



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Untersuchung der  
Benzoxazinoidbiosynthese in den  
Dikotyledonen *Consolida orientalis* und  
*Lamium galeobdolon*

Dissertation



Laura Hannemann



# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Untersuchung der Benzoxazinoidbiosynthese in den Dikotyledonen

*Consolida orientalis* und *Lamium galeobdolon*

Laura Hannemann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Alfons Gierl
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 06.05.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.08.2019 angenommen.

Für Mama

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Sekundärmetabolite und ihre Funktion .....	1
1.2 Benzoxazinoide.....	2
1.2.1 Struktur und Eigenschaften .....	2
1.2.2 Vorkommen der Benzoxazinoide.....	3
1.2.3 Biosynthese der Benzoxazinoide.....	6
1.3 Die Enzyme der BX Biosynthese.....	7
1.3.1 Oxygenasen als Modifikationsenzyme .....	8
1.3.2 Detoxifizierende Glukosyltransferasen .....	9
1.3.3 B-Glukosidasen in der Bioaktivierung.....	11
1.4 Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzucht.....	14
2.1.2 Bakterienstämme .....	15
2.1.3 Hefestämme.....	15
2.1.4 Plasmide .....	15
2.1.5 Oligonukleotide .....	16
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	19
2.2.1 DNA-Isolierung.....	19
2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	19
2.2.3 Allgemeine DNA-Klonierungstechniken.....	19
2.2.4 PCR-Verfahren.....	20
2.2.5 Transkriptionelle Analyse nach Verwundungsstress.....	21
2.2.6 Codonoptimierung von P450 Genen auf das Hefeexpressionssystem .....	21
2.2.7 DNA-Sequenzierung .....	21
2.2.8 Sequenzierung des <i>L. galeobdolon</i> Transkriptoms.....	21
2.2.9 Sequenzierung von genomischer <i>L. galeobdolon</i> DNA.....	22
2.3 Hefe- und Gewebekulturen.....	23
2.3.1 Anzucht und Induktion von Hefe.....	23

2.3.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	23
2.3.3	Transiente Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i> Agroinfiltration.....	24
2.3.4	Erzeugung und Analyse von transgenen <i>A. thaliana</i> -Pflanzen .....	25
2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	25
2.4.1	Proteinrohextraktion aus <i>C. orientalis</i> und <i>L. galeobdolon</i> .....	25
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	26
2.4.4	Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> .....	26
2.4.5	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie bzw. Glutathion Agarose Säule .....	26
2.4.6	Mikrosomenisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> .....	27
2.4.7	Mikrosomenisolierung aus <i>C. orientalis</i> und <i>Z. mays</i> .....	27
2.5	Isolierung von Naturstoffen.....	28
2.5.1	Isolierung von DIBOA aus <i>L. galeobdolon</i> bzw. DIMBOA aus <i>Z. mays</i> .....	28
2.5.2	Isolierung von GDIBOA aus <i>L. galeobdolon</i> .....	28
2.5.3	Isolierung von GDIMBOA aus <i>Z. mays</i> .....	28
2.6	Analyse von Naturstoffen .....	29
2.6.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	29
2.7	Enzymtests .....	31
2.7.1	Test der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität.....	31
2.7.2	In vitro Enzymtests mit Mikrosomen .....	31
2.7.3	Tests auf Glukosyltransferase-Aktivität.....	31
2.7.4	Tests auf $\beta$ -Glukosidase-Aktivität .....	31
2.8	Identifikation von POR Sequenzen aus dem <i>C. orientalis</i> Transkriptom .....	33
2.9	Phylogenetische Analysen .....	34
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Untersuchung von <i>C. orientalis</i> P450-Enzymen .....	35
3.1.1	Hydroxylierung von Intermediaten der DIBOA-Synthese durch <i>Consolida orientalis</i> Mikrosomen .....	35
3.1.2	Identifikation der P450 Kandidaten aus dem Transkriptom.....	36
3.1.3	Expression der P450-Enzyme in Hefe.....	38
3.2	Analysen zur Identifizierung von <i>Bx</i> -Genen in <i>L. galeobdolon</i> .....	42
3.2.1	Verifizierung von Gen-Assemblierungen des Transkriptoms .....	42
3.2.2	Enzyme der Detoxifizierung und Bioaktivierung der Benzoxazinoide in <i>L. galeobdolon</i> .....	45
3.2.3	Untersuchung von <i>L. galeobdolon</i> UDP-Glukosyltransferasen .....	45
3.2.4	Charakterisierung der <i>L. galeobdolon</i> BGLUs .....	48

3.3	Phylogenetische Untersuchung der <i>L. galeobdolon</i> Enzyme .....	64
3.3.1	Phylogenie der $\beta$ -Glukosidasen.....	65
3.3.2	Phylogenie der P450-Enzyme .....	67
3.3.3	Phylogenie der UGTs .....	69
4	Diskussion.....	72
4.1	Zwei-Komponenten-Systeme als Strategie der Pflanzenabwehr. ....	72
4.2	Analyse von <i>C. orientalis</i> P450-Enzymen.....	74
4.3	Analyse der BX-Biosynthese in <i>L. galeobdolon</i> .....	75
4.3.1	<i>LgBX8</i> konnte nicht identifiziert werden.....	75
4.3.2	Die BGLU <i>LgGLU1</i> hydrolysiert GDIBOA. ....	76
4.3.3	Substratpräferenzen der BXBGLUs aus Monokotyledonen und Dikotyledonen. 78	
4.4	Enzympromiskuität und Evolution von Biosynthesewegen. ....	79
4.5	Die Phylogenien der an der BX-Biosynthese beteiligten Enzyme .....	81
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis .....	87
7	Anhang.....	109
8	Danksagung.....	144
9	Lebenslauf.....	145

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Angiospermen. ....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Vorkommen und Konzentration der BX .....	5
Abbildung 3: Biosyntheseweg der Benzoxazinoide in <i>Z. mays</i> . ....	7
Abbildung 4: Transkript-Level definierter <i>Bx</i> -Gene und <i>P450</i> -Gene von <i>C. orientalis</i> . ....	37
Abbildung 5: Phylogenie der PORs aus verschiedenen Pflanzen .....	40
Abbildung 6: 5'-Bereich der <i>LgBGLU</i> Kandidaten aus <i>L. galeobdolon</i> .....	43
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Sequenzierungsalignment .....	44
Abbildung 8: Heterologe Expression von UGT11 mit GST-Tag. ....	47
Abbildung 9: Entgiftungsversuch der Arabidopsis Keimlinge in DIBOA-haltigem Medium....	48
Abbildung 10: Alignment verschiedener Mannosidasen.....	51
Abbildung 11: Steady State RNA-Level der <i>LgGlus</i> .....	52
Abbildung 12: Steady State RNA-Level der <i>LgGlus</i> nach Verwundung .....	53
Abbildung 13: Aminosäuresequenzen von <i>LgGLU1</i> und <i>LgGLU3</i> mit Modifikationen. ....	55
Abbildung 14: Heterologe Expression von Proteinen durch Magnifektion .....	55
Abbildung 15: Analytierte Substrate der <i>L. galeobdolon</i> $\beta$ -Glukosidasen .....	58
Abbildung 16: Substratpräferenz der GDIBOA-Glukosidasen <i>LgGLU1</i> und <i>CoGLU</i> .....	59
Abbildung 17: Vergleich der $\beta$ -Glukosidase-Aktivität von Rohextrakt und heterolog exprimiertem <i>LgGLU1</i> mit verschiedenen Substraten.....	60
Abbildung 18: Vergleich von pH- und Temperaturoptima für die GDIBOA-Hydrolyse durch Rohextrakt und heterolog exprimiertes <i>LgGLU1</i> .....	61
Abbildung 19: Michaelis-Menten-Enzymkinetiken für <i>LgGLU1</i> und <i>CoGLU</i> mit den Substraten GDIBOA, Dhurrin, Oleuropein .....	62
Abbildung 20: Hemmung der GDIBOA-Hydroxylierung durch Inkubation mit Oleuropein und Dhurrin. ....	64
Abbildung 21: Phylogenetische Analyse der Pflanzen $\beta$ -Glukosidasen.....	66
Abbildung 22: Phylogenetische Analyse der P450-Enzyme.....	68
Abbildung 23: Phylogenie der UGTs aus <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> und <i>L. galeobdolon</i> .....	71
Abbildung 24: Organisation des Sekundärstoffwechselweges.....	72
Abbildung 25: Detailansicht der <i>LgGLU1</i> enthaltenden Klade aus der BGLU Phylogenie...	109
Abbildung 26: Detailansicht der <i>CoGLU</i> und <i>LgGLU2</i> enthaltenden Kladen aus der BGLU Phylogenie. ....	110
Abbildung 27: Detailansicht der <i>LgGLU3</i> enthaltenden Klade aus der BGLU Phylogenie...	111
Abbildung 28: Detailansicht der <i>LgGLU4</i> enthaltenden Klade aus der BGLU Phylogenie...	112
Abbildung 29: Detailansicht der <i>CoCYP80</i> -Klade aus der P450 Phylogenie.....	113
Abbildung 30: Detailansicht der <i>ZmBX</i> -Klade aus der P450 Phylogenie.....	114

Abbildung 31: Detailansicht der <i>ZmBX8/9</i> und <i>CoBX8</i> enthaltenden Gruppen aus der P450 Phylogenie. ....	114
Abbildung 32: Eingesetzte Sequenzen für den POR-Stammbaum. ....	115
Abbildung 33: Eingesetzte Sequenzen für den BGLU-Stammbaum. ....	124
Abbildung 34: Eingesetzte Sequenzen für den UGT-Stammbaum.....	125
Abbildung 35: Eingesetzte Sequenzen für den CYP450-Stammbaum.....	125

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Bakterienstämme von <i>E.coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	15
Tabelle 2: Hefestämme .....	15
Tabelle 3: Eingesetzte Plasmide .....	15
Tabelle 4: (Adaptor)Primer für die Klonierung.....	16
Tabelle 5: Primer für die 5'- und 3'-RACE und AIMS.....	17
Tabelle 6: Primer für die qRT-PCR.....	18
Tabelle 7: Bedingungen der quantitativen RT-PCR. ....	20
Tabelle 8: Codonoptimierung für die Expression von <i>C. orientalis</i> Genen in Hefe .....	21
Tabelle 9: Endonukleasen mit 4-Basen-Erkennungssequenzen .....	22
Tabelle 10: Eingesetzte Kombinationen unterschiedlicher Provektoren für die transiente Expression von <i>LgGLU1</i> , <i>LgGLU2</i> , <i>LgGLU3</i> , <i>LgGLU4</i> und <i>CoGLU</i> , sowie von GFP in <i>N. benthamiana</i> . ....	25
Tabelle 11: HPLC Methodenprofile.....	29
Tabelle 12: HPLC-Programme und Retentionszeiten für präparative Trennungen bei der Isolierung der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA.....	30
Tabelle 13: Benzoxazinoid Aktivität der Mikrosomen aus Mais und <i>C. orientalis</i> . ....	36
Tabelle 14: P450-Kandidaten für die Benzoxazinoidbiosynthese in <i>C. orientalis</i> .....	38
Tabelle 15: Schema der Enzym-Kombinationen in heterologer Expression .....	42
Tabelle 16: Konzentration der Metaboliten in <i>L. galeobdolon</i> Material .....	45
Tabelle 17: Glykosylierung von DIBOA im Rohextrakte.....	45
Tabelle 18: Verschiedene Methoden der Expression für die <i>LgUGT</i> -Kandidaten.....	47
Tabelle 19: Charakteristika der BGLUs aus <i>L. galeobdolon</i> .....	49
Tabelle 20: Spezifische Aktivität von <i>L. galeobdolon</i> BGLUs .....	57
Tabelle 21: Steady-State-Konstanten von <i>LgGLU1</i> und <i>CoGLU</i> .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen und dem Ein- oder Dreibuchstabencode für Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Å	Ångström
ABC Transporter	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter
AIMS	<i>Amplification of Insertion Mutagenised Sites</i>
<i>A. mollis</i>	<i>Acanthus mollis</i>
<i>A. repens</i>	<i>Agropyron repens</i>
<i>A. squarrosa</i>	<i>Aphelandra squarrosa</i>
AS	Aminosäuren
<i>A. tetragona</i>	<i>Aphelandra tetragona</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BASTA	formuliertes Herbizid mit dem Wirkstoff Phosphinotricin, eingetragenes Warenzeichen der Firma Hoechst
<i>B. edulis</i>	<i>Blepharis edulis</i>
BGLU	$\beta$ -Glukosidase
BME	$\beta$ -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BOA	Benzoxazolin-2(3H)-one
BSA	Rinderserumalbumin
BX	Benzoxazinoid
ca.	circa
CAZY	<i>Carbohydrate-Active enZYmes Database</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. infundibuliformis</i>	<i>Crossandra infundibuliformis</i>
<i>C. lacryma-jobi</i>	<i>Coix lacryma-jobi</i>
<i>C. orientalis</i>	<i>Consolida orientalis</i>
<i>C. pungens</i>	<i>Crossandra pungens</i>
CPR	NADPH-Cytochrom-P450- Oxidoreduktasen
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
Da	Dalton
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-one
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-one
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraacetat
EtOAc	Ethylacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDIBOA	2-O-glucosyl-1,4(2 <i>H</i> )-benzoxazin-3- one
GDIMBOA	2-O-glucosyl -7-Methoxy-2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-one
<i>G. aurea</i>	<i>Genlisea aurea</i>
GFP	Green fluorescent protein

GH	Glykosid Hydrolase
Glc	Glukosid
GS	Glukosinolat
GT	Glykosyltransferase
<i>H. lechleri</i>	<i>Hordeum lechleri</i>
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HBOA	2-Hydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-one
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HION	3-Hydroxyindolin-2-on
HNG	Hydroxynitrilglukosid
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGL	Indol-3-Glycerinphosphatlyase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
$k_{cat}$	Wechselzahl
$k_{cat}/K_m$	katalytischer Effizienzparameter
kDa	Kilo Dalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
K-P <sub>i</sub>	Kalium-Phosphat
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>L. galeobdolon</i>	<i>Lamium galeobdolon</i>
<i>L. japonicus</i>	<i>Lotus japonicus</i>
MBOA	6-Methoxy-2-Benzoxazolinone
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MP	<i>Movement Protein</i>
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
na	nicht analysierbar
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nd	nicht detektierbar
N-Terminus	Amino-Terminus
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
OD	Optische Dichte
ODD	2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase
OMT	O-Methyltransferase
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
P450	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyetylenglykol
pNPC	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside
pNPG	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid
pNPM	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranosid
pNPF	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid
POR	NADPH-Cytochrom-P450- Oxidoreduktasen
PPT	Phosphinothricin
PSPG	<i>Plant Secondary Product-Glucosyltransferase</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>

---

RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
<i>S. bicolor</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>S. cereale</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>S. dulcis</i>	<i>Scoparia dulcis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>T. repens</i>	<i>Trifolium repens</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TB	<i>Terrific Broth</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-Nk-Nk-Tetramethyldiamin
TIM-barrel	Triosephosphat-Isomerase-barrel
TMV	Tabakmosaikvirus
TRIBOA	2,4,7-Trihydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TS	Transkriptionsstart
TSA	$\alpha$ -Untereinheit der Tryptophansynthase
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glukosid
UDP	Uracildiphosphat
UDPG	Uracildiphosphatglukose
UGT	UDP-abhängige Glykosyltransferase
UV	ultraviolett
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit
Vol	Volumen
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient



# 1 Einleitung

## 1.1 Sekundärmetabolite und ihre Funktion

Pflanzen produzieren eine Vielzahl an unterschiedlichsten chemischen Verbindungen, welche entweder Teil des primären oder sekundären Stoffwechselwegs sind. Die Produkte des Primärmetabolismus sind lebenswichtig für die Pflanze und notwendig für Wachstum, Fotosynthese und Reproduktion. Sekundärmetabolite werden häufig als spezialisierte Metabolite bezeichnet. Über 200.000 Sekundärmetaboliten wurden bisher beschrieben (Dixon und Strack, 2003; Harborne, 2001; Wink *et al.*, 2004). Sie lassen sich in Gruppen unterschiedlicher chemischer Struktur einteilen. Terpene und Terpenoide bilden die größte Klasse. Sie übernehmen unterschiedlichste Funktionen in Pflanzen. Oft dienen sie der Kommunikation der Pflanze mit Insekten. Als leichtflüchtige Duftstoffe sind sie wichtige Lockstoffe, aber ein großer Teil der verschiedenen Strukturen sind auch bei der Abwehr von Fraßfeinden wirksam (Mallikarjuna *et al.*, 2004; Pichersky *et al.*, 2006; Wink, 2003). Sekundärmetabolite aus der Klasse der Flavonoide können Signalstoffe für Bestäuber sein, so z.B. die Anthocyanidine. Doch Flavonoide fungieren auch in der Abwehr von Pilze (Skadhauge *et al.*, 1997) und herbivoren Insekten (Mallikarjuna *et al.*, 2004), haben eine Schutzfunktion vor UV-B Strahlung (Wink, 2003) und spielen eine Rolle bei der Pollenreifung (Napoli *et al.*, 1990; Taylor und Jorgensen, 1992). Sekundärmetabolite können allelopathisch wirksam sein (Stamp, 2003). In Abwehr- und Signalfunktion wird Spezifität dadurch erreicht, dass chemischen Verbindungen oft charakteristischerweise in Pflanzenfamilien, Genera oder Spezies vorkommen (Wink und Waterman, 1999). Sie können daher verwendet werden, um Pflanzen taxonomisch einzuordnen. Nichtsdestotrotz gibt es auch Sekundärmetabolitklassen, die in unterschiedlichen nicht miteinander verwandten Spezies auftreten (Wink, 2003).

Pathogen- und Herbivorabwehr ist eine Hauptfunktion von sekundären Pflanzenmetaboliten, hohe Konzentrationen bedeuten oft resistenterer Pflanzen. Jedoch ist ihre Biosynthese auch energetisch teuer und kann das Wachstum der Pflanze vermindern (Siemens *et al.*, 2002; Stotz *et al.*, 1999; Tollrian und Harvell, 1999). Außerdem sind Abwehrmetabolite meist reaktiv gegen essentielle Strukturen wie Aminosäuren, Nukleinsäuren und Fettsäuren, was sie zwar nützlich gegen Fraßfeinde und Pathogene macht, jedoch auch zu Autotoxizität führt. Die Pflanze kann auf drei Arten diese Gefahr umgehen. Die Synthese des toxischen, sekundären Pflanzenstoffs kann erst bei Fraß oder Pathogenbefall induziert werden, d.h. wenn das Toxin für die Abwehr benötigt wird (Osbourn, 1996). Phytoalexine sind z.B. gegen mikrobielle Pathogene gerichtete *de novo* synthetisierte Abwehrchemikalien (VanEtten *et al.*, 1994). Ihre Synthese kann zwei bis drei Tage dauern, da oft zuerst das Enzymsystem

gebildet werden muss (Grayer und Harborne, 1994). Der reaktive Metabolit kann alternativ auf Vorrat synthetisiert werden; diese Verbindungen werden Phytoantizipine genannt, wenn sie gegen Mikroben wirksam sind. Ihre Biosynthese erfordert Energie und verbraucht Ressourcen (Mauricio, 1998), die Abwehrfunktion ist jedoch sofort abrufbar und damit unmittelbar einsetzbar. Konstitutiv gebildete Abwehrchemikalien können angereichert in speziellen Kompartimenten vorliegen, besonderen Organellen oder Geweben, die auf die Einlagerung spezialisiert sind (Jones und Vogt, 2001; Osbourn, 1996). Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Metabolite in eine stabilisierte Form überführt und getrennt von reaktivierenden ebenfalls konstitutiv gebildeten Enzymen gelagert werden. Beispiele für diese „Zwei-Komponenten-Abwehr-Systeme“ sind alkalische Glukoside, Benzoxazinoidglukoside, cyanogene Glukoside, Glukosinolate, Iridoidglukoside und Salicinoide (siehe Pentzold *et al.*, 2014a für Review).

## 1.2 Benzoxazinoide

### 1.2.1 Struktur und Eigenschaften

Benzoxazinoide (BX) sind Sekundärmetabolite, die vor allem in Gräsern gefunden werden. Sie dienen der Pathogen- und Herbivorabwehr, aber auch allelopathische Funktionen wurden für sie gezeigt (Pérez und Ormenoñuñez, 1991; Warnock *et al.*, 2001). Oft wird die Konzentration der Sekundärmetabolite in Nutzpflanzen aufgrund ihrer Toxizität durch Züchtung vermindert, Benzoxazinoide jedoch sind besonders in Mais seit den 1970er Jahren Ziel positiver Selektion um den Schutz gegen herbivore Insekten zu erhöhen (Barry *et al.*, 1994; Grombacher *et al.*, 1989; Klun *et al.*, 1970).

BX bilden eine vielfältige Chemikalienklasse. Die wichtigsten Vertreter sind die Benzoxazinone mit DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2*H*-1,4-Benzoxazin-3(4*H*)-one) und DIBOA (2,4-Dihydroxy-2*H*-1,4-Benzoxazin-3(4*H*)-one), sie stellen oft das Endprodukt in der konstitutiven Synthese dar. Daneben werden induzierbare Benzoxazinone wie HDMBOA (2-Hydroxy-4,7-Dimethoxy-1,4-Benzoxazin-3-one) (Meihls *et al.*, 2013; Tzin *et al.*, 2017), DIM<sub>2</sub>BOA (2,4-Dihydroxy-7,8-Dimethoxy-1,4-Benzoxazin-3-one) und HDM<sub>2</sub>BOA (2-Hydroxy-4,7,8-Trimethoxy-1,4-Benzoxazin-3-one) (Handrick *et al.*, 2016) gebildet. Die Lagerform ist das Glukosid (z.B. GDIBOA). Das Benzoxazolinon (6-Methoxy-2-Benzoxazolinone) MBOA kann durch Degradation entstehen und wird aus der Zelle transportiert (Maresh *et al.*, 2006). BX-Aglukone sind reaktiv durch die Interaktion ihrer N-OH Funktion wie auch der tautomerisierten zyklischen Hemiacetaleinheit mit NH<sub>2</sub>- und SH-Nukleophilen die sich z. B. in Lysinreste finden. Entsprechend können Enzyme gehemmt werden (Pérez und Niemeyer, 1989), Beispiele sind Papain, H<sup>+</sup>-ATPase, Alpha-Chymotrypsin und Cholinesterase. Fraßfeinde werden dadurch negativ beeinflusst (Cuevas *et al.*, 1990; Cuevas und Niemeyer, 1993; Friebe *et al.*, 1997). Desweiteren interkalieren die BX in Nukleinsäuren, was zu

Mutationen führen kann (Hashimoto *et al.*, 1979). Auch das Herbizid Atrazin kann durch BX inaktiviert werden und Toleranz vermitteln (Hamilton, 1964; Wenger *et al.*, 2005).

### **1.2.2 Vorkommen der Benzoxazinoide**

Neben dem charakteristischen Vorkommen der BX in den Poales (Niemeyer, 2009; Sicker *et al.*, 2000) findet man sie sporadisch in Acanthaceen, Ranunculaceen, Lamiaceen und Plantaginaceen (Alipieva *et al.*, 2003; Baumeler *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2005; Kanchanapoom *et al.*, 2001; Özden *et al.*, 1992). Während in den letzten drei Familien jeweils nur eine einzige Spezies, nämlich *Consolida orientalis* Schrödinger, *Lamium galeobdolon* (L.) L. und *Scoparia dulcis* L. Benzoxazinoide synthetisiert, zeigen mehrere Spezies aus den Acanthaceen diese Eigenschaft. Innerhalb der Familie der Poaceen produziert eine Vielzahl von Spezies BX. Vor allem in den Nutzpflanzen *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. und in einigen wilden Hordeum Spezies (Grün *et al.*, 2005) sind sie zu finden. Acanthaceen, Plantaginaceen und Lamiaceen gehören zur Ordnung der Lamiales aus der Gruppe der Asteride und sind miteinander verwandt. Ranunculales bilden eine weitere Ordnung in den Eudikotyledonen, BX findet man also in drei Pflanzenordnungen (Abbildung 1).

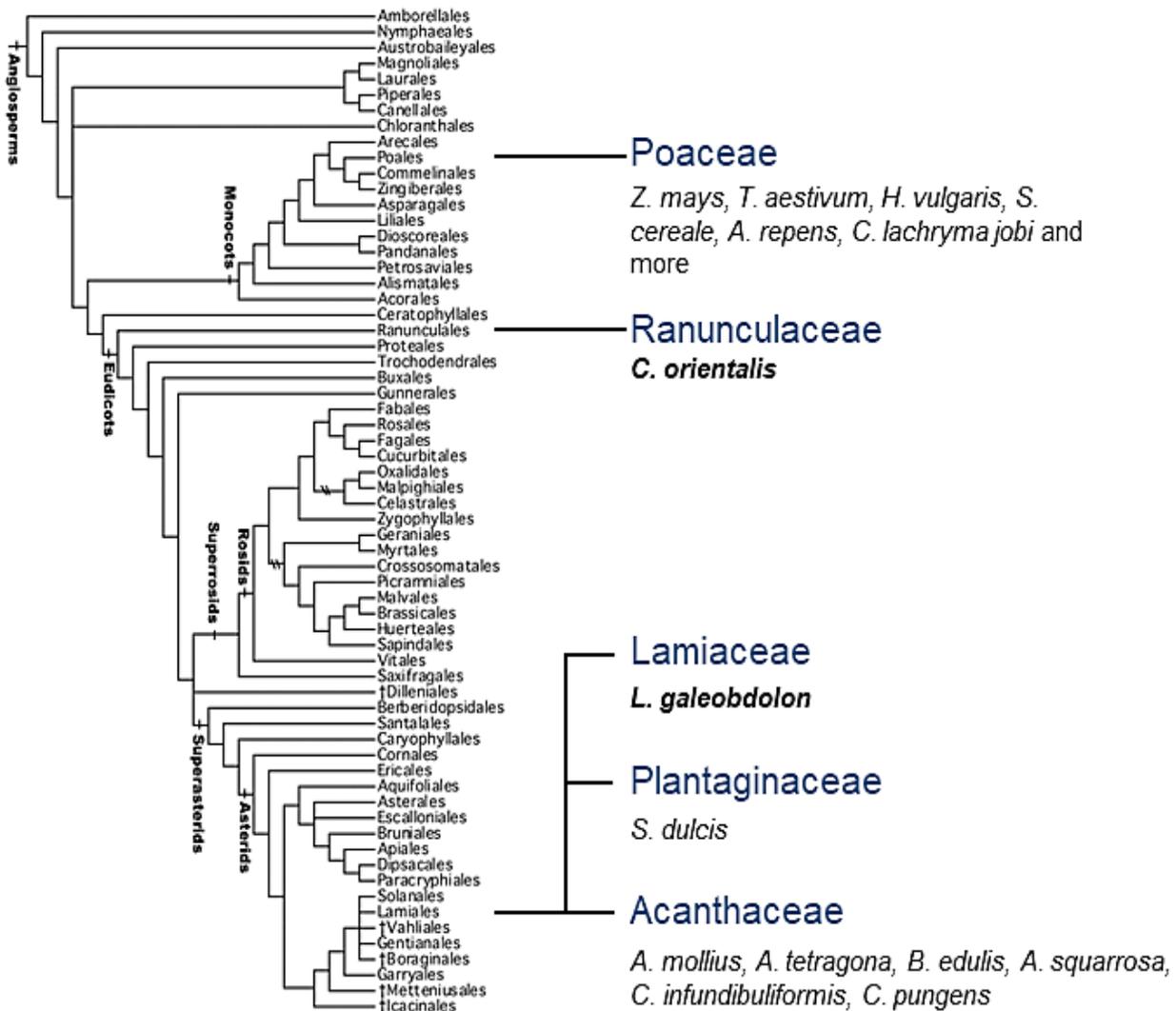


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Angiospermen nach dem APG IV System (Angiosperm Phylogeny Group, 2016), unterstützt durch Bootstrapwerte >50. Familien der benzoxazinoidproduzierenden Spezies in dunkelblau hervorgehoben, die in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind fett gedruckt.

BX sind in Mais schon lange Gegenstand der Analyse. In der jungen Pflanze wird überwiegend (G)DIMBOA gebildet, das bereits kurz nach der Keimung detektierbar ist und maximalen Konzentrationen 4 bis 11 Tage nach Keimansatz (Abbildung 2) (Schullehner *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2015). Die Endkonzentration und Dauer der Biosynthese kann sich von Maislinie zu Maislinie unterscheiden (Zheng *et al.*, 2015). In adulten Maispflanzen ist die Konzentration der BX variabel, sie ist jedoch allgemein geringer als im Keimling. Für eine effektive biologische Aktivität werden hohe Mengen an DIMBOA benötigt (Campos *et al.*, 1989; Long *et al.*, 1977; Long *et al.*, 1975). Die Synthese der BX lässt sich durch herbivoren Angriff induzieren (Dafoe *et al.*, 2011; Huffaker *et al.*, 2013). Die Konzentration und die Modifikation der BX wird beeinflusst durch mikrobielle und herbivore Angriffe auf die Pflanze

(zusammengefasst in Niculaes *et al.*, 2018). Während bei Mais BX auf vegetatives Gewebe beschränkt sind, werden in Weizen und Roggen BX auch in Samen nachgewiesen (Hanhineva *et al.*, 2011).

In Dikotyledonen findet sich hauptsächlich DIBOA, andere BX wie z.B. DIMBOA sind nur in Spuren detektierbar (Niemeyer, 2009; Schullehner *et al.*, 2008; Sicker *et al.*, 2000). Dabei sind die Höchstmengen nicht auf das Keimlingsstadium beschränkt. Im Gegenteil, in jungen Pflanzen von *C. orientalis* wurden die niedrigsten Konzentrationen gefunden, Blätter und Keimblätter wiesen Mengen an der Nachweisgrenze auf (Abbildung 2, Schullehner *et al.*, 2008). Interessanterweise enthalten die Blüten und späte Blätter der adulten Pflanzen die höchsten Konzentrationen an BX, während sie in der Wurzel nicht detektierbar sind (Abbildung 2, Schullehner *et al.*, 2008). Auch in adulten *L. galeobdolon* finden sich hohe Mengen an DIBOA, hier vor allem in jungen Blättern (Abbildung 2). Je älter die Blätter werden, desto geringer wird der BX Gehalt. Wurzeln und Knospen enthalten nur noch geringe Mengen des Sekundärmetaboliten (Abbildung 2). Ob die Unterschiede im BX Muster der Dikotyledonen und Monokotyledonen unterschiedliche Verteidigungsstrategien reflektieren ist unbekannt.

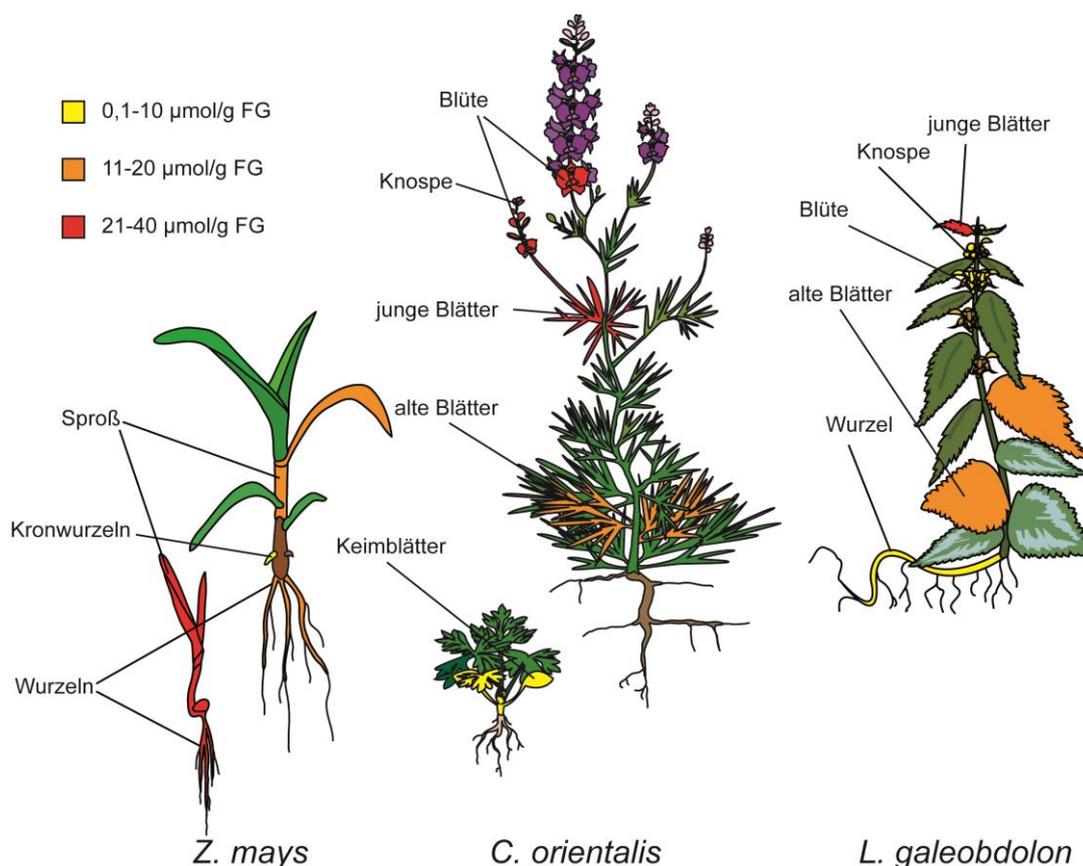


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Vorkommen und Konzentration der BX in den Organen von *Zea mays* L., *Consolida orientalis* Schrödinger und *Lamium galeobdolon* (L.) L.

### 1.2.3 Biosynthese der Benzoxazinoide

Die Biosynthese der BX ist für *Z. mays* aufgeklärt. Hier konnte der gesamte Syntheseweg zuerst ermittelt werden (Frey et al., 1997, Frey et al., 2003, Glawischnig et al., 1999, Von Radnet al., 2001, Jonczyk et al., 2008, Handrick et al 2016, Cicek und Esen, 1998; Esen 1992). Nachfolgend wurden die orthologen Gene (*Bx1-Bx5*, *Bx8*) von Weizen und teilweise von Roggen und *Hordeum lechleri* (Steud.) Schenck charakterisiert (Nomura et al., 2002, Nomura et al., 2005, Grün et al., 2005, Nomura et al., 2008, Sue et al., 2011, Bakera et al., 2015, Rakoczy-Trojanowska et al., 2017, Tanwir et al., 2017). Es zeigte sich, dass sich die Biosynthese der BX in Gräsern monophyletisch entwickelt hat (Abbildung 3). Die BX-Biosynthese zweigt vom Primärmetabolismus mit dem Signaturenzym BX1 ab. Dieser erste Schritt findet in den Plastiden statt, dabei entsteht durch die Spaltung von Indol-3-Glycerinphosphat freies Indol. Dieses wird anschließend durch vier aufeinanderfolgende Oxidationsreaktionen zu DIBOA modifiziert. Diese Umsetzungen werden durch die vier Cytochrom-abhängigen Monooxygenasen BX2-BX5 katalysiert, welche in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind (Frey et al., 1997; Spiteller et al., 2001). DIBOA ist das erste toxische Produkt des Synthesewegs und wird durch Glukosylierung von einer der beiden UDP-Glukosyltransferasen (UGT) BX8 und BX9 stabilisiert (von Rad et al., 2001) In Mais wird GDIBOA durch die 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase (ODD) BX6 weiter hydroxyliert, dabei entsteht GTRIBOA (2,4,7-Trihydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one). Methylierung durch die O-Methyltransferase (OMT) BX7 liefert das finale Produkt GDIMBOA (Jonczyk et al., 2008).

GDIMBOA kann in der Vakuole eingelagert werden. Zwei in den Plastiden lokalisierte  $\beta$ -Glukosidasen *ZmGLU1* und *ZmGLU2* überführen das Glukosid in das reaktive Aglukon, liegen aber bei Integrität der Zelle räumlich getrennt von ihrem Substrat vor. Erst bei Zellzerstörung nach z.B. Pathogenbefall kommen Enzym und Substrat in Kontakt und der Sekundärmetabolit wird in seine toxische Form überführt (Cicek und Esen, 1999; Cuevas et al., 1992; Esen, 1992).

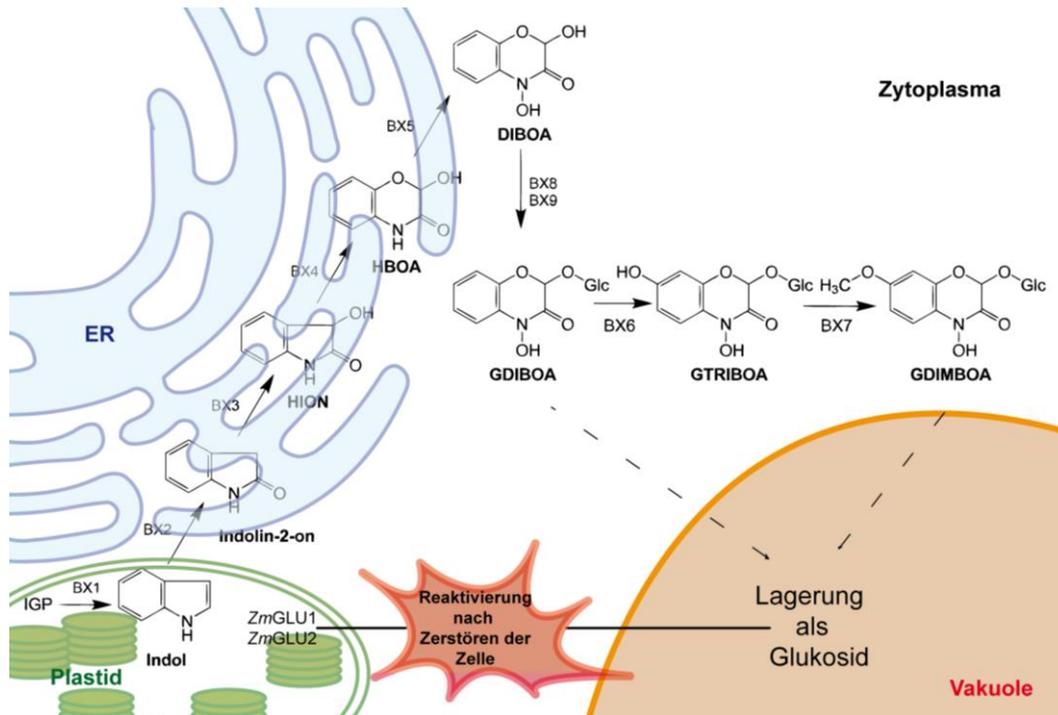


Abbildung 3: Biosyntheseweg der Benzoxazinoide in *Z. mays*. Dargestellt sind Enzyme und Intermediate mit ihrer Kompartimentierung. Der erste Schritt findet in den Plastiden statt, das Tryptophansynthase (TSA)-Homolog *ZmBX1* katalysiert die Produktion von Indol. Die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen *ZmBX2-ZmBX5* befinden sich im ER. Der aktive Metabolit wird durch die zytosolischen Glukosyltransferasen *ZmBX8* und *ZmBX9* stabilisiert und kann dann durch Hydroxylierung (2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase, *ZmBX6*) und Methylierung (O-Methyltransferase, *ZmBX7*) im Zytosol in DIMBOA-Glukosid umgewandelt werden. Beide Glukoside werden vermutlich in der Vakuole gelagert und können durch die  $\beta$ -Glukosidasen *ZmGLU1* und *ZmGLU2* reaktiviert werden. Beide Glukosidasen befinden sich im Plastid.

In den Dikotyledonen (*C.orientalis*, *L.galeobdolon*, *Aphelandra squarrosa* R.Br.) konnte die Biosynthese der Benzoxazinoide bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Jedoch wurde durch Fütterungsversuche gezeigt, dass auch hier Indol das erste Intermediat darstellt, generiert durch ein Tryptophansynthase (TSA) Homolog aus Indol-3-Glycerinphosphat (Schullehner *et al.*, 2008). Aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* konnte jeweils eine Indol-3-Glycerinphosphatlyase (IGL) mit entsprechenden Eigenschaften isoliert werden. *CoBX1* aus *C. orientalis* hat enzymatische Kenndaten die den *BX1* Enzymen aus den Poaceae ähnlich sind (Schullehner *et al.*, 2008). Dick *et al.*, 2012 gelang es für *C. orientalis* die UGT *CoBX8* und die spezifische Glukosidase *CoGLU* zu isolieren und charakterisieren. Für *L. galeobdolon* sind entsprechende Enzyme bisher unbekannt.

### 1.3 Die Enzyme der BX Biosynthese

Die Synthese der BX nach der Abzweigung vom Primärmetabolismus und ihre Funktion hängt in Mais von drei verschiedenen Enzymklassen ab: den Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (P450), den Uridipinphosphat-abhängigen Glycosyltransferasen (UGTs)

und den  $\beta$ -Glukosidasen (BGLU). Diese werden in dieser Arbeit vergleichsweise für die Dikotyledonen untersucht und sind im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.3.1 Oxygenasen als Modifikationsenzyme

Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen sind Hämproteine, die in allen Eukaryonten vorkommen. Sie oxidieren ihre Substrate unter Spaltung von molekularem Sauerstoff. In Pflanzen benötigen sie NADPH als Elektronendonator. Assoziierte Membran-gebundene NADPH-Cytochrom-P450- Oxidoreduktasen (CPR, POR) vermitteln den Elektronentransfer vom NADPH-Donor (Vetten *et al.*, 1999). P450-Enzyme sind häufig mit einer einzelnen N-terminalen Transmembranhelix im Endoplasmatischen Retikulum verankert, das Protein selbst ragt in das Zytosol (Schuler, 1996; Werck-Reichhart *et al.*, 2002; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

P450 generieren meist hydroxylierte Derivate der Substrate. Weitere von den P450 Enzyme ausgeführte Reaktionen sind z.B. aromatische Hydroxylierungen, Epoxidierungen, N-, O- und S-Dealkylierungen, Stickstoff- und Schwefeloxidierungen, Dehalogenierungen und Desaminierungen (Schuler, 1996; Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Mehr als 20 verschiedene Reaktionen wurden beschrieben (Guengerich, 2001; Sono *et al.*, 1996). Es zeigte sich, dass in Pflanzen häufig mehrere P450 einen Metaboliten an unterschiedlichen Positionen modifizieren (Haudenschild *et al.*, 2000; Karp *et al.*, 1990; Lupien *et al.*, 1999). P450 Enzym können mehrere Substrate akzeptieren (Robineau *et al.*, 1998) und einzelne P450 katalysieren eine Reihe von Oxidationen am selben Metaboliten (Halkier und Gershenzon, 2006; Helliwell *et al.*, 1999; Morrone *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2015).

P450 katalysieren Reaktionen mit vielen hundert verschiedenen Verbindungen. Außer in der Biosynthese wirken sie auch in der Detoxifikation schädlicher Stoffe (Chapple, 1997; Schuler, 1996; Werck-Reichhart *et al.*, 2000). P450 haben große Bedeutung in der Synthese von Ligninen, Pigmenten (Anthocyanine), Hormonen (Gibberelline, Brassinosteroide, Auxin) und von Verteidigungsstoffen (Isoflavonoide, Benzoxazinoiden, Glukosinolate, cyanogenen Glukoside, Terpene, Benzoxazinoide; Benveniste *et al.*, 1998; Cabello-Hurtado *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 2002; Frey *et al.*, 1995; Humphreys *et al.*, 1999; Le Bouquin *et al.*, 2001; Meyer, 1996; Schoch *et al.*, 2001; Werck-Reichhart, 1995). Auch für die Detoxifizierung exogener Stoffe wie den Herbiziden, Insektiziden und anderen Schadstoffen, die die Pflanze aus der Umgebung aufnehmen kann, werden P450 Enzyme eingesetzt (Chaudhry *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2002; Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Der Umsatz der schädlichen Verbindung erfolgt schnell, Herbizide werden in eine hydroxylierte oder dealkylierte inaktive Form gebracht, die anschließend weiter modifiziert und in die Vakuole oder in die Pflanzenzellwand eingelagert werden kann (Barrett, 1995; Frear, 1995).

In Pflanzen bilden die P450-Gene eine Supergenfamilie. In *Arabidopsis* finden sich 244 P450-Gene und 28 Pseudogene, in Reis 356 P450-Gene und 99 verwandte Pseudogene (Bak *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2004). Eine Auswertung der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen der P450 Enzyme, zeigt dass diese kaum in ihrer Primärstruktur konserviert sind, aber häufig in Sekundär- und Tertiärstruktur. Das eindeutigste P450 Signaturmotiv ist hierbei eine kurze Sequenz FXXGXXXCXG, die charakteristischerweise den Cysteinliganden für Fe-Protoporphyrin IX stellt und sich nahe dem C-Terminus befindet (Nelson *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1993). P450 werden in Familien gruppiert. Enzyme mit mehr als 40% Sequenzübereinstimmung werden zu einer Familie zusammengeschlossen und mit Nummern bezeichnet (CYP1, CYP2, usw.). Familienmitglieder mit 55% oder höherer Sequenzübereinstimmung bilden Subfamilien, die mit Buchstabe und Zahl bezeichnet werden (CYP1A1, CYP1A2, CYP1A3, usw.; Nelson *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1993). Dieses Nomenklatorsystem wird universell auf alle Organismen angewandt. Für P450 von Pflanzen wurden die Nummern ab 70 und ab 700 vergeben. In *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. sind 47 P450 Familien präsent, nur die beiden CYP51-Gene der Sterol-Biosynthese sind nicht pflanzenspezifische P450 Vertreter. Die BX-Gene *Bx2-Bx5* begründen die Subfamilie CYP71C.

### 1.3.2 Detoxifizierende Glukosyltransferasen

Die Glykosyltransferasen weisen große strukturelle und funktionelle Heterogenität auf, ihre Klassifizierung ist sequenzbasiert. Hunderte von Glykosyltransferasen können mehr als 90 Familien zugeordnet werden (CAZY Datenbank, Carbohydrate-Active enZymes Database; <http://www.cazy.org/>; Campbell *et al.*, 1997; Coutinho *et al.*, 2003). Die Uridipinphosphat-abhängigen Glykosyltransferasen finden sich in geringer Zahl in Familie GT4, hauptsächlich aber in Familie GT1 (Lim und Bowles, 2004; Mackenzie *et al.*, 1997). UGTs der Klasse GT1 sind in vielen Lebewesen zu finden und bilden in Pflanzen eine Supergenfamilie. Der Begriff „UGT“ wird bei Pflanzen meist als Synonym für GT der Klasse 1 verwendet, so auch im Folgenden in dieser Arbeit. Für *A. thaliana* sind 122 UGTs beschrieben (Paquette *et al.*, 2003) und 193 für *Oryza sativa* L. (Ko *et al.*, 2006). Pflanzliche UGTs haben Molekulargewichte von rund 45 bis 60 kDa und sind in monomerer Form aktiv (Vogt und Jones, 2000). Sie besitzen weder Signalpeptide noch eine Bindestelle für die Verankerung in einer Membran (Li *et al.*, 2001) und kommen vorwiegend im Zytosol vor. Pflanzen-UGTs teilen sich das stark konservierte PSPG-Motiv (Plant Secondary Product Glycosyltransferase), ein 44 Aminosäuren-langes Motiv am C-Terminus, welches für die Bindung des hoch energetischen Glukosedonor UDPG zuständig ist (Gachon *et al.*, 2005; Hughes und Hughes, 1994; Paquette *et al.*, 2003). Außerhalb des PSPG-Motivs sind die UGTs sehr heterogen und die Sequenzhomologie gering (10%). Innerhalb des 44 AS langen

Bereichs besteht dagegen eine Sequenzübereinstimmung von 60-80% und hier befinden sich die hochkonservierten Motive HCGQNS und WAPQV (Vogt und Jones, 2000).

Die grundlegende Funktion der UGTs ist die Übertragung eines Zuckermoleküls auf das entsprechende Aglukonsubstrat. Durch die Ausbildung einer glykosidischen Bindung wird dieses zum Glykosid. Meist dient Uridindiphosphat-Glukose als Glukosid-Donor und die katalysierte Reaktion ist eine Glukosylierung (Vogt und Jones, 2000). Seltener werden UDP-Galaktose (Miller *et al.*, 1999), UDP-Rhamnose (Jones *et al.*, 2003), UDP-Xylose (Martin *et al.*, 1999) oder UDP-Glucuronsäure (Sawada *et al.*, 2005) von den Glykosyltransferasen als Donorsubstrate akzeptiert.

Die Aglukonsubstrate der UGTs umfassen verschiedene Metabolitklassen. Viele der Substrate kommen aus der Familie der Flavonoide. Durch Glykosylierung und Modifikation der Flavangrundstruktur werden verschiedenen Derivate erzeugt. So werden z.B. für Quercetin um die 180 verschiedenen Glykoside beschrieben (Watzl und Rechenkammer, 2001). Eine der häufigsten Modifikationen ist die Glykosylierung der 3-OH-Position der Grundstruktur von Flavonolen. Diese und die Substitution an den aromatischen Ringen der Verbindungen, führt zur Stabilisierung des Moleküls, ein Grund warum Flavonoide *in planta* meist als Glykoside vorliegen (Gachon *et al.*, 2005). Auch die Glykosylierung von Phytohormonen wird von UGTs katalysiert. Durch die Bildung der Ester- und Etherkonjugate wird der Transport, die Lagerung und der Abbau beeinflusst und dadurch die Bioaktivität der Pflanzenhormone reguliert. Die Phytohormonglykosylierung hat damit Einfluss auf die Hormonhomöostase in Geweben und Zellen. Prozesse wie Pflanzenwachstum und Entwicklung werden auf diese Art gesteuert (Bowles *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2001; Jakubowska und Kowalczyk, 2004; Piotrowska und Bajguz, 2011).

Die für diese Arbeit wichtigste Aufgabe der UGTs ist die Modifikation von Abwehrmetaboliten. Wie bereits beschrieben, werden diese oft toxischen Verbindungen oft konstitutiv gebildet um schnell für die Pflanzenzelle abrufbar zu sein. Durch die Glykosylierung mit Hilfe der UGTs werden die reaktiven Metabolite detoxifiziert und stabilisiert (Jones und Vogt, 2001). Die Konjugation mit einem Zuckermolekül erhöht desweiteren die Stabilität und die Wasserlöslichkeit, so dass die Verbindung einfacher in z.B. der Vakuole abgelagert werden kann (z.B. Grubb *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1999; von Rad *et al.*, 2001). Meist findet diese Reaktion im Zytosol statt, der Transport in das einlagernde Gewebe oder Kompartiment wird dann durch Protonen-Antiport Transporter (Flavonoid-Glycoside, Klein *et al.*, 1996) oder ABC Transporter (ATP-binding cassette (Herbizide, Frangne *et al.*, 2002) geleistet. Glukosylierung und Kompartimentierung ermöglichen der Pflanze die Synthese hochreaktiver Metabolite. Die UGTs der BX-BGLUs BX8 und BX9 aus

Mais gehören zur Familie UGT710E, das entsprechende Enzym aus *C. orientalis* zur Familie UGT85N1.

### 1.3.3 B-Glukosidasen in der Bioaktivierung

B-Glukosidasen werden entsprechend ihrer Aminosäuresequenz in die Glykosidhydrolase Familien GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH30 und GH116 eingeteilt, die Familien GH1, GH3, GH5 und GH116 kommen in Pflanzen vor (<http://www.cazy.org>; Lombard *et al.*, 2014). BGLU der Glykosidhydrolase Familie 1 findet man in Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen. Nachdem genomische Sequenzen vieler Pflanzenspezies zugänglich und die Gene annotiert waren, zeigte sich, dass jeweils zahlreiche putative  $\beta$ -Glukosidase-Isoenzyme vorhanden waren. GH1 ist die umfangreichste Familie zu der die meisten Pflanzen  $\beta$ -Glukosidasen gehören und die Bezeichnung  $\beta$ -Glukosidase wird im Allgemeinen mit Glukosidase der Familie GH1 gleichgesetzt. In Pflanzen bilden *BGlus* eine kleine Genfamilie, die rund 40 Mitglieder jeweils in *A. thaliana* und *O. sativa* umfasst. Mais hat 24  $\beta$ -Glukosidasegene (Gómez-Anduro *et al.*, 2011). Ihre Funktion besteht aus Abspaltung des terminalen  $\beta$ -D-Glukosylrest von Glukokonjugaten wie Glukosiden, 1-O-Glukosylestern und Oligosacchariden.

B-Glukosidasen können als Homo- und Heteromultimere vorliegen (Czjzek *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Sue *et al.*, 2006). Die basale Sekundär- und Tertiärstruktur der BGLU ist konserviert und für einige Enzyme wurde Röntgenstrukturanalyse erfolgreich durchgeführt, dazu gehören *ZmGLU1* aus *Z. mays* und *TaGLU1a* aus Weizen (Czjzek *et al.*, 2001; Czjzek *et al.*, 2000; Sue *et al.*, 2006). Das Grundgerüst des Enzyms besteht aus einer sogenannten Fasstruktur (TIM-barrel), bei der 8  $\alpha$ -Helices und 8  $\beta$ -Faltblätter eine fassartige Ringform bilden, in deren Mitte sich das aktive Zentrum befindet (Czjzek *et al.*, 2001; Czjzek *et al.*, 2000; Sue *et al.*, 2006). In dieser katalytischen Tasche sind gegenüberliegend zwei konservierte Glutamatreste positioniert, welche in zwei stark konservierten Motive eingebettet sind. Das Glutamat im I/VTENG Motiv dient als Nukleophil, jenes in NEP zur allgemeinen Säure-Base-Katalyse (Wang *et al.*, 1995; Withers *et al.*, 1990). Die Hydrolyse der glykosidischen Bindung findet zwischen dem anomeren C-Atom (C1 der Glukose) und dem glukosidischen Sauerstoff des Substratmoleküls statt (Davies und Henrissat, 1995). Die katalytischen Glutamatreste sind je auf gegenüberliegenden Seiten der  $\beta$ -glukosidischen Bindung des angedockten Substrats in einer Entfernung von ungefähr 5,5 Å plaziert (Davies und Henrissat, 1995). Erster Schritt in der Katalyse ist der nukleophile Angriff am anomeren C-Atom, was zur Bildung des Glukose-Enzym Intermediats führt. Die Abspaltung des Aglukons durch Protonierung des glukosidischen Sauerstoffs wird durch den Säurekatalysten unterstützt. Während des zweiten katalytischen Schritts, wird ein Wassermolekül durch die katalytische Base aktiviert und dient als Nukleophil für die

Hydrolyse der glykosidischen Bindung, es folgt die Freisetzung der Glukose ([http://www.cazy.org/fam/ghf\\_INV\\_RET.html](http://www.cazy.org/fam/ghf_INV_RET.html); Davies und Henrissat, 1995).

B-Glukosidasen spielen eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen Prozessen der Pflanzenphysiologie, z.B. Mobilisation von Vorratsmetaboliten während der Keimung (Leah *et al.*, 1995), Rekonstruktion der Zellwand (Dharmawardhana *et al.*, 1995) und Phytohormonhomöostase (Falk und Rask, 1995). BGLU übernehmen also essentielle Funktionen im Primärmetabolismus, dabei können sie zusätzlich zur Hydrolyseaktivität auch als Transglukosidasen fungieren (Opassiri *et al.*, 2004). Transglykosylierung könnte insbesondere bei Aufbau und Modifikation der Zellwand von großer Bedeutung sein (Franková und Fry, 2013). Acyl-Glukose-abhängigen Transglukosidasen, die in der Anthocyaninsynthese fungieren, sind nahe verwandt mit  $\beta$ -Glukosidasen (Matsuba *et al.*, 2010; Nishizaki *et al.*, 2013).

Die Anzahl an glukosylierten Metaboliten, potentiellen BGLU Substraten, ist in Pflanzen höher als die Anzahl an  $\beta$ -Glukosidasen. Dieses Ungleichgewicht wird dadurch verringert, dass BGLUs mehrere Substrate akzeptieren können (Ketudat Cairns und Esen, 2010). Viele Substrate sind dem Sekundärmetabolismus zuzurechnen und bilden ein diverses, über das Pflanzenreich verteiltes Spektrum. Bei Analysen zeigen sich tendenziell überlappende Substratmuster, was die Bestimmung der *in planta* Funktion erschwert (Ketudat Cairns *et al.*, 2015). Die evolutionäre Grundlage für die jeweils funktionellen BGLUs stellt das gemeinsame Set von BGLUs des Primärmetabolismus dar, Genduplikation und Neo-Funktionalisierung können zu veränderten enzymatischen Eigenschaften führen. Entsteht eine vorteilhafte Funktion, z. B. die der Aktivierung eines Abwehrmetaboliten, kann es zur Fixierung des evolvierten Gens kommen.

### 1.4 Ziel der Arbeit

Die Benzoxazinoid-Biosynthese stellt ein Modell des Zwei-Komponenten-Systems der chemischen Abwehr der Pflanzen dar. Benzoxazinoide werden in Gräsern und einzelnen Spezies phylogenetisch unverwandter Dikotyledonen gefunden. Im Gegensatz zu den Gräsern ist der Biosyntheseweg in den Dikotyledonen nur unvollständig etabliert. In dieser Arbeit sollten bisher unbekannte P450-Kandidatengene für die Aktivierung des definierten Intermediats Indol aus *C. orientalis* charakterisiert werden. Für *L. galeobdolon* sollten die Benzoxazinoid-spezifische UGT und die komplementäre BGLU isoliert werden. Grundlage für die Analysen bildeten Transkriptom-Daten und im Fall der UGT zusätzlich Peptidsequenzen. Die erzielten Ergebnisse sollten Einblick in die Evolution des Biosynthesewegs geben. Die disperse Verteilung der Benzoxazinoide im Pflanzenreich kann durch konvergente Evolution (auch wiederholte Evolution genannt) erklärt werden, oder durch monophyletischen Ursprung bei wiederholtem Verlust, während der Bildung von

Pflanzen Ordnungen und Spezies. Phylogenetische Untersuchung aller identifizierten Gene des Biosynthesewegs kann diese Frage klären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

*C. orientalis* Saatgut wurde von PD Dr. Margot Schultz freundlicherweise zur Verfügung gestellt und am Lehrstuhl für Genetik nachgezogen. Die Samen wurden auf einem 2:1-Gemisch aus Erde (Einheitserde, CL T) und Quarzsand ausgestreut und mit Erde bedeckt. Zur Keimung wurden die Samen zunächst für 3-4 Tage einer Vernalisation bei 4 °C ausgesetzt, woraufhin die Samen für 3-4 Tage in der Pflanzenkammern (16 h bei Licht (22°C) und 8 h bei Dunkelheit (18°C)) kultiviert wurden. Nach einer erneuten Vernalisation verblieben die Samen in der Pflanzenkammer.

*L. galeobdolon* wurde vom Staudengarten Weihenstephan, Freising zur Verfügung gestellt. Zur Vermehrung wurden abgeschnittene Triebe ca. eine Woche zur Wurzelbildung in Wasser gehalten und anschließend auf ein 2:1-Gemisch aus Erde (Einheitserde, CL T) und Quarzsand verpflanzt und bei natürlichen Lichtbedingungen in den Räumen des Instituts gehalten.

Es wurde *A. thaliana* des Ökotyps Columbia verwendet. Samen wurden entweder auf Erde oder zur Selektion BASTA-resistenter Pflanzen auf ½ MS-Platten (2,2 g/l MS-Medium, 20 g/l Saccharose, 9 g/l Agar, pH 5,8) mit dem Herbizid Phosphinotricin (D+L, 25 µg/µl, Duchefa, NL) ausgestreut. Die Samen wurden für zwei Tage einer Vernalisation bei 4°C im Dunkeln ausgesetzt und in der Pflanzenkammer (16 h bei Licht (22°C) und 8 h bei Dunkelheit (18°C)) bis zum Alter von 10-14 Tagen angezogen. Die Pflanzen wurden vereinzelt bzw. auf Erde umgesetzt und bis zur Reife der Samen in der Pflanzenkammer belassen.

Samen von *Nicotiana benthamiana* Domin wurden vom Lehrstuhl für Genetik der Ludwig-Maximilian-Universität in München zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden auf einem 3:2-Gemisch aus Erde (Einheitserde, CL T) und Quarzsand ausgestreut und in der Pflanzenkammern 16 h bei Licht (22°C) und 8 h bei Dunkelheit (18°C) angezogen. 7-14 Tage alte Keimlinge wurden vereinzelt, in ein 3:2-Gemisch aus Erde (Einheitserde CL T) und Quarzsand umgetopft und in den Pflanzenkammern angezogen. Für die Infiltration wurden 5-6 Wochen alte Pflanzen verwendet.

Die *Z. mays* Linien B73, Mo17, Cairo und Commando wurden bis zum Keimlingstadium angezogen. Dazu wurden die Körner mit 1,2 % NaOCl (w/v) für ca. 5 min behandelt, gewaschen und auf Keimungspapier ausgelegt. Dieses wurde gerollt und anschließend bei hoher Luftfeuchtigkeit (80%) im Dunkeln bei 28°C inkubiert. Die Keimlinge wurden nach 4-5 Tagen geerntet.

## 2.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 1: Eingesetzte Bakterienstämme von *E.coli* und *A. tumefaciens*

Bakterienstamm	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
<b><i>E.coli</i></b>		
XL1-Blue		(Bullock, 1987)
BL21 (DE3)		(Studier und Moffatt, 1986)
Origami™ (DE3)	Kanamycin	Novagen
<b><i>A. tumefaciens</i></b>		
GV3101	Rifampicin	(van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
GV3101 pMP90	Rifampicin, Gentamycin	(Koncz und Schell, 1986)
GV3101 pMP90:RK	Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin	(Koncz und Schell, 1986)

## 2.1.3 Hefestämme

Tabelle 2: Hefestämme

Hefestamm	Selektionsmarker	Hersteller/Literaturnachweis
WAT11	ADE, HIS, LEU, URA, TRP	(Pompon <i>et al.</i> , 1996)
BY4741	HIS, LEU, MET, URA	(Baker Brachmann <i>et al.</i> , 1998)

## 2.1.4 Plasmide

Tabelle 3: Eingesetzte Plasmide

Plasmid	Resistenzmarker/Selektionsmarker	Hersteller/Literaturnachweis
pBluescript KS+	Ampicillin	Stratagene
pGEM-T Easy	Ampicillin	Promega
pET28a-His	Kanamycin	Novagen
pGEX-4T1	Ampicillin	Amersham
pICH31070	Kanamycin	Icon Genetics
pICH7410	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH20111	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH20115	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH14011	Carbenicillin	Icon Genetics
pGPTV-35SBarB	Kanamycin, BASTA	(Becker <i>et al.</i> , 1992; Dick <i>et al.</i> , 2012)
pYeDP60	Ampicillin, ADE	(Urban <i>et al.</i> , 1990)
pGREG503	Kanamycin, HIS	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)

pGREG504	Kanamycin, TRP	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)
pGREG505	Kanamycin, LEU	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)
pGREG506	Kanamycin, URA	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)

## 2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 4: (Adaptor)Primer für die Klonierung

Name	Sequenz	Gen
LgGLU1F	ggtctcgaggtATGCCATTGCCAACTCAAACCT	LgGLU1
LgGLU1rev	ggtctcgaagcTTACATTGCATACAACATTTTTGAAGA	LgGLU1
LgBGLU1_NdeF	GGTGTGAATCAGGACGGGAT	LgGLU1
LgBGLU1_NdeRev	ACTCAAAGTCCAGGGCTCGT	LgGLU1
LgGLU2F	ggtctcgaggtATGGGGATTCTTGTGTTTTTTG	LgGLU2
LgGLU2rev	ggtctcgaagcTTAGTGAACCTTAGCGAGGCA	LgGLU2
LgGLU3F	ggtctcgaggtATGTATTGTTGTACCACTTCACTC	LgGLU3
LgGLU3rev	ggtctcgaagcTTAATGCTTCTTCTGTCTCTGTT	LgGLU3
LgGLU4F	ggtctcgaggtATGTTGGAGAGGAAAGGTTTAAT	LgGLU4
LgGLU4rev	ggtctcgaagcTTAAGAAGCTAAGAAGTTTTTAAACCA	LgGLU4
Lg4GLU_SALF	GATTTACAACGTATGCTGAAA	LgGLU4
Lg4GLU_SALRev	ATCCGTGTTGTTTTGTTTTGTATA	LgGLU4
LgK11_Fw	ATGGAGGCCAAAAATGGC	LgUGT11
LgK11_Rev	TGAGAGGATCCTCATTTTCTAAGA	LgUGT11
LgGTK11fwd1	CCGTTGTCTCTCAGCAACA	LgUGT11
LgGTK11rev6	GGTCTCACAAACCCACAGAA	LgUGT11
UGT27_Start_fw	ATGGGTTCTATTTCTACTCAACA	LgUGT27
UGT27_Stopp_Rev	TTATAGCAAAGCTCCTTGATCA	LgUGT27
LgUGT28FW	ATGGAAGAAGAAGAAGAGGGGA	LgUGT28
LgUGT28Rev	GACAAACAACATGCAAATAAACCT	LgUGT28
LgUGT28XbaFW	AGTTGGTGCTGCCGGAA	LgUGT28
LgUGT28XbaRev	CAGTTGTTGCTGAGAGACAACG	LgUGT28
4127Fw2	gatatctaataATGGAACAAACCAATCTCCTCT	CoCYP 4127
4127Rev3	gtcgactctagCCAGCTGGACCACTTCTCATA	CoCYP 4127
3302START	gatatctaataATGGAAGAAACCAATCTCTT	CoCYP 3302
3302STOP	gtcgactctagACTACGCATTTATTTTCCTCAGT	CoCYP 3302
3362Start	gatatctaataATGGAAGAAACCAAACCTCT	CoCYP 3362
3362Stopp	gtcgaccctagGTTAATCATTTAGTTTCCTCA	CoCYP 3362
8863Y_P_FW	gatatcgaattctaataATGGAAGAGTCCAATCTCT	CoCYP 8863

8863Y_P_rev	gtcgactctagATTAACCATTTATGTTCCCTCAGCT	CoCYP 8863
905_P_FW	cccgggtaataATGAACACCATCTCCACCA	CoCYP 905
905_P_REV	gtcgactctagATTAAGCTTCAACCAATCTGT	CoCYP 905
5112Y_P_FW	gatatcgaattctaataATGGCTGTGTTACCTCA	CoCYP 5112
5112Y_P_Rev	gtcgactctagATTATGCTCTTGGCTTAGCCAC	CoCYP 5112
2640Y_P_FW	cccggggaattctaataATGGATGCATCAGCAGTG	CoCYP 2640
2640Y_P_REV	gtcgactctagACTAACCTTCAACGCCATCC	CoCYP 2640
CoCyp1885_f	ggatccataataATGAAGGTAATGGAGGTGAT	CoCYP 1885
CoCyp1885_Stopp	tctcgAGCACCATAGAATCTGATCTTCCA	CoCYP 1885
POR14_Start_Bam	GaGGATCCtttgatATGAACTCCGAGAG	CoPOR14
POR14_End_Xhol	ctctcGAGGAAATTACCATACATCACGCA	CoPOR14
POR14_BglII_F	TGAGAACGGCATTGACCCTAT	CoPOR14
POR14_BglII_rev	CTAAAGCCATGAGAGCAGCC	CoPOR14

Tabelle 5: Primer für die 5'- und 3'-RACE und AIMS

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Gen (Methode)</b>
LgGLU1_SP3	CCAATGTGGGATTTGCAGCAC	<i>LgGLU1</i> (5'RACE)
LgGLU1_SP2	CAGCAGGAAAGATTCGACGG	<i>LgGLU1</i> (5'RACE)
LgGLU1_SP1	TGAAAAGCCGATGATGCTGC	<i>LgGLU1</i> (5'RACE)
LgGLU1_SP0	GCTTCAATCTTTCCGCCTGGC	<i>LgGLU1</i> (5'RACE)
LgGLU1_SP5	GAGTGGTCTGCTGGATTTTCGG	<i>LgGLU1</i> (3'RACE)
LgGLU1_SP4	CAGCAAACGAGACGTTGGAAG	<i>LgGLU1</i> (3'RACE)
LgGLU2_SP3	AGCTGTGGTTGCAAATGCTG	<i>LgGLU2</i> (5'RACE)
LgGLU2_SP2	GCCACTTCGATTGAATTCAGC	<i>LgGLU2</i> (5'RACE)
LgGLU2_SP1	CTCCAAAAGAAAGCCAGGTGG	<i>LgGLU2</i> (5'RACE)
LgGLU2_SP1b	CAGCCTGAATGCATCCAATCC	<i>LgGLU2</i> (5'RACE)
LgGLU2_SP0	TCTAGTGCTTGTGGAAGGTCCC	<i>LgGLU2</i> (5'RACE)
LgGLU2_SP5	CCCAAAGGTCAGCTCTTTGG	<i>LgGLU2</i> (3'RACE)
LgGLU2_SP5b	GGTGTGAAGGTGAAAGGTTACATCG	<i>LgGLU2</i> (3'RACE)
LgGLU2_SP4	TGGTATTGGTGATACCGCTGAAG	<i>LgGLU2</i> (3'RACE)
LgGLU3_SP3	CTTCAAAGTTGGAAGGTGTGTCTG	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)
LgGLU3_SP2b	GAGAGCGAAAGTGTAACACAAAAG	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)
LgGLU3_SP2	CTCCTCGTGAATTATAGCGAAGC	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)
LgGLU3_SP1	TCTTTAGGAAAGCTGCCTCTGCT	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)
LgGLU3_SP0b	ATTTATGATATTGGTCCACCGACAC	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)
LgGLU3_SP0	TTGCCATAACATCAATGTCCTCC	<i>LgGLU3</i> (5'RACE)

LgGLU3_SP5	GCGCAAACGTGAAAGGCTAC	<i>LgGLU3</i> (3'RACE)
LgGLU3_SP4	CCAGGAAACCTCACACTCCCA	<i>LgGLU3</i> (3'RACE)
LgGLU2_1B	CCTCCTTATATCGATGATAAAAGTCGTT	<i>LgGLU2</i> (AIMS)
LgGLU2_2B	CGTCTCCGCTGCTCTTATCAGCT	<i>LgGLU2</i> (AIMS)
LgGLU2_1M	ATCTTGATTGATTTCTGATATCAAA	<i>LgGLU2</i> (AIMS)
LgGLU2_2M	AACTTCCTCACTACCTCCTCTCT	<i>LgGLU2</i> (AIMS)

Tabelle 6: Primer für die qRT-PCR

Name	Sequenz	Gen
LgGAPspecFwd	GGGTTGCTCTTCAGAGACGATGT	<i>LgGAPDH</i>
LgGAPspecRev	CCACCTCTCCAGTCCTTGGCAGAT	<i>LgGAPDH</i>
LgGLU1_fw_5	TTTAAAGAAAGATACAATGATCCACT	<i>LgGLU1</i>
LgGLU1_rev_end	ATTGCATACAACATTTTTGAAGA	<i>LgGLU1</i>
LgGLU2_fw_6	TATTGGAAATCCAACAGGAAT	<i>LgGLU2</i>
LgGLU2_rev_end	AACCAAAGAGCTGACCTTTT	<i>LgGLU2</i>
LgGLU3_fw_6	CCCATGGAACAATGTAGAGCCA	<i>LgGLU3</i>
LgGLU3_rev_1	CCCATGGAACAATGTAGAGCCA	<i>LgGLU3</i>
Lg4GLU_F4	CTGTATGGTTGTATATTGTGCCT	<i>LgGLU4</i>
LgGLU4_rev_end	AGAAGCTAAGAAGTTTTTAAACCATT	<i>LgGLU4</i>

### 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad® (USA), Boehringer (Mannheim), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und SIGMA-Aldrich (Deutschland) bezogen.

DNA-Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme wurden bei den Firmen Roche (Schweiz), New England Biolabs (USA), Promega (USA) und Qiagen (Hilden) bezogen. Oligonukleotide wurden von Microsynth (Schweiz) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert.

Die Substrate DIBOA und DIMBOA wurden von Prof. Dr. Sicker, Universität Leipzig freundlicherweise zu Verfügung gestellt. DIBOA wurde außerdem aus *L. galeobdolon* isoliert, DIMBOA aus *Z. mays*-Keimlingen. GDIBOA und GDIMBOA wurden aus *L. galeobdolon* bzw. *Z. mays*-Keimlingen isoliert (siehe 2.5.2 und 2.5.3). Harpagid, Daidzin, Daidzein, Phloretin, Phloridzin, und Arbutin wurden von Extrasynthese (Frankreich) bezogen, *trans*-Zeatin-O-

Glukosid (*t*ZOG) und *trans*-Zeatin von OChemIm Ltd. Olomouc (Tschechische Republik) und Oleuropein, Geniposid, Genipin, Genistin, Genistein, *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid, *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranosid, *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid, *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside von SIGMA-Aldrich (Deutschland) erworben.

Der Proteinstandard SERVA Triple Color Protein Standard III wurde von Serva (Heidelberg) bezogen. Als DNA- bzw. RNA- Längenstandard wurden der 1 kb Plus DNA Marker bzw. der 0,5-10 kb RNA Marker von Invitrogen eingesetzt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Isolierung

Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani & Chalmers 1919 wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) präpariert. Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942 wurde ebenfalls mittels alkalischer Lyse (Plant Transformation Workshop, 2003) isoliert. Die Isolierung genomischer DNA aus *L. galeobdolon* wurde nach (Dellaporta *et al.*, 1983) durchgeführt.

### 2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin®RNA Plant-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aus ca. 100 mg Pflanzenmaterial isoliert. Alle Lösungen wurden mit DNase-freiem Wasser angesetzt.

Zur Analyse der RNA-Qualität wurde die RNA-Lösung (ca. 500 ng) mit 4 Vol. RNA-Probenpuffer (60% deionisiertes Formamid, 8% Formaldehyd, 0,03% Bromphenolblau in 1,2x Northern-Puffer) versetzt und 15 min bei 68 °C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und die Probe auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen (1,2% Agarose in 7% Formaldehyd und 1x Northern-Puffer). Die Elektrophorese erfolgte in 1x Northern Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natrium-Acetat, 2 mM EDTA, pH7) bei ca. 65 V. Das Formaldehyd-Gel wurde für 10 min mit 0,1% Toluidinblau gefärbt und mit 10% Ethanol entfärbt. Die RNA wurde als intakt bewertet, wenn die 18S- und die 28S-ribosomale RNA Bande klar sichtbar waren und die 28S-RNA-Bande eine höhere Intensität aufwies.

cDNA wurde aus ca. 500 ng Gesamt-RNA mit dem TaqMan cDNA Kit von Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

### 2.2.3 Allgemeine DNA-Klonierungstechniken

Allgemeine Klonierungstechniken, wie Agarosegelelektrophorese, die Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Polymerase, alkalischer Phosphatase und T4-DNA Ligase, sowie die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen und die

Hitzeschocktransformation von *E. coli* wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

## 2.2.4 PCR-Verfahren

### 2.2.4.1 Standard-PCR

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde die OneTaq-Polymerase verwendet, für die Amplifikation von Genfragmenten für die Proteinexpression wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, USA) genutzt. Restriktionsschnittstellen wurden durch Adaptorprimer eingeführt (Tabelle 4). Es wurde der T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) verwendet.

### 2.2.4.2 Quantitative PCR

Die quantitative Bestimmung von Transkriptmengen wurde am StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Zur Normierung wurde parallel die Transkriptmenge des house-keeping-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Es wurde der KAPA SYBR FAST-Kit von ABI PRISM eingesetzt. Die Spezifität der PCR wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Die PCR-Bedingungen für die durchgeführten quantitativen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 7 aufgezeigt, die Primer in Tabelle 6.

Tabelle 7: Bedingungen der quantitativen RT-PCR.

Gen	Annealingtemperatur [°C]	Extensionszeit [s]	Messung bei [°C]
<i>LgGAPDH</i>	58	23	80
<i>LgGlu1</i>	57	23	75
<i>LgGlu2</i>	57	23	75
<i>LgGlu3</i>	64	23	78
<i>LgGlu4</i>	58	23	76

### 2.2.4.3 Verfahren zur Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden

#### 5'- und 3'-RACE

5'- und 3'-cDNA-Enden wurden durch das 5'-RACE-Verfahren mit dem 5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation, (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers isoliert. Primer sind in Tabelle 5 angegeben.

#### AIMS

Zur Verlängerung von fehlenden 5'- und 3'-cDNA-Enden wurde darüber hinaus eine modifizierte Form der AIMS-Methode (Amplification of Insertion Mutagenised Sites; Frey *et al.*, 1998) durchgeführt. 1 µg genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Bfal

geschnitten. Nach Adaptorligation (5'-gaccacgctatcgtatcgtcgcgagatgagtcctgag-3'; 5'-tactcaggatccactcat 3') wurden eine PCR- und Nested-PCR-Reaktion mit Adaptor- (5'-gaccacgctatcgtatcgtcgcgac-3'; 5'-gaccacgctatcgtatcgtcgcgag-3') und genspezifischen Primern durchgeführt (Tabelle 5).

### 2.2.5 Transkriptionelle Analyse nach Verwundungsstress

Um die transkriptionelle Veränderung der *Bglu* Gene in *L. galeobdolon* nach Verwundungsstress zu messen wurden adulte Blätter mit einer Pinzette im Abstand von 5 mm gequetscht. Proben wurden nach 2, 30, 60, 240 und 480 min genommen und umgehend in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren. RNA Isolation, cDNA Synthese und qRT-PCR Reaktion wurden wie in 2.2.2 und 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die qRT-PCR Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

### 2.2.6 Codonoptimierung von P450 Genen auf das Hefeexpressionssystem

Die *C. orientalis* P450 Kandidaten Contig8863 und Contig4127 wurde auf die Codon-Präferenz von Hefe angepasst. Die ursprüngliche Codierung entspricht weitestgehend der von *A. thaliana*. Um Translation in Hefe zu verbessern, wurden die Codons wie in Tabelle 8 beschrieben verändert.

Tabelle 8: Codonoptimierung für die Expression von *C. orientalis* Genen in Hefe

Aminosäure	Ausgangscodon	Optimiertes Codon
Leu	CTC	CTA
Glu	GAG	GAA

Die jeweils ca. ersten 500 bp des Gens wurden angepasst, und synthetisiert (GeneArt Gene Synthesis, Invitrogen). Über die interne AatII Schnittstelle erfolgte die Verbindung mit der Restsequenz. Die Klonierung in den Expressionsvektor erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben. Das Konstrukt wurde im Anschluss durch Sequenzierung überprüft (2.2.7).

### 2.2.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Plasmid-DNA wurde zuvor durch Fällung mit Polyethylenglykol (PEG, Sambrook *et al.*, 1989) gereinigt. PCR-Produkte wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY+NAGEL, Düren) aufgereinigt.

### 2.2.8 Sequenzierung des *L. galeobdolon* Transkriptoms

Für die Sequenzierung des *L. galeobdolon* Transkriptoms wurde zunächst Gesamt-RNA aus Blätter, Blüten und Adventivwurzeln von *L. galeobdolon* isoliert und in gleichen Mengen kombiniert um eine zufallsprimierte und normalisierte Bibliothek zu erstellen. Die

Sequenzierung wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit MiSeq generierten „paired-end reads“ durchgeführt. Über 20 Millionen Bibliothekfragmente konnten so erzeugt werden.

Diese ‘reads’ wurden mit dem Trinity de novo tool (trinityrna-seq\_r2013\_08\_14, Haas et al 2013) unter der Verwendung von Standardparametern zusammengesetzt. Anschließend wurde die Transkriptannotation durch den BLAST Vergleich mit der *A. thaliana* Datenbank TAIR9 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) durchgeführt. Der BLASTn Algorithmus wurde mit einem maximalen E-value von 10-e5 eingesetzt. Falls mehrere Treffer erzielt wurden, wurde der am Besten passende ausgewählt.

### 2.2.9 Sequenzierung von genomischer *L. galeobdolon* DNA

Aus genomischer DNA wurde wie von (Howard III *et al.*, 2014) beschrieben eine Illumina Sequenzierungsbibliothek erzeugt. Dazu wurde isolierte genomische DNA (2.2.1) durch Restriktionsendonukleasen mit 4-Basen-Erkennungssequenzen geschnitten. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Für Illuminasequenzierung verwendete Endonukleasen mit 4-Basen-Erkennungssequenzen

Enzymname	Erkennungsstelle
AluI	5´-AG CT-3´
ApoI	5´-R AATTY-3´
Avall	5´-G GWCC-3´
TaqI	5´-T CGA-3´

Je 5 µg genomische DNA wurden mit 30 units Enzym (New England Biolabs) nach Herstellerangaben verdaut und durch Fällung mit Polyethylenglykol (PEG, Sambrook *et al.*, 1989) gereinigt.

Die gereinigten Fragmente wurden mit dem paired-end TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina) nach Herstellerangaben an Illumina paired-end „barcode“-Adapter ligiert. Bei Generierung dieser Paired-end Bibliothek findet automatisch ein Größenausschluss von Fragmenten kleiner als 100 bp und größer als 500 bp statt. Bis zu 2,5 Gb Datenvolumen wurde von je einer der vier Paired-end Datenbanken am Illumina HiSeq2500 nach Herstellerangaben sequenziert. Die so erzeugten einzelnen „reads“ betragen pro Ende eine Länge von 126 bp und konnten durch die ligierten Adapter einander zugeordnet werden.

## 2.3 Hefe- und Gewebekulturen

### 2.3.1 Anzucht und Induktion von Hefe

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Hefestämme bei 28 °C inkubiert, Flüssigkulturen auf dem Roller oder im Schüttler bei 120 rpm. Untransformierte Zellen wurden in YPGA (2 % Glukose, 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 30 mg / l Adenin), transformierte Zellen im SC Selektionsmedium (2 % (w/v) Glukose, 0,67 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) (Roth, Karlsruhe), je 0,01% (w/v) Arginin, Cystein, Lysin, Threonin und je 0,005%(w/v) Aspartat, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin) gezogen. Die Aminosäuren Adenin, Leucin, Tryptophan, Uracil und Histidin wurden je nach Selektionsbedarf zugegeben oder weggelassen. Anzucht von Hefezellen zur Transformation: Eine Kolonie von einer frischen, bei 28 °C inkubierten YPGA-Platten wurde in 5 ml YPGA überimpft und über Nacht bei 28 °C auf dem Roller inkubiert. Davon wurden 50 ml YPGA beimpft, und bei 120 rpm und 28 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 -0,8 inkubiert. In diesem Stadium konnten die Zellen zur Transformation eingesetzt werden.

Die Induktion von Zellen erfolgte durch Zugabe von 27 ml 20% (w/v) Galaktose-Lösung in eine 10 h alte 250 ml Kultur in YPGE (0,5 % Glukose, 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 3 % Ethanol), welche aus einer 25 ml Übernachtskultur in SC Medium angeimpft wurde.

### 2.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation der Hefezellen mit den pYEDP60 oder pGREG-Konstrukten erfolgte über Elektroporation (Becker und Guarente, 1991) oder über Hitzeschock Lithiumacetat-behandelter Zellen (Gietz und Woods, 2002). Es wurden 0,2 – 1 µg DNA pro Transformationsansatz eingesetzt. Transformierte Zellen wurden über die entsprechende Aminosäure-Komplementation selektiert.

Die Hefen wurden mit Lithiumacetat kompetent gemacht. 10 ml Aliquots der geernteten Zellen wurden zweimal mit 10 ml H<sub>2</sub>O und einmal mit 1 ml 100 mM LiAc gewaschen.

Für den Hitzeschock wurden nach Resuspendierung in 50 µl 100 mM LiAc die zu transformierende DNA, 50 µg ss-Heringssperma DNA sowie 300 µl PEG 4000 Lösung (50% PEG (w/v)) zugegeben. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C im Wasserbad für 40 min. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 100µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, und jeweils 1/100, 1/20 und 1/2 des Ansatzes auf Selektionsmedium SC (2% (w/v) Agar, 2 % (w/v) Glukose, 0,67 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) (Roth, Karlsruhe), je 0,01% (w/v) Arginin, Cystein, Lysin, Threonin und je 0,005%(w/v) Aspartat, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin) ausplattiert, und mindestens 4 Tage bei 28 °C inkubiert. Für die Elektroporation wurden die frisch kompetent gemachten Zellen mit der zu

transformierenden DNA vermischt, anschließend mit dem Gene-Transfection-Pulser (BioRad, USA) in 2 mm Küvetten (Thermo Scientific) bei 2,5 kV, 400Ω und 25 μF elektroporiert und im Anschluss gleichermaßen ausplattiert.

### **2.3.3 Transiente Proteinexpression in *N. benthamiana* Agroinfiltration**

Die *LgBGLU* Kandidaten wurden mit Hilfe von Agroinfiltration und dem TMV (Tabak-Mosaik-Virus)-basierenden viralen Vektoren (Marillonnet *et al.*, 2005) transient in *N. benthamiana* exprimiert: Dabei wird eine Kombination aus drei verschiedenen Provektoren in die Pflanze eingebracht. Die 5´-Provektoren (pICH20111 und pICH20115) beinhalten virale Komponenten, wie z.B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und das Movementprotein (MP), das eine Ausbreitung des Systems von Zelle zu Zelle vermittelt. Zudem steuern diese Vektoren die zelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins (pICH20111: Cytoplasma; pICH20115: Apoplast). Der 3´-Provektor (pICH31070) enthält das zu exprimierende Gen. Der dritte Provektor (pICH140111) enthält eine spezifische Integrase, welche die 5´- und 3´-Provektoren in der Pflanze rekombiniert. Als Positivkontrolle wurde der 3´-Provektor pICH7410 eingesetzt, der die GFP (Green fluorescent protein)-Genesequenz enthält. Für die transiente Expression in *N. benthamiana* wurden die *LgBGLU* Kandidaten cDNAs mit Adaptorprimern (Tabelle 4) amplifiziert und mit der Golden Gate-Klonierungstechnik (Engler *et al.*, 2008) in den 3´-Provektor pICH31070 kloniert und sequenziert. *A. tumefaciens* des Stammes GV3101 wurde mit den Provektoren transformiert (Tabelle 1).

#### **2.3.3.1 Elektroporation von Agrobakterien**

Elektrokompetente *A. tumefaciens*-Zellen wurden nach der Methode von Walkerpeach und Velten, 1994 hergestellt. Die Elektroporation der kompetenten Agrobakterien mit dem jeweiligen Vektor erfolgte mit dem Gene-Transfection-Pulser (BioRad, USA) in 2 mm Küvetten (Thermo Scientific) bei 2,5 kV, 400Ω und 25 μF mit 50-100 ng DNA. Die Selektion erfolgte auf YEP-Platten (5g/l Hefeextrakt, 10g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, pH 6,8) mit einem Resistenzmarker des eingesetzten *A. tumefaciens* Stamms (Tabelle 2) und dem Selektionsmarker des eingesetzten Plasmids.

#### **2.3.3.2 Agroinfiltration**

Es wurden Übernacht-Kulturen der transformierten Agrobakterien verwendet. Die Kulturen wurden bei 4 °C und 3900 g 20 min zentrifugiert und die Pellets in 10 ml Infiltrationspuffer (10 mM MES-NaOH, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5,5) resuspendiert. Die mit den verschiedenen Vektoren transformierten Agrobakterien wurden in verschiedenen Kombinationen (Tabelle 10) gemischt und 1:40 bzw. 1:200 mit Infiltrationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 400 ml verdünnt. Die zu infiltrierende Pflanze wurde in die Lösung getaucht und anschließend wurde zweimal für 1-2 min ein Vakuum angelegt.

Tabelle 10: Eingesetzte Kombinationen unterschiedlicher Provektoren für die transiente Expression von *LgGLU1*, *LgGLU2*, *LgGLU3*, *LgGLU4* und *CoGLU*, sowie von GFP in *N. benthamiana*. \*: Die Lokalisation in den Apoplast resultiert aus dem Apoplast-Signal der *LgGlu*-Kandidaten-Gene.

Provektoren Kombination	Exprimiertes Protein	Lokalisation
pICH31070 mit <i>LgGLU1</i> ; pICH14011; pICH20111	<i>LgGLU1</i>	Apoplast*
pICH31070 mit <i>LgGLU2</i> ; pICH14011; pICH20111	<i>LgGLU2</i>	Apoplast*
pICH31070 mit <i>LgGLU3</i> ; pICH14011; pICH20111	<i>LgGLU3</i>	Apoplast*
pICH31070 mit <i>LgGLU4</i> ; pICH14011; pICH20111	<i>LgGLU4</i>	Apoplast*
pICH31070 mit <i>CoGLU</i> ; pICH14011; pICH20111	<i>CoGLU</i>	Apoplast*
pICH7410; pICH14011; pICH20111	GFP	Cytoplasma

## 2.3.4 Erzeugung und Analyse von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

### 2.3.4.1 Elektroporation von Agrobakterien und Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens*

Die zu testenden UGT Konstrukte wurden in den binären Vektor pGPTV-35SBarB kloniert. *A. tumefaciens* des Stammes GV3101 wurde wie in 2.3.3.1 aufgeführt mit dem Vektor transformiert. Die Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* erfolgte mit der floral-dip-Methode (Clough und Bent, 1998). Transgene T0-Pflanzen wurden über Phosphinothricin (PPT)-Resistenz selektioniert.

### 2.3.4.2 Analyse der transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

Homozygote *A. thaliana*-Samen der T2-Generation wurden sterilisiert und für drei Tage einer Vernalisation bei 4 °C unterzogen. Die Pflanzen wurden für neun Tage bei 18 °C und 24 h Licht in der Pflanzenkammern auf ½-MS-Medium angezogen. Einzelne Pflanzen wurden in Mikrotiterplattenkavitäten transferiert, welche flüssiges ½-MS-Medium mit DIBOA bzw. DIMBOA-Konzentrationen von 0-2 mM enthielten. Das Medium wurde täglich gewechselt, da DIBOA und DIMBOA in wässriger Lösung instabil sind und die Benzoxazinone Benzoxazolin-2(3H)-one (BOA) und 6-Methoxybenzoxazolin-2(3H)-one (MBOA) entstehen. Nach vier Tagen Inkubation in den Mikrotiterplatten wurden die Pflanzen bonitiert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinrohextraktion aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

Zur Herstellung eines Proteinrohextrakts aus *C. orientalis* bzw. *L. galeobdolon* wurde das jeweilige Pflanzenmaterial (*C. orientalis*: oberirdischer Teil von 7-10 Tagen alten Keimlingen oder Knospen von 6 Wochen alten Pflanzen, bzw. *L. galeobdolon*: junge Blätter) auf Eis geerntet und mit Seesand, Extraktionspuffer (50 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7,5) und 0,3 g Polyclar pro g Pflanzenmaterial in einer gekühlten Reibeschale fein gemörsert. Die Suspension wurde 10-15 min bei 30000 g und 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit Inhibitor Cocktail Tissue (Roth) und Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

#### **2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) durchgeführt. Die Proteine wurden mit Coomassieblau (1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig) gefärbt und mit Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol) entfärbt.

#### **2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bio-Rad® Protein Assay nach Bradford, 1976 angewandt.

#### **2.4.4 Proteinextraktion aus *N. benthamiana***

4-10 Tage nach der Agroinfiltration wurde aus einzelnen Blättern von infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen ein Proteinextrakt hergestellt. Das Blatt wurde dazu mit Seesand, 0,3 g Polyclar und 3 ml Extraktionspuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer, 5 mM BME, 10 mM EDTA, 0,1% Triton, pH 7,0) pro g Pflanzenmaterial in einer gekühlten Reibeschale auf Eis fein zerrieben. Die Suspension wurde anschließend bei 4 °C und 17500 g für 5-10 min zentrifugiert. Das Proteinextrakt wurde mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 20%) und in Aliquots bei -80 °C eingefroren.

#### **2.4.5 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie bzw. Glutathion Agarose Säule**

Die Proteine CoBX8, LgUGT11, LgUGT27 und LgUGT28 wurden in *E. coli* heterolog exprimiert: Die amplifizierten cDNAs wurden zunächst blunt-end in pBluescript KS+ subkloniert und sequenziert. Die cDNAs wurden anschließend in frame mit dem aminoterminalen 6xHisTag und GST-Tag in den Expressionsvektor pET28a (Novagen) und pGEX-4T1 (Amersham) umkloniert. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden die Bakterien in Terrific Broth (TB)-Medium (Tartoff und Hobbs, 1987) mit 1% Glukose und 50 µg/ml Kanamycin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3-0,5 angezogen, auf Eis abgekühlt und die Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 2-4h bei 37°C oder für 2-3 Tage bei 18 °C induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3900 g, 4 °C, 20 min) geerntet und das Zellpellet bei -70 °C eingefroren.

Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 3 ml Lysepuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM BME, pH 8,0) pro g Zellpellet resuspendiert. Es wurden 1 mg/ml Lysozym zu den Zellen gegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (5 min, 10 s Puls, 20 s Pause,

Amplitude 60%) aufgebrochen. Das Lysat wurde mit 10 µg/ml RNase und 10 µg/ml DNase versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile für 10 min bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Zu dem Bakterien-Rohextrakt wurde bei His-Tag die 50%ige Ni-Agarose-Suspension (Qiagen) oder GST-Agarose (GENAXXON bioscience, Ulm) im Verhältnis 1:4 zugegeben. Die Suspension wurde 1 h bei 4 °C geschüttelt und in eine Säule gepackt. Die Säule wurde mit Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM BME, pH 8,0) gewaschen und die His-Tag Proteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol bzw. 50 mM reduziertes Glutathion, 10 mM BME, pH 8,0) eluiert. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE (2.4.2) analysiert und ihre Proteinkonzentration (2.4.3) bestimmt. Fraktionen mit dem höchsten Reinheit und Gehalt wurden vereinigt und mit NAP-Säulen (GE-Healthcare) in Reinigungspuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7,5) umgepuffert. Die Proteinlösung wurde anschließend in Aliquots bei -70 °C gelagert.

#### **2.4.6 Mikrosomenisolierung aus *S. cerevisiae***

Galaktose-induzierte Hefezellen (2.3.1) wurden geerntet, in TEK-Puffer (0,1 M KCl, 50 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA) 5 min bei RT gewaschen, und in einem FastPrep-24 Homogenisator (MP Biomedicals, USA) (3x 20 Sekunden.) in 2,5 ml TES-B (50 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol, 2 mM DTT) und 15g Glasperlen (Sigma) geöffnet. Der Überstand wurde abgenommen, das Glasperlen-Pellet 3 x mit je 5 ml TES-B gewaschen. Nach Vereinigen des Überstandes mit den drei Waschfraktionen wurden diese zur Abtrennung von Zelltrümmern 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand dieses Schrittes wurde die mikrosomale Fraktion in der Ultrazentrifuge Optima LE-70 (Beckman) 1h bei 350000 g pelletiert. Das Mikrosomenpellet wurde in TES-B gewaschen, und in 50 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20% Glycerin durch Pottern homogenisiert. Aliquots dieser Präparation wurden sofort für Enzymtests eingesetzt oder in Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert

#### **2.4.7 Mikrosomenisolierung aus *C. orientalis* und *Z. mays***

15 g bis 20 g Pflanzengewebe wurde in etwa 20 ml Extraktionspuffer (250 mM Tris, 250 mM Saccharose, 100 mM Ascorbinsäure, 2 mM DTT, 5 mg/ml BSA, 2 mM EDTA, pH 8,0), Polyclar AT und Seesand auf Eis gemörsert, über Mull filtriert und der Durchlauf abzentrifugiert (10000 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge Optima LE-70 45 min bei 4 °C, 250000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufbewahrungspuffer (100 mM Tris, 25 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 8,0) im Potter resuspendiert und zur weiteren Reinigung erneut 45 min, 4 °C, 250000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 2 ml Aufbewahrungspuffer mit 15 % Glycerin

resuspendiert und der Proteingehalt mittels Bradford-Test bestimmt. Alle Puffer wurden vor Gebrauch entgast.

## 2.5 Isolierung von Naturstoffen

### 2.5.1 Isolierung von DIBOA aus *L. galeobdolon* bzw. DIMBOA aus *Z. mays*

Für die Gewinnung von DIBOA bzw. DIMBOA wurde das jeweilige Pflanzenmaterial (junge Blätter von *L. galeobdolon* bzw. 4 Tage alte etiolierte *Z. mays*-Sprossen) mit destilliertem Wasser (ca. 10x Frischgewicht) im Polytron PT 3000 (Kinematic AG) zerkleinert und 1 h bei RT inkubiert. Die Suspension wurde über Faltenfilter filtriert und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert. Die Suspension wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen erneut filtriert. Die organische Phase wurde durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über präparative HPLC aufgereinigt. Die Quantifizierung von DIBOA und DIMBOA erfolgte photometrisch nach Bailey und Larson (1989) ( $\epsilon_{254}$  (DIMBOA)= 8500  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ,  $\epsilon_{262}$  (DIBOA)=10000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ).

### 2.5.2 Isolierung von GDIBOA aus *L. galeobdolon*

GDIBOA wurde aus jungen *L. galeobdolon* Blättern extrahiert. Dazu wurde das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff gefroren, grob zerkleinert, in kochendes destilliertes Wasser gegeben (ca. 10-fach Frischgewicht) und aufgekocht. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend im Polytron PT 3000 (Kinematic AG) zerkleinert und bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde über Faltenfilter filtriert und dreimal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde erneut filtriert und bis zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Quantifizierung des gereinigten GDIBOAs wurde mit Hilfe des DIBOA-Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{262}$  (DIBOA)=10000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ , Bailey und Larson, 1989) durchgeführt.

### 2.5.3 Isolierung von GDIMBOA aus *Z. mays*

GDIMBOA wurde aus 4 Tage alten etiolierten *Z. mays*-Sprossen isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in Aceton suspendiert. Die Suspension wurde zweimal bei 26000 g für 20 min zentrifugiert und der Überstand einrotiert bis eine gelbe Suspension in Wasser zurückgeblieben war. Diese wurde mit Wasser verdünnt und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Es folgte eine dreimalige Extraktion mit 1 Vol. Ethylacetat. Die Phasentrennung wurde jeweils durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 g erreicht. Die wässrige Phase wurde eingedampft, der Rückstand in Methanol resuspendiert und präparativ über HPLC aufgereinigt. Gereinigtes GDIMBOA

wurde über den Extinktionskoeffizienten von DIMBOA ( $\epsilon_{262}$  (DIMBOA) =  $8500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , Bailey und Larson, 1989) quantifiziert.

## 2.6 Analyse von Naturstoffen

### 2.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für HPLC-Trennungen wurde die HPLC mit dem Diodendetektor PDA-100 (Dionex), und der Bedienungs- und Auswertungssoftware Chromeleon verwendet. Die Trennungen wurden nach dem Reversed Phase-Prinzip (mit der MultoHigh 100 RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ) Säule, (Göhler HPLC-Analysentechnik, Chemnitz), analytisch:  $\varnothing = 5 \mu\text{m}$ , Fluss = 1 ml/min, präparativ:  $\varnothing = 10 \mu\text{m}$ , Fluss = 6 ml/min) durchgeführt.

#### Analytische Trennungen

Für die analytische Trennung enzymatischer Umsetzungen wurden unterschiedliche Gradienten von 10-100% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure gefahren (Tabelle 11).

Tabelle 11: HPLC Methodenprofile

Substrat	Methode		Quantifizierung [nm]
	Retentionszeit [min]	B (MeOH) [%]	
GDIBOA DIBOA	3-12	12-50	255
	12-17	50	
	17-18	50-100	280
	18-19	100	
GDIMBOA DIMBOA	3-12	12-50	265
	12-17	50	
	17-18	50-100	290
HBOA HION Indolin-2-on Indol	3-12	12-50	254
	12-17	50	
	17-18	50-100	290
	18-19	100	
tZOG Zeatin	3-18	10-45	274
	18-23	45	
	23-24	45-100	
	24-25	100	

Phloridzin	3-17	12-100	260
Phloretin	17-19	100	
Genistin Genistein	0-3	12-50	265
	3-10	50	
	10-12	50-90	
	12-17	90-95	
	17-18	95-100	
Geniposid Genipin	3-12	12-50	240
	12-17	50	
	17-18	50-100	
Daidzin Daidzein	3-17	12-100	260
	17-19	100	
Zimtsäure	3-18	20-100	326
Coumarsäure	18-20	100	

### Präparative Trennungen

Zur Isolierung der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA (siehe 2.5.1, 2.5.2 und 2.5.3) wurden die jeweiligen Substanzgemische präparativ (RP-18e-Säule) aufgetrennt. Als Lösungsmittel A wird 0,3%ige Ameisensäure eingesetzt, Lösungsmittel B ist Methanol. Nach den präparativen Trennungen (Tabelle 12) wurden, die das Produkt enthaltenen Fraktionen, vereinigt und einrotiert. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über analytische HPLC quantifiziert.

Tabelle 12: HPLC-Programme und Retentionszeiten für präparative Trennungen bei der Isolierung der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA.

	Gradient			Retentionszeit [min]
	von	bis	in	
DIBOA	10% B	50% B	9 min	8,5
DIMBOA	10% B	50% B	9 min	4,0
GDIBOA	23% B	37% B	12 min	3,5
GDIMBOA	22% B	23% B	40 min	17

## 2.7 Enzymtests

### 2.7.1 Test der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität

Um die Qualität der Mikrosomen zu testen wurden 25 µg Mikrosomen-Protein in 50 mM K-P<sub>i</sub> pH 7,5 mit 5 mM Zimtsäure und 1 mM NADPH (200 µl Endvolumen) 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 % HOAc angesäuert und zweimal mit 200 µl EtOAc ausgeschüttelt, der Überstand wurde einrotiert und der Rückstand in 100 µl MeOH aufgenommen. Der Umsatz von Zimtsäure zu Coumarsäure wurde mittels HPLC bestimmt.

### 2.7.2 In vitro Enzymtests mit Mikrosomen

In einem Volumen von 200 µl wurden in 50 mM K-P<sub>i</sub> pH 7,4, 0,7 mM NADPH 150 µl Mikrosomen-Protein mit 200 µM Substrat 1h bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl MeOH abgestoppt, mit 1,3 Volumen 0,1 M Essigsäure angesäuert und dreimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Die EtOAc-Phase wurde eingedampft und der Rückstand in 100 µl MeOH aufgenommen. Der Umsatz von Indol zu Indolinon, Indolinon zu HION, HION zu HBOA und HBOA zu DIBOA wurde mittels HPLC bestimmt. Nachdem jedes Substrat in den Standardbedingungen untersucht war, wurden Substratkonzentration (100 µM, 500 µM, 1 mM) und Inkubationszeit (10 min, 30 min, 2h) entsprechend variiert.

### 2.7.3 Tests auf Glukosyltransferase-Aktivität

Der Enzymaktivitätstest für die UDPG:DIBOA Glukosyltransferasen aus *L. galeobdolon* erfolgte in abgewandelter Form nach Bailey und Larson, 1989. 1,5 µg gereinigtes UGT wurde in 200 µl Assaypuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 1 mM UDPG, pH 8,2) mit 2 mM bzw. 1 mM UDPG als Glukose-Donor eingesetzt und DIBOA oder DIMBOA als Akzeptor (je 1 mM bzw. 500 µM) 4 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Akzeptor-Substrats gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Folchlösung (Chloroform:Methanol (2:1, v/v), 1% HCl) gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 17500 g zentrifugiert und 100 µl der oberen Phase über HPLC analysiert. Die gebildete GDIBOA bzw. GDIMBOA-Stoffmenge wurde über eine DIBOA- bzw. DIMBOA Eichkurve ermittelt. Als Kontrolle wurde hitzeinaktiviertes Enzym (5 min, 100 °C) eingesetzt.

### 2.7.4 Tests auf β-Glukosidase-Aktivität

#### pNP-Enzymtests

Die Umsetzung des allgemeinen Substrats *para*-Nitrophenyl-β-D-glukopyranosid (pNPG) und der künstlichen Substrate *para*-Nitrophenyl-β-D-mannopyranosid (pNPM), *para*-Nitrophenyl-β-D-fucopyranosid (pNPF), *para*-Nitrophenyl-β-D-cellobioside (pNPC) durch die LgBGLUs wurde in einem Reaktionsvolumen von 400 µl spektrometrisch gemessen. 2 µg transient

exprimiertes BGLU (2.4.4) wurden mit 66400  $\mu\text{M}$  *p*NPG für 15 min in Citratpuffer (0,1 M Natrium-Phosphat/Citrat, pH 5,5) bei 37 °C inkubiert. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 2% Natriumcarbonat gestoppt und die Stoffmenge des gebildeten *para*-Nitrophenols photometrisch gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient für *para*-Nitrophenol bei 405 nm beträgt 18300 l/mol cm. Für den Vergleich der *p*NP-Umsetzung durch die BGLUs mit anderen Substraten wurden 2  $\mu\text{g}$  *Lg*GLU1, *Lg*GLU2 und *Lg*GLU4 mit 1 mM *p*NPG, *p*NPM, *p*NPF und *p*NPC bei 30 °C inkubiert.

### **Benzoxazinoid-Glukosid-Enzymtests**

Die Deglukosylierung der Benzoxazinoid-Glukoside GDIBOA und GDIMBOA durch die BGLUs wurde in einem Reaktionsvolumen von 200  $\mu\text{l}$  in Citratpuffer gemessen. 2  $\mu\text{g}$  Enzym wurden mit 500  $\mu\text{M}$  des Glukosids 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats in 10  $\mu\text{l}$  Ethanol gestartet. Der Substratumsatz wurde über die Bildung des Aglukons (HPLC-Analyse) bestimmt. Für die Quantifizierung des Aglukons über HPLC wurde die Reaktion durch Ausschütteln mit 800  $\mu\text{l}$  Folchlösung (Chloroform:Methanol (2:1, v/v), 1% HCl) abgestoppt. Die obere wässrige Phase wurde über die HPLC analysiert.

pH- und Temperaturwerte der GDIBOA-Hydrolyse wurden für heterolog exprimiertes *Lg*GLU1 und Rohextrakt ermittelt. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden die Reaktionen in Citratpuffer mit pH-Werten von 3 bis 8 bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Für die Ermittlung des Temperaturoptimums wurden die Ansätze in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 bei Temperaturen in einem Bereich von 30°C bis 70°C in 10°C Schritten durchgeführt. Nach der Vorinkubation bei der jeweiligen Temperatur wurden die Reaktionen durch Zugabe von Enzymextrakt gestartet und 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4 Vol. Folchlösung gestoppt und der Überstand in der HPLC analysiert.

Die Bestimmung der enzymatischen Parameter für *Lg*GLU1 und CoGLU für das Substrat GDIBOA erfolgte mit einer Enzymmenge und Inkubationsdauer, bei der die Produktbildung im linearen Bereich liegt. 2  $\mu\text{g}$  *Lg*GLU1 und CoGLU wurden mit den Substratkonzentrationen 0,175 mM, 0,35 mM, 0,7 mM, 1,4 mM, 2,8 mM und 5,6 mM 5 min bei 37 °C inkubiert. Für jede Substratkonzentration wurden drei Bestimmungen durchgeführt. Die Enzymparameter  $K_M$  und  $v_{\text{max}}$  wurden durch das Programm Graph Pad Prism Version 4.03 über nichtlineare Regression berechnet.

Um die Inhibierung der GIBOA Hydrolyse durch Dhurrin und Oleuropein zu messen wurden 2  $\mu\text{g}$  *Lg*GLU1 und CoGLU in Citratpