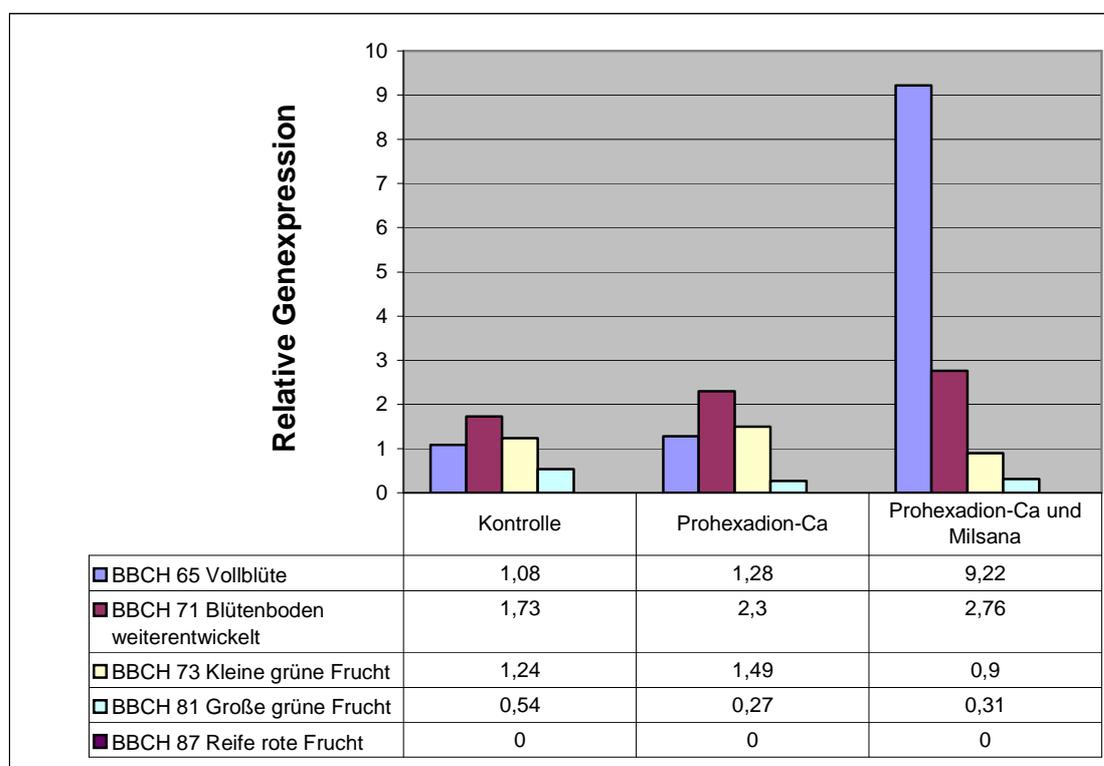
**Abb. 25: ANR Genexpression in verschiedenen Blüten- und Fruchtstadien nach einer Prohexadion-Ca- und Milsana®-Kombinationsbehandlung**

A. Northern Blot Analyse der Erdbeer ANR in verschiedenen unbehandelten Blüten- und Fruchtstadien. Jede Spur enthält 7,5 µg RNA. 1 = Blüte (BBCH 65), 2 = Blütenboden weiterentwickelt (BBCH 71), 3 = Kleine grüne Frucht (BBCH 73), 4 = Große grüne Frucht (BBCH 81), 5 = Reife Frucht (BBCH 87).

B. Northern Blot Analyse der Erdbeer ANR in verschiedenen Blüten- und Fruchtstadien nach einer Prohexadion-Ca und Milsana®-Kombinationsbehandlung. Jede Spur enthält 7,5 µg RNA. 1 = Blüte (BBCH 65), 2 = Blütenboden weiterentwickelt (BBCH 71), 3 = Kleine grüne Frucht (BBCH 73), 4 = Große grüne Frucht (BBCH 81), 5 = Reife Frucht (BBCH 87), 6 = Hybridisierungskontrolle und entspricht der (Spur 1) Blüte unbehandelt (BBCH 65) aus A.

C. Auf N+-Nylonmembran geblottete 18S RNA, wie A mit Ethidiumbromid gefärbt.

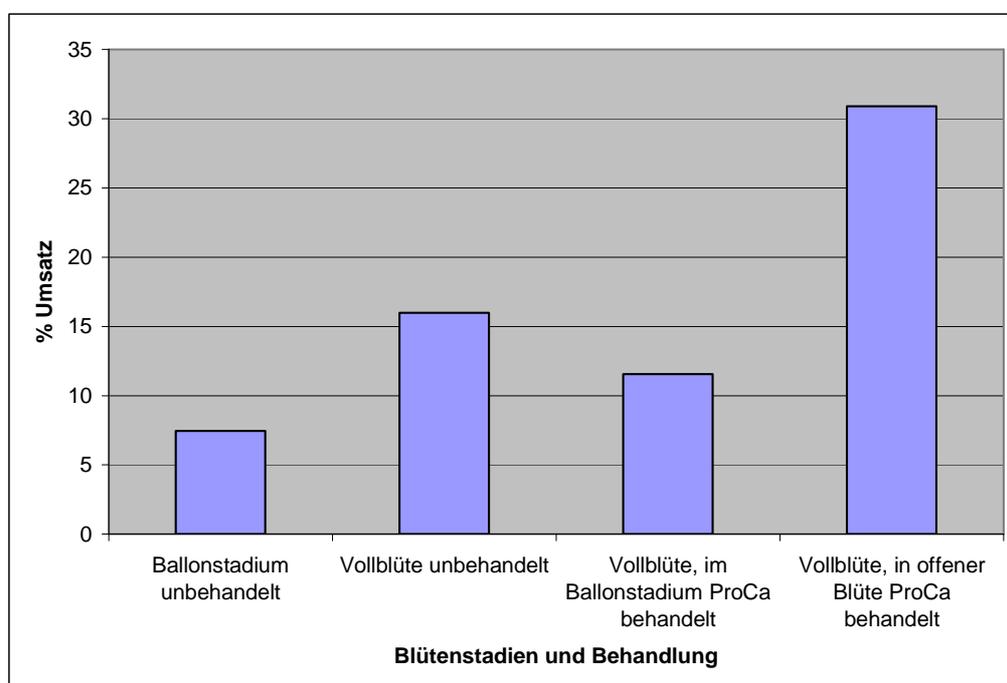
D. Relative Genexpression der verschiedenen Blüten- und Fruchtstadien. n.m. = nicht messbar.



**Abb. 26: Vergleich der relativen Genexpressionen der Erdbeer-ANR aus ‚Elsanta‘, nach unterschiedlichen Behandlungen mit Wachstumsregulatoren bzw. Pflanzenstärkungsmitteln**

### C.3.2 Enzymologische Untersuchung der LAR

Die Inhaltsstoffanalyse von Proben aus dem Versuch 2004 gab den Anhaltspunkt, dass eine Prohexadion-Ca-Behandlung im Blütenstadium die Catechinproduktion beeinflusst (PUHL, persönliche Mitteilung, 2006). Catechine und Proanthocyanidine scheinen eine entscheidende Rolle bei Resistenzmechanismen gegen Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) zu spielen. Es war davon auszugehen, dass die Flavonoidbiosynthese erst nach dem Ballonstadium (BBCH 58) einsetzt. Bei dem Versuch 2005 (Kap. B.1.1.2) wurden deshalb Blüten der Sorte ‚Elsanta‘, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (BBCH 60 und 65), mit Prohexadion-Ca behandelt. Untersuchungen sollten zeigen, wann die Flavonoidbiosynthese einsetzt, und welche Wirkung Prohexadion-Ca ausübt.



**Abb. 27: Vergleich der LAR-Aktivität un behandelter und Prohexadion-Ca-behandelter Blüten**

Die Ansätze enthielten je 25 µg Protein, die Inkubationszeit betrug 30 min bei 25°C. Alle Ansätze mit [<sup>14</sup>C]-DHQ als Substratvorläufer, sowie überschüssiger, rekombinanter DFR zur Substratproduktion. Die Auftrennung erfolgte in BAW.

Die Abbildung 27 zeigt die normale Entwicklung der LAR-Aktivität zwischen Ballonstadium und Vollblüte in un behandelten Blüten. Eine Prohexadion-Ca-Behandlung während des Ballonstadiums führt zu einer Reduktion der LAR Aktivität, gemessen in der Vollblüte. Die LAR-Aktivität wird jedoch bei einem späten Behandlungszeitpunkt in der Vollblüte (BBCH 65) stark stimuliert. Falls es sich dabei um einen gut reproduzierbaren Effekt handeln sollte, wäre damit eine brauchbare Methode zur effizienten Steigerung der LAR-Aktivität und damit eventuell auch der Catechin- und Proanthocyanidin-Gehalte gefunden.

### C.3.3 Wirkungen der Prohexadion-Ca-Behandlung auf die Pflanzen- und Fruchtentwicklung

Nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung stellte sich bei den Erdbeerpflanzen und -früchten ein wachstumsregulierender Effekt ein. So konnten ein deutlich reduzierter Wuchs, geringere Ausläuferbildung und eine dunklere Blattfarbe der Prohexadion-Ca-behandelten Pflanzen festgestellt werden. Weiterhin verlief die Fruchtentwicklung verzögert, der Fruchtbesatz war vermindert und die Nüsschen auf den Früchten dieser Variante waren vergrößert. Die Abbildungen 28 und 29 verdeutlichen diese Phänomene.



Abb. 28: Einfluss von Prohexadion-Ca auf das Pflanzenwachstum

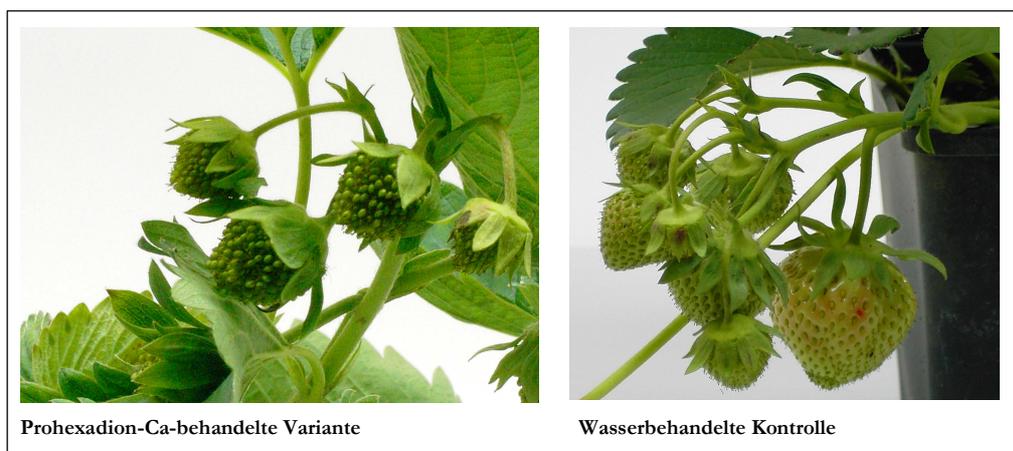


Abb. 29: Einfluss von Prohexadion-Ca auf die Fruchtentwicklung

## D Diskussion

### D.1 Flavonoidbiosynthese in der unbehandelten Erdbeerfrucht

Zu den Zielen der Erdbeerzüchtung zählen unter anderem, Sorten mit verzögerter Fruchtreife und erhöhter Krankheitsresistenz zu erzeugen. Von großem Interesse ist die Erforschung der Pilzkrankheit *Botrytis cinerea* – dem Grauschimmel. An der Resistenz gegen Krankheitserreger sind Polyphenole maßgeblich beteiligt. Besonders im Hinblick auf die resistenz-vermittelnde Wirkung der Flavan 3-ole, sowie der UV-Schutz-verleihenden Wirkung der Flavonole, wurden drei bisher nicht klonierte Gene (FLS, LAR und ANR) als *full-length* cDNA-Klone isoliert und heterolog in Hefe exprimiert. Weiterhin wurde die DFR aus der Sorte ‚Korona‘ kloniert und heterolog in Hefe exprimiert. Sie wurde für kombinierte LAR-Enzymtests verwendet. Die Sequenzinformation der DFR aus der Sorte ‚Thetis‘ stand bereits aus einer Vorarbeit zur Verfügung. Alle vier Gene sind an der Bildung von Flavonoiden in der Erdbeer-Frucht beteiligt, die im menschlichen Körper antioxidativ wirken. Mithilfe molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen dieser Gene und Enzyme, sollten die Hintergründe der Biosynthese wichtiger Erdbeerflavonoide, wie der Flavonole und Flavan 3-ole, aufgeklärt werden. Genexpressionsstudien zeigten einen Einblick in zeitliche und räumliche Regulationsmechanismen der Transkription der ANR. Biochemische Untersuchungen bestimmten die Eigenschaften der Enzyme, die an der Synthese der Flavonole und Flavan 3-ole beteiligt sind. Darauf basierend, und in Kombination mit bereits veröffentlichtem Hintergrundwissen, konnte ein allgemeines Bild des Flavonoidmetabolismus in Erdbeeren erstellt werden. Die Verfügbarkeit dieser Gene für eine wichtige Nahrungspflanze, wie der Erdbeere, eröffnet gute Möglichkeiten, die Biosynthese wichtiger Inhaltsstoffe in den Früchten zu verstehen, weitere molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen und dieses Wissen in moderne Züchtungsprogramme zu integrieren.

#### D.1.1 Klonierung von Flavonoidgenen der Erdbeere

Mittlerweile steht zu allen wichtigen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese ausreichend Sequenzinformation, in Form von ESTs, zur Verfügung, so dass relativ problemlos konservierte Regionen in der Sequenz identifiziert und partiell degenerierte Primer für die Klonierung abgeleitet werden können. Dies ermöglicht die Isolierung von cDNA-Fragmenten über PCR-Strategien, ohne das aufwendigere Anlegen einer cDNA-Bibliothek. Mit partiell degenerierten und genspezifischen Primern konnten cDNA-Fragmente der FLS und ANR und bereits zuvor (GOSCH, 2003) ein *full-length* Klon der DFR isoliert werden. Im Fall der LAR konnte durch eine Kombination eines spezi-

fischen, partiell degenerierten *forward* Primers und eines unspezifischen, an das Poly(A)<sup>+</sup>-Ende bindenden *reverse* Primers, ein cDNA Fragment mit komplettem 3'-Ende isoliert werden.

RACE-Methoden dienen zur Isolierung der fehlenden cDNA-Enden von FLS, LAR und ANR. Die fehlenden 3'-Enden konnten über 3'-RACE problemlos generiert werden. Erhebliche Schwierigkeiten brachte das 5'-RACE-Verfahren. Die umfassenden Einzelschritte dieser Methode ließen nur eine Isolierung eines Fragments, das kleiner als 1 kb war, zu. Weiterhin können hohe GC-Gehalte am 5'-Ende von Genen, störende Sekundärstrukturen der mRNA und ineffiziente *tailing*-Reaktionen Faktoren darstellen, die ein erfolgreiches Durchführen des 5'-RACE-Verfahrens verhindern (FOX et al., 2000). Deshalb wurden die 5'-Enden der cDNAs von der FLS und LAR schrittweise, in zwei Runden 5'-RACE-Prozedur, generiert. Das jeweils neu erhaltene Fragment diente zur Konstruktion neuer, weiter *upstream* liegender, genspezifischer Primer für weitere 5'-RACE-Runden. Da für die LAR Klonierung degenerierte Primer verwendet wurden, die so konzipiert waren, dass sowohl LAR1, als auch LAR2 Klone (bezüglich *Malus*) detektiert werden konnten, besteht Grund zu der Annahme, dass, neben der lediglich einen klonierten und heterolog exprimierten LAR, in der Erdbeere keine zweite LAR exprimiert wird. Da das Verfahren bei der Generierung des 5' Endes der ANR erfolglos blieb, wurde auf ein anderes 5'-RACE-Verfahren zurückgegriffen. Hierbei wurden die notwendigen Modifikationen am 5' Cap bei der mRNA vorgenommen und nicht nach der cDNA-Synthese durch *tailing* oder Ligation eines Adapters. Da inzwischen die Zahl der klonierten Flavonoidgene ständig wächst, lässt sich feststellen, dass viele Gensequenzen, insbesondere innerhalb einer Art, auch an den 3'- und 5'-Enden, hohe Übereinstimmungen aufweisen. Aus diesem Grund liegt die Überlegung nahe, ganz auf RACE-Methoden zu verzichten und die Klonierung von vollständigen cDNA-Enden mittels RT-PCR vorzunehmen. So konnte DEIML (2003) mithilfe eines an der *leader*-Sequenz der F3'5'H von *Osteospermum* angepassten Primers, das vollständige 5'-Ende einer F3'H cDNA aus *Gerbera* generieren.

## D.1.2 Funktion und Substratspezifität

### D.1.2.1 Dihydroflavonol 4-Reduktase

Der im Rahmen dieser Arbeit gewonnene DFR cDNA Klon U1-1 aus Früchten, im Stadium des Farbumschlags von weiß nach rot der Sorte ‚Korona‘, wurde heterolog in Hefe exprimiert. Das rekombinante Enzym verwendete sowohl Dihydrokämpferol, als auch Dihydroquercetin als Substrat (Abb. 10). Eine in einer Vorarbeit klonierte DFR (GOSCH, 2003) aus reifen Früchten der Sorte ‚Thetis‘ zeigte eine hohe Substratspezifität für Dihydrokämpferol, ebenso eine DFR aus reifen Früchten der Sorte ‚Queen Elisa‘ (ALMEIDA et al., 2007). Letztgenannte zeigte nur eine geringe Aktivität mit Dihydroquercetin, Eriodictyol oder Naringenin. Rekombinantes Protein von gleichen cDNAs der DFR aus ‚Thetis‘ wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in Hefe exprimiert (GOSCH 2003, Seitz 2004). Enzymtests zeigten enorme Abweichungen in der Substratspezifität. Tests mit dem Klon der Sorte ‚Thetis‘ im Rahmen dieser Arbeit und von der Arbeitsgruppe Stich in Wien durchgeführt, zeigten keine deutliche Präferenz für Dihydrokämpferol als Substrat (Abb. 10; GOSCH, 2003). SEITZ (2004) stellte eine tendenzielle Präferenz der DFR der Erdbeersorte ‚Thetis‘ für Dihydrokämpferol fest, deren Früchte fast ausschließlich Pelargonidin- und nur wenig Cyaninderivate akkumulieren. Mögliche Ursachen für derartige Unterschiede könnten in den Testbedingungen zu finden sein. So diskutierte GOSCH (2003) unterschiedliche Proteinextraktionsmethoden, Lagerungsverfahren der Proteine (Glycerin), sowie andere Bedingungen der Enzymtests (Puffer und dessen pH Wert) als mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Testergebnisse. SEITZ (2004) zeigte, dass die rekombinante DFR der Sorte ‚Thetis‘ aus einer Mischung von Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin circa dreimal soviel Leukopelargonidin wie Leukocyanidin synthetisiert. Vergleichbare Tendenzen zeigten sich auch, wenn zusätzlich Dihydromyricetin als weiteres Substrat angeboten wurde. Er konnte somit die von GOSCH (2003) festgestellte hohe Substratspezifität für Dihydrokämpferol der Erdbeer DFR grundsätzlich bestätigen. Die DFR scheint auf die Reduktion von Dihydrokämpferol optimiert zu sein. Unter Konkurrenzbedingungen wird Dihydroquercetin deutlich schlechter und Dihydromyricetin kaum reduziert. SEITZ (2004) maß dem pH-Wert des Reaktionspuffer die größten Effekte bezüglich der gemessenen Substratspezifitäten bei. Er stellte mit einem rekombinanten Protein der *Osteospermum* DFR, bei einem pH Wert von 7,5, im Vergleich zu pH 6,8 und 6,0, eine Verdoppelung an gebildetem Leukopelargonidin im Verhältnis zu Leukocyanidin fest. Je höher der pH-Wert des Reaktionspuffers, desto höher war die *in vitro* gemessene Substratspezifität für Dihydrokämpferol und umgekehrt. Somit dürften die von GOSCH (2003) berichteten Unterschiede in der Substratspezifität von rekombinanten Proteinen gleicher cDNA Klone und die dazugehörigen Untersuchungen in dieser Arbeit, zu einem größeren Teil auf die unterschiedlichen pH Werte in den Enzymtests zurückzu-

führen sein. DAVIES (1997) präferiert pH 6,8 für die Untersuchung der Substratspezifität, da dieser Wert den annähernd neutralen Bedingungen im Zytosol eher entspricht. Doch auch mit optimierten Enzymtests, sollten Ergebnisse zur Definition von Substratspezifitäten aus *in vitro* Tests nicht unbedacht auf die Situation *in planta* übertragen werden. Die Reaktionsbedingungen der *in vitro* Enzymtests können die Situation *in vivo* nicht exakt nachahmen. Es wäre möglich, dass die klonierten DFR cDNAs aus den verschiedenen Sorten unterschiedliche Homologe der *dfr* Multigenfamilie in der Erdbeere darstellen, die zu verschiedenen Zeiten oder in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Es wäre ferner möglich, dass die, aus vollreifen Früchten klonierten, DFRs aus ‚Queen Elisa‘ und ‚Thetis‘ mit der Anthocyanbiosynthese gekoppelt sind. Bei der aus der ‚Korona‘-Frucht beim Farbumschlag von weiß nach rot klonierten DFR dagegen, könnte es sich um ein Homolog handeln, das eine breitere Substratspezifität besitzt und somit unter anderem eine Bildung von unterschiedlich hydroxylierten Flavan 3-olen begünstigt. Solange nicht unterschiedliche Homologe kloniert und charakterisiert werden, können keine abschließenden Aussagen über mögliche unterschiedliche Substratspezifitäten getroffen werden. Außerdem können *in vitro* Untersuchungen einzelner Enzymreaktionen nicht die Situation in der Pflanze widerspiegeln, wo noch undefinierbare Mechanismen wie zum Beispiel *metabolic channeling* stattfinden können. Ebenso könnten unterschiedliche Anthocyanmuster in den drei Sorten ‚Thetis‘, ‚Queen Elisa‘ und ‚Korona‘ vorhanden sein. Um die DFR als Schalterpunkt der Flavonoidbiosynthese zu untersuchen, wäre es erforderlich, diverse DFR cDNAs aus den unterschiedlichen Reifestadien der Erdbeerfrucht zu klonieren und diese heterolog in der Pflanze zu exprimieren. Für genauere Aussagen müsste eine DFR aus Früchten später Reifestadien in Früchten früher Fruchtstadien, oder umgekehrt, oder konstitutiv, exprimiert werden.

Solange die Substratspezifität der DFR nicht eindeutig belegt wird, muss weiterhin die Frage erörtert werden, ob die Dominanz der Pelargonidin-Derivate, im Vergleich zu den Cyanidin-Derivaten, auf eben diese Substratspezifität der DFR oder eine schwache Aktivität der F3'H zurückzuführen ist. AHARONI et al. (2001) vermuteten, dass ein spezifischer Rückgang von Quercetin, im Vergleich zu Kämpferol, in FaMYB1-überexprimierten Tabaklinien, auf eine Reduzierung der F3'H-Aktivität zurückzuführen ist. Allerdings konnte keine F3'H aus Erdbeere kloniert und genauer charakterisiert werden und somit nicht verifiziert werden, ob die F3'H unter dem Einfluss von FaMYB1 in FaMYB1 exprimierenden Pflanzen steht.

JOHNSON et al. (2001) zeigten, dass die DFR Substratspezifität einiger Pflanzenarten, durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure, verändert werden kann. Diese ist aber nicht allein für die Substratspezifität verantwortlich. Von den bekannten Erdbeer DFRs sind die jeweiligen AS-Sequenzen der „Substrate specificity determining region“ (SSDR) laut JOHNSON et al. (2001) in Abb. 30 dargestellt.



### D.1.2.2 Flavonolsynthase

Das rekombinante Protein der in Hefe heterolog exprimierten *Fragaria* ‚Korona‘ FLS cDNA, zeigte eine schwache, aber eindeutig nachweisbare FLS-Aktivität. Es wurde sowohl das Substrat Dihydrokämpferol als auch Dihydroquercetin akzeptiert. Die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Rosati von ALMEIDA et al. (2007) klonierte und heterolog in Hefe exprimierte *Fragaria* ‚Queen Elisa‘ FLS cDNA zeigte zusätzlich eine Nebenfunktion als FHT. Sie konnte Flavanone zu Dihydroflavonolen umbilden. Mit der, in dieser Arbeit klonierten, ‚Korona‘ FLS wurden keine Nebenreaktionen mit Nicht-FLS-Substraten getestet. Nach ALMEIDA et al. (2007) zeigte die FLS aus ‚Queen Elisa‘ eine Substratpräferenz für Dihydrokämpferol und Naringenin. Da sich mengenmäßig mehr Quercetin- als Kämpferolderivate in ‚Queen Elisa‘ Früchten akkumulieren, stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein von Quercetin ausschließlich auf die FLS-Reaktion mit Dihydroquercetin oder auf eine F3'H-Aktivität und somit eine Umsetzung von Kämpferol zu Quercetin zurückzuführen ist. In Früchten der Sorte ‚Korona‘ sind die Flavonole Quercetin und Kämpferol zu gleichen Teilen vorhanden (unpubliziert). Ein interessanter Aspekt wäre hier die Prüfung potenziell unterschiedlich starker F3'H-Aktivitäten in den verschiedenen Erdbeersorten. Schon 2002 vermuteten PRESCOTT et al., dass die *Arabidopsis* FLS als FHT arbeitet und beide Enantiomere von Naringenin verwenden kann. WELLFORD et al. (2001) zeigten, dass rekombinante ANS von *Arabidopsis thaliana* aus Naringenin Dihydrokämpferol und zu geringem Umfang Kämpferol bilden kann. Multifunktionale FLS Gene besitzen auch *Citrus unshiu* und *Petroselinum crispum* mit breiter Substratspezifität. Diese zeigte auch eine rekombinante ANS aus *Gerbera*. Dagegen verhielten sich die rekombinante FHT aus *Petunia* und die rekombinante FNS I aus *Petroselinum* viel selektiver (LUKAČIN et al., 2003; MARTENS et al., 2003). Folglich gehören ANS und FLS zu einer Gruppe von Dioxygenasen mit einer breiten Substratspezifität, während FNS I und FHT selektiver arbeiten und wie es scheint, eine separate Gruppe von Dioxygenasen bilden, in Übereinstimmung mit dem hohen Grad an Sequenzhomologie (MARTENS et al., 2003). Sequenzvergleiche weisen auf eine nähere Verwandtschaft der ANS zur FLS, als zur FHT hin. Es wäre möglich, dass sich die Multifunktionalität der FLS aus einer multifunktionalen Dioxygenase herausentwickelt hat. Ebenso könnte die Evolution der FLS, der der FHT gefolgt sein.

### D.1.2.3 Leukoanthocyanidin 4-Reduktase

Das rekombinante Protein, der klonierten und heterolog in Hefe exprimierten LAR cDNA aus *Fragaria*, zeigte *in vitro* Umsatz von Leukocyanidin zu Catechin. Weiterhin besitzt die LAR eine Präferenz und somit eine höhere Aktivität bei 3',4'-hydroxylierten Substraten. Neben Leukocyanidin wurde Leukopelargonidin als Substrat verwendet, aber nur in Spuren zu Afzelechin umgesetzt. Die Erdbeer LAR ist auch in der Lage, das 3-Deoxyleukocyanidin Luteoforol zu dem 3-Deoxycatechin Luteoliflavan umzusetzen. PFEIFFER et al. (2006) klonierten zwei LAR cDNAs aus Apfelblättern. Die rekombinanten Proteine setzten sowohl Leukocyanidin als auch Leukodelphinidin um. Aber nur die *Malus* LAR2 konnte signifikant Leukopelargonidin als Substrat verwenden. Beide *Malus* LARs setzten Luteoforol zu Luteoliflavan um. Rekombinante Proteine, der von PFEIFFER et al. (2006) klonierten und heterolog exprimierten LAR1 und LAR2 cDNAs aus *Vitis* Blättern, akzeptierten alle drei Leukoanthocyanidine (Leukopelargonidin, Leukocyanidin und Leukodelphinidin) als Substrate. Auch bei *Vitis* sind beide LARs in der Lage, Luteoforol zu Luteoliflavan umzusetzen. Sowohl in *Malus* als auch in *Vitis* steht die breite Substratspezifität dem Vorhandensein von spezifischen und unterschiedlich hydroxylierten Flavan 3-olen gegenüber. In *Vitis* werden ausschließlich 3'4'- und 3'4'5'-hydroxylierte Flavan 3-ole (Catechin und Gallocatechin) gebildet. Da die *Vitis* DFR keine Substratpräferenz besitzt, könnte das Fehlen von 4'-hydroxylierten Flavan 3-olen auf eine starke F3'H und F3'5'H-Aktivität zurückzuführen sein. In *Malus* konnten nur 3'4'-hydroxylierte Catechine detektiert werden. Das lässt auf eine starke F3'H-Aktivität schließen, mit Naringenin und Dihydrokämpferol als verwendete Substrate. Das gewonnene 3'4'-hydroxylierte Leukocyanidin stellt eine Vorstufe von Catechin, Cyanidinglykosiden und Epicatechin dar.

### D.1.2.4 Anthocyanidinreduktase

Das rekombinante Protein, der in Hefe heterolog exprimierten *Fragaria* ‚Korona‘ ANR cDNA, konnte *in vitro* die Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin in die korrespondierenden Flavan 3-ole mit gleicher Effizienz umwandeln und zeigte somit keine Präferenz betreffend der B-Ring-Hydroxylierung der Substrate. *In vivo* stehen der ANR aber, allen Anschein nach, Delphinidin und Pelargonidin nicht als Substrat zur Verfügung, so dass Epigallocatechin und Epiafzelechin in Erdbeerfrüchten nicht detektierbar sind. Als Ursache für das Fehlen von Epiafzelechin könnte eine sehr hohe F3GT-Aktivität in Betracht gezogen werden, was das Vorhandensein von Pelargonidin-3-Glycosid andeutet. Der Mangel an 3'4'5'-hydroxylierten Produkten könnte auf eine sehr schwach ausgeprägte F3'5'H oder auf ihr Fehlen zurückzuführen sein. PFEIFFER et al. (2006) charakterisierten ANRs aus *Vitis* und *Malus* Blättern. Beide ANRs verwendeten, wie die Erdbeer ANR, die drei Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin als

Substrate und bildeten die entsprechenden Flavan 3-ole. In beiden Fällen stimmten die Ergebnisse der rekombinanten Enzyme mit den Enzympräparationen aus Apfel- und Weinblättern überein. Auch wenn die ANR eine breite Substratakzeptanz besitzt, kommen bei Apfel fast ausschließlich 3'4'-hydroxylierte, bei *Vitis* 3'4' und 3'4'5'-hydroxylierte Flavan 3-ole vor. Diese Diskrepanz, wie sie auch in der Erdbeere auftritt, sollte im Zusammenhang des gesamten Flavonoidmetabolismus betrachtet werden, was im Kapitel D.1.3.3 genauer erörtert wird.

#### **D.1.2.5 Weitere Flavonoidenzyme**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Rosati wurden des Weiteren rekombinante Proteine von Erdbeer FHT, ANS und F3GT cDNAs untersucht. Rekombinante Proteine der FHT und ANS zeigten höhere Aktivität mit 3',4'-hydroxylierten Substraten. Die ANS erwies sich als trifunktionales Enzym, da sie Nebenaktivitäten als FHT und FLS besitzt. Sie konnte Flavanone direkt in Flavonole und Dihydroflavonole in Flavonole umwandeln. Die F3GT zeigte eine breite O-Glykosyltransferase-Aktivität bei Anthocyanidinen und Flavonolen. Sie besaß eine Präferenz für 3',4'-hydroxylierte Verbindungen, wie Cyanidin und Quercetin, akzeptierte aber auch 3',4',5'-hydroxyliertes Delphinidin (ALMEIDA et al., 2007).

### **D.1.3 Flavonoidbiosyntheseweg in Erdbeerfrüchten**

#### **D.1.3.1 Flavonoid- und Proanthocyanidinverbindungen in Erdbeerfrüchten**

In Erdbeerfrüchten konnten bisher die in Tabelle 9 aufgelisteten Flavonoid- und Proanthocyanidinverbindungen detektiert werden.

Tab. 9: Detektierte Flavonoid- und Proanthocyanidinstoffklassen in *Fragaria x ananassa*

Stoffklasse	3'4'-hydroxyliert	4'-hydroxyliert	3'4'5'-hydroxyliert	Referenz
Flavonole	Quercetin* Qu-3-Galactosid Qu-3-Glucosid Qu-3-Glucuronid Qu-3-Xyloglucuronid Qu-3-Xylosylglucuronid	Kämpferol* Km-3-Galactosid Km-3-Glucosid Km-3-Glucuronid Km-3-Xyloglucosid Km-3-Xyloglucuronid Km-3-Xylosylglucuronid Km-3-Xylosylglucosid	Myricetin	ALMEIDA et al., 2007 KOSAR et al., 2004 HÄKKINEN und TÖRRÖNEN, 2000 HÄKKINEN et al., 1999 HÄKKINEN et al., 1998 MIKKONEN et al., 2002 GIL et al., 1997 SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004 *DEIML, unveröffentlicht
Leukoanthocyanidine	Leukocyanidin			CO und MARKAKIS, 1968
Anthocyane	Cy-3-Glucosid 1 weiteres Cy-Glykosid Cyanidin-3-Glycosid-Malonat	Pg-3-Glucosid Pg-3-Arabinosid 4 weitere Pg-Glykoside Pg-3-Rutinoside Pg-3-Glucosid-Malonat		KOSAR et al., 2004 GOIFFON et al., 1999 BAKKER et al., 1992 GIL et al., 1997 SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004 ALMEIDA et al., 2007 AABY et al., 2005
Flavan 3-ole	Catechin * Epicatechin *	Afzelechin	Gallocatechin	STÖHR und HERRMANN, 1975 SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004 YAMADA et al., 1998 CO und MARKAKIS, 1968 ALMEIDA et al., 2007 ISHIMARU et al., 1995 * DEIML, unveröffentlicht
Proanthocyanidine	B3, B6			YAMADA et al., 1998 ISHIMARU et al., 1995
Dimere	Qu-3-Glucuronid-Km-3-Glucosid Km-3-Glucosid-Km-3-Glucuronid Catechin(4 $\alpha$ - 8) Pg-3-O- $\beta$ -Glucopyranosid Epicatechin(4 $\alpha$ - 8) Pg-3-O- $\beta$ -Glucopyranosid Afzelechin(4 $\alpha$ - 8) Pg-3-O- $\beta$ -Glucopyranosid Epiafzelechin(4 $\alpha$ - 8) Pg-3-O- $\beta$ -Glucopyranosid Epicatechin-Epicatechin, Catechin-Catechin, Epicatechin-Catechin Epiafzelechin-Catechin, Epiafzelechin-Epicatechin Afzelechin-Catechin, Afzelechin-Epicatechin Epiafzelechin-Pg-3-Glucosid Afzelechin-Pg-3-Glucosid			GIL et al., 1997 FOSSEN et al., 2004 LUNKENBEIN et al., 2006 ISHIMARU et al., 1995

### D.1.3.2 Lokalisierung von Flavan 3-olen und Anthocyanen in der reifenden Erdbeerfrucht

Die hohen Gehalte an Anthocyanen und geringe Mengen an Flavonolen und Flavan 3-olen in reifen Erdbeerfrüchten deuten auf eine Anreicherung der Anthocyane auf Kosten der genannten Stoffklassen hin. Während der Fruchtreife, sind schon die Abnahme des adstringierenden Geschmacks, basierend auf Flavan 3-olen und Proanthocyanidinen, die Bildung von flüchtigen Aromastoffen, der Anstieg des Zuckergehalts, das Weichwerden und die kräftig rote Anthocyanpigmentierung der Früchte, Anzeichen für stoffliche Veränderungen. Die Verteilung der farbigen Anthocyane ist optisch leicht zu verifizieren, jedoch ist dies, für Flavan 3-ole, nicht direkt möglich. Da bisher keine Informationen über die Lokalisierung dieser Stoffe vorhanden waren, wurden Längs- und Querschnitte bei Früchten verschiedener Reifestadien, mit anschließender Färbung der Flavan 3-ole, mit DMAZA durchgeführt (Kap. B.2.4 und C.2.3). Flavan 3-ole gehen mit dem aromatischen Aldehyd, dem p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA), eine äußerst empfindliche Reaktion ein, bei der die, normalerweise ungefärbten Flavan 3-ole, in einen intensiv blau gefärbten Farbkomplex umgewandelt werden. Von den weißen zu den roten Fruchtstadien nahm die Flavan 3-ol abhängige DMAZA-Färbung in allen Geweben bis auf die Leitbündel ab, während die Anthocyanfärbung anstieg. Die DMAZA-Färbung zeigte sich in weißen Fruchtstadien in Gefäß-, Epidermis- und Fruchttinnengewebe und war bei reiferen Fruchtstadien auf die Leitgefäße limitiert. Dieser Aspekt könnte für eine entwicklungspezifisch regulierte, gewebespezifische Anreicherung der Flavan 3-ole in Erdbeerfrüchten sprechen. JERSCH et al. (1989) belegten in diesem Zusammenhang eine negative Korrelation zwischen Proanthocyanidingehalt und Pilzwachstum von *Botrytis cinerea* in Erdbeerfrüchten.

### D.1.3.3 Klonierungen

Aus der Erdbeere konnten bisher, einschließlich dieser Arbeit, die CHS, CHI, FHT, DFR, ANS, F3GT, FLS, LAR und ANR erfolgreich kloniert und charakterisiert werden. Somit konnte die Entstehung aller bisher detektierten Flavonoidverbindungen in der Erdbeerfrucht nachvollzogen werden. FLS, LAR und ANR wurden das erste Mal aus *Fragaria* kloniert. Sie sind an der Bildung wichtiger Antioxidantien beteiligt, und werden als Resistenzfaktoren in Betracht gezogen. Gene konnten, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, kloniert und die Genexpression und die Substratspezifitäten der entsprechenden Enzyme festgelegt werden. Mit der Klonierung und Charakterisierung der F3'H und der F3'5'H bleibt allerdings ein wichtiger Schritt zum vollständigen Verständnis des Hydroxylierungsmusters in Erdbeerfrüchten offen. Denn ohne eine Charakterisierung der F3'H ist es schwierig, genaue Aussagen über frühe Schritte der Flavonoidbiosynthese

zu machen. In Erdbeeren wurden bisher vor allem 4'- und 3'4'-hydroxylierte Vertreter der Stoffklassen Flavonole, Anthocyane und Flavan 3-ole bestimmt (Tab. 9). HÄKKINEN et al. (1998) detektierten das 3'4'5'-hydroxylierte Myricetin, STÖHR und HERRMANN (1975) Galocatechin in Erdbeerfrüchten. Da bisher keine Flavanone oder Dihydroflavonole detektiert wurden, kann spekuliert werden, dass nur Naringenin über eine PAL und CHS /CHI-Aktivität gebildet wird, da die Verwendung von Kaffeoyle-CoA als Substrat für die CHS nicht weit verbreitet ist. Ein funktioneller Beweis für die Verwendung von Kaffeoyle-CoA wurde bisher von SPRINGOB et al. (2000) in *Ruta* und von CHRISTENSEN et al. (1998) in UV- oder elicitorbehandelter Petersilie erbracht. Die FHT bevorzugt Naringenin als Substrat zur Bildung von Dihydrokämpferol. Somit scheinen Eriodictyol und Dihydroquercetin nicht direkt über eine CHS / FHT-Reaktion, sondern auch über eine F3'H-Reaktion gebildet zu werden; ebenso Dihydromyricetin über die entsprechende F3'5'H-Reaktion. Allerdings scheint letzt genannte nur schwach exprimiert zu sein, da nur Spuren von Myricetin nachgewiesen werden konnten. Es könnte jedoch auch eine Spezifität der FLS für 4'- und 3'4'-hydroxylierte Substrate vorliegen. Flavonole kamen meist zu nahezu gleichen Anteilen als 4'-hydroxylierte Kämpferol- und 3'4'-hydroxylierte Quercetinderivate vor. Myricetin fand sich nur in Spuren. Die mengenmäßige Verteilung der beiden Hauptflavonole variierte stark zwischen den analysierten Sorten. Dabei zeigten sowohl die Sorte, als auch das Anbaugebiet und die Anbautechnik starken Einfluss auf die Flavonolmenge und -zusammensetzung. Ebenso erschwerten unterschiedliche Analysemethoden verschiedener Arbeitsgruppen den direkten Vergleich der erzielten Ergebnisse (HÄKKINEN, 2000; ALMEIDA et al., 2005; KOSAR et al., 2004; HÄKKINEN und TÖRRÖNEN, 2000; HÄKKINEN et al., 1999; HÄKKINEN et al., 1998; MIKKONEN et al., 2002; GIL et al., 1997; SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004). Die DFR besitzt vermutlich eine Substratpräferenz für Dihydrokämpferol. Damit kann das verstärkte Auftreten von Pelargonidinderivaten im Vergleich zu Cyanidinderivaten erklärt werden. Den Hauptanteil an Anthocyanen stellen die 4'-hydroxylierten Pelargonidinderivate (Pelargonidin-3-O-Glucoside, Pelargonidin-3-O-Malonyl-Glucosid, Pelargonidin-3-O-Arabinosid, Pelargonidin-3-O-Rutinosid). Nur zwei unterschiedliche Cyanidin-Glucoside konnten in Spuren nachgewiesen werden (KOSAR et al., 2004; GOIFFON et al., 1999; BAKKER et al., 1992; GIL et al., 1997; SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004; ALMEIDA et al., 2007). Flavan 3-ole waren hauptsächlich als 3',4'-hydroxyliertes Catechin oder Epicatechin vorhanden und Proanthocyanidine als Di- oder Polymere beider Stoffe (STÖHR und HERRMANN, 1975; SKUPIEN und OSZMIANSKI, 2004; YAMADA et al., 1998; CO und MARKAKIS, 1968; DEIML, unveröffentlicht). Nur STÖHR und HERRMANN (1975) konnten 3'4'5'-hydroxyliertes Galocatechin nachweisen. Weiterhin fand die Arbeitsgruppe von D'Amico heraus, dass Catechin hauptsächlich als *terminal unit* und Epicatechin als *extension unit* in Proanthocyanidinen der Erdbeerfrucht benutzt wird (ALMEIDA et al., 2007). Das weist darauf hin, dass in der Erdbeere die LAR das Schlüsselenzym in der Initiation

der Proanthocyanidine ist, während die ANR die Substrate für die Proanthocyanidin Oligo- und Polymersynthese bereit stellt. Die FLS, ANS und F3GT zeigten einen Anstieg der Transkriptmengen bis zum Zeitpunkt des Farbumschlags von weiß nach rot. Danach wurde die FLS herunterreguliert, und die ANS und F3GT stark hochreguliert. Dadurch wird die Konkurrenz von Flavonolen, Flavan 3-olen und Anthocyanen in den reifen Fruchtstadien verdeutlicht, wie auch von TAKOS et al. (2006) für *Malus* beschrieben. Bisher konnte keine Flavonoid 3'- oder Flavonoid 3'5'-Hydroxylase aus der Erdbeere kloniert und charakterisiert werden. Deshalb bleibt die Frage offen, welche Gene den Hydroxylierungsstatus regulieren. In frühen Fruchtstadien dominieren 3'4'-hydroxylierte Flavonoide, in späten Fruchtstadien die 4'-hydroxylierten. Das Hydroxylierungsmuster der Erdbeerflavonoide kann prinzipiell von verschiedenen Faktoren bestimmt werden, die zeitgleich oder getrennt voneinander auftreten. Zum einen wäre eine Substratspezifität der CHS (Kaffeoyl-CoA oder Cumaroyl-CoA) zu nennen. Die CHS kann theoretisch die beiden Substrate Kaffeoyl-CoA oder Cumaroyl-CoA verarbeiten, wobei die Verwendung von Kaffeoyl-CoA nicht sehr verbreitet ist. Sie würde so auf direktem Weg den Stofffluss Richtung ein- oder zweifach-hydroxylierter Flavonoidverbindungen lenken. Weiterhin ist die bereits erwähnte Substratpräferenz der FHT für Naringenin vorhanden. Eine F3'H-Aktivität mit Flavanonen und / oder Dihydroflavonolen erklärt das in etwa mengenmäßig gleiche Vorhandensein von Quercetin und Kämpferol. Es scheint, dass die F3'5'H-Aktivität dagegen nur sehr schwach ausgebildet ist und die 4'-hydroxylierten Substrate von der F3'H zu den entsprechenden Verbindungen umgesetzt werden. Eventuell dienen aber unerwarteterweise auch 4'-hydroxylierte Anthocyanvorstufen (Leukopelargonidin und Pelargonidin) oder Flavan 3-ole (Afzelechin oder Epiafzelechin) als Substrate für die F3'H. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, warum fast ausschließlich 3',4'-hydroxyliertes Catechin und Epicatechin frei vorhanden sind. Allerdings konnten von FOSSEN et al. (2004) Afzelechin- und Epiafzelechin-enthaltende Dimere identifiziert werden und von STÖHR und HERRMANN (1975) Gallo-catechin. Das bedeutet, dass nicht die gesamte Menge an 4'-hydroxylierten Flavonoidverbindungen durch die F3'H umgeleitet werden würde, sie aber dominierenden Charakter besäße. Hierzu müssen noch genauere Untersuchungen durchgeführt werden. Die bereits diskutierte, mögliche und ungewöhnliche, Substratpräferenz der DFR für Dihydrokämpferol würde für die Anreicherung von 4'-hydroxylierten Pelargonidinderivaten in der reifen Frucht sprechen. Ebenso muss die Koexistenz multipler (Iso)Enzyme in Betracht gezogen werden. Diese besitzen vermutlich unterschiedliche katalytische Eigenschaften, die räumlich und zeitlich reguliert werden und einzelne Endprodukte ansteigen lassen könnten (WINKEL, 2004). Es scheint, dass die frühe Aktivität der PAL, CHS, CHI, FHT und ANS der Bereitstellung von Substraten für die Bildung von Flavan 3-olen dient, der späte Anstieg der Aktivität dann zur Bildung von Flavonolen und Anthocyanen. Die Transkriptmenge der DFR steigt während der Fruchtreife permanent an. LAR und ANR werden in

Blüten- und frühen Fruchtreifestadien exprimiert, um die Bildung von Flavan 3-olen und Proanthocyanidinen zu ermöglichen. Die späten Aktivitäten der FLS und F3GT dienen der Bildung von Anthocyanen und Flavonolen. Auffällig ist, dass Anthocyane in den reifen Früchten hauptsächlich in 4'-hydroxylierter Form vorkommen, die Verbindungen der Flavan 3-ole hauptsächlich in 3'4'-hydroxylierter Form. Flavonole kommen zu etwa gleichen Teilen als 3'- und 3'4'-hydroxylierte Verbindungen vor und müssen schon vor der Bildung der Anthocyane als Copigmente zum Schutz der Anthocyane zur Verfügung stehen. Somit könnte auch eine zeitliche Begrenzung der F3'H-Aktivität ins Auge gefasst werden.

Aufgrund der vorangegangenen Erläuterungen lässt sich folgendes Flavonoidbiosyntheschema ableiten (Abb. 31).

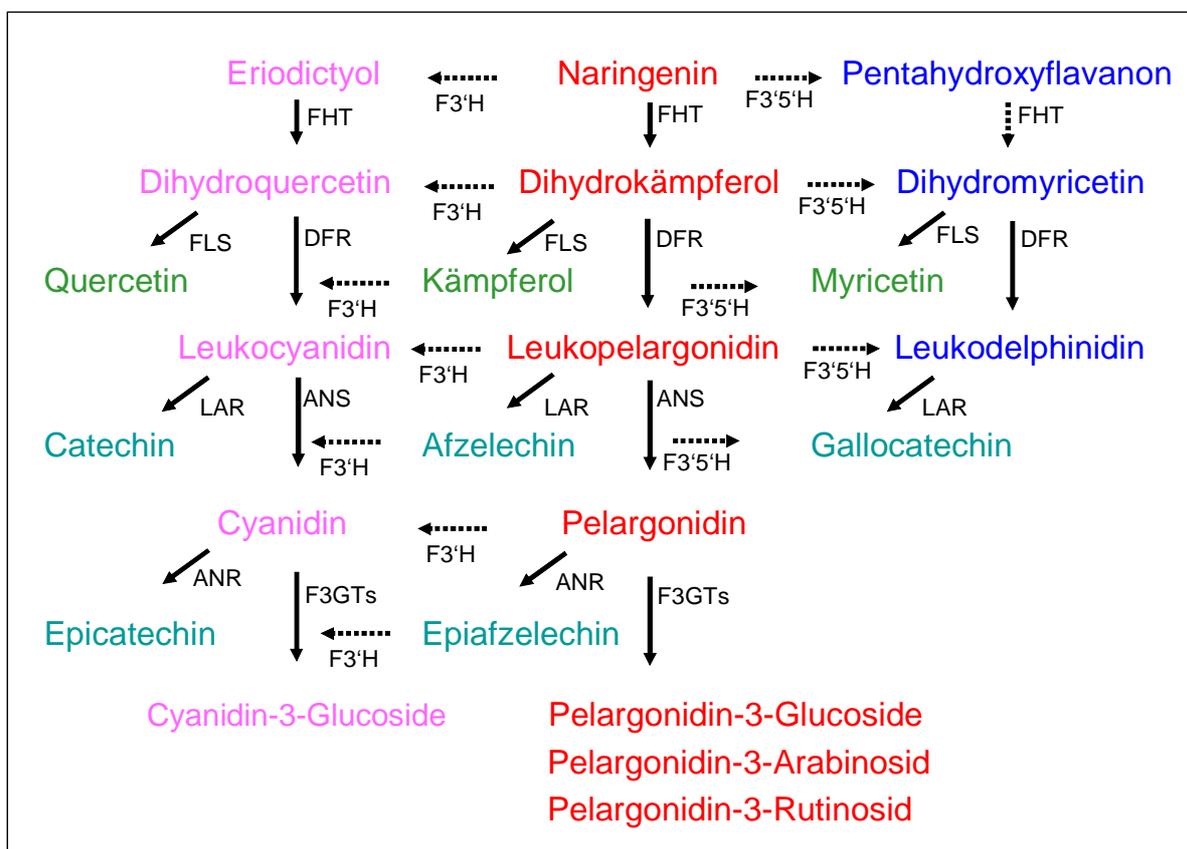


Abb. 31: Flavonoidbiosyntheschema der Erdbeerfrucht

Gepunktete Linien zeigen mögliche, nicht geprüfte Syntheschritte.

#### D.1.3.4 Entwicklungsspezifische Regulation der Flavonoidbiosynthese in Erdbeerfrüchten

Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigten sich mit der Expression von Flavonoidgenen und Genen, die an der Reife von Erdbeerfrüchten beteiligt sind. Im Folgenden wird eine Zusammenfassung der bisherigen Forschungsergebnisse getroffen, bei der die eigenen Ergebnisse dieser Arbeit mit integriert und mit dem bisherigen Wissen verglichen werden.

Nach Ergebnissen einer Forschungskoooperation mit der Arbeitsgruppe Rosati (2007), zeigte die PAL ein zweiphasiges Expressionsmuster mit einem hohen Expressionsniveau in grünen Fruchtstadien, einem Abfall im weißen Fruchtstadium und einem erneuten Anstieg bei Fruchtreife. PAL ist ein Schlüsselenzym zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Es katalysiert die Umsetzung der Aminosäure Phenylalanin zu Zimtsäure, die ein wichtiges Zwischenprodukt in der Flavonoidbiosynthese ist. Derivate der Zimtsäure sind aber auch Vorstufen einer Reihe von Sekundärstoffwechselverbindungen, wie Lignine, Stilbene und Cumarine. Damit gibt die PAL nur geringen Aufschluss über die anschließende Flavonoidbildung. Nach ALMEIDA et al. (2007) zeigte auch die CHS ein zweiphasiges Expressionsmuster mit einem hohen Expressionsniveau in den grünen Fruchtstadien und das Maximum im Stadium des Farbumschlags von weiß nach rot. Die starke Hochregulation der CHS verdeutlicht ihre zentrale Rolle in der Flavonoidbiosynthese. WILKINSON et al. (1995) klonierte eine putative CHS mithilfe *Differential Display*. Die Expression der putativen CHS erfolgte mit einer RNA Gel Blot Analyse. Die Aktivität begann beim Farbumschlag von weiß nach rot und war in der reifen Frucht am höchsten. MANNING (1998) klonierte zwei unterschiedliche putative CHS-Sequenzen mittels *Differential Screening*. Eine davon schien identisch mit der von WILKINSON et al. (1995) klonierten CHS. Beide CHS zeigten ein zweiphasiges Expressionsmuster mit einem Peak etwa eine Woche nach Vollblüte und einem zweiten zum Zeitpunkt des Farbumschlags von weiß nach rot. Die von AHARONI et al. (2000) untersuchte CHS zeigte ein einphasiges Profil mit einem Expressionsmaximum im Stadium des Farbumschlags. Ebenso verhielt sich die von ihm detektierte CHI. Der von ALMEIDA et al. (2007) ermittelte Verlauf der Transkriptmengen an CHI, FHT, ANS war ebenfalls zweiphasig, mit einem starken Anstieg in grünen Früchten und einem, zum Zeitpunkt des Farbumschlags von weiß nach rot. Nur die CHI zeigte anschließend eine geringfügige Herunterregulierung im reifen Fruchtstadium. Die Transkriptmenge der DFR nahm geringfügig, aber kontinuierlich, bis in die reifen Fruchtstadien, zu. Alle Gene zeigten ein frühes Expressionshoch, auch wenn Unterschiede in der Transkriptmenge in grünen Stadien vorhanden waren. Die von MANNING (1998) klonierten vier unterschiedlichen putativen FHTs zeigten ähnliche Expressionsmuster, ebenso die von AHARONI et al. (2000). Die DFR der Arbeitsgruppe Rosati (ALMEIDA et al., 2007) war auffällig, da sie sich nicht zweiphasig und somit anders, als die

von MOYANO et al. (1998) berichtet, verhielt. Da die DFR Enzyme von einer kleinen Multigen-Familie codiert werden (MOYANO et al., 1998), wäre es möglich, dass die von Rosati klonierte DFR (aus cDNA der reifen Frucht) mit der Anthocyaninbiosynthese assoziiert ist, und dass andere, entwicklungsspezifisch regulierte, DFRs in Erdbeeren vorhanden sind, die dem zweiphasigen Expressionsmuster entsprechen. Die von MOYANO et al. (1998) klonierte putative DFR wurde zuerst in grünen Früchten detektiert. Es folgte eine Abnahme und wieder ein starker Anstieg der Expression beim Farbumschlag von weiß nach rot. Der erste Expressionspeak war vermutlich für die Proanthocyanidinakkumulation verantwortlich, der zweite Anstieg für die Bildung von Anthocyanen. Weiterhin stellten MOYANO et al. (1998) eine hormonelle Kontrolle der DFR durch Auxin fest, wie es schon bei anderen Erdbeergenen vermutet wurde (REDDY und POOVAIAH, 1990; REDDY et al., 1990; MEDINA-ESCOBAR et al., 1997). So konnte die Transkription in unreifen, grünen Früchten durch Entfernen der Achänen induziert werden. Diese Induktion konnte zum Teil durch eine Behandlung dieser Früchte mit NAA verhindert werden. FLS, LAR, ANR und F3GT zeigten bei Versuchen der Arbeitsgruppe Rosati ein konträres Transkriptionsmuster, mit einem geringeren relativen Expressionsniveau (ALMEIDA et al., 2007). LAR und ANR Gene hatten ähnliche Expressionsmuster, mit einer starken Expression in grünen Fruchtstadien und einem folgenden Abfall hin zu dem weißen Fruchtstadium. Es folgte ein zweites Expressionshoch bei Früchten beim Farbumschlag von weiß nach rot, signifikant stärker bei der LAR. In der Erdbeerfrucht konnte, wie bereits in Kapitel D.1.1 beschrieben, nur eine LAR kloniert werden. Aufgrund des Primerdesigns, wäre allerdings eine Klonierung mehrerer unterschiedlicher LARs möglich gewesen. Deshalb muss in Betracht gezogen werden, dass in der Erdbeerfrucht möglicherweise keine weitere LAR vorhanden sein könnte. Die klonierte LAR wurde über die gesamte Fruchtentwicklung exprimiert und die Substratspezifität der rekombinanten Proteine stimmte mit den gebildeten Stoffen *in planta* überein. Somit war die Situation in der Erdbeerfrucht anders als zum Beispiel in Weintrauben (BOGS et al., 2005) oder Apfelfrüchten (TAKOS et al., 2006). In Weintrauben zeigten die beiden LARs unterschiedliche Expressionsmuster. LAR1 wurde circa sechs Wochen vor einsetzender Fruchtreife exprimiert und die Transkriptmenge nahm ab diesem Zeitpunkt, zu einem niedrigen Expressionsniveau, kontinuierlich ab. LAR2 Transkripte hatten dagegen ihr Maximum bei einsetzender Fruchtreife und nahmen dann ab. In grünen Apfelfrüchten zeigte LAR1 zwei Expressionsspitzen, bei 48 und 62 Tagen nach der Blüte. Danach sank das Expressionsniveau jeweils wieder. In roten Fruchtteilen war die Expression während der gesamten Fruchtreife nahezu stabil und etwa halb so stark, wie der Maximallevel in grünen Früchten. Das Transkriptniveau von LAR2 war immer relativ niedrig (TAKOS et al., 2006).

Die in Rahmen dieser Arbeit klonierte ANR besaß kein zweiphasiges Expressionsmuster und somit keinen späten Anstieg der Expression im Fruchtstadium des Farbumschlags von weiß nach rot. Sie

---

zeigte ihr Expressionsmaximum im Stadium des weiterentwickelten Blütenboden. Die Expression nahm mit zunehmender Fruchtreife ab. In der reifen Frucht war keine Expression mehr nachweisbar. Die ANR aus *Malus* zeigte ein ähnliches Expressionsmuster, wie die aus der Erdbeere ‚Korona‘. Das bedeutet, dass das Expressionsniveau mit zunehmender Fruchtreife sank (TAKOS et al., 2006). Ebenso verhielt sich die ANR aus Weinblättern (PFEIFFER et al., 2006). Die ANR Transkriptmenge aus Weintrauben zeigte ihr Maximum circa sechs Wochen vor einsetzender Fruchtreife, fiel dann ab und war bei einsetzender Fruchtreife bereits nicht mehr detektierbar (BOGS et al., 2005). Die Überlegung, dass es sich bei den beiden ANR-Sequenzen aus Erdbeere nur um Homologe handelt, konnte, aufgrund der hohen Sequenzidentität, verworfen werden. Bei den beiden Anthocyanidinreduktasen waren lediglich drei Aminosäuren ausgetauscht. Dennoch wurde mittels Southern Blot Analyse festgestellt, dass von der ANR in der Erdbeere zwei Genkopien vorliegen (ALMEIDA et al., 2007). Wahrscheinlich ist die ANR in den Sorten ‚Korona‘ und ‚Queen Elisa‘ unterschiedlich reguliert. Untersuchungen der FLS und F3GT zeigten einen Anstieg der Transkriptmengen, bis hin zum Stadium des Farbumschlags von weiß nach rot. Die FLS wurde danach, im roten Fruchtstadium, stark herunterreguliert, die F3GT stark hochreguliert. Diese starke Expressionsreduzierung der FLS verdeutlicht den Wettbewerb zwischen Flavonolen, Flavan 3-olen und Anthocyanen in den Reifestadien (ALMEIDA et al., 2007). Der einphasige Anstieg der F3GT Expression stimmte mit Untersuchungen einer putativen F3GT von Manning (1998) überein. Nach AHARONI et al. (2000) nahm auch die Transkriptmenge der F3GT im reifen Fruchtstadium ab. Die von AHARONI et al. (2000) klonierte putative ANS zeigte einen konstanten Anstieg der Transkriptmengen bis zum reifen Fruchtstadium. Dagegen zeigte die von ALMEIDA et al. (2007) klonierte ANS einen kleinen Expressionspeak in kleinen grünen Früchten; die Transkriptmenge sank bis zum weißen Fruchtstadium und hatte ihr Maximum im Stadium des Farbumschlags von weiß nach rot. Laut ALMEIDA et al. (2007) zeigten sich auffallende Unterschiede bei der Expression von Genen, die bei der Synthese von Anthocyanen, beziehungsweise von Flavonolen und Flavan 3-olen beteiligt sind. Das kritische Stadium war das, der vollständigen Fruchtreife. Hier wurden FLS, LAR und ANR zu einem geringeren Maße herunterreguliert und Anthocyanogene hochreguliert, um die Synthese von Pelargonidinderivaten auf Kosten der Flavonole und Flavan 3-ole zu begünstigen. Während der Fruchtreife korrespondiert dabei die Hochregulation der DFR und anderer Flavonoidgene hin zu den Anthocyanen, mit einem Anstieg der Enzymaktivität in Fruchtextrakten (HALBWIRTH et al., 2006; CHENG und BREEN, 1991). Parallelen zwischen PAL-Aktivität und Anthocyanengehalt wurden von CHENG und BREEN (1991) berichtet. So zeigte die PAL einen ersten Aktivitätspeak in grünen Früchten, der mit der Bildung anderer Flavonoide wie Proanthocyanidine und Polyphenole in frühen Fruchtentwicklungsstadien in Zusammenhang stand. Ein zweiter Peak wurde mit der Anthocyanakkumulation in den reifen Früchten in Verbindung gebracht. Laut

HALBWIRTH et al. (2006) besaß die CHS ihre maximale Enzymaktivität schon in der kleinen grünen Frucht, nahm dann während der Fruchtentwicklung konstant ab und nahm noch einmal, bei beginnender Fruchtreife, etwas zu. Die DFR verhielt sich zweiphasig, mit einem Maximum bei mittelgroßen grünen Früchten und einem weiteren Maximum in der reifen Frucht. Die FLS-Aktivität konnte in frühen Fruchtstadien nicht detektiert werden. Erst in der weißen Frucht stieg die Aktivität und erreichte ihr Maximum beim Stadium des Farbumschlags von weiß nach rot. Die F3GT besaß ebenfalls ein zweiphasiges Aktivitätsmuster, mit Maxima in mittelgroßen grünen und in vollreifen Früchten.

Die beobachteten Transkriptionsmuster der Strukturgene lassen, genau wie in anderen Pflanzen, auf die Aktion verschiedener Transkriptionsfaktoren schließen, die an der Regulation beteiligt sind (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Diese Regulation könnte ein oder mehrere Gene betreffen oder im Extremfall könnten verschiedene Sets von Genen die Enzyme der einzelnen Biosynthesephasen codieren. Ein Set, das vermutlich die Flavan 3-ol- / Proanthocyanidinbiosynthese in frühen Entwicklungsstadien reguliert, ein Set zur Steuerung der Flavonolsynthese in der reifen Frucht und ein Set für die Anthocyan synthese in den Stadien des Farbumschlags von weiß nach rot und der reifen Frucht (HALBWIRTH et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007). Es scheint ähnlich *Arabidopsis*, Mais und Petunie, bei denen MYB-, MYC- und WRD-Typen von Transkriptionsfaktoren Komplexe bilden, die diese drei Äste der Flavonoidbiosynthese regulieren (LEPINIEC et al., 2006). Der schwache, aber stetige Anstieg der Expression von MYB1, während der Fruchtreife, ist mit dieser Hypothese vereinbar. MYB1 reduziert möglicherweise die Transkription, um die Anthocyangehalte während der Fruchtreife stabil zu halten und um die Stoffflüsse, zu den anderen Abflüssen der Flavonoidbiosynthese, zu regulieren. Der inhibierende Effekt von MYB1 auf die Flavonoidbiosynthese zielt vermutlich auf die Verringerung des Expressionsniveaus der FLS und Proanthocyanidin-bildenden Gene in reifen Fruchtstadien (AHARONI et al., 2001). Hier sind noch genauere Untersuchungen notwendig.

## D.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren und Pflanzenstärkungsmitteln auf die Flavonoidbiosynthese von Erdbeerpflanzen und –früchten

### D.2.1 Einfluss auf die Genexpression der ANR

Eine Prohexadion-Ca-Behandlung bewirkt eine Induktion der ANR-Expression bereits in der Vollblüte, im weiterentwickelten Blütenboden und in der kleinen grünen Erdbeerfrucht. Schon in der großen grünen Frucht liegt das Expressionsniveau der behandelten Frucht unterhalb dem der unbehandelten Kontrolle. Dennoch bleibt der Verlauf der Genexpression unverändert, wie bei der unbehandelten Kontrolle, mit stetiger Abnahme der Transkriptmenge, bei zunehmender Frucht-reife (Kap. C.3.1).

FISCHER et al. (2006) bestätigten eine Induktion der Genexpression und der Enzymaktivitäten verschiedener Flavonoidgene in Prohexadion-Ca-behandelten Apfelblättern. Demnach könnten durch die Prohexadion-Ca-Behandlung auftretende Verschiebungen der Polyphenolzusammensetzung für die Veränderungen der Genexpression durch Rückkopplungsmechanismen über Flavonoidkonzentrationen verantwortlich sein. So konnte im Prohexadion-Ca-behandeltem Apfel-laub eine frühe, starke Induktion der Genexpression von CHS, FHT und DFR/FNR festgestellt werden. Der Effekt setzte bei der PAL erst später ein. Die FLS-Expression wurde nur schwach induziert, wohingegen die ANS Expression etwas abnahm.

Bei der Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca und Milsana<sup>®</sup> zeigte sich eine sehr starke Induktion der ANR-Expression zum Zeitpunkt der Vollblüte und im weiterentwickelten Blütenboden. Bereits in den grünen Fruchtstadien sank die ANR-Expression stark ab, sogar unter das Expressionsniveau der unbehandelten Kontrolle (Kap. C.3.1). Dieser frühe, starke Anstieg der Genexpression könnte auf die Wirkung von Prohexadion-Ca zurückzuführen sein, wie bereits beim behandelten Apfelblatt vorher erläutert (Fischer et al., 2006). Allerdings demonstrierten FOFANA et al. (2002) einen induzierenden Effekt von Milsana<sup>®</sup> auf die Genexpression und Enzymaktivität von CHI und CHS. Damit war eine Resistenz gegen Mehltau an Gurkenpflanzen durch Anreicherung bestimmter Flavonoide verbunden. SCHNEIDER und ULLRICH (1994) bestätigten einen Anstieg der PAL-Aktivität nach Einsatz von Extrakten aus *Reynoutria sachalinensis*. Hier müssten noch weiterfüh- rende Untersuchungen zur Klärung durchgeführt werden.

### D.2.2 Einfluss auf die Enzymaktivität der LAR

Der LAR-Aktivitätsverlauf wurde an unbehandelten Früchten der Sorte ‚Korona‘ untersucht. Die Enzymaktivität war zweiphasig, mit einem zweitem Anstieg der Enzymaktivität in der reifen Frucht. Die biologische Funktion dieser späten erhöhten LAR-Aktivität ist noch unklar. Möglicherweise zeigt sich hier eine durch externe Faktoren verursachte erneute Enzymaktivität in der reifen Frucht. Diese könnte zum Beispiel durch Pflanzenschutzmitteleinsatz verursacht worden sein. Da mit zunehmender Fruchtreife Flavan 3-ol-Gehalte stark abnehmen, muss in Erwägung gezogen werden, dass dieses spät gebildete Catechin sofort in die Bildung von Proanthocyanidinen eingesetzt wird. Somit kann es nicht mehr als frei verfügbares Catechin detektiert werden. Deshalb sollte in weiteren Untersuchungen besonderer Augenmerk auf sich verändernde Gehalte von Proanthocyanidinen gelegt werden. Weiterhin wäre eine Rückreaktion von Catechin zu Leukocyanidin in der reifen Frucht denkbar. Bei einer starken LAR-Aktivität in der reifen Frucht und bei Vorhandensein von NADP<sup>+</sup> wäre eine Rückreaktion möglich. Das gebildete Leukocyanidin könnte dann über eine ANS-Reaktion zu Cyanidin verstoffwechselt werden. Dazu müsste Catechin frei verfügbar und nicht zu Proanthocyanidinen polymerisiert sein.

Eine Prohexadion-Ca-Behandlung zu einem späten Behandlungszeitpunkt in der Vollblüte bei Pflanzen der Sorte ‚Elsanta‘, führte zu einer Stimulation der LAR-Aktivität, in den untersuchten Proben dieses Stadiums. Eine Behandlung mit Prohexadion-Ca im Ballonstadium hingegen, verursachte eine Reduktion der LAR-Aktivität in Proben des Stadiums der Vollblüte (Kap. C.3.2). Falls diese Ergebnisse reproduzierbar wären, könnte so eine brauchbare Methode zur effizienten Steigerung der LAR-Aktivität und damit eventuell der Catechin- und Proanthocyanidin-Gehalte etabliert werden. PUHL konnte in den behandelten Proben beider Varianten geringere Mengen an Catechin, als in unbehandelten Proben feststellen (Persönliche Mitteilung, 2006). Durch die Prohexadion-Ca-Behandlung werden die 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenasen FHT, ANS und FLS inhibiert. Es kommt so zu einem Umlenken der Flavonoidbiosynthese und der Bildung neuer Flavonoidverbindungen (FISCHER et al., 2003; HALBWIRTH et al., 2003; RÖMMELT et al., 2003). Somit stehen für Enzyme, die später im Flavonoidbiosyntheseweg wirken, weniger Substrate zur Verfügung. Nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung versucht die Pflanze möglicherweise, diese Limitierung durch erhöhte Enzymaktivitäten zu kompensieren.

Mithilfe des Einsatzes von Pflanzenstärkungsmitteln (Milsana<sup>®</sup>) und Wachstumsregulatoren (Prohexadion-Ca) konnten Veränderungen in der Flavonoidbiosynthese in Erdbeerfrüchten und -blüten bewirkt und detektiert werden. Durch gezielten Einsatz von Prohexadion-Ca in der offenen Blüte konnte die LAR-Aktivität in Erdbeerblüten induziert werden. Catechin, als Baustein von Proanthocyanidinen, gilt als ein wichtiger Metabolit in der Resistenzausbildung gegen Pathogene, wie *Botrytis*

*cinerea*. Proanthocyanidine sind in der Lage die mazerierenden Enzyme von *Botrytis cinerea* zu hemmen (HILL et al., 1981; JERSCH et al., 1989; DI VENERE et al., 1998). SCHLÖSSER (1993) und JERSCH et al. (1989) führten die Stadienlatenz der jungen Erdbeerfrucht auf frühe, hohe Proanthocyanidingehalte zurück. Passend zu dieser Theorie sind die abnehmenden Proanthocyanidin-Gehalte bei zunehmender Fruchtreife (SCHERER et al., 1982; JERSCH et al., 1989; DI VENERE et al., 1998; HALBWIRTH, 2006). Durch den Einsatz von Prohexadion-Ca und Milsana<sup>®</sup> konnte ebenfalls die ANR-Expression induziert werden. In beiden Fällen müsste in weiterführenden Arbeiten geprüft werden, ob eine Anreicherung von Catechin, Epicatechin oder entsprechender Proanthocyanidine stattfindet und ob damit die Quieszenz in den reifen Fruchtstadien hinausgezögert werden kann. Denn eine Steigerung der Flavan 3-ol-Gehalte, in ohnehin schon resistenten Fruchtstadien, bringt keinen zusätzlichen Nutzen, der den Aufwand (Arbeit, Material) rechtfertigen könnte. Der Behandlungszeitpunkt hat vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf die Modifizierung des Catechingehaltes. Es scheint, dass Prohexadion-Ca allein die *Botrytis*-Resistenz nicht induziert. Durch Kombination mit Milsana<sup>®</sup> konnte allerdings der Botrytisbefall reduziert werden (PUHL, 2006, persönliche Mitteilung). Die vielen Untersuchungen von Milsana<sup>®</sup> an unterschiedlichen Kulturpflanzen zeigen generell vielversprechende Ergebnisse im Schutz vor pilzlichem Befall (FOFANA et al., 2002; WURMS et al., 1999; DAAYF et al., 2000; ISEBAERT et al., 2002; STEFFEK und ALTENBURGER, 2003).

### D.2.3 Einfluss auf das Pflanzenwachstum und Bedeutung für den Anbau

Auf die Prohexadion-Ca-Behandlung reagierten die Erdbeerpflanzen mit reduziertem Wuchs, geringerer Ausläuferbildung und dunklerer Blattfarbe. Somit könnte in Erwerbsanlagen eine arbeitseffiziente Möglichkeit gefunden sein, die Ausläuferbildung ohne mechanische Maßnahmen zu limitieren. Weiterhin wurde die Fruchtentwicklung um bis zu fünf Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verzögert. Dies könnte einen Ansatz für eine Verschiebung der Erntezeit darstellen. Dabei müssten jedoch die Aufwandkosten einer Prohexadion-Ca-Behandlung, mit denen herkömmlicher Maßnahmen der Reifeverzögerung, verglichen werden. Allerdings ist dies noch keine umsetzbare Alternative, da Prohexadion-Ca keine Zulassung im Erdbeeranbau besitzt und ein Genehmigungsverfahren aus Kostengründen für den Hersteller wenig reizvoll ist. Die Verzögerung der Reifezeit lässt sich vermutlich auf gesteigerte Auxinkonzentrationen zurückführen, denn die Prohexadion-Calcium-behandelten Erdbeerfrüchte hatten deutlich vergrößerte Achänen, als die Kontrollfrüchte. Auxin, das von den Achänen gebildet wird, spielt eine wichtige Rolle im Wachstum der Erdbeerfrucht (NITSCH, 1950). Eine Gabe von synthetischen Auxin ver-

zögert laut GIVEN et al. (1988) die Fruchtreife. Das Wachstum der Frucht hängt von einer kontinuierlichen Versorgung mit Auxin aus den Achänen ab. Allerdings scheint der Abfall des Auxin-gehaltes während der Achänenreifung, die Fruchtreife auszulösen (ARCHBOLD und DENNIS, 1984). Auch MANNING (1994) bestätigt GIVEN et al. (1988), dass das Reifen der Erdbeerfrucht von Auxin reguliert wird.

Laut REEKIE et al. (2003, 2005a, 2005b, 2006) besaßen Prohexadion-Ca-behandelte Erdbeerpflanzen reduzierte Pflanzenhöhen und Gesamtblattflächen, erhöhte Wurzel-Spross-Verhältnisse und verringerte spezifische Blattflächen. Diese Pflanzen verfügten über eine erhöhte Nettphotosyntheserate. Allerdings führte in diesen Versuchen eine Applikation mit Prohexadion-Calcium zur verstärkten Bildung von Tochterpflanzen, vor allem in vermarktungsfähiger Qualität. Es konnte mehr robuste Pflanzware mit verbesserter Anwachsrate und osmotischer Anpassung erzielt werden, die die Setzlinge auf Wasserstress anpasst. Ebenso wurde ein höherer Fruchtertrag und eine Ernteverfrühung erzielt. Laut BLACK (2006) reduzierten Prohexadion-Calcium-Behandlungen die Ausläuferanzahl um bis zu 50 Prozent. Es wurden Pflanzen mit erhöhter Anzahl an Wurzelhälsen und höhere Fruchterträge bei der Sorte ‚Selva‘ erzielt. Es bleibt noch ungeklärt, warum in den Versuchen von Reekie et al. die Ausläuferzahl erhöht und die Fruchtreife verfrüht, bei den Versuchen von BLACK (2006) und den hier vorgestellten Versuchen, gegensätzliche Ergebnisse erzielt wurden. Mögliche Ursachen könnten in der Versuchsdurchführung liegen, wie unterschiedliche Konzentrationen und Aufwandmengen von Prohexadion-Calcium. So wurde im Rahmen dieser Arbeit und bei BLACK (2006) die circa drei- bis vierfache Konzentration des Wirkstoffes verwendet.

### D.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cDNAs von FLS, LAR und ANR in Erdbeerfrüchten erstmalig kloniert und exprimiert, die nun für weitere Forschungsarbeiten zur Verfügung stehen. Die Gene sind maßgeblich an der Bildung pflanzenstärkender und Resistenz-bildender Substanzen beteiligt. Somit sind sie auch als Merkmale in der klassischen Züchtung zu beachten. Sie tragen ebenfalls zum Erreichen von Züchtungszielen, wie Resistenz oder Toleranz gegen die wichtigsten Krankheiten und Schädlinge und somit zum Ertrag und zur Fruchtqualität durch wertgebende Inhaltsstoffe bei.

#### D.3.1 Nutzung molekularbiologischer Ansätze für die klassische Züchtung

Da transgene Sorten mangelnde Akzeptanz beim Verbraucher finden, muss in Zukunft auf andere Züchtungsmethoden zurückgegriffen werden, die von Gesetzgeber und Verbraucher gleichermaßen legitimiert werden. Dabei können molekularbiologische Ansätze in klassische Züchtungsprogramme übernommen und so ein rascheres und effizienteres Vorgehen, zur Verbesserung von Sorten, ermöglicht werden. Eine Methode stellt MAS (*marker assisted selection*) dar. Frühe Selektionen mit molekularen Markern erlauben eine exakte Selektion von Sämlingen, lange bevor die gesuchten Merkmale durch klassische Züchtung untersucht werden könnten. Weiterhin kann der Einfluss von umweltbedingter Variation ausgeschlossen werden, der oftmals die phänotypische Beurteilung verfälscht. Vorselektionen zur Pathogenresistenz können vorgenommen werden, ohne Pathogene in den Bestand einführen zu müssen.

Bei der Erdbeere (*Fragaria × ananassa*) wurden bereits viele Gene mit Relevanz für die Praxis kloniert und identifiziert. Verschiedene Studien zur Fruchtreife wurden durchgeführt. Dabei wurden Expressionsmuster von Genen, die an der Zellwandhydrolyse, am Weichwerden der Früchte beteiligt sind, untersucht. Dazu gehören die Pectat-Lyase (BENTITEZ-BURRACO et al., 2003), Polygalacturonase (AHARONI und O'CONNELL, 2002; REDONDO-NEVADO et al., 2001), Pektin Methyl-Esterase (AHARONI und O'CONNELL, 2002), Cellulasen (MANNING, 1998; HARPSTER et al., 1998; TRAINOTTI et al., 1999), Galaktosidasen (TRAINOTTI et al., 1999), Expansin (CIVELLO et al., 1999; HARRISON et al., 2001). Weiterhin wurden Flavonoidgene (MOYANO et al., 1998; MANNING, 1998; AHARONI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007; eigene Arbeit) und Gene, die an der Lignifizierung beteiligt sind, kloniert (BLANCO-PORTALES et al., 2002; AHARONI und O'CONNELL, 2002). Genkartierungen mit dem Ziel, genomische Regionen zu bestimmen, die die Fruchtgröße, Zucker- und Säureproduktion, Konsistenz, Krankheitsresistenz und Fruchtfarbe bestimmen, wurden durchgeführt. Datenbanken mit exprimierten Genen wurden entwickelt, mit dem Hauptziel wichtige

qualitätsbestimmende Gene zu identifizieren. Mit der Klonierung der FLS, LAR und ANR stehen drei weitere Flavonoidgene für molekulare Züchtungsansätze zur Verfügung.

Nach einer erfolgreichen Klonierung können die gewonnenen Sequenzen für Transformationen in die Pflanze genutzt werden und *in vivo*, durch Methoden wie *gene silencing* oder Überexpression die klonierten Gene charakterisiert werden. Basierend auf den neuen, funktionell charakterisierten *Fragaria* cDNAs dieser Arbeit, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen jeweils Genfamilien identifiziert werden konnten. Ferner wurden mit den cDNA Klonen der LAR, ANR und FLS in der AG Schwab *silencing*-Konstrukte erstellt, die eine weitere Aufklärung der Zusammenhänge der Flavonoidbiosynthese in der Erdbeerfrucht ermöglichen werden.

Mit RT-PCR Klonierung könnten unterschiedliche Allele identifiziert werden. Mit heterologer Hefeexpression und anschließender Enzymtests könnten unterschiedliche Substratspezifitäten getestet werden. Die cDNA-Sequenzen der Allele würden dann, durch Identifikation von Polymorphismen, der Herstellung von genetischen Markern zur Züchtung von Sorten mit bestimmten Inhaltsstoffen oder Stoffen zur Pathogenabwehr, dienen. Dabei können *simple sequence repetition type* Polymorphismen (SSR) (NEWCOMB et al., 2006; TARTARINI, 2003), Indels (*insertions/deletions*) oder SNP (*single nucleotide polymorphism*) als Marker verwendet werden, ebenso CAPS Marker (BARONI, 2003; KUNIHISA, 2006). Zur Identifikation nützlicher Allele würde ein analytisches Screenen auf züchtungsrelevante Stoffwechselprodukte (z.B. Proanthocyanidine, Flavonole) von phäno- oder genotypisch auffallenden Erdbeersorten folgen, die für Unterschiede in der Biosynthese verantwortlich sind und die erwünschten Eigenschaften (z.B. Pathogenresistenz) besitzen. Mit ausgewählten Genen könnten quantitative oder Allel-spezifische Genexpressionsanalysen durchgeführt werden. Eine neue Methode zur Klärung Allel-spezifischer Genexpression stellt dabei das von SCHAART et al. (2005) vorgestellte *Pyrosequencing* dar. Somit könnten Sortenunterschiede im Sekundärstoffwechsel herausgearbeitet werden. Enzymtests mit Pflanzenextrakten würden dabei Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten klären.

### **D.3.2 Ansätze mit Phytohormonen und Wachstumsregulatoren**

Durch den Einsatz des Wachstumsregulators Prohexadion-Ca und dem Pflanzenstärkungsmittel Milsana® konnte deren Einfluss auf die Flavonoidbiosynthese in Erdbeerfrüchten detektiert werden. Mit verschiedenen Versuchsansätzen konnten Veränderungen der LAR-Enzymaktivität und der ANR-Genexpression festgestellt werden. Die erzielten Ergebnisse mit Prohexadion-Calcium sind allerdings, wie bereits in Kapitel D.2.3 erörtert, für die Weiterverfolgung oder für den Praxiseinsatz nicht weiter relevant. Aufgrund vielversprechender Ergebnisse im Bereich der Patho-

genabwehr, sollte in Zukunft mehr Aufmerksamkeit auf das Pflanzenstärkungsmittel Milsana<sup>®</sup> gelegt werden (PUHL, persönliche Mitteilung, 2006; FOFANA et al., 2002; WURMS et al., 1999; DAAFY ET AL., 2000; ISEBAERT et al., 2002; STEFFEK und ALTENBURGER, 2003).

### **D.3.3 Ungeklärte Fragen der Flavonoid- bzw. der Proanthocyanidin-Biosynthese**

#### **D.3.3.1 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) und Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H)**

Bisher konnte keine Flavonoid 3'- oder Flavonoid 3'5'-Hydroxylase aus der Erdbeere kloniert werden. Eigene Versuche, die Flavonoid 3'-Hydroxylase zu klonieren, blieben ebenfalls erfolglos. Deshalb ist nach wie vor ungeklärt, welche Gene den Hydroxylierungsstatus in Erdbeerfrüchten regulieren. Wie bereits im Kapitel D.1.3.3 erörtert, scheint die F3'5'H-Aktivität nur sehr schwach ausgebildet zu sein. Die 4'-hydroxylierten Substrate werden vermutlich nur durch die F3'H-Aktivität zu den entsprechenden Verbindungen umgesetzt. Welche als Substrate verwendet werden, wann und wo die F3'H exprimiert wird und wie viele Genkopien vorliegen, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Versuche von AHARONI et al. (2001), die F3'H zu klonieren, und ihre Genexpression und Enzymaktivität zu prüfen, blieben erfolglos. Nach ihren Untersuchungen ließ die spezifische Reduktion von Quercetin, im Vergleich zu Kämpferol in FaMYB1-überexprimierten Tabaklinien, eine Verminderung der Enzymaktivität der F3'H vermuten. Sie konnten den Einfluss von FaMYB1 auf die F3'H nicht testen, vermuteten aber, dass FaMYB1 verschiedene Schritte in der späteren Flavonoidbiosynthese beeinträchtigt, indem mRNA Niveaus von Genen gesenkt wurden, deren Enzyme an der Bildung von Anthocyanen und Flavonolen beteiligt sind.

#### **D.3.3.2 Entstehung der Proanthocyanidine**

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Erforschung der Proanthocyanidinbiosynthese erzielt. Die beiden Gene, Leukoanthocyanidin 4-Reduktase und Anthocyanidinreduktase, die für die Bildung der Proanthocyanidinmonomere Catechin und Epicatechin verantwortlich sind, konnten aus verschiedenen Pflanzen kloniert werden (PAOLOCCI et al., 2007; PFEIFFER et al., 2006; TAKOS et al., 2005; BOGS et al., 2005; XIE et al., 2003; TANNER et al., 2003); in dieser Arbeit auch die LAR und ANR von Erdbeeren. Weiterhin konnten die entsprechenden Enzymreaktionen nachgewiesen und Substratspezifitäten bestimmt werden. Rekombinante Proteine der Leukoanthocyanidin 4-Reduktase und Anthocyanidinreduktase katalysieren die Bildung von *trans* beziehungsweise *cis* Flavan 3-olen (LEPINIEC, 2006). Es kommen alle chiralen Zwischenprodukte der

Flavonoidbiosynthese, bis zu den Leukoanthocyanidinen, in 2,3-*trans* Stereochemie vor. Die Entstehung der 2,3-*cis* Stereochemie der (-)-Epicatechin Extensionseinheit ist noch nicht nachgewiesen. Es wurden bereits wichtige Erkenntnisse in der Proanthocyanidin-Entstehung erzielt, wie die übliche Verknüpfung der Basiseinheiten, üblicherweise zwischen C4 der *extension unit* und C8 der *starter unit*. Dennoch bleibt weiterhin unklar, wie die Polymerisation der Proanthocyanidine abläuft. Wie bereits in Kapitel A.1.2.3 ausführlich beschrieben, wurden verschiedene Modelle dazu entworfen (DIXON et al., 2004; TANNER et al., 2003; XIE UND DIXON, 2005). Kürzlich zeigten WELLMANN et al. (2006), dass die Anthocyanidinsynthase in der Lage ist, eine Dimerisation von Catechin, Cyanidin und Quercetin durchzuführen. Es scheint, dass Catechin ein weiteres Substrat für die Anthocyanidinsynthase ist. Es besteht Grund zu der Annahme, dass die ANS die Oxidation von Leukocyanidinen durchführt. So eine Funktion kommt theoretisch auch für die Leukoanthocyanidin 4-Reduktase oder Anthocyanidinreduktase in Frage. Ebenso bleiben grundlegende Mechanismen der Proanthocyanidinbiosynthese ungeklärt, wie zum Beispiel der Mechanismus, der den Stofffluss zwischen Anthocyanin- und Proanthocyanidinbiosyntheseweg regelt. Weiterhin ist unklar, ob die Leukoanthocyanidin 4-Reduktase oder die Anthocyanidinreduktase nur monomere Flavan 3-ole als Startereinheiten der Proanthocyanidinbiosynthese produzieren oder ob die Extensionseinheiten auch von beiden Enzymen synthetisiert werden. Es muss untersucht werden, wie spezifisch der Polymerisationsprozess ist und wie die Stereochemie der Proanthocyanidinverknüpfung kontrolliert wird. Gibt es ein ANR-Enzym, das 2,3-*trans*-Flavan 3-ol aus Anthocyanidinen bilden kann? Ebenso muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Proanthocyanidinpolymerisation nicht-enzymatisch abläuft und eventuell nur das Vorhandensein von Substrat und geeigneten physikalischen Bedingungen (pH-Wert der Vakuole) benötigt (XIE UND DIXON, 2005; DIXON et al., 2004).

Die Enzyme des Phenylpropanoid- und des Flavonoidbiosyntheseweges scheinen als Multienzymkomplexe organisiert zu sein. Diese leiten den Substratfluss durch spezifische, untergliederte Biosynthesewege. Für die Proanthocyanidinbiosynthese könnte ein Modell dargestellt werden, in dem alle Enzyme im Flavonoidbiosyntheseweg, die bis zur Bildung von Catechin und Epicatechin beteiligt sind, auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums oder der Vakuolmembran lokalisiert sind. Ob die Leukoanthocyanidin 4-Reduktase oder Anthocyanidinreduktase diesem Enzymkomplex angehören, ist noch nicht bestimmt (LEPINIEC, 2006). Die genaue Lokalisierung von LAR- und ANR-Proteinen in der Zelle steht aus, ebenso die Zuordnung, wie viele Proteine beziehungsweise Gene für den Transport der Proanthocyanidin-Monomere zur Vakuole benötigt werden. Unklar ist, ob und wie Leukoanthocyanidine zur Polymerisation in die Vakuole transportiert werden. Es muss geprüft werden, ob es ein Enzymsystem in der Vakuole

gibt, das für die Polymerisation der Proanthocyanidine zuständig ist und ob dabei eine Polyphenoloxidase beteiligt ist.

In verschiedenen Pflanzenfamilien werden die Strukturgene der Flavonoidbiosynthese von einem Komplex von Transkriptionsfaktoren mit MYB oder helix-loop-helix (HLH)-Bereichen und einem WD40 Protein reguliert (KOES et al., 2005). Mutationsanalysen bei *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass die Gene, die an der Bildung von Anthocyanen, Proanthocyanidinen und Flavonolen beteiligt sind, spezifisch von den MYB-Transkriptionsfaktoren *PAP1*, *PAP2*, *TT2* und *MYB12* reguliert werden (MEHRTENS et al., 2005; NESI et al., 2001; BOREVITZ et al., 2000). Aus der Erdbeere konnten bisher nur zwei Regulatorgene kloniert und identifiziert werden. *FaMYB1*, das die Flavonoidbiosynthese negativ reguliert (AHARONI et al., 2001) und das RAN-Gen (*regulation of anthocyanin biosynthetic pathway*), ein *Del*-ähnliches Regulatorgen (DENG UND DAVIS, 2001). Die Identifikation zusätzlicher Regulatorgene in der Erdbeere bleibt ein Ziel weiterer Untersuchungen, ebenso die Beantwortung der offenen Fragen der vorangegangenen Zusammenfassung.

## E Zusammenfassung

Die Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) zählt zu den wichtigsten Obstkulturen in Deutschland. Allerdings sind viele Standardsorten stark anfällig für Pilzkrankheiten wie zum Beispiel *Botrytis cinerea*, den Grauschimmel. An der Resistenz gegen pilzliche Schaderreger und der Abwehr von anderen biotischen und abiotischen Stressoren sind Flavan 3-ole, Proanthocyanidine und Flavonole maßgeblich beteiligt. Ferner stellen sie in der menschlichen Ernährung gesundheitlich wichtige Inhaltsstoffe dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von drei Strukturgenen, die die Synthese von Flavan 3-olen (LAR und ANR) beziehungsweise Flavonolen (FLS) betreffen, erstmalig *full-length* cDNA Klone isoliert. Zudem wurde anhand bekannter Sequenzen die cDNA der DFR kloniert. Alle Klone wurden heterolog in Hefe exprimiert und die Funktionalität, sowie die jeweilige Substratspezifität der rekombinanten Proteine, getestet.

Die rekombinante FaDFR reduzierte sowohl Dihydrokämpferol zu Leukopelargonidin, als auch Dihydroquercetin zu Leukocyanidin. Die Funktionalität der rekombinanten FaANR wurde mit Anthocyanidinen als Substrat bestätigt. Pelargonidin wurde zu Epiafzelechin, Cyanidin zu Epicatechin und Delphinidin zu Epigallocatechin umgesetzt. Da Leukoanthocyanidine, die Substrate der LAR, instabil sind, wurde für die LAR-Enzymtests ein kombinierter Assay eingesetzt. Zunächst wurden mithilfe der rekombinanten DFR die Leukoanthocyanidine synthetisiert und im gleichen Assay anschließend die rekombinante FaLAR getestet. Die FaLAR setzte Leukocyanidin zu Catechin und im geringeren Maße auch Leukopelargonidin zu Afzelechin um. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch das 3-Deoxyleukocyanidin (Luteoforol) von der FaLAR als Substrat akzeptiert und zu Luteoliflavan umgesetzt wird. Die rekombinante FaFLS reduzierte erwartungsgemäß sowohl Dihydrokämpferol zu Kämpferol als auch Dihydroquercetin zu Quercetin.

Der zeitliche Verlauf der Flavan 3-ol Biosynthese, während der Blüten- und Fruchtentwicklung, wurde im Fall der ANR über Northern Blot Analysen und im Fall der LAR über die Quantifizierung der jeweiligen Enzymaktivitäten verfolgt. Parallel dazu wurde der Einfluss des Wachstumsregulators Prohexadion-Ca, sowie des Pflanzenstärkungsmittels Milsana<sup>®</sup> auf die Genexpression beziehungsweise Enzymaktivität untersucht. Von beiden Verbindungen ist bekannt, dass sie die Synthese phenolischer Inhaltsstoffe stimulieren können, die an induzierten Resistenzmechanismen beteiligt sind.

Die Genexpression der ANR in unbehandelten Kontrollpflanzen begann bereits in der Blüte und hatte ihren Höhepunkt bei dem BBCH Stadium 71 (Blütenboden deutlich gewölbt). Mit zuneh-

mender Fruchtreife nahm die Expression wieder ab und war in reifen Früchten nicht mehr nachweisbar. Eine Prohexadion-Ca-Behandlung in den BBCH Stadien 65, 71 und 85 bewirkte eine Verzögerung der Genexpression während der Blütenentwicklung. Dennoch nahm die Expression im Verlauf der Fruchtreife ab. Nach einer Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca und Milsana<sup>®</sup> zeigte sich eine verfrühte ANR-Expression, die ihren Höhepunkt in der Vollblüte besaß. Sie fiel im Stadium des weiterentwickelten Blütenbodens wieder stark ab. Wie bei den anderen Behandlungen, nahm die ANR-Expression dann mit zunehmender Fruchtreife weiter ab. Die Enzymaktivität der LAR war zweiphasig, mit einer sehr starken Aktivität zum Zeitpunkt der Vollblüte und einem zweitem Anstieg der Enzymaktivität in der reifen Frucht. Eine Prohexadion-Ca-Behandlung zu einem späten Zeitpunkt in der Vollblüte führte zu einer gleichzeitigen Stimulation der LAR-Aktivität. Eine Behandlung mit Prohexadion-Ca im Ballonstadium (späte Knospe) hingegen verursachte eine spätere Reduktion der LAR-Aktivität im Stadium der Vollblüte.

Weiterhin stand die Lokalisierung der Flavan 3-ole im Erdbeerfruchtgewebe, über den gesamten zeitlichen Verlauf der Fruchtreife, im Blickpunkt. Dazu wurden Färbereaktionen mit dem selektiv Flavan 3-ole färbenden Reagenz p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) durchgeführt. Der Gehalt an Flavan 3-olen nahm mit zunehmender Fruchtreife kontinuierlich ab und war zu der Biosynthese der Anthocyane zeitlich und räumlich komplementär. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen der ANR-Genexpressionsstudie. DMAZA-färbbare Flavan 3-ole fanden sich fast homogen in der unreifen, weißen Frucht; dagegen in der reifen, roten Frucht auf die (weißen) Leitbündel und die Epidermis beschränkt. Dieser Verlauf beziehungsweise diese Lokalisierung stützt die Hypothese eines Flavan 3-ol-Schutzes der frühen Frucht und der Leitbündel in der reifen Frucht vor *Botrytis cinerea* Ausbruch.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Aufschluss über den molekularbiologischen und biochemischen Hintergrund der Flavonol- und Flavan 3-ol Biosynthese in Erdbeerblüten und -früchten und ermöglichen so eine weitere Aufklärung der Zusammenhänge der Flavonoidbiosynthese in Erdbeeren.

## E Summary

The strawberry (*Fragaria × ananassa*) is one of the main fruit crops in Germany. However, many standard varieties are highly susceptible to fungus diseases like *Botrytis cinerea*, the grey mold. Flavan 3-ols, proanthocyanidins, and flavonols have a controlling interest to the resistance against fungus pathogens and the defense of abiotic and biotic stress situations. Moreover, they are health promoting, important contents in the human diet.

Within the scope of this study from three structural genes involved in the biosynthesis of flavan 3-ols (LAR and ANR) and flavonols (FLS) full-length cDNA clones were isolated for the first time. Furthermore, the cDNA of the DFR was cloned on the basis of already known sequence information. All clones were expressed heterologous in yeast. The functionality and the respective substrate specificity of the recombinant proteins were tested as well.

The recombinant FaDFR reduced dihydrokaempferol to leucopelargonidin as well as dihydroquercetin to leucocyanidin. The functionality of the recombinant FaANR was confirmed with anthocyanidins as substrates. Pelargonidin was converted to epiafzelechin, cyanidin to epicatechin, and delphinidin to epigallocatechin. Since leucoanthocyanidins, the substrates of the LAR, are instable, a combined enzyme assay was applied for the LAR enzyme tests. First, leucoanthocyanidins were synthesized by the help of the recombinant DFR and, in the same assay, the recombinant FaLAR was subsequently tested. The FaLAR converted leucocyanidin to catechin and in trace amounts leucopelargonidin to afzelechin. Besides, it could be demonstrated that FaLAR accepted the 3-deoxyleucocyanidin (luteoforol) as substrate to form luteoliflavan. The recombinant FaFLS reduced as expected dihydrokaempferol to kaempferol as well as dihydroquercetin to quercetin.

The time course of the flavan 3-ol-biosynthesis during the flower and fruit development was followed by northern blot analysis in the case of the ANR and by quantification of the enzyme activities in the case of the LAR. In parallel, the influence of the growth regulator Prohexadion-Ca and Milsana<sup>®</sup>, an inducer of plant defense reactions, on the gene expression or rather the enzyme activity, was investigated. Both compounds are known to stimulate the synthesis of phenolic compounds involved in induced resistance mechanisms.

The gene expression of the ANR in untreated control plants began already in the flower and reached its maximum at the BBCH stadium 71 (receptacle protruding from sepal whorl). With increasing ripeness the ANR expression decreased. No more detectable gene expression occurred in fully ripened fruits. A Prohexadion-Ca treatment at BBCH stadiums 65, 71, and 85 induced a delay of the ANR expression in the flower. Nevertheless, the expression decreased during fruit ripening. A combined treatment with Prohexadion-Ca and Milsana<sup>®</sup> showed an early ANR expression with

its maximum in full flower. It decreased strongly in the stadium of protruded receptacles. Like in the other treatments, the ANR expression decreased during fruit ripening. LAR showed a two-phase enzyme activity with a strong activity at the time of full flower and a second increase of the enzyme activity in the fully ripened fruit. A treatment with Prohexadion-Ca late in the full flower led to a simultaneous stimulation of the LAR activity. However, a treatment with Prohexadion-Ca in the balloon stage caused a late reduction of the LAR activity in the stadium of a full flower.

Furthermore, the localization of flavan 3-ols in strawberry fruit flesh during the time course of fruit ripening was pointed out. Staining reactions by treating fruit sections with selective flavan 3-ol staining reagent p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) were carried out. The content of flavan 3-ols decreased continuously during fruit ripening and was temporarily and spatially complementary to the biosynthesis of anthocyanins. These results correlated with the results of the ANR gene expression study. DMACA stainable flavan 3-ols were almost homogenous in the unripe white fruit and restricted to the vascular tissues in the ripe red fruit. This development or localization, respectively, supports the hypothesis of the protection of early fruits and of vascular bundles in ripe fruits against *Botrytis cinerea* infection by flavan 3-ols.

The results of this study shed light on the molecular biological and biochemical background of the flavonol and flavan 3-ol biosynthesis in strawberry flowers and fruits and therefore enable a further explanation of the coherences of the *Fragaria* flavonoid biosynthesis.

## F Literatur

AABY K, SKREDE G und WROLSTAD RE (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4032-4040

AHARONI A, KEIZER LCP, BOUWMEESTER HJ, SUN Z, ALVAREZ-HUERTA M, VERHOEVEN HA, BLAAS J, VAN HOUWELINGEN AMML, DE VOS CHR, VAN DER VOET H, JANSEN RC, GUIJUS M, MOL J, DAVIS RW, SCHENA M, VAN TUNEN AJ und O'CONNELL AP (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavour biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell* 12: 647-661

AHARONI A, DE VOS CHR, WEIN M, SUN Z, GRECO R, KROON A, MOL JNM und O'CONNELL AP (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal* 28(3): 319-332

AHARONI A und AP O'CONNELL (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* 53(377): 2073-2087

ALMEIDA JRM, D'AMICO E, PREUSS A, CARBONE F, DE VOS CHR, DEIML B, MOURGUES F, PERROTTA G, FISCHER TC, BOVY AG, MARTENS S und ROSATI C (2007) Characterization of major genes and enzymes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* submitted

ARCHBOLD DD und DENNIS FG jr (1984) Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 330-335

BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS SJ, DAS DK, RAY SD, KUSZYNSKI CA, JOSHI SS und PRUESS HG (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187-197

BAKKER J, BRIDLE P und KOOPMAN A (1992) Strawberry juice colour: the effect of some processing variables on the stability of anthocyanins. *Journal of the science of food and agriculture* 60(4): 471-476

BARONI A (2003) Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. "Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?" University of Turin and FAO international workshop in Turin, Italien 17.-18. Oktober 2003

BAZZI C, MESSINA C, TORTORETO L, BINI F, CECCA GS und STEFANI E (2003) Investigations on the possible use of abiotic and biotic elicitors in defence-related responses in plants. *European Journal of Horticultural Science* 68: 115-122

BECKMANN CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110

- BELD M, MARTIN C, HUTTS H, STUITJE AR und GERATS AG (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Molecular Biology* 13(5): 491–502
- BENITEZ-BURRACO A, BLANCO-PORTALES R, REDONDO-NEVADO J, BELLIDO ML, MOYANO E, CABALLERO JL und MUNOZ-BLANCO J (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* 54(383): 633–645
- BLACK BL (2006) Strawberry runner suppression with prohexadione-calcium. *Acta Horticulturae* 708: V International Strawberry Symposium, 249–252
- BLANCO-PORTALES R, MEDINA-ESCOBAR N, LÓPEZ-RÁEZ JA, GONZÁLEZ-REYES JA, VILLALBA JM, MOYANO E, CABALLERO JL und MUÑOZ-BLANCO J (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* 53(375): 1723–1734
- BOGS J, DOWNEY MO, HARVEY JS, ASHTON AR, TANNER GJ und ROBINSON SP (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
- BOREVITZ JO, XIA YJ, BLOUNT J, DIXON RA und LAMB C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12: 2383–2393
- BRADFORD MA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248–254
- BRITSCH L, HELLER W und GRISEBACH H (1981) Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch.* 36c: 742–750
- BRITSCH L und GRISEBACH H (1985) Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* 24: 1975–1976
- BRITSCH L, RUHNAU-BRICH B und FORKMANN G (1992) Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3- $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Journal of Biological Chemistry* 267 (8): 5380–5387
- BROWN RGS, YAN L, BEALE MH und HEDDEN P (1998) Inhibition of gibberellin 2- $\beta$ -hydroxylase by novel acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* 47: 679–687
- BRUILLARD R und DANGLES O (1993) Flavonoids and flower colour In: Harborne J.B. (Hrsg.) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, 565–587
- BUBÁN T, FÖLDES L, KORMÁNY A, HAUPTMANN S, STAMMLER G und RADEMACHER W (2003) Prohexadion-Ca in apple trees: control of shoot growth and reduction of fire blight incidence in blossoms and shoots. *Journal of Applied Botany* 77: 95–102

- CHENG GW und BREEN PJ (1991) Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116(5): 865-9
- CHRISTENSEN AB, GREGERSEN PL, SCHRÖDER J und COLLINGE DB (1998) A chalcone synthase with unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology* 37: 849-857
- CIVELLO PM, POWELL ALT, SABEHAT A und BENNETT AB (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 121: 1273-1279
- CO H und MARKAKIS P (1968) Flavonoid compounds in the strawberry fruit. *Journal of Food Science* 33(3): 281-283
- CONRATH U, PIETERSE CMJ und MAUCH-MANI B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7(5): 210-216
- COSTA G, SPINELLI F, SABATINI E und RADEMACHER W (2004) Incidence of scab (*Venturia inaequalis*) in apple as affected by different plant growth retardants. *Acta Horticulturae* 653: 133-137
- CROZIER A, INDU B, JAGANATH L und CLIFFORD MN (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: CROZIER A (Hrsg): *Plant Secondary Metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing Limited
- DAAYF F, SCHMITT A und BÉLANGER, RR (1995) The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *Plant Disease* 79: 577-580
- DAAYF F, BÉLANGER RR und SCHMITT A (1996) Alteration of cucumber leaf physiology by treatment with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. In: LYR H, RUSSEL PE, SISLER HD (Hrsg) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Andover, UK, 245-251
- DAAYF F, ONGENA M, BOULANGER R, EL HADRAMI I und BÉLANGER RR (2000) Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Journal of Chemical Ecology* 26(7): 1579-1593
- DANGELMAYR B (1982) Nachweis von Enzymen der Flavonoidbiosynthese und der genetischen Kontrolle von Chalkon-Isomerase-Aktivität in Blüten. Dissertation. Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- DAVIES J (1997) The bioenergetics of vacuolar H<sup>+</sup> pumps. In: LEIGH R, SANDERS D und CALLOW J (Hrsg): *The plant vacuole*. Academic Press, San Diego, 340-363
- DAVIES K und SCHWINN K (1997) Flower colour. In: GENEVE R, PREECE J und MERKLE S (Hrsg): *Biotechnology of ornamental plants*. CAB International, Wallingford, 259-294
- DAVIES KM und SCHWINN KE (2003) Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology* 30: 913-925

- DEIML B (2003) Cloning and Expression of the Flavonoid 3'-hydroxylase and the Flavonol Synthase of *Gerbera hybrida*. Technische Universität München. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- DELLUS V, HELLER W, SANDERMANN H und SCALBER A (1997) Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues. *Phytochemistry* 45: 1415-1418
- DENG C und DAVIS TM (2001) Molecular identification of the yellow fruit color (c) locus in diploid strawberry: a candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics* 103 (2-3), 316-322
- DI VENERE D, LINSALATA V, IPPOLITO A, NIGRO F, ARCUTI P und LATTANZIO V (1998) Endogenous phenolics, ripening and susceptibility of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) to post-harvest diseases. In: Proceedings of the XIX International Conference on Polyphenols, Polyphenols Communication 98, Lille, Frankreich, 1.-4. September 1998, 459-460
- DIESPERGER H, MÜLLER R und SANDERMANN, H (1974) Rapid isolation of a plant microsomal fraction by Mg<sup>2+</sup> precipitation. *FEBS Letters* 43: 155
- DIXON RA, XIE DY, SHARMA SB, CHEN F und FERREIRA D (2004) Biochemical and molecular genetic approaches to proanthocyanidin biosynthesis. *Cell*: 81
- DIXON RA, XIE DY und SHARMA SB (2005) Tansley review Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165:9-28
- FEDOROFF NV, FURTEK DB und NELSON OE (1984): Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable element Activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81: 3825-3829
- FEUCHT W und KHAN MZ (1973) Einfluß des DL-Catechins auf das Wachstum von *in vitro* kultivierten *Prunus*-Sproßsegmenten. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 69: 242-248
- FISCHER TC, HALBWIRTH H, MEISEL B, STICH K und FORKMANN G (2003) Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus x domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412: 223-230
- FISCHER TC, HALBWIRTH H, RÖMMELT S, SABATINI E, SCHLANGEN K, ANDREOTTI C, SPINELLI F, COSTA G, FORKMANN G, TREUTTER D und STICH K (2006) Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor. *Physiologia Plantarum* 128: 604-617
- FOFANA B, McNALLY DJ, LABBE C, BOULANGER R, BENHAMOU N, SEGUIN A und BELANGER RR (2002) Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(2): 121-132
- FORKMANN G (1994) Genetics and molecular biology of flavonoids. *Acta horticulturae* 381: 121-140

- 
- FORKMANN G und HELLER W (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: Sankawa U (Hrsg) *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 713-748
- FOSSEN T, RAYYAN S, ANDERSEN ØM (2004) Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria × ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry* 65:1421-1428
- FOX DK, WESTFALL B, NATHAN M, HUGHES AJ Jr., RASHTCHIAN A und SCHUSTER DM (2000) Striding new distances with 5'-RACE: long 5'-RACE of Human APC and TSC-2 cDNA. *Focus* 18(2): 33-37
- GARCIA-VIGUERA C, ZAFRILLA P und TOMÁS-BARBERÁN FA (1998) The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* 9: 274-277
- GIL MI, HOLCROFT DM und KADER AA (1997) Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1662-1667
- GIVEN NK, VENIS MA und GRIERSON D (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174: 402-406
- GOIFFON JP, MOULY PP und GAYDOU EM (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 382(1): 39-50
- GOSCH C (2003) Dihydroflavonol 4-reductases from various crop plants: molecular cloning, heterologous expression, and consequences of the substrate specificity for induced disease resistance. Diplomarbeit, Technische Universität München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- GOSCH C, PUHL I, HALBWIRTH H, SCHLANGEN K, ROEMMELT S, ANDREOTTI C, COSTA G, FISCHER TC, TREUTTER D, STICH K und FORKMANN G (2003) Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *The European Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 68(3): 144-151
- GRAYER RJ (1989) Flavonoids. In: Harborne JB (Hrsg) *Methods in Plant Biochemistry – Volume 1: Plant Phenolics*. Academic Press, London, UK, 283-325
- GRIGGS DL, HEDDEN P, TEMPLE-SMITH KE und RADEMACHER W (1991) Inhibition of gibberellin 2 $\beta$ -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* 30: 21513-21517
- GROSSMANN K, KÖNIG-KRANZ S und KWIATKOWSKI J (1994) Phytohormonal changes in intact shoots of wheat and oilseed rape treated with the acylcyclohexanedione growth retardant prohexadione calcium. *Physiologia Plantarum* 90: 139-143
- HÄKKINEN S, KÄRENLAMPI S, HEINONEN M, MYKKÄNEN H und TÖRRÖNEN R (1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 543-551

HÄKKINEN S, HEINONEN M, KÄRENLAMPI S, MYKKÄNEN H, RUUSKANEN J und TÖRRÖNEN R (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 33: 345-353.

HÄKKINEN S (2000) Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral Dissertation University of Kuopio, Faculty of Medicine

HÄKKINEN S und TÖRRÖNEN 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: 517-524

HALBWIRTH H, KAMPAN W, STICH K, FISCHER TC, MEISEL B, FORKMANN G und RADEMACHER W (2002) Biochemical and molecular biological investigations with respect to induction of fire blight resistance in apple and pear by transiently altering the flavonoid metabolism with specific enzyme inhibitors. *Acta Horticulturae* 590: 485-492

HALBWIRTH H, FISCHER TC, ROEMMELT S, SPINELLI F, SCHLANGEN K, PETEREK S, SABATINI E, MESSINA C, SPEAKMAN JB, ANDREOTTI C, RADEMACHER W, BAZZI C, COSTA G, TREUTTER D, FORKMANN G und STICH K (2003) Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight. *Zeitschrift für Naturforschung Section C,-Biosciences* 58(11/12): 765-770

HALBWIRTH H, PUHL I, HAAS U, JEZIK K, TREUTTER D und STICH K (2006) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1479-1485

Hammerschmidt R. (1999) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2):77-84

HAMMOND-KOSACK KE und JONES JDG (1996) Resistance Gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791

HARBORNE JB (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, New York.

HARBORNE J (1995) Ökologische Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

HARBORNE JB und GRAYER RJ (1993) Flavonoids and insects. In HARBORNE JB (Hrsg), The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman & Hall, London, 589-618

HARBORNE JB und BAXTER H (1999) The Handbook of natural flavonoids. Wiley, Chichester

HARBORNE JB und WILLIAMS CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992 (review). *Phytochemistry* 55: 481-504

HARPSTER MH, BRUMMELL DA und DUNSMUIR P (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed Endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology* 118: 1307-1316

HARRISON EP, MCQUEEN-MASON SJ und MANNING K (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany* 52(360) 1437-1446

- HAYMES KM, VAN DE WEG WE, ARENS P, MAAS JL, VOSMAN B und DEN NIJS APM (2000) Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *Journal of the American Society for horticultural science* 125: 330-339
- HÉBERT C, CHARLES MT, GAUTHIER L, WILLEMOT C, KHANIZADEH S und COUSINEAU J (2002) Strawberry proanthocyanidins: biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability. *Acta Horticulturae* 567: 659-661
- HILL G, STELLWAAG-KITTLER F, HUTH G und SCHLÖSSER E (1981) Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* 102: 328-338
- HOLTON TA, CORNISH EC und TANAKA Y (1993a) Plant flavonoid 3' hydroxylase genes and transgenic plants containing these or related nucleic acids. *PCT Int. Appl.* 85
- HOLTON TA, CORNISH EC und TANAKA Y (1993b) Plant flavonoid 3' hydroxylase genes and transgenic plants containing these or related nucleic acids. *PCT Int. Appl.* 85
- HOLTON TA und TANAKA Y (1994) Blue roses – A pigment of our imagination? *Trends in Biotechnology* 12: 40-42
- ISEBAERT S, VERHOEVEN R, HAESAERT G (2002) Disease control by means of induced resistance. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwked Toegep Biol Wet* 67(2): 159-64
- ISHIMARU K, OMOTO T, ASAI I, EZAKI K und SHIMOMURA K (1995) Taxifolin 3-Arabinoside from *Fragaria x Ananassa*. *Phytochemistry* 40(1): 345-347
- JERSCH S, SCHERER C, HUTH G und SCHLÖSSER E (1989) Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits. *Pflanzenkrankheiten* 96 (4): 365-378
- JOHNSON E, RYU S, YI H, SHIN B, CHEONG H und CHOI G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25(3): 325-333
- KNOTT J (2004) Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel. Dissertation, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- KOES R, VERWEIJ W und QUATTROCCHIO F (2005) Flavonoids: a colourful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10: 236-242
- KOSAR M, KAFKAS E, PAYDAS S, CAN B, HUESNUE K (2004) Phenolic Composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(6): 1586-1589
- KREUZALER F, RAGG H, FAUTZ E, KUHN DN und HAHNBROCK K (1983) UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80: 2591-2593

- KUNIHISA M, FUKINO N und MATSUMOTO S (2006) Development of PCR-RFLP marker on strawberry and the identification of cultivars and their progeny. *ISHS Acta Horticulturae* 708: V International Strawberry Symposium
- LEPINIEC L, DEBEAUJON I, ROUTABOUL JM, BAUDRY A, POURCEL L, NESI N und CABOCHE M (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57:405–430
- LERCETEAU-KOHLER E, GUERIN G, LAIGRET F und DENOYES-ROTHAN B (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 619-628
- LUCAS JA (1999) Plant immunisation: from myth to SAR. *Pesticide Science* 55(2):193-196
- LUKAČIN R, GRÖNING I, SCHILTZ E, BRITSCH L und MATERN U (2000) Purification of recombinant flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of the primary site of proteolytic degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 375(2) 364-370
- LUKAČIN R, WELLMANN F, BRITSCH L, MARTENS S und MATERN, U (2003) Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. *Phytochemistry* 62(3):287-92
- LUNKENBEIN S, COINER H, DE VOS CHR, SCHAART JG, BOONE MJ, KRENS FA, SCHWAB W und SALENTIJN MJ (2006) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2145-2153
- MANNING K (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochemistry* 195(1): 45-50
- MANNING K (1994) Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* 194: 62-68
- MANNING K (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205 (4): 622-631
- MARBRY TL, MARKHAM KR und THOMAS MB (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin
- MARTENS S und FORKMANN G (1999) Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *The Plant Journal* 20 (5): 611-618
- MARTENS S, FORKMANN G, MATERN U und LUKAČIN R (2001) Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* 58: 43-46
- MARTENS S, TEERI T und FORKMANN G (2002) Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Letters* 531(3):453-458
- MARTENS S, FORKMANN G, BRITSCH L, WELLMANN F, MATERN U und LUKAČIN R (2003) Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley. *FEBS Letters* 544 (1-3): 93-98

- MARTIN C, CARPENTER R, SOMMER H, SAEDLER H und COEN ES (1985) Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. *The EMBO Journal* 4: 1625-1630
- MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S, BARTLETT J und VRIJLANDT E (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal* 1: 37-49
- MAYR U, MICHALEK S, TREUTTER D und FEUCHT W (1997) Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology* 145: 69-75
- MEDINA-ESCOBAR N, CARDENAS J, MOYANO E, CABALLERO JL und MUNOZ-BLANCO J (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology* 34: 867-877
- MEHDY MC und LAMB CJ (1987) Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *The EMBO Journal* 6: 1527-1533
- MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P und WEISSHAAR B (2005) The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 138: 1083-1096
- MEIER U, GRAF H, HACK H, HESS M, KENNEL W, KLOSE R, MAPPES D, SEIPP D, STAUSS R, STREIFF J und VAN DEN BOOM T (1994) Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (*Prunus*-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 46: 141-153
- MENSSON A, HÖHMANN S, MARTIN W, SCHANLE PS, PETERSON PA, SAEDLER H und GIERL A (1990) The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene. *The EMBO Journal* 9: 3051-3058
- MERZLYAK MN, SOLOVCHENKO AE und CHIVKUNOVA OB (2002) Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* (Paris, France) 40(6-8): 679-684
- MIKKONEN TP, HUKKANEN AT, MAATTA KR, KOKKO HI, TORRONEN AR, KARENLAMPI SO und KARJALAINEN RO (2002) Flavonoid content in strawberry cultivars. *Acta Horticulturae* 567, 815-818
- MORIGUCHI T, KITA M, OGAWA K, TOMONO Y, ENDO T und OMURA M (2002) Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 114 (2): 251-258
- MOYANO E, PORTERO-ROBLES I, MEDINA-ESCOBAR N, VALPUESTA V, MUNOZ-BLANCO J, CABALLERO JL (1998) A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiology* 117: 711-716
- NAKASHITA H, YOSHIOKA K, YASUDA M, NITTA T, ARAI Y, YOSHIDA S und YAMAGUCHI I (2002) Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(4): 197-203

- NESI N, JOND C, DEBEAUJON I, CABOCHE M und LEPINIEC L (2001) The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant Cell* 13: 2099–2114
- NEWCOMB RD, CROWHURST RN, GLEAVE AP, RIKKERINK EHA, ALLAN AC, BEUNING LL, BOWEN JH, GERA E, JAMIESON KR, JANSSEN BJ, LAING WA, MCARTNEY S, NAIN B, ROSS GS, SNOWDEN KC, SOULEYRE EJJ, WALTON EF und YAUK YK (2006) Analyses of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiology* 141: 147-166
- NIJVELDT RJ, VAN NOOD E, VAN HOORN DEC, BOELENS PG, VAN NORREN K und VAN LEEUWEN PAM (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425
- NITSCH JP (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany* 37: 211-215
- Noda N, Kanno Y, Kato N, Yazuma K und Suzuki M (2004) Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiologia Plantarum* 122: 305–313
- O'REILLY C, SHEPHERD NS, PEREIRA A, SCHWARZ-SOMMER Z, BERTRAM I, ROBERTSON DS, PETERSON PA und SAEDLER H (1985) Molecular cloning of the *a1* locus in *Zea mays* using transposable elements *En* and *Mu1*. *The EMBO Journal* 4: 877-882
- PAOLOCCI F, ROBBINS MP, MADEO L, ARCIONI S, MARTENS S und DAMIANI F (2007) Ectopic expression of a basic helix-loop-helix gene transactivates parallel pathways of proanthocyanidin biosynthesis. structure, expression analysis, and genetic control of leucoanthocyanidin 4-reductase and anthocyanidin reductase genes in *Lotus corniculatus*. *Plant Physiology* 143: 504-516
- PASINI C, D'AQUILA F, CURIR P und GULLINO L (1997) Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection* 16(3): 251-256
- PAULSON GS, HULL LA und BIDDINGER DJ 2005 Effect of a plant growth regulator prohexadione-calcium on insect pests of apple and pear. *Journal of Economic Entomology* 98: 423-431
- PFEIFFER J, KÜHNEL C, Brandt J, Duy D, PUNYASIRI PAN, FORKMANN G und FISCHER TC (2006) Biosynthesis of catechins by leucoanthocyanidin 4-reductases (LAR) and anthocyanidin reductases (ANR) in leaves of grape (*Vitis vinifera*), apple (*Malus x domestica*) and other crops. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 323-334
- PIETERSE CMJ und VAN LOON LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4(2):52-58
- POMPON D, LOUERAT B, BRONINE A und URBAN P (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* 272: 51–64
- PRELL HH (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena

PRESCOTT AG und JOHN P (1996) Dioxygenases: molecular structure and the role in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 245-271

PRESCOTT AG, STAMFORD NPJ, WHEELER G und FIRMIN JL (2002) *In vitro* properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 60(6): 589-593

PUNJA ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 216-235

PUNYASIRI PAN, ABEYSINGHE ISB, KUMAR V, TREUTTER D, DUY D, GOSCH C, MARTENS S, FORKMANN G und FISCHER TC (2004) Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 431: 22-30

RADEMACHER W (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 501-531

RADEMACHER W und KOBER R (2003) Efficient use of prohexadion-Ca in pome fruits. *European Journal of Horticultural Science* 68(3), 101-107

RADEMACHER W (2005) Prohexadione-Ca and crop protection in pomme fruit trees. In Curry E. (Hrsg.): 31st Annual Meeting Plant Growth Regulation Society of America, 2004, Charleston, 79-85

REDDY ASN und POOVAIAH BW (1990) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. *Plant Molecular Biology* 14: 127-136

REDDY ASN, JENA PK, MUKHERJEE SK und POOVAIAH BW (1990) Molecular cloning of cDNAs for auxin-induced mRNAs and developmental expression of the auxin-inducible genes. *Plant Molecular Biology* 14(5): 643-653

REDONDO-NEVADO J, MOYANO E, MEDINA-ESCOBAR N, CABALLERO JL und MUÑOZ-BLANCO J (2001) A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany*, 52(362):1941-1945

REEKIE JY, HICKLENTON PR, DUVAL JR, CHANDLER CK und STRUIK PC (2003) Manipulating transplant morphology to advance and enhance fruit yield in strawberry. *Acta Horticulturae* 626: XXVI International Horticultural Congress: Berry Crop Breeding, Production and Utilization for a New Century

REEKIE JY, HICKLENTON PR und STRUIK PC (2005 a) Prohexadione-calcium modifies growth and increases photosynthesis in strawberry nursery plants. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 671-677

REEKIE JY, HICKLENTON PR, DUVAL JR, CHANDLER CK und STRUIK PC (2005 b) Leaf removal and prohexadione-calcium can modify Camarosa strawberry nursery plant morphology for plasticulture fruit production. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 665-670

Reekie JY (2006) Manipulating transplant morphology to advance post-transplant growth and yield in strawberry. PGRSA 2006 Annual Meeting, 8.-12. Juli 2006, Quebec City, Kanada

ROEMMELT S, TREUTTER D, SPEAKMAN JB und RADEMACHER W (1999) Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. Proceedings of the 8th Int. workshop on fire blight. *Acta Horticulturae* 489

ROEMMELT S, FISCHER TC, HALBWIRTH H, PETEREK S, SCHLANGEN K, SPEAKMAN JB, TREUTTER D, FORKMANN G und STICH K (2003) Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: chemical, biochemical and molecular biological aspects. *European Journal of Horticultural Science* 68(3): 129-136.

SAMBROOK J, FRITSCH E und MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

SASLOWSKY DE, WAREK U und WINKEL BSJ (2005) Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 280(25): 23735-23740

SCALBERT A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30(12): 3875-3883

SCHAART JG, MEHLI L und SCHOUTEN HJ (2005) Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using pyrosequencing<sup>TM</sup>. *The Plant Journal* 41: 493-500

SCHERER C (1982) Rolle von Proanthocyanidinen bei der Stadienresistenz von Erdbeerfrüchten gegenüber *Botrytis cinerea* Pers. Dissertation, Gießen

SCHLÖSSER E (1993) Preformed phenols as resistance factors. *Acta Horticulturae* 381: International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance

SCHNEIDER S und ULLRICH WR (1994) Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 291-304

SCHWINN K, VENAIL J, SHANG Y, MACKAY S, ALM V, BUTELLI E, OYAMA R, BAILEY P, DAVIES K und MARTIN C (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant Cell*, 18: 831-851

SEITZ C (2004) Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus *Osteospermum*. Dissertation, Technische Universität München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

SHEN GA, PANG Y, WU W, LIU X, ZHAO L, SUN X und TANG K (2006) Isolation and characterization of a putative anthocyanidin reductase gene from *Ginkgo biloba*. *Journal of Plant Physiology* 163 (2): 224-227

SKADHAUGE B, THOMSEN K und VON WETTSTEIN D (1997) The role of barley testa layer and flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 126: 147-160

SKUPIEN K und OSZMIANSKI J (2004) Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology* 219: 66-70

- SPINELLI F, SPEAKMAN JB, RADEMACHER W, HALBWIRTH H, STICH K und COSTA G (2005) Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 112: 133-142
- SPRINGOB K, LUKAČIN R, ERNWEIN C, GRÖNING I und MATERN U (2000) Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *European Journal of Biochemistry* 267: 6552-6559
- STAFFORD HA und LESTER HH (1984) Flavan-3-ol biosynthesis. The conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3,4-cis-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of Douglas fir. *Plant Physiology* 76:184-186
- STEFFEK R und ALTENBURGER J (2003) Erfahrungen mit Pflanzenhilfsmitteln im biologischen Erdbeeranbau. Tagungsband der 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Wien, 24.-26.2.2003
- STÖHR H und HERRMANN K (1975) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 159: 341-348
- STOTZ G, DE VLAMING P, WIERING H, SCHRAMM AW und FORKMANN G (1985) Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. *Theoretical and Applied Genetics* 70(3): 300-305
- TAKOS AM, EWA-UBI B, ROBINSON SP und WALKER AR (2006) Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Science* 170:487-499
- TANAKA Y, FUKUI Y, FUKUCHI-MIZUTANI M, HOLTON TA, HIGGINS E, KUSUMI T (1995) Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant and Cell Physiology* 36(6): 1023-31
- TANNER GJ, MOATE PJ, DAVIES LH, LABY RH, YUGUANG L und LARKIN PA (1995) Proanthocyanidins (condensed tannins) destabilise plant protein foams in a dose dependent manner. *The Australian Journal of Agricultural Research* 46: 1101-1109
- TANNER GJ, FRANCKI KT, ABRAHAMS S, WATSON JM, LARKIN PJ und ASHTON AR (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 278 (34): 31647-31656
- TARTARINI S (2003) Marker-assisted selection in pome fruit breeding. "Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?" University of Turin and FAO international workshop in Turin, Italien, 17.-18. Oktober 2003
- TERRY LA, JOYCE DC, ADIKARAM NKB und KHAMBAY BPS (2004) Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* 31: 201-212
- TRAINOTTI L, FERRARESE L, VECCHIA FD, RASCIO N und CASADORO G (1999a) Two different endo- $\beta$ -1,4-glucanases contribute to the softening of the strawberry fruits. *Journal of Plant Physiology* 154(3) 355-362

- TRAINOTTI L, SPOLAORE S, PAVANELLO A, BALDAN B und CASADORO G (1999b) A novel E-type endo- $\beta$ -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Molecular Biology* 40: 323–332
- TREUTTER D (1989) Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *Journal of Chromatography* 467: 185-193
- TREUTTER D, FEUCHT W und CHRIST E (1991) Flavan 3-ol und deren Einfluss auf die Pilzresistenz bei der Erdbeere. *Mitteilungen Klosterneuburg* 41: 79-83
- TREUTTER D (2000) Induzierte Resistenz in der Phytomedizin, Konsequenzen für die Nahrungsqualität? *Journal of Applied Botany* 74: 1-4
- Treutter D (2005) Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of their Biosynthesis. *Plant Biology* 7: 581-591
- VAN ELDIK GJ, REIJNEN WH, RUTTER RK, VAN HERPEN MM, SCHRAUWEN JA und WULLEMS GJ (1997) Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant Journal* 11(1): 105-113
- VERBERNE MC, HOEKSTRA J, BOL JF und LINTHORST HJM (2003) Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal* 35(1): 27-32
- WELFORD RW, TURNBULL JJ, CLARIDGE TD, PRESCOTT AG und SCHOFIELD CJ (2001) Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. *Chemical Communications (Camb)* 18: 1828-9
- WELLMANN F, LUKAČIN R, MORIGUCHI T, BRITSCH L, SCHILTZ E und MATERN U (2002) Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *citrus unshiu*. *European Journal of Biochemistry* 269: 4134-4142
- WELLMANN F, GRIESSER M, SCHWAB W, MARTENS S, EISENREICH W, MATERN U und LUKAČIN R (2006) Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin. *FEBS Letters* 580: 1642-1648
- WILKINSON JQ, LANAHAN MB, CONNER TW und KLEE HJ (1995) Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology* 27 (6): 1097-1108
- WINKEL-SHIRLEY B (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in plant science* 1: 377-382
- WINKEL-SHIRLEY B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493
- Winkel-Shirley B (2004) Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55:85–107

WISMAN E, HARTMANN U, SAGASSER M, BAUMANN E, PALME K, HAHNBROCK K, SAEDLER H und WEISSHAAR B (1998) Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (21): 12432-12437

WURMS K, LABBE C, BENHAMOU N und BELANGER RR (1999) Effects of miltana and ben-zothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* 89(9): 728-736

XIE DY, SHARMA S, PAIVA NL, FERREIRA D und DIXON RA (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* (Washington, DC, United States) 299(5605): 396-399

XIE DY, SHARMA S und DIXON RA (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422: 91-102

XIE DY und DIXON RA (2005) Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* 66: 2127-2144

YAMADA S, MOTOMORI Y, NAKASHIMA T, KUNITAKE H, MORI K, NAKAMURA N, TSUJI T, TANAKA M und ISHIMARU K (1998) Polyphenols in *Fragaria x ananassa*. *Japanese Journal of Food Chemistry* 5(2)

## **G Anhang**

### **G.1 BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien der Erdbeere nach MEIER et al. (1994)**

#### **Makrostadium 6: Blüte**

- 60 Erste Blüten (Primär- oder A-Blüte) offen
- 61 Beginn der Blüte: etwa 10 Prozent der Blüten geöffnet
- 65 Vollblüte: B- und C-Blüten geöffnet; erste Blütenblätter fallen ab
- 67 Abgehende Blüte: Mehrzahl der Blütenblätter abgefallen

#### **Makrostadium 7: Fruchtentwicklung**

- 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt
- 73 Samen deutlich auf dem Fruchtgewebe erkennbar (Nüsschenstadium)

#### **Makrostadium 8: Fruchtreife**

- 81 Beginn der Fruchtreife: Mehrzahl der Früchte weiß gefärbt
- 85 Früchte beginnen sich sortentypisch auszufärben
- 87 Hauptpflücke: Mehrzahl der Früchte sortentypisch ausgefärbt
- 89 2. Pflücke: Weitere Früchte sortentypisch ausgefärbt

## G.2 Partiiell degenerierte, genspezifische und genunspezifische Primer

Partiiell degenerierte Primer			
Genspezifität	Name des Primers	Nukleotid- oder Aminosäuresequenz	Herkunft
LAR	3LAR6	5'-GCCATCACCRRTAGATWWGRAAC-3'	
	5LAR7	5'-GAGGTTTTYTGCCBTCVGAGTTTGG-3'	
	5LAR8	5'-GCAAYTCMATYGCHKCTTGCC-3'	
ANR	5ANR2n	5'-AAGTCTGCTTGTGTCATCG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	3ANR2n	5'-CAGCTAGTACCTTTGAAACAGG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>

Genspezifische Primer			
Genspezifität	Name des Primers	Nukleotid- oder Aminosäuresequenz	Herkunft
DFR	5FraDFR	5'-GCACTAACTAAAGCATGGG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	3.2FraDFR	5'-GATAACTTCGACTGGATCGGAG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
FLS	FLSRoVo	5'-GGTAGAGAGAGTTCAAGACATTGC-3'	<i>Rosa hybrida</i>
	3RoFLS1	5'-GAGCCTTGTGAGCTCTGAGAC-3'	<i>Rosa hybrida</i>
	3FLSRACE1	5'-AGCAGTAGTTAATGGCAGAAGG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	3FLSRACE2	5'-GGTCGCTGAAATCAATGGTAGG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	5FLS	5'-CGAAAGAGTACAAGACATTTGCC-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	3FLS	5'-CCCTGCAGTAATCAATCAG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
LAR	LAR5'-RACE2	5'-GATCTGGAAGTATGATCCAACG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	LAR5'-RACE3	5'-CCAAGCAGCAATGGAGTTGC-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	5LARfra	5'-CCGCAGGCAGCCATG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>
	3LARfra1	5'-GAGCAAACCTATTACATTG-3'	<i>Fragaria x ananassa</i>

ANR	3ANRRACE1	5'-ACCACTGCCAAGCCACCTACC-3'	<i>Fragaria × ananassa</i>
	5ANRRACE1	5'-AGCATCAAAGCTCCCTTCATCG-3'	<i>Fragaria × ananassa</i>
	5ANRRACE2	5'-CGGCATAGCCCTTCTCTAGC-3'	<i>Fragaria × ananassa</i>
	5ANR2	5'-GCAAAGCTAGAGTTTAAGCC-3'	<i>Fragaria × ananassa</i>
	3ANR1	5'-CCATGTAAACCAGGATCATAG-3'	<i>Fragaria × ananassa</i>

Genuspezifische Primer			
Genpezifität	Name des Primers	Nukleotid- oder Aminosäuresequenz	Herkunft
	AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT(17)	
	AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGG IIIGGIIIG	
	AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
	Oligo(dT)	(TTT)10VN	
	Oligo(dT) Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTT TTTTTTTTTTTV-Wobbles	
	TOPO forward	AGCTCGGATCCACTAGTAACG	pCR®2.1-TOPO®
	TOPO reverse	CCTCTAGATGCATGCTCGAG	pCR®2.1-TOPO®
	pYes2_for	CCCGGATCGGACTACTAGCAG	pYes2.1V5-His-TOPO
	pYes2_rev	GAGGGCGTGAATGTAAGCGTGAC	pYes2.1V5-His-TOPO



## G.3.2 Flavonolsynthese

L	S	S	F	S	E	D	K	M	G	V	E	R	V	Q	D	I	A	18		
CTT	TCT	TCT	TTC	TCA	GAA	GAT	AAA	ATG	GGG	GTA	GAA	AGA	GTG	CAA	GAC	ATT	GCA	54		
										<b>G</b>	<b>GTA</b>	<b>GAG</b>	<b>AGA</b>	<b>GTT</b>	<b>CAA</b>	<b>GAC</b>	<b>ATT</b>	<b>GC</b>	<b>&gt; FLSRoVo</b>	
S	T	I	S	E	D	T	I	P	A	E	Y	I	R	S	E	N	E	36		
TCT	ACA	ATT	TCC	GAG	GAC	ACA	ATC	CCG	GCG	GAG	TAC	ATT	AGG	TCG	GAG	AAT	GAG	108		
Q	P	G	I	T	T	V	P	N	T	V	L	E	C	P	T	I	D	54		
CAG	CCG	GGA	ATC	ACC	ACC	GTC	CCT	AAC	ACA	GTC	CTC	GAA	TGC	CCT	ACC	ATT	GAT	162		
														<b>GGA</b>	<b>TGG</b>	<b>TAA</b>	<b>CTA</b>			
F	S	D	P	D	E	E	K	L	L	K	Q	I	F	E	A	S	I	72		
TTC	AGC	GAC	CCT	GAT	GAG	GAG	AAG	CTC	CTC	AAA	CAA	ATC	TTC	GAG	GCC	AGC	ATC	216		
<b>AAG</b>	<b>TCG</b>	<b>CTG</b>	<b>G</b>	<b>&gt;</b>	<b>3FLSRACE2</b>															
D	W	G	M	Y	Q	I	V	N	H	D	I	S	N	E	A	I	S	90		
GAC	TGG	GGC	ATG	TAC	CAA	ATC	GTG	AAC	CAT	GAC	ATT	TCC	AAC	GAG	GCC	ATA	TCC	270		
K	L	Q	A	V	G	K	E	F	F	E	L	P	Q	E	E	K	E	108		
AAG	TTA	CAG	GCC	GTC	GGA	AAA	GAG	TTC	TTT	GAG	CTC	CCG	CAG	GAG	GAG	AAA	GAG	324		
V	Y	A	K	D	P	N	S	K	S	V	E	G	Y	G	T	F	L	126		
GTT	TAC	GCA	AAA	GAT	CCT	AAC	TCA	AAG	TCC	GTG	GAG	GGT	TAC	GGT	ACA	TTT	TTG	378		
Q	K	E	L	E	G	K	K	G	W	V	D	H	L	F	H	K	I	144		
CAG	AAG	GAA	CTG	GAA	GGG	AAG	AAA	GGG	TGG	GTG	GAT	CAT	CTG	TTC	CAT	AAG	ATT	432		
W	P	P	S	T	I	N	Y	R	F	W	P	K	T	P	A	S	Y	162		
TGG	CCA	CCT	TCT	ACC	ATT	AAC	TAC	CGC	TTT	TGG	CCT	AAG	ACT	CCA	GCT	TCT	TAC	486		
										<b>GGA</b>	<b>AGA</b>	<b>CGG</b>	<b>TAA</b>	<b>TTG</b>	<b>ATG</b>	<b>AGC</b>	<b>A</b>	<b>&gt; 3FLSRACE1</b>		
R	E	A	N	E	E	Y	A	K	N	L	H	K	V	V	E	K	L	180		
AGG	GAA	GCC	AAT	GAA	GAG	TAT	GCA	AAG	AAT	TTA	CAC	AAG	GTG	GTG	GAG	AAG	CTA	540		
F	K	L	L	S	L	G	L	G	L	E	A	Q	E	L	K	K	A	198		
TTT	AAA	CTT	TTA	TCT	TTG	GGG	TTA	GGG	CTT	GAA	GCA	CAA	GAA	CTG	AAG	AAG	GCA	594		
I	G	G	D	D	L	V	Y	L	L	K	I	N	Y	Y	P	P	C	216		
ATT	GGT	GGT	GAT	GAC	TTG	GTG	TAC	CTT	CTC	AAA	ATC	AAT	TAC	TAT	CCG	CCG	TGT	648		
P	R	P	D	L	A	L	G	V	V	A	H	T	D	M	S	A	L	234		
CCC	CGC	CCT	GAT	CTT	GCT	CTT	GGT	GTG	GTT	GCC	CAT	ACT	GAC	ATG	TCC	GCC	CTC	702		
T	I	L	V	P	N	E	V	Q	G	L	Q	A	C	R	D	G	Q	252		
ACC	ATT	CTC	GTC	CCA	AAC	GAA	GTT	CAG	GGC	CTC	CAA	GCT	TGC	CGC	GAT	GGC	CAG	756		
W	Y	D	V	K	Y	I	P	N	A	L	V	I	H	I	G	D	Q	270		
TGG	TAC	GAT	GTC	AAG	TAC	ATC	CCT	AAT	GCC	CTA	GTC	ATC	CAC	ATT	GGT	GAT	CAA	810		
M	E	I	M	S	N	G	K	Y	R	A	V	L	H	R	T	T	V	288		
ATG	GAG	ATA	ATG	AGC	AAT	GGA	AAG	TAC	AGG	GCT	GTG	CTG	CAC	AGA	ACC	ACA	GTG	864		
S	K	D	K	T	R	I	S	W	P	V	F	L	E	P	P	A	D	306		
AGC	AAA	GAC	AAG	ACG	AGA	ATC	TCC	TGG	CCT	GTG	TTT	CTG	GAA	CCT	CCG	GCA	GAC	918		
Q	V	I	G	P	H	P	K	L	V	N	D	K	E	N	P	P	E	324		
CAA	GTA	ATA	GGG	CCT	CAC	CCC	AAG	CTC	GTT	AAT	GAT	AAG	GAG	AAT	CCA	CCA	GAG	972		
Y	K	T	K	K	Y	S	E	Y	V	Y	N	K	L	N	K	M	P	342		
TAC	AAG	ACC	AAG	AAG	TAC	AGC	GAG	TAT	GTT	TAC	AAC	AAG	CTC	AAC	AAG	ATG	CCC	1026		
Q	*	F	T	D														347		
CAG	TAA	TTT	ACT	GAT	TGA	TTA	CTG	CAG	GGG	GTG	TCT	CAG	AGC	TCA	CAA	GGC	TC	1079		
			<b>&lt;</b>	<b>GA</b>	<b>CTA</b>	<b>ACT</b>	<b>AAT</b>	<b>GAC</b>	<b>GTC</b>	<b>CC</b>	<b>3FLS</b>									
											<b>&lt;</b>	<b>C</b>	<b>AGA</b>	<b>GTC</b>	<b>TCG</b>	<b>AGT</b>	<b>GTT</b>	<b>CCG</b>	<b>AG</b>	<b>3RoFLS1</b>

fett = Primer; &gt; = forward Primer; &lt; = reverse Primer

ATG = Startcodon; TAA = Stoppcodon

## G.3.3 Leukoanthocyanidin 4-Reduktase

* A F A A A M T V S P S I A S A A K	18
TAA GCC TTC GCA GCA GCC ATG ACG GTG TCA CCT TCT ATT GCC TCT GCT GCA AAG	54
<b>C GCA GCA GCC ATG 5LARfra &gt;</b>	
S G R V L I I G A T G F I G K F V A	36
AGT GGC CGA GTC CTC ATT ATC GGC GCC ACC GGC TTC ATC GGC AAG TTC GTC GCC	108
E A S L D S G L P T Y V L V R P G P	54
GAA GCC AGC CTC GAC TCC GGC CTT CCC ACT TAC GTC CTC GTC CGA CCC GGC CCG	162
S R P S K S D T I K S L K D R G A I	72
TCT CGT CCT TCC AAG TCC GAC ACC ATC AAG TCC CTC AAA GAC AGA GGC GCC ATC	216
I L H G V M S D K P L M E K L L K E	90
ATC CTA CAT GGG GTG ATG AGT GAT AAG CCA TTG ATG GAG AAG CTA CTG AAA GAG	270
H E I E I V I S A V G G A T I L D Q	108
CAT GAG ATC GAG ATA GTC ATA TCA GCC GTG GGT GGT GCA ACA ATT CTA GAC CAG	324
I T L V E A I T S V G T V K R F L P	126
ATC ACC CTA GTC GAA GCC ATT ACT TCT GTA GGA ACG GTC AAG AGG TTT CTG CCG	378
S E F G H D V D R A D P V E P G L T	144
TCG GAG TTC GGG CAT GAC GTG GAC CGG GCC GAT CCG GTG GAA CCG GGT CTG ACC	432
M Y L E K R K V R R A I E K S G V P	162
ATG TAT TTG GAG AAG CGC AAG GTG AGG CGT GCG ATT GAG AAG AGT GGG GTC CCT	486
Y T Y I C C N S I A S W P Y Y D N K	180
TAC ACG TAT ATT TGT TGC AAT TCT ATT GCT TCT TGG CCC TAC TAT GAC AAC AAG	540
<b>&lt; CG TTG AGG TAA CGA CGA ACC LAR5'-RACE3</b>	
H P S E V I P P L D Q F Q I Y G D G	198
CAT CCT TCG GAG GTT ATC CCA CCG TTG GAT CAG TTC CAG ATC TAC GGT GAT GGC	594
<b>&lt; GC AAC CTA GTC AAG GTC TAG LAR5'-RACE2</b>	
T V K A Y F V D G P D I G K F T M K	216
ACG GTT AAA GCC TAC TTC GTC GAC GGC CCT GAT ATC GGA AAA TTC ACA ATG AAG	648
T V D D I R T M N K N V H F R P S S	234
ACG GTG GAC GAC ATC AGA ACT ATG AAC AAA AAT GTT CAC TTT CGA CCT TCA AGC	702
N L Y D I N G L A S L W E K K I G R	252
AAT TTA TAT GAT ATC AAT GGA CTT GCT TCA CTG TGG GAG AAG AAA ATT GGT CGC	756
T L P K V T I T E N D L L T M A A E	270
ACC CTC CCA AAA GTT ACC ATA ACT GAG AAC GAC CTA TTG ACT ATG GCT GCA GAG	810
N R I P E S I V A S F T H D I F I K	288
AAC CGT ATA CCA GAA AGT ATT GTA GCC TCG TTC ACT CAT GAT ATC TTC ATC AAA	864
G C Q T N F P I E G P N D V D I G T	306
GGT TGT CAA ACC AAC TTC CCC ATT GAA GGT CCG AAT GAT GTT GAT ATA GGC ACT	918
L Y P E E S F R T L D E C F N D F L	324
CTC TAC CCT GAA GAG TCT TTT AGG ACT TTG GAT GAG TGC TTC AAT GAT TTT CTT	972
V K V G G K L E T D K L A A K N T A	342
GTC AAA GTT GGG GGG AAG CTA GAG ACT GAT AAA CTT GCC GCC AAG AAC ACG GCA	1026
A V G V E P M A I S R L L V P E E H	360
GCG GTC GGA GTT GAA CCT ATG GCA ATA TCA CGG CTA CTT GTG CCT GAA GAA CAT	1080
S I S * S P K T L S C Y S P E K L V	378
TCC ATA TCC TAA TCA CCA AAG ACA TTG TCC TGT TAC TCC CCA GAA AAG TTG GTT	1134
P L F V * Q S H V Y F K E N V L I S	396
CCA CTA TTT GTT TAG CAG TCC CAC GTT TAC TTC AAA GAG AAT GTG CTA ATT TCA	1188
L F G K S K E A A F S S A H E N D P	414
TTA TTT GGT AAA AGC AAG GAA GCT GCA TTT TCA TCT GCA CAT GAA AAT GAT CCA	1242
A V V M N L * L F G * S M *	428
GCT GTT GTT ATG AAC TTA TGA TTG TTT GGT TAA TCA ATG TAA TA	1286
<b>&lt; 3LARfra1 GT TAC ATT ATC AAA CGA G</b>	

fett = Primer; &gt; = forward Primer; &lt; = reverse Primer ATG = Startcodon; TAA = Stoppcodon

## G.3.4 Anthocyanidinreduktase

* S C S * V S M S T T Q P I I S T K	18
TAA AGC TGC AGC TGA GTT AGC ATG TCC ACC CAA CCC ATC ATC TCA ACA AAG	54
<b>G CAA AGC TAG AGT TTA AGCC 5ANR2 &gt;</b>	
S A C V I G G T G F V A S Q L I K L	36
TCT GCT TGT GTC ATC GGC GGC ACC GGC TTC GTG GCG TCT CAG CTA ATC AAG CTC	108
L L E K G Y A V R T T V R D P D N L	54
TTG CTA GAG AAG GGC TAT GCC GTC AGA ACC ACT GTT AGA GAC CCA GAT AAT CTG	162
<b>&lt; C GAT CTC TTC CCG ATA CGG C 5ANRRACE2</b>	
K K I S H L T A L Q E L G E L T I F	72
AAG AAG ATC TCC CAC CTA ACA GCA CTA CAA GAG TTG GGA GAG CTA ACA ATA TTT	216
R G D L T D E G S F D A A I A G S D	90
CGT GGG GAT TTA ACC GAT GAA GGG AGC TTT GAT GCT GCT ATA GCA GGT TCT GAT	270
<b>&lt; G CTA CTT CCC TCG AAA CTA CGA 5ANRRACE1</b>	
L V F H V A T P V H F G S P D P E N	108
CTT GTT TTC CAT GTA GCC ACA CCA GTC CAC TTT GGC TCG CCG GAT CCA GAG AAC	324
D M I K P G V Q G V L N V M K S C V	126
GAC ATG ATC AAG CCA GGA GTC CAA GGA GTA CTA AAC GTT ATG AAA TCA TGT GTG	378
K A K T V K R V V L T S S A A A V T	144
AAA GCA AAA ACA GTT AAA CGA GTC GTT TTG ACA TCA TCA GCA GCT GCA GTA ACT	432
V N T L S G T G L I A D E N D W S D	162
GTC AAT ACT CTT AGT GGA ACA GGC TTG ATT GCC GAC GAA AAT GAT TGG TCT GAT	486
V E F L T T A K P P T W G Y P V S K	180
GTT GAG TTC TTG ACC ACT GCC AAG CCA CCT ACC TGG GGA TAT CCT GTT TCA AAG	540
<b>TGG TGA CGG TTC GGT GGA TGG &gt; 3ANRRACE1</b>	
V L A E K T A W K F A E Q N N I D L	198
GTA CTA GCT GAG AAG ACA GCA TGG AAA TTT GCT GAA CAA AAC AAC ATT GAT CTC	594
I A V I P S L M A G A S L T P D I P	216
ATC GCT GTG ATC CCT TCT CTC ATG GCT GGT GCT TCT CTC ACT CCA GAC ATC CCC	648
S S I G L A T S L I T G N E F L I N	234
AGC AGT ATA GGC CTC GCC ACG TCT TTA ATC ACA GGA AAT GAG TTC CTC ATA AAT	702
G L K G M Q M L S G S I S I T H V E	252
GGC TTG AAA GGC ATG CAA ATG CTA TCA GGT TCC ATA TCC ATT ACA CAT GTG GAG	756
D V C R A H I F L A E K E S A S G R	270
GAT GTC TGC CGA GCT CAT ATA TTT TTG GCA GAG AAA GAA TCT GCT TCT GGT CCG	810
Y I C C A E N S S V P E V A K F L S	288
TAC ATA TGC TGT GCT GAA AAT AGT AGT GTT CCT GAG GTT GCA AAG TTC CTC AGC	864
K R Y P E Y K V P T E F G D F P S K	306
AAA AGA TAT CCT GAA TAC AAA GTC CCG ACT GAG TTT GGA GAT TTT CCA TCC AAG	918
A K T I L P S E K L K K E G F T F K	324
GCG AAG ACC ATA CTC CCC TCA GAA AAG CTT AAG AAG GAG GGG TTC ACT TTC AAG	972
F G I E D I Y D Q T V E Y L K L K G	342
TTC GGG ATT GAA GAC ATA TAT GAC CAA ACT GTG GAG TAC TTG AAA CTT AAG GGG	1026
V L Q N * T * K A G G L T L F N Y D	360
GTG CTG CAG AAC TAG ACC TAG AAA GCT GGT GGT CTC ACG TTG TTT AAC TAT GAT	1080
<b>&lt; 3ANR1 C ATA CTA</b>	
P G L H E G R A R V P *	372
CCT GGT TTA CAT GAA GGG CGA GCT CGA GTC CCC TGA AG	1118
<b>GGA CCA AAT GTA CC</b>	

fett = Primer; > = forward Primer; < = reverse Primer  
 ATG = Startcodon; TAG = Stoppcodon

## G.4 Verwendete Sequenzen

Acc.No	Herkunft	Familie	Funktion	Referenz
AB201759	<i>Fragaria x ananassa</i>	Rosaceae	DFR	ADACHI Y et al. (2005) unveröffentlicht
AY695812	<i>Fragaria x ananassa</i>	Rosaceae	DFR	ALMEIDA JRM et al. (2004) unveröffentlicht
AY227732	<i>Pyrus communis</i>	Rosaceae	DFR	FISCHER TC et al. (2003)
AY227729	<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	DFR	FISCHER TC et al. (2003)
AF029685	<i>Fragaria x ananassa</i>	Rosaceae	DFR	MOYANO E et al. (1998)
D85102	<i>Rosa hybrida</i>	Rosaceae	DFR	TANAKA Y et al. (1995)
U1-1	<i>Fragaria x ananassa</i> cultivar Korona	Rosaceae	DFR	DEIML B et al. (2005) unveröffentlicht
AF117268	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	DFR	LEE JR et al. (1998) unveröffentlicht
AY227731	<i>Pyrus communis</i> cultivar Conference	Rosaceae	DFR	FISCHER TC et al. (2003)
AY227730	<i>Pyrus communis</i> cultivar Pyrodwarf	Rosaceae	DFR	FISCHER TC et al. (2003)
AY227728	<i>Malus x domestica</i> cultivar M9	Rosaceae	DFR	FISCHER TC et al. (2003)
AF240764	<i>Eustoma russellianum</i>	Gentianaceae	FLS	NIELSEN KM (2000) unveröffentlicht
AB078965	<i>Eustoma grandiflorum</i>	Gentianaceae	FLS	NODA N et al. (2004)
AB078512	<i>Nierembergia sp.</i>	Solanaceae	FLS	UEYAMA Y et al. (2002) unveröffentlicht
Z22543	<i>Petunia x hybrida</i>	Solanaceae	FLS	HOLTON TA et al. (1993)
X92178	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	FLS	VAN ELDIK GJ et al. (1997)
DQ272591	<i>Antirrhinum majus</i>	Plantaginaceae	FLS	SCHWINN K et al. (2006)
Osteck	<i>Osteospermum ecklonis</i>	Asteraceae	FLS	SEITZ C et al. (2002) unveröffentlicht
Gerhyb	<i>Gerbera hybrida</i>	Asteraceae	FLS	DEIML B et al. (2003) unveröffentlicht
AY965343	<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	FLS	HALBWIRTH H et al. (2005) unveröffentlicht
AF119095	<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	FLS	LEE JR et al. (1999) unveröffentlicht
AB038247	<i>Rosa hybrida</i> cultivar Kardinal	Rosaceae	FLS	TANAKA Y und YONEKURA K. (2003) unveröffentlicht
AY221247	<i>Allium cepa</i>	Alliaceae	FLS	KIM S et al. (2003) unveröffentlicht
AB011796	<i>Citrus unshiu</i>	Rutaceae	FLS	MORIGUCHI T et al. (2002)
AY496932	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	FLS	PANG Y et al. (2003) unveröffentlicht
U84259	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	FLS	WISMAN E et al. (1998)
U84260	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	FLS	HARTMANN U und WEISSHAAR B (1997) unveröffentlicht
NM_148158	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	FLS	NCBI review
AY230249	<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	FLS	MARTENS S et al. (2003)
DQ087252	<i>Fragaria x ananassa</i> cultivar Korona	Rosaceae	FLS	DEIML B et al. (2005) unveröffentlicht
AY730617	<i>Lotus uliginosus</i>	Nelumbonaceae	LAR	YU M et al. (2004) unveröffentlicht
AJ550154	<i>Desmodium uncinatum</i>	Fabaceae	LAR	TANNER GJ et al. (2003)
BN000698	<i>Phaseolus coccineus</i>	Fabaceae	LAR	BOGS J et al. (2005)
AJ865335	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	LAR1	BOGS J et al. (2005)
DQ129685	<i>Vitis vinifera</i> cultivar Regent	Vitaceae	LAR1	PFEIFFER J et al. (2005) unveröffentlicht
AJ865336	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	LAR1	BOGS J et al. (2005)
BN000702	<i>Vitis shuttleworthii</i>	Vitaceae	LAR1	BOGS J et al. (2005)

AY830131	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	LAR1 putativ	TAKOS AM et al. (2006)
DQ139836	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	LAR1	KÜHNEL C et al. (2005) unveröffentlicht
AY830132	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	LAR2 putativ	TAKOS AM et al. (2006)
DQ139837	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	LAR2	KÜHNEL C et al. (2005) unveröffentlicht
DQ087253	<i>Fragaria × ananassa</i> cultivar Korona	Rosaceae	LAR	DEIML B et al. (2006) unveröffentlicht
BN000700	<i>Gossypium raimondii</i>	Malvaceae	LAR1	BOGS J et al. (2005)
BN000695	<i>Gossypium arboreum</i>	Malvaceae	LAR1	BOGS J et al. (2005)
BN000701	<i>Gossypium raimondii</i>	Malvaceae	LAR2	BOGS J et al. (2005)
BN000699	<i>Gossypium arboreum</i>	Malvaceae	LAR2	BOGS J et al. (2005)
AJ865334	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	LAR2 putativ	BOGS J et al. (2005)
DQ129686	<i>Vitis vinifera</i> cultivar Regent	Vitaceae	LAR2	PFEIFFER J et al. (2005) unveröffentlicht
BN000696	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	Poaceae	LAR	BOGS J et al. (2005)
AY169404	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	LAR	PARK JS et al. (2002) unveröffentlicht
BN000697	<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	LAR	BOGS J et al. (2005)
AY641729	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	ANR	SINGH K et al. (2004) unveröffentlicht
BN000165	<i>Gossypium arboreum</i>	Malvaceae	ANR	TANNER GJ et al. (2003)
BN000164	<i>Phaseolus coccineus</i>	Fabaceae	ANR	TANNER GJ et al. (2003)
AY184243	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	ANR	TANNER GJ et al. (2003)
BN000166	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	ANR	TANNER GJ et al. (2003)
DQ129684	<i>Vitis vinifera</i> cultivar Spätburgunder	Vitaceae	ANR	PFEIFFER J et al. (2005) unveröffentlicht
AY830130	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	ANR putativ	TAKOS AM et al. (2006)
DQ099803	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	ANR	HAN Y et al. (2005) unveröffentlicht
DQ139835	<i>Malus × domestica</i>	Rosaceae	ANR	KÜHNEL C et al. (2005) unveröffentlicht
DQ438979	<i>Fragaria × ananassa</i> cultivar Korona	Rosaceae	ANR	DEIML B et al. (2005) unveröffentlicht
AY750963	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Ginkgoaceae</i>	ANR	SHEN GA et al. (2006)
DQ664192	<i>Fragaria × ananassa</i>	Rosaceae	ANR	ALMEIDA JRM et al. (2006) unveröffentlicht
DQ664193	<i>Fragaria × ananassa</i>	Rosaceae	ANR	ALMEIDA JRM et al. (2006) unveröffentlicht



AY227729	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
AF117268	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
AY227728	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
AY227731	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
AY227730	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
AY227732	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPILRNESHYGI IKQGQYVHLDDLCLS	237
D85102	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPLTGNE SHYSI IKQGQFIHLDDLQCS	237
AY695812	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLAPSMPPSLISGLSPLTGNEAHYGI IKQCQYVHLDDLQCS	239
U1-1	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLAPSMPPSLISGLSPLTGNEAHYGI IKQCQYVHLDDLQCS	240
AB201759	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLAPSMPPSLISGLSPLTGNEAHYGI IKQCQYVHLDDLQCS	239
AF029685	AKENNIDFITIIPTLVIGPFLAPSMPPSLISGLSPLTGNEAHYGI IKQCQYVHLDDLQCS	239
	*****:****: **:*.**** *: :***** *	
AY227729	HIYLYEHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
AF117268	HIYLYEHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
AY227728	HIYLYEHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
AY227731	HIYLYKHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
AY227730	HIYLYKHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
AY227732	HIYLYKHPKAEGRYICSSHDATIH ELVKMLREKYPEYNIP TKFKGIDDNLEPVHFSSKKL	297
D85102	HIYLYEHPKAEGRYICSSHDATIH EIAKLLKGKYPEYNVPTTFKGI EENLPKVHFSSKKL	297
AY695812	HIFLYEHPKAEGRYICSSHDATIH DIAKLLNEKYPKYNVPPKFKGI EENLTNIHFSSKKL	299
U1-1	HIFLYEHPKAKGRYICSSHDATIH DIARLLNEKYPKYNVPPKFKGI EENLTNIHFSSKKL	300
AB201759	HIFLYEHPKAKGRYICSSHDATIH DIAKLLNEKYPKYNVPPKFKGI EENLTNIHFSSKKL	299
AF029685	HIFLYEHPKAKGRYICSSHDATIH DIAKLLNEKYPKYNVPPKFKGI EENLTNIHFSSKKL	299
	***:*.**:*****: : : :. ***:***:*.****: : :*****	
AY227729	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIPIPAEKTEAAEESNLVDVKVG-	348
AF117268	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIPIPAEKTEAAEESNLVDVKVG-	348
AY227728	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIPIPAEKTEAAEESNLVDVKAG-	348
AY227731	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIP--AEKTEAAEESNLVDVKVGG	347
AY227730	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIP--AEKTEAAEESNLVDVKVGG	347
AY227732	REIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIP--AEKTEAAEESNLVDVKVGS	347
D85102	LETGFEFKYSLEDMFVGAVDACKEKGLLPPPTERVEKQEVEDESSVVRVKVTG	349
AY695812	KEMGFEFKHSLEDMFTGAVDACREKGLLPLP----QEEETEKR-----RAG-	341
U1-1	KEMGFEFKHSLEDMFTGAVDACREKGLLPLP----QEEEA EKS-----RAG-	342
AB201759	KEMGFEFKHSLEDMFTGAVDACREKGMIPLP----QEEETEKR-----RAG-	341
AF029685	KEMGFEFKHSLEDMFTGAVDACREKGLLPLP----QEEETEKR-----RAG-	341
	* *****:*****.*****: **::* * : : : : : .	

\* = identische Aminosäure : = konservierter Bereich . = teilkonservierter Bereich  
Rote Buchstaben = identische Aminosäuren

Graue Markierung: Rossmann Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsbereich (XIE et al. 2004)

## G.5.2 Flavonolsynthase

Osteck	-----MEFEK-----VQKIASLSNLKGTIPSEFIRSENEQPAITTIH-	37
Gerhyb	----ALPHMEGKR-----VQEIASLSNLKGTIPNDFIRSENEQPATTTIH-	41
DQ272591	-----MEGER-----VQAIASLSKYADTIPSEFIRSENEQPAATTLR-	37
AF240764	-----MEVQR-----VQEIASLSKVIDTIPAEYIRSENEQPVISTVH-	37
AB078965	-----MKVQR-----VQEIASLSKVIDTIPAEYIRSENEQSVISTVH-	37
AB078512	-----MEVAS-----RVQAIASLIKCMDTIPSEYIRSENEQPATTTLH-	38
Z22543	-----MKTAQGVSAT--LTMEVARVQAIASLSKCMDTIPSEYIRSENEQPAATTLH-	49
X92178	-----MKTIQGSATTALTMEVARVQAISSITKCMDTIPSEYIRSENEQPAATTLQ-	51
AY230249	-----MEVER-----VQAIKMSRCMDTIPSEYIRSESEQPAVTTMQ-	37
AB038247	-----MGVER-----VQDIASAT--SKDTIPVEFIRSENEQPGITTVP-	36
DQ087252	LSSFSEDKMGVER-----VQDIASAT--SEDTIPAEYIRSENEQPGITTVP-	44
AY965343	-----MGVES-----VE--RERES--NEGTIPAEFIRSENEQPGITTVH-	35
AF119095	-----MGVES-----VE--RERES--NEGTIPAEFIRSENEQPGITTVH-	35
AY221247	-----MEVER-----VQAIATLTANLGTIPPEFIRSDHERPDLTTYH-	37
AB011796	-----MEVER-----VQAIASLSHNGTIPAEFIRPEKEQPASTTYH-	37
AY496932	-----MAPTR-----VQYVAESR--PQTIPLEFVRPVEERPINTTFND	36
U84259	-----MEVER-----VQDISSSSLLTEAIPLEFIRSEKEQPAITTFR-	37
U84260	-----MEVER-----VQDISSSSLLTEAIPLEFIRSEKEQPAITTFR-	37
NM_148158	-----MEVER-----DQHKPPLSLQNNKIP-----	20
	* : **	
Osteck	--GVTLEV <span style="color: red;">PVIDLS</span> -----HHDDQ--SLVDSISKASKDWGIFQVVNHGIPNELISK	84
Gerhyb	--GVLLEV <span style="color: red;">PVIDLS</span> -----HSDHQ--TLLASIAEASRNWGIFQVVNHGIPSEVISK	88
DQ272591	--GVVLEV <span style="color: red;">PVIDLS</span> D-----DFNEK--ILVKNISEASRDWGIFQVVNHGISNEVISK	85
AF240764	--GVVLEV <span style="color: red;">PVIDLS</span> -----DSDEK--KIVGLVSEASKEWGIFQVVNHGIPNEVIRK	84
AB078965	--GVVLEV <span style="color: red;">PVVDLS</span> -----DSDEK--KIVGLVSEASKEWGIFQVVNHGIPNEVIRK	84
AB078512	--GVELQV <span style="color: red;">PVIDL</span> LAPRVVGDEQHDHDDV--EVVKQIADASKEWGIFQVINHGIPNDVIAD	94
Z22543	--GVLQV <span style="color: red;">PVIDLR</span> -----DPDEN--KMKVLIADASKEWGIFQLINHGIPDEAIAD	96
X92178	--GVVLEV <span style="color: red;">PVIDISN</span> -----VDDDEE--KLVKEIVEASKEWGIFQVINHGIPDEVIEN	100
AY230249	--GVLQV <span style="color: red;">PVIDLGS</span> -----SNNTEE--NLVELIAEASRENWIFQVVNHGIPDDAIK	86
AB038247	--GTVLECP <span style="color: red;">IIDFS</span> -----DPDEE--KLLKQIFEASTDWGMYQIVNHDISNEAIK	83
DQ087252	--NTVLECP <span style="color: red;">TIDFS</span> -----DPDEE--KLLKQIFEASIDWGMQIVNHDISNEAIK	91
AY965343	--GKVLEV <span style="color: red;">PIIDFS</span> -----DPDEE--KLIVQITEASSNWGMQIVNHDIPISEVISK	82
AF119095	--GKVLEV <span style="color: red;">PIIDFS</span> -----DPDEE--KLIVQITEASSNWGMQIVNHDIPISEVISK	82
AY221247	--GPVPEL <span style="color: red;">PVIDLA</span> -----NSSQE--NVVKQISEAAREYGIFQLVNHGIPNEVINE	84
AB011796	--GPAP <span style="color: red;">EIP</span> TIDLD-----DPVQD--RLVRSIAEASREWGIFQVTNHGIPSDLICK	84
AY496932	DIGLGRQ <span style="color: red;">IPVIDMCS</span> -----LEAPELRVKTfKEIARASKEWGIFQVINHAI SPLLFES	89
U84259	--GPTPA <span style="color: red;">IPVVDLS</span> -----DPDEE--SVRRAVVKA SEEWGLFQVVNHGIPTELIRR	84
U84260	--GPTPA <span style="color: red;">IPVVDLS</span> -----DPDEE--SVRRAVVKA SEEWGLFQVVNHGIPTELIRR	84
NM_148158	---SSQN <span style="color: red;">FPVVDLS</span> -----NTNGE--LVARKVAKA SEEWGLFQVVNHGIPTELIRR	66
	* **: . : * : : * : : * : * : *	

Osteck	LQKVGKEFFE-LPQEEKEVIAKPIGYQGVGYGTKLQKEV-EG---KEGWVDHLFHRVWP	139
Gerhyb	LQKVGKEFFE-LPQVEKESIAPKPGYDGVGYGTKLQKEL-EG---KKGWVDHLFHRVWP	143
DQ272591	LQKVGKEFFE-LPKKEKEFVAKTP-ESGIEGYGTILQKEV-EG---KKGWVDHLFHKIWP	139
AF240764	LQEVGKHFFE-LPQEEKELIAKPEGSQSIEGYGTRLQKEV-DG---KKGWVDHLFHKIWP	139
AB078965	LQEVGKHFFE-LPQEEKELIAKPEGSQSIEGYGTRLQKEV-DG---KKGWVDHLFHKIWP	139
AB078512	LQKVGKEFFENVPQEEKELIAKTPGSNEIEGYGTSLQKEV-EG---KKGWVDHLFHKIWP	150
Z22543	LQKVGKEFFEHPVQEEKELIAKTPGSNDIEGYGTSLQKEV-EG---KKGWVDHLFHKIWP	152
X92178	LQKVGKEFFEEVPQEEKELIAKPGAQSLEGYGTSLQKEI-EG---KKGWVDHLFHKIWP	156
AY230249	LQKVGKEFFE-LPQEEKEVIAKPEGYQGVGYGTKLQKEL-GG---KKGWVDHLFHIWP	141
AB038247	LQAVGKEFFE-LPHEEKEVYAKDPNSKSVEGYGTFLQKEL-EG---KKGWVDHLFHKIWP	138
DQ087252	LQAVGKEFFE-LPQEEKEVYAKDPNSKSVEGYGTFLQKEL-EG---KKGWVDHLFHKIWP	146
AY965343	LQAVGKEFFE-LPQEEKEAYAKPPDSGSIEGYGTKLFKEISEGDTTKKGWVDNLFNKIWP	141
AF119095	LQAVGKEFFE-LPQEEKEAYAKPPDSASIEGYGTKLFKEISEGDTTKKGWVDNLFNKIWP	141
AY221247	LQRVGKEFFQ-PPQEEKEVYATVPDSGSFEGYGTKLQKDL-EG---KKAWDYDLFHNWVP	139
AB011796	LQAVGKEFFE-LPQEEKEVYSRPADAKDVQGYGTKLQKEV-EG---KKSVDHLFHRVWP	139
AY496932	LETVGKQFFQ-LPQEEKEAYACTGEDGSSTGYGTKLACTT-DG---RQGSDFHFHMLWP	144
U84259	LQDVGKFFE-LPSSEKESVAKPEDSKDIEGYGTKLQKDP-EG---KKAWDHLFHRIWP	139
U84260	LQDVGKFFE-LPSSEKESVAKPEDSKDIEGYGTKLQKDP-EG---KKAWDHLFHRIWP	139
NM_148158	LHKVDTQFFE-LPESKKEAVAKPANSKEIQGY--EMDDV-QG---RRS---HIFHNLYP	115
	*. *. .** : * :** :	**
		* :.. :* :**

Osteck	PSVINYHLWPKNPPSYRDINEQYTESLIGVANKLLGFLSNGLGLEENELKQGLGGEELIY	199
Gerhyb	PSVINYQFWPKNPPSYRETNEEYQMLIGVANKLFEFLSKGLGLEGHELKEGLGGEELTY	203
DQ272591	PSAINYKFWPKNPPSYREANEYTKKIRDVSDKLTNWLSSLGLGKIGHELKAAMGGDDTIF	199
AF240764	PSAINYQFWPKNPPAYREANEYAKRLQLVVDNLFKYLSLGLDLEPNSFKDGAGGDDLIVY	199
AB078965	PSSINYQFWPKNPPAYREANEYAKRLQLVVDNLFKYLSLGLDLEPNSFKDGAGGDDLIVY	199
AB078512	PSSINYRYWPKNPPSYREANEVYGGKLRVVDKIFKLSLGLGLEAHMKEAAGGDDIVY	210
Z22543	PSAVNYRYWPKNPPSYREANEYGYKRMREVDRIFKLSLGLGLEGHEMIEAAGGDEIVY	212
X92178	PSAINYRYWPKNPPSYREANEYAKWLRKVADGIFRSLSSLGLGLEGHEMMEAAGSEDIVY	216
AY230249	KSAVNYNFWPKNPPPLYREANEYAVALRGVVDKLFELSLGIGLEKHELKASGGDDLIY	201
AB038247	PSAINYCFWPKNPPASYREANEYAKNLHKVVEKLFKLSLGLGLEAQELKKAAGGDDLIVY	198
DQ087252	PSTINYRFWPKNPPASYREANEYAKNLHKVVEKLFKLSLGLGLEAQELKKAIGGDDLIVY	206
AY965343	PSVNYQFWPKNPPSYREANEYAKHLHNVVEKLFRLSSLGLGLEGQELKKAAGGDNLEY	201
AF119095	PSVNYQFWPKNPPSYREANEYAKHLHNVVEKLFRLSSLGLGLEGQELKKAAGGDNLEY	201
AY221247	EHKINYKFWPKNPPAYRKANEYTKHLQVVVDKMHSYLSLGLGLESHVLKEAVGGDDLEY	199
AB011796	PSSINYRFWPKNPPSYRAVNEEYAKYMREVVDKLFITYLSLGLGVEGGVLKEAAGGDDIEY	199
AY496932	PSLRDFSKWPKNPPSSYIEVTEEYSKILGVLNKLSSALSISLELQESALKDALGGENLEM	204
U84259	PSCVNYRFWPKNPPPEYREVNEEYAVHVKKLSETLLGLISDGLGLKRDALKEGLGEMAEY	199
U84260	PSCVNYRFWPKNPPPEYREVNEEYAVHVKKLSETLLGLISDGLGLKRDALKEGLGEMAEY	199
NM_148158	SSSVNYAFWPKNPPPEYREVTEEFKAKHAKQLAEIILGLLSEGAG-----Y	159
	: : **..* . * .* :	: : : ** .

Osteck MLKINYYPPCPCPDALGVVPHDMSITILVNEVQGLQVFRDDHWYDVAYIPNALIIH 259  
Gerhyb MMKINYYPPCPCPELALGVVPHDMSLTIILVNEVQGLQVFKDDHWYDVAYIPNALIIH 263  
DQ272591 LMKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSFLTIILVNEVQGLQVFRDEHWYDVKYIPNALIVH 259  
AF240764 LMKINYYPPCPRPDALG-VAHTDMSAITVLVNEVPGQVYKDGHWYDCKYIPNALIVH 258  
AB078965 LMKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSAITVLVNEVQGLQVYKDGHWYDCKYIPNALIVH 259  
AB078512 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSYITILVNEVQGLQVFKDGHWYDVKYIPNALIVH 270  
Z22543 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSYITILVNEVQGLQVFKDGHWYDVKYIPNALIVH 272  
X92178 MLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSYITILVNEVQ---VFKDGHWYDVNYIPNAIIH 273  
AY230249 MLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSAITILVNEVQGLQVHKDDHWYDVKYIPNALIIH 261  
AB038247 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSALTIILVNDVQGLQACRDGQWYDVKYIPNALVIH 258  
DQ087252 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSALTIILVNEVQGLQACRDGQWYDVKYIPNALVIH 266  
AY965343 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSVTIILVNDVQGLQACKDGRWYDVKYIPNALVIH 261  
AF119095 LLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDMSVTIILVNDVQGLQACKDGRWYDVKYIPNALVIH 261  
AY221247 LLKINYYPPCPRPNLALGVVAHTDMSLTIILVNEVPGQVFKDDHWFDAKYIPNALICH 259  
AB011796 MLKINYYPPCPRPDALGVVAHTDLSALTIILVNEVPGQVFKDDRWDYDVKYIPNALVIH 259  
AY496932 ELKINYYPTCPQPEVAFGVVPHDMSALTIILKPNVPGQVVKDEKWITAHYVPNALIIH 264  
U84259 MMKINYYPPCPRPDALGVVAHTDLSGITLLVNEVPGQVFKDDHWFDAEYIPSAVIVH 259  
U84260 MMKINYYPPCPRPDALGVVAHTDLSGITLLVNEVPGQVFKDDHWFDAEYIPSAVIVH 259  
NM\_148158 LMKINYYRCPPEPDWVMGIKAHTDFNGLTLLIPNEIFGLQVFKEDRWLDVDYIYPAVII 219  
:\*\*\*\*\* .\*\* \*: .:\* .\*\*\*: .:\* \* \*\*:: . : : \* \* : \* \* :

Osteck IGDQIEIMSNNGKYKSVYHRTTVNKEKTRMSWPMFLEPPGEFEVGPPIPKLIN-EENPPKYK 318  
Gerhyb IGDQIEILSNNGKYKSVYHRTTVNKEKTRMSWPMFLEPPPEFEVGPPIPKLIN-EANPSKYK 322  
DQ272591 IGDQIEILSNNGKYKAVFHRRTTVNKNTRMSWPFLEPHPEFEVGPPIPELVS-EESPSKYK 318  
AF240764 IGDQVEIMSNNGKYKSVYHRTTVNKEKTRMSWPFLEPPDHEVGPPIPKLVN-EENPAKFK 317  
AB078965 IGDQVEIMSNNGKYKSVYHRTTVNKEKTRMSWPFLEPPDHEVGPPIPKLVN-EENPAKFK 318  
AB078512 IGDQVEILSNNGKYKSVYHRTTVTKDKTRMSWPFLEPPSEQEVGPPIPKLVN-EANPPKFK 329  
Z22543 IGDQVEILSNNGKYKSVYHRTTVNKNKTRMSWPFLEPPSEHEVGPPIKLLS-EANPPKFK 331  
X92178 IGDQVEILSNNGKYKSVYHRTTVNKYKTRMSWPFLEPPSEHEVGPPIPNLIN-EANPPKFK 332  
AY230249 IGDQIEIMSNNGKYKSVYHRTTVNKNKTRMSWPFLEPPPELLTGPISKLIT-DENPAKFK 320  
AB038247 IGDQMEVMSNGKFKAVLHRRTTVSKDKTRISWPFLEPPDHIIGPHPKLVNDKENPPKYK 318  
DQ087252 IGDQMEIMSNNGKYRAVLHRRTTVSKDKTRISWPFLEPPADQVIGPHPKLVNDKENPPKYK 326  
AY965343 IGDQMEIMSNNGKYTSVLHRRTTVNKNKTRISWPFLEPPADHVVGPHQPLVN-AVNQPKYK 320  
AF119095 IGDQMEIMSNNGKYTSVLHRRTTVNKNKTRISWPFLEPPADHVVGPHQPLVN-AVNQPKYK 320  
AY221247 IGDQLEILSNNGKYKSVLHRRTTVNKEKTRMSWPFLEPPGDTMIGPLPQPLVN-DENPPKFK 318  
AB011796 IGDQIEILSNNGKYKAVLHRRTTVNKNKTRISWPFLEPPADTVVGPLPQLVD-DENPPKYK 318  
AY496932 IGDQIQILSNNGKFKSVLHRSLVNKEKVRMSWPFLEPPPLDVTIGPLKELID-DSNPPLYN 323  
U84259 IGDQILRLSNNGRYKNVLRHRTTVDKKTRMSWPFLEPPREKIVGPLPELTG-DDNPPKFK 318  
U84260 IGDQILRLSNNGRYKNVLRHRTTVDKKTRMSWPFLEPPREKIVGPLPELTG-DDNPPKFK 318  
NM\_148158 IGDQIMKMSNGRYNNVLRHRLMDKKTTRMSVSVHIKPPYDMVVSHP-----NSP--A 270  
\*\*\*\*: :\*\*\*\*: \* \*\* : \* : \*\* : . . \* : . . . . .

Osteck	TKKYKDYVYCKLNKLPQRTNFMPIYNKIKHSYIHICMYVYVRVHVFDLLECRFVRDIK	378
Gerhyb	TKKFKDYVYCKLNKLPQ---MASQGRASRSPIR-----	353
DQ272591	TKKYKDYVYCKLNKIPQ-----	335
AF240764	TKKYKDYAYCKLNKLPQ-----	334
AB078965	TKKYKDYAYCKLFLKLPQ-----	335
AB078512	TKKYKDYVYCKLNKLPQ-----	346
Z22543	TKKYKDYVYCKLNKLPQ-----	348
X92178	TKKYKDYVYCKLNKLPQ-----	349
AY230249	TKKYKDYVYCKLNKLPQ-----	337
AB038247	TKKYSEYVYNKLNKIPQ-----	335
DQ087252	TKKYSEYVYNKLNKMPQ-----	343
AY965343	TKKYGDYVYCKINKLPQ-----	337
AF119095	TKKYGDYVYCKINKLPQ-----	337
AY221247	TKKYKDYAYCKINKLPQ-----	335
AB011796	AKKFKDYSYCKLNKLPQ-----	335
AY496932	ARTYREYKHRKINKLGQ-----	340
U84259	PFAFKDYSYRKLKLPD-----	336
U84260	PFAFKDYSYRKLKLPD-----	336
NM_148158	AIILPSSSL-----	279

. .

Osteck	LSILVLSYGKKKKK	392
Gerhyb	-----	
DQ272591	-----	
AF240764	-----	
AB078965	-----	
AB078512	-----	
Z22543	-----	
X92178	-----	
AY230249	-----	
AB038247	-----	
DQ087252	-----	
AY965343	-----	
AF119095	-----	
AY221247	-----	
AB011796	-----	
AY496932	-----	
U84259	-----	
U84260	-----	
NM_148158	-----	

\* = identische Aminosäure    : = konservierter Bereich    . = teilkonservierter Bereich

Rote Buchstaben = identische Aminosäuren

Grüne Markierungen: Charakteristische 2-ODD Bereiche nach MARTENS et al. (2003)

Türkise Markierung: Charakteristische 2-ODD Bereiche nach LUKAČIN et al. (2000)

Gelbe Markierungen: Charakteristische 2-ODD Bereiche nach VAN ELDIK et al. (1997)

Graue Markierung: Charakteristische 2-ODD Bereiche nach WELLMANN et al. (2002)

## G.5.3 Leukoanthocyanidin 4-Reduktase

AY730617	-----MVSTAAIP-----PATAGRI	15
AJ550154	-----MTVSGAIP-----SMTKNRT	15
BN000698	-----MVTSP TIP-----SHTKARV	15
AJ865335	-----MTVS-PVP-----SP-KGRV	13
DQ129685	-----MTVS-PVP-----SP-KGRV	13
AJ865336	-----MTVS-PVP-----SP-KGRV	13
BN000702	-----MTVS-PVP-----SL-KGRV	13
AY830131	-----MTVSSSLS-----VAKNGRV	15
DQ139836	-----MTVSSSLS-----VAKNGRV	15
AY830132	-----MTVSPSLS-----VARNGRV	15
DQ139837	-----MTVSPSLS-----VTRNGRV	15
DQ087253	-----AFAAAMTVSPSIAS-----AAKSGRV	21
BN000700	-----MTVS-----VANGRV	10
BN000695	-----MTVS-----VANGRV	10
BN000701	-----MKSTHMNGSYPN-----ESETGQT	19
BN000699	-----MKSTQMNGSYPN-----ESEAGQT	19
AJ865334	-----MTVLSVSTPPAPQAPP-----AATGPRT	23
DQ129686	-----MTVLSVSTSPAPQAPP-----AATGPRT	23
BN000696	-----MAPCEELQEE-----VARSGPA	17
BN000697	MACATDVARQFLPCVQVPSSMGETARSINLTCNGLSPPQPQYNAENHDQDTTVATRV	60
AY730617	LII <b>GATGFMGQ</b> FVTKASLGFGRSTYLLLRPGP-LTPSKAAIVKSFQDRGAKVIHGVINDK	74
AJ550154	LVV <b>GGTGF</b> IQFITKASLGFGYPTFLVLRPGP-VSPSKAVIIKTFQDKGAKVIYGVINDK	74
BN000698	LII <b>GATGF</b> IKFVTEASLLTAHPTYLLLRPPP-LVPSKDAIVKTFQEKGAMIIHGVINNK	74
AJ865335	LIAG <b>GATGF</b> IQFVAAASLDAHRPTYILARPGP-RSPSKANIFKALEDKGAIIVYGLINEQ	72
DQ129685	LIAG <b>GATGF</b> IQFVAAASLDAHRPTYILARPGP-RSPSKANIFKALEDKGAIIVYGLINEQ	72
AJ865336	LIAG <b>GATGF</b> IQFVATASLDAHRPTYILARPGP-RSPSKAKIFKALEDKGAIIVYGLINEQ	72
BN000702	LIAG <b>GATGF</b> IQFVAAASLDAHRPTYILARPGP-RSPSKAKIIKAHEDKGAIIVYGLINEQ	72
AY830131	LIAG <b>GATGF</b> IGRFVAEASLAAGQPTYVLRPGP-LHPSKADTVKSFKDKGAIILHGLISDK	74
DQ139836	LIAG <b>GATGF</b> IGRFVAEASLAAGQPTYVLRPGP-LHPSKADTVKSFKDKGAIILHGLISDK	74
AY830132	LIV <b>GATGF</b> IGRFVAEASLAAGRPTYVLRPGP-LHPSKADTVKSFKHKGAIILHGLISDK	74
DQ139837	LIV <b>GATGF</b> IGRFVAEASLAAGRPTYVLRPGP-LHPSKADTVKSFKHKGAIILHGLISDK	74
DQ087253	LII <b>GATGF</b> IKFVAEASLDGLPTYVLRPGP-SRPSKSDTIKSLKDRGAIILHGVMSDK	80
BN000700	LIV <b>GATGF</b> IGRFVADASLDAGRPTYVLRPSSGNQYSKDKVAKALRDRGAILLNGLANDK	70
BN000695	LIV <b>GATGF</b> IGRFVADASLDAGRPTYVLRPSSGNQYSKDKVAKALQDRGAILLNGLANDK	70
BN000701	LVI <b>GSSGF</b> IGRFITEACLDGRPTYILVRSSSN-SPSKASTIKFLQDKGAIIVYGSITDQ	78
BN000699	VVI <b>GSSGF</b> IGRFITEACLDGRPTYILVRSSSN-SPSKASTIKFLQDKGAIIVYGSITDQ	78
AJ865334	LEV <b>GASGF</b> IGRFVAEASLSSGHPPTYVLRSSATTSSSKASTIKSLEDQGAILVTGSIGDK	83
DQ129686	LVV <b>GASGF</b> IGRFVAEASLSSGHPPTYVLRSSATTSSSKASTIKSLEDQGAILVTGSIGDK	83
BN000696	LIV <b>GATGY</b> IGRFVAEACLDGRPTFILVRPGN-ACPARAASVDALLRKGAFVVEGRVDGK	76
BN000697	LII <b>GATGF</b> IGRFVAEASVKSGRPTYALVRPTT--LSSKPKVIQSLVDSGIQVYVYGLCLHDH	118
	: * . : * : * : * : * : * . : * : * * . : : . * : : * :	



AY730617 TVKAYFVDGNDIGKFTMKAIDDIRTRNKNVHFRPPSNCY SINELASLWEK IGRKIPRAI 251  
 AJ550154 NTKAYFIDGNDIGKFTMKTIDDIRTLNKNVHFRPSSNCYSINELASLWEK IGRTLPRFT 251  
 BN000698 NVKAYFVDGIDIGKFTMKVIDDVKTINKNVHFRPSKNCYSINELASLGEMK IGR TIPRVT 251  
 AJ865335 NVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDVVRTLNKSVHFRPSCNCLNINELASVWEK IGRTLPRVT 249  
 DQ129685 NVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDVVRTLNKSVHFRPSCNCLNINELASVWEK IGRTLPRVT 249  
 AJ865336 NVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDVVRTLNKSVHFRPSCNCLNINELASVWEK IGRTLPRVT 249  
 BN000702 NVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDVVRTLNKSVHFRPSCNCLNINELASVWEK IGRTLPRVT 249  
 AY830131 TVKAYFVDGTDIGKFTMKTVDMDRTINKNVHFRPPSNLYDINGLASLWEK IGRTLPRVT 251  
 DQ139836 TVKAYFVDGTDIGKFTMKTVDMDRTINKNVHFRPPSNLYDINGLASLWEK IGRTLPRVT 251  
 AY830132 TVKAYFVDGTDIGKFTIKTVDDIRTINKNIHFRPPSNLYDINGLASLWEK IGRTLPRIT 251  
 DQ139837 TVKAYFVDGTDIGKFTIKTVDDIRTINKNIHFRPPSNLYDINGLASLWEK IGRTLPRIT 251  
 DQ087253 TVKAYFVDGPDIGKFTMKTVDDIRTMKNVHFRPSSNLYDINGLASLWEK IGRTLPKVT 257  
 BN000700 SVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDDIRTLNKS VHFRPACNFYMNELAAALWERK IRRTLPRVT 247  
 BN000695 SVKAYFVAGTDIGKFTMKTVDDIRTLNKS VHFRPACNFYMNELAAALWERK IRRTLPRVT 247  
 BN000701 TVKAYFVAGSDIGKFTVMSIDDRTLNKTVHFQPPSNLLNMNEMASLWETK IGRVLP RVN 255  
 BN000699 TVKAYFVAGSDIGKFTVMSIDDRTLNKTVHFQPPSNLLNMNEMASLWETK IGRVLP RVN 255  
 AJ865334 SVKAYFVAGTDIGKFTIETINDRVTNKS LHFRPPSNLVSINELASLWEK IGRTLPRVT 260  
 DQ129686 SVKAYFVAGTDIGKFTIKTINDRVTNKS LHFRPPSNLVSINELASLWEK IGRTLPRVT 260  
 BN000696 TVRAFFVAGTDIGKFTVKAAYDARSVNKAVHFRPACNLLSTNEMACLWESK IGRTLPRVT 256  
 BN000697 SVKAFVVTGDDIGAYTMKAVDPRTLNKSIHFRPPKNFLNINELADIWENK INRTLPRVS 293  
 ..\*: \*: \* \*\* :\*: \* :: \*\* :\*:\*. \* . \* : \* \* \* :\*:

AY730617 ISADDLLAAAENCIPGSIVAAFTHDIFINGCQINF TIDGPNDIEIGTLYPDEKFRCL EE 311  
 AJ550154 VTADKLLAHAENIIPESIVSSFTHDIFINGCQVNF SIDEHSDVEIDTLYPDEKFRSLDD 311  
 BN000698 ISEDDLLAAAENCIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNF SIDGVDDVEISTLYPDEEFRSLED 311  
 AJ865335 VTEDDLLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNF SIDGPEDVEVTTLYPEDSFRTVEE 309  
 DQ129685 VTEDDLLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNF SIDGPEDVEVTTLYPEDSFRTVEE 309  
 AJ865336 VTEDDLLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNF SIDGPEDVEVTTLYPEDSFRTVEE 309  
 BN000702 VTEDDLLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNF SIDGPEDVEVTTLYPEDSFRTVEE 309  
 AY830131 VTEDHLLALAADNRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNF AVEGPHDVEVGTLYPGDSFRTLDE 311  
 DQ139836 VTEDHLLALAADNRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNF AVEGPHDVEVGTLYPGDSFRTLDE 311  
 AY830132 ITENHLLALAAENRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNF AVEGPRDVEVGTLYPGDSFRTLDE 311  
 DQ139837 ITENHLLALAAENRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNF AVEGPRDVEVGTLYPGDSFRTLDE 311  
 DQ087253 ITENDLLTMAENRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNFPIEGPNDVDIGTLYPEESFRTLDE 317  
 BN000700 VTEEDLLSAAENIIPQSVVASFTHDIFIKGCQVNFPIEGPNETEACSLYPNEPFRTLDD 307  
 BN000695 VTEEDLLSAAENIIPQSVVASFTHDIFIKGCQVNFPIEGPNETEACSLYPNEPFRTLDD 307  
 BN000701 ITEQDLLQRAQEMRIPQSVVAATHDIFINGCQINFSLDKTTDVEVCSLYPNTSFRTIAE 315  
 BN000699 ITEQDLLQRAQEMRIPQSVVAATHDIFINGCQINFSLDKTTDVEICSLYPNTSFRTIAE 315  
 AJ865334 VEEDDLLAAAEMCIPESIVASFTHDIFIKGCQVNFSLDKPTDLEATSLYPEMQFR TIDE 320  
 DQ129686 VEEDDLLAAAEMRIPDSIVASFTHDIFIKGCQVNFSLDKPTDLEATSLYPEMQFR TIDE 320  
 BN000696 LSKEELLLAMAEDIIPESIVASLTHDIFINGCQVNF GIDGSRDIEISSLYPDIPFR TIDE 316  
 BN000697 VSAEDLVMIAKANFMPSIVAALTHDIFINGCQVNFPIQEPHVEACELYPDIKYTTMED 353  
 : .\*: \* \*\* :\*: \* :: \*\* :\*:\*. \* . \* : \* \* \* :\*:

AY730617	CFKDFVPMTHDMN-----VHVGTTENNRR-----KS	337
AJ550154	CYEDFVPMVHDKIHAGKSGEIKIKDGKPLVQTGTIEEINKDIKTLVETQPNEEIKKDMKA	371
BN000698	CYEDFAHMIEDNI-----HKGEHKITGT-----KS	336
AJ865335	CFGEYIVKIEEKQ-----PTADSAIANTG-----P	334
DQ129685	CFGEYIVKIEEKQ-----PTADSAIANTG-----P	334
AJ865336	CFGEYIVKMEEKQ-----PTADSAIANTG-----P	334
BN000702	CFGEYIVKIEEKQ-----PTADSAIANTG-----P	334
AY830131	CFDGFLLKLDNLE-----LELLQEEEDQKVSTEN-----T	342
DQ139836	CFDGFLLKLDNLE-----LELLQEEEDQKVSTEN-----T	342
AY830132	CFNDFLLKLDN-----LEPVHEEN---VSTKN-----A	337
DQ139837	CFNDFLLKLDN-----LEPVHEEN---VSTKN-----A	337
DQ087253	CFNDFLVKVGKLE-----TDKLAAKNTAAVGVEP-----M	348
BN000700	CFNDFVAKMKDEN-----MKQSDENTKQSNEIPPP-----KP	339
BN000695	CFNDFLAKMKDEN-----MKQSDENTKQSNEIPPP-----KP	339
BN000701	CFDDFAKKISDNEK-----AVSKPVTASNTDIFVP-----TA	347
BN000699	CFDDSAKKISDNEK-----AVSKPVTASNTDIFVP-----TA	347
AJ865334	CFDFEVEKIMGGQA-----AAEK--AAGKEGIVVP-----AS	350
DQ129686	CFDFEVEKIMGGQA-----AAEK--AAGKEGIVVP-----AS	350
BN000696	CFDDYARGHLLEE-----EAEESKKSNAPE-----	340
BN000697	FFQGYL-----	359

:

AY730617	LVEVAPISAMG-----	348
AJ550154	LVEAVPISAMG-----	382
BN000698	VVEAVPIMASCNGIYE	352
AJ865335	VVGMRQVTATCA----	346
DQ129685	VVGMRQVTATCA----	346
AJ865336	VVGMRQVTATCA----	346
BN000702	VVGMRQVTATCA----	346
AY830131	VVESRTVTATCA----	354
DQ139836	VVESRTVTATCA----	354
AY830132	VVESRAVTPTCA----	349
DQ139837	VVESRAVTPTCA----	349
DQ087253	AISRLLVPEEHSIS--	362
BN000700	VVEAFAITATCA----	351
BN000695	VVEAFAITATCA----	351
BN000701	KPEALAITAICT----	359
BN000699	KPEALAITAICT----	359
AJ865334	APDALVITATCA----	362
DQ129686	APDALVITATCA----	362
BN000696	MVEILAVYPTCA----	352
BN000697	-----	

\* = identische Aminosäure    : = konservierter Bereich    . = teilkonservierter Bereich

Rote Buchstaben = identische Aminosäuren

Grüne Markierungen: THD Motiv nach Bogs et al. (2005)

Türkise Markierung: ICCN Motiv nach Bogs et al. (2005)

Gelbe Markierungen: RFLP Motiv nach Bogs et al. (2005)

Graue Markierung: Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle nach XIE et al. (2004)

## G.5.4 Anthocyanidinreduktase

BN000164	-MATVKKIG--KKA <b>CVI</b> GGSGFMA <b>SCLVKQLLHKG</b> YAVNT <b>TVRDP</b> DNAKKI <b>SHLLALQS</b> 56
AY184243	-MASIKQIEIEKKK <b>CVI</b> GGTGFVA <b>SLLIKQLLEKGY</b> AVNT <b>TVRDL</b> DSANK <b>TSHLLIALQS</b> 59
BN000166	--MATQHP-IGKKT <b>ACV</b> GGTGFVA <b>SLLVKLLQKGY</b> AVNT <b>TVRDP</b> DNQKK <b>VSHLLELQE</b> 57
DQ129684	--MATQHP-IGKKT <b>ACV</b> GGTGFVA <b>SLLVKLLQKGY</b> AVNT <b>TVRDP</b> DNQKK <b>VSHLLELQE</b> 57
AY641729	---MEAQP-TAPKAA <b>CVV</b> GGTGFVA <b>AATLIKLLLEKGY</b> AVNT <b>TVRDP</b> GNQKK <b>TSHLLALKG</b> 56
BN000165	---MASQL-VG <b>TKRACV</b> GGSGFVA <b>SLLVKLLLEKGF</b> AVNT <b>TVRDP</b> DNQKKI <b>SHLVTLQE</b> 56
AY830130	--MATQQP-ISKKT <b>ACV</b> GGTGFVA <b>SLLVKLLQKGY</b> AVRT <b>TVRDP</b> DNHKK <b>VSHLTALQE</b> 57
DQ099803	--MATQQP-ISKKT <b>ACV</b> GGTGFVA <b>SLLVKLLQKGY</b> AVRT <b>TVRDP</b> DNHKK <b>VSHLTALQE</b> 57
DQ139835	--MATQQP-ISKKT <b>ACV</b> GGTGFVA <b>SLLVKLLQKGY</b> AVRT <b>TVRDP</b> DDRKK <b>VSHLTALQE</b> 57
DQ438979	--MSTTQPIISTK <b>SACV</b> GGTGFVA <b>SQLIKLLLEKGY</b> AVRT <b>TVRDP</b> DNLKKI <b>SHLTALQE</b> 58
AY750963	MAPQAYPTAGQTT <b>TV</b> CVTGAAGFMA <b>SWLVKRLLEKGY</b> I <b>VHATVR</b> DPENKAK <b>VSHLLNLP</b> G 60
	. . ** *.:**:*: ** **.*: *.:**** . * *** *
BN000164	LGD-LNIFGAD <b>LTGERD</b> FDAPIAG <b>CELVFQLATP</b> VNF <b>ASEDP</b> ENDMI <b>KPAISG</b> VLN <b>VLKA</b> 115
AY184243	LGE-LNLFKAEL <b>LTIEED</b> FDAPI <b>SGCELVFQLATP</b> VNFASQ <b>DP</b> ENDMI <b>KPAIKG</b> VLN <b>VLKA</b> 118
BN000166	LGD-LKIFRAD <b>LTDELS</b> FEAPIAG <b>CDFVFHVATP</b> VH <b>FASEDP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VV <b>NV</b> MKA 116
DQ129684	LGD-LKIFRAD <b>LTDELS</b> FEAPIAG <b>CDFVFHVATP</b> VH <b>FASEDP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VV <b>NV</b> MKA 116
AY641729	SGN-LKIFRAD <b>LTDEQS</b> FDT <b>PVAGCDLVFHVATP</b> VNF <b>FASEDP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VV <b>NV</b> LKA 115
BN000165	LGD-LKIFQAD <b>LTDEGS</b> FDAPIAG <b>CDLVFHVATP</b> VNF <b>FASEDP</b> ENDMI <b>KPATQ</b> G <b>VV</b> NV <b>LKA</b> 115
AY830130	LGE-LEIFAGD <b>LTDEGS</b> FDAPIAG <b>CDLVFHVATP</b> VNFASQ <b>DP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VLN <b>VLKS</b> 116
DQ099803	LGE-LEIFAGD <b>LTDEGS</b> FDAPIAG <b>CDLVFHVATP</b> VNFASQ <b>DP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VLN <b>VLKS</b> 116
DQ139835	LGE-LEIFAGD <b>LTDEGS</b> FDAPIAG <b>CDLVFHVATP</b> VNFASQ <b>DP</b> ENDMI <b>KPAIQG</b> VLN <b>VLKS</b> 116
DQ438979	LGE-LTIFRGD <b>LTDEGS</b> FDA <b>AIAGSDLVFHVATP</b> VH <b>FGSPDP</b> ENDMI <b>KPGVQ</b> G <b>V</b> LV <b>NV</b> MKS 117
AY750963	ATDR <b>LKLFRAEL</b> CE <b>DG</b> SF <b>DA</b> AV <b>AGCNGVFHVATP</b> TE <b>FMPKDP</b> END <b>LKPAIEG</b> TL <b>NV</b> LKS 120
	: * :: :.* : .*:.:*.: **::**.* . *****:*** . *:****:
BN000164	CARVKG <b>VKRVILTSSAA</b> AVTIN <b>PVKDTGLV</b> ME <b>SNWTD</b> VE <b>FLNTAKP</b> PT <b>WGYP</b> SK <b>ALAE</b> 175
AY184243	CVRAKE <b>VKRVILTSSAA</b> AVTINE <b>LEGTGHV</b> ME <b>ETN</b> WSD <b>VEFLNTAKP</b> PT <b>WGYP</b> SK <b>VLAE</b> 178
BN000166	CTRAK <b>SVKRVILTSSAA</b> AVTIN <b>QLDGTGLV</b> DE <b>EKNWTD</b> IE <b>FLTSAKP</b> PT <b>WGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 176
DQ129684	CTRAK <b>SVKRVILTSSAA</b> AVTIN <b>QLDGTGLV</b> DE <b>EKNWTD</b> IE <b>FLTSAKP</b> PT <b>WGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 176
AY641729	CAKAG <b>TVKRVILTSSAA</b> AVSIN <b>KLNGTGLV</b> ME <b>ESHWTD</b> TE <b>FLNSAKP</b> PT <b>WGYP</b> L <b>SK</b> TLAE 175
BN000165	CAKAK <b>TVKRVVLTSSAA</b> AVSIN <b>TLDGTDLV</b> ME <b>EKD</b> WTDIE <b>FLSSAKP</b> PT <b>WGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 175
AY830130	CVKAK <b>TVKRVVLTSSAA</b> TVSIN <b>TLEGTGLV</b> DE <b>EKD</b> WSD <b>LEFLTNV</b> K <b>PPTWGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 176
DQ099803	CVKAK <b>TVKRVVLTSSAA</b> TVSIN <b>TLEGTGLV</b> DE <b>EKD</b> WSD <b>LEFLTNV</b> K <b>PPTWGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 176
DQ139835	CVKAK <b>TVKRVVLTSSAA</b> TVSIN <b>TLEGTGLV</b> DE <b>EKD</b> WSD <b>LEFLTNV</b> K <b>PPTWGYP</b> ASK <b>TLAE</b> 176
DQ438979	CVKAK <b>TVKRVVLTSSAA</b> AVT <b>NTLSGTGLI</b> AD <b>END</b> WSD <b>VEFLTAKP</b> PT <b>WGYP</b> SK <b>VLAE</b> 177
AY750963	CTK <b>VDSIKRVVLTSSAA</b> TVSIN <b>NSSEQNY</b> ID <b>ESC</b> WTD <b>VN</b> FL <b>TSQKPPG</b> W <b>AYP</b> SK <b>TLAE</b> 180
	*.:. :*****:***: . . * .** :*. . *** *.* **.*

BN000164	KA <b>AWKFAE</b> ENHIDLIT <b>VI</b> PALTT <b>GP</b> SL <b>TP</b> DI <b>PSS</b> VGLATSLIT <b>GN</b> DFLIN-AL <b>KGMQ</b> FLS 234
AY184243	KA <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PTLT <b>IG</b> PSLT <b>QD</b> I <b>PSS</b> VAMGMSLLT <b>GN</b> DFLIN-AL <b>KGMQ</b> FLS 237
BN000166	KA <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PTLMAGSSLT <b>SD</b> VP <b>PSS</b> IGLAMSLIT <b>GN</b> EFLIN-GM <b>KGMQ</b> MLS 235
DQ129684	KA <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PTLMAGSSLT <b>SD</b> VP <b>PSS</b> IGLAMSLIT <b>GN</b> EFLIN-GM <b>KGMQ</b> MLS 235
AY641729	KA <b>AWKFAE</b> ENNINLIT <b>VI</b> PTLMAGPSLT <b>TAD</b> VP <b>PSS</b> IGLAMSLIT <b>GN</b> EFLIN-GL <b>KGMQ</b> MLS 234
BN000165	KA <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PSLMT <b>GP</b> SL <b>TP</b> IV <b>PSS</b> IGLATSLIS <b>GN</b> EFLIN-AL <b>KGMQ</b> MLS 234
AY830130	KT <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PSLMAGPSLT <b>TP</b> DV <b>PSS</b> IGLAMALIT <b>GDD</b> FLINMAL <b>KGMQ</b> MLS 236
DQ099803	KT <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PSLMAGPSLT <b>TP</b> DV <b>PSS</b> IGLAMALIT <b>GDD</b> FLINMAL <b>KGMQ</b> MLS 236
DQ139835	KT <b>AWKFAE</b> ENNIDLIT <b>VI</b> PSLMAGPSLT <b>TP</b> DV <b>PSS</b> IGLAMALIT <b>GDD</b> FLINMAL <b>KGMQ</b> MLS 236
DQ438979	KT <b>AWKFAE</b> QNNIDLIA <b>VI</b> PSLMAGASLT <b>PD</b> I <b>PSS</b> IGLATSLIT <b>GN</b> EFLIN-GL <b>KGMQ</b> MLS 236
AY750963	QA <b>ALKYAE</b> EHSLDVV <b>TV</b> IPV <b>LV</b> VGPAV <b>TP</b> TV <b>PSS</b> VELALS <b>LIT</b> GDEFKMG-AL <b>KGMQ</b> FVS 239 ::* *::*: ::::*** * *.::* :***: .: .:::***: .: .:*****:*
BN000164	<b>GS</b> ISITH <b>VED</b> ICRAH <b>IY</b> V <b>AENE</b> SS <b>GR</b> YIVSAHSTSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> SKRYPQYK <b>VP</b> TE <b>FD</b> DC 294
AY184243	<b>GS</b> ISITH <b>VED</b> ICRAH <b>I</b> F <b>VAE</b> KE <b>ST</b> SGRY <b>I</b> CCA <b>HN</b> TSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> SKRYPQYK <b>VP</b> TE <b>FD</b> DF 297
BN000166	<b>GS</b> VS <b>IAH</b> VED <b>V</b> CQ <b>A</b> H <b>I</b> F <b>VAE</b> KE <b>S</b> AS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>AN</b> TSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> SKRYPQYK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 295
DQ129684	<b>GS</b> VS <b>IAH</b> VED <b>V</b> CQ <b>A</b> H <b>I</b> F <b>VAE</b> KE <b>S</b> AS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>AN</b> TSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> SKRYPQYK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 295
AY641729	<b>GS</b> IS <b>ISH</b> VED <b>V</b> CR <b>A</b> H <b>V</b> F <b>VAE</b> KE <b>S</b> AS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>V</b> STSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> N <b>KR</b> Y <b>PE</b> YN <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 294
BN000165	<b>GS</b> ISITH <b>VED</b> CR <b>A</b> H <b>V</b> FL <b>A</b> E <b>KE</b> SAS <b>GR</b> Y <b>I</b> CS <b>AV</b> NTSV <b>PE</b> LAK <b>FL</b> N <b>KR</b> Y <b>PD</b> FK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 294
AY830130	<b>GS</b> IS <b>IAH</b> VED <b>V</b> CR <b>A</b> H <b>I</b> FL <b>A</b> E <b>KE</b> SAS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>AN</b> T <b>GV</b> PE <b>LAK</b> FLN <b>KR</b> Y <b>Q</b> YK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 296
DQ099803	<b>GS</b> IS <b>IAH</b> VED <b>V</b> CR <b>A</b> H <b>I</b> FL <b>A</b> E <b>KE</b> SAS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>AN</b> T <b>GV</b> PE <b>LAK</b> FLN <b>KR</b> Y <b>Q</b> YK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 296
DQ139835	<b>GS</b> IS <b>IAH</b> VED <b>V</b> CR <b>A</b> H <b>I</b> FL <b>A</b> E <b>KE</b> SAS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>AN</b> T <b>GV</b> PE <b>LAK</b> FLN <b>KR</b> Y <b>Q</b> YK <b>VP</b> TE <b>FD</b> GDF 296
DQ438979	<b>GS</b> ISITH <b>VED</b> CR <b>A</b> H <b>I</b> FL <b>A</b> E <b>KE</b> SAS <b>GR</b> Y <b>I</b> CCA <b>EN</b> SS <b>VE</b> AK <b>FL</b> SKR <b>Y</b> PE <b>YK</b> VP <b>TE</b> FD <b>GDF</b> 296
AY750963	<b>GS</b> IS <b>LV</b> HID <b>V</b> CS <b>A</b> Q <b>I</b> FL <b>M</b> E <b>K</b> PS <b>A</b> Q <b>GR</b> Y <b>I</b> CF <b>P</b> VNT <b>GI</b> P <b>Q</b> LA <b>E</b> FLSKRYPQYK <b>VP</b> TK <b>FD</b> DDV 299 ***: *:::* *::: : * :*.**** .: .:***:***.*****:***.*
BN000164	<b>PS</b> KAKLT <b>IS</b> SEKL <b>V</b> KE <b>GF</b> S <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>E</b> Y <b>L</b> KN <b>K</b> GT <b>L</b> KN 337
AY184243	<b>PS</b> KAK <b>LI</b> IS <b>SG</b> KL <b>I</b> KE <b>GF</b> S <b>F</b> K <b>H</b> SI <b>A</b> ET <b>FD</b> Q <b>T</b> V <b>E</b> Y <b>L</b> K <b>T</b> Q <b>G</b> - <b>IK</b> - 338
BN000166	<b>PP</b> K <b>KL</b> I <b>IS</b> SEKL <b>V</b> KE <b>GF</b> S <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> Y <b>DE</b> SV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>LL</b> Q <b>N</b> 338
DQ129684	<b>PP</b> K <b>KL</b> I <b>IS</b> SEKL <b>V</b> KE <b>GF</b> S <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> Y <b>DE</b> SV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>LL</b> Q <b>N</b> 338
AY641729	<b>PS</b> KAK <b>LI</b> ISSEKL <b>T</b> KE <b>GF</b> S <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> SV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>I</b> L <b>KN</b> 337
BN000165	<b>PS</b> K <b>KL</b> I <b>IS</b> SEKL <b>I</b> SE <b>GF</b> S <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>E</b> Y <b>L</b> K <b>S</b> K <b>G</b> LL <b>K</b> - 336
AY830130	<b>P</b> SEAK <b>LI</b> ISSEKL <b>I</b> KE <b>GF</b> D <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>LL</b> Q <b>N</b> 339
DQ099803	<b>P</b> SEAK <b>LI</b> ISSEKL <b>I</b> KE <b>GF</b> D <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>LL</b> Q <b>K</b> 339
DQ139835	<b>P</b> SEAK <b>LI</b> ISSEKL <b>I</b> KE <b>GF</b> D <b>F</b> KY <b>GI</b> EE <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>EY</b> FK <b>AK</b> G <b>LL</b> Q <b>N</b> 339
DQ438979	<b>PS</b> KAK <b>T</b> IL <b>P</b> SEKL <b>K</b> KE <b>GF</b> T <b>FK</b> FG <b>I</b> ED <b>I</b> YD <b>Q</b> TV <b>E</b> Y <b>L</b> KL <b>K</b> G <b>V</b> L <b>Q</b> N 339
AY750963	<b>P</b> AT <b>P</b> KL <b>T</b> IS <b>S</b> Q <b>KL</b> L <b>D</b> CG <b>S</b> F <b>F</b> KY <b>GI</b> ED <b>I</b> YD <b>Q</b> AI <b>EY</b> M <b>K</b> T <b>K</b> G <b>LL</b> TC 342 * . .* :.* ** . ** **.* : :***:***: * :

\* = identische Aminosäure : = konservierter Bereich. .= teilkonservierter Bereich

Rote Buchstaben = identische Aminosäuren

Graue Markierung: Dinukleotid (NADPH/NADP)-Bindungsstelle nach Xie et al. (2004)

---

## Danksagung

Viele Menschen haben das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich in der Entstehungsphase begleitet haben. Besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Gert Forkmann, für die Überlassung des Themas und sein entgegengebrachtes Vertrauen.

Dr. Thilo Fischer, der mir immer mit Rat zur Verfügung stand. Für seine Hilfsbereitschaft und seine anregende Art möchte ich mich sehr bedanken.

Iva Puhl, für die vielen aufmunternden und abwechslungsreichen Stunden in der Erdbeerversuchsanlage, als Kollegin und Freundin.

den Kollegen Judith Pfeiffer, Dr. Christian Seitz und Wiebke Rathje, die im Labor immer vor Ort mit vielen konstruktiven und motivierenden Einfällen, mit Rat und Tat zur Seite standen.

Erna Look. Sie ist diejenige, die den Lehrstuhl in allen Lebenslagen familiär wirken lies. Jeden noch so grauen Tag konnte sie mit ihrem nicht beeindruckbaren Optimismus zu einen erfolgreichen Tag verwandeln. Für die vielen schönen Stunden möchte ich mich besonders bedanken.

Dr. Johannes Müller, für seine Begleitung durch meine Doktorandenzeit. Er hat mich motiviert, immer weiter zu schreiben und einen Sinn im Abschluss dieser Arbeit zu sehen.

meinen Freunden. Ohne sie wäre diese Arbeit noch nicht beendet. Ihr zum Teil aufdringliches Nachfragen nach dem Stand der Doktorarbeit gab mir immer wieder Anreiz doch weiter zu arbeiten. Danke für die entgegengebrachte Geduld, das Anspornen und die offenen Ohren.

meinen Eltern. Sie unterstützten und begleiteten mich immer bedingungslos, egal welchen Weg ich für mich wählte.

meinem Ehemann Markus. Er war es, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglichte. Er gab Rückhalt, Unterstützung, Motivation. Besonders an Tagen, an denen ich ans Aufhören dachte, an denen mir die Kraft und der Mut fehlten, war er mein Rückgrad und mein Motor. Dafür liebe und schätze ich ihn umso mehr.

meinem Sohn Florian. Ohne seine Geduld wäre diese Arbeit sicher nie beendet worden. Ich hoffe, er verzeiht mir die millionen Momente, an denen ich ihn mit „Ich komm gleich Maus“, vertröstet habe.

---

## Lebenslauf

Persönliche Daten: Bettina Deiml, geb. Rösch  
Geboren am 13.06.1976 in Pegnitz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet  
Geburt 1. Kind 06/2006

Schulbesuch: 1982 - 1986 Grundschule in Pegnitz  
1986 - 1995 Gymnasium in Pegnitz  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 10/1995 - 04/2000 Diplomstudiengang Gartenbau  
Fachhochschule Weihenstephan  
Abschluss: Dipl. Ing. (FH)  
11/2001 - 12/2003 Masterstudiengang Landnutzung  
Technische Universität München  
Abschluss: Master of Science

Berufliche Tätigkeiten: 08/2000 - 11/2001 Angestellte in der Kreisfachberatung,  
Amt für Gartenbau und Landschaftspflege am Landratsamt  
Nürnberger Land, Lauf a.d. Pegnitz  
12/2003 - 06/2005 wissenschaftliche Angestellte  
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Technische Universität München  
07/2005 - 12/2005 wissenschaftliche Angestellte  
Institut für Pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg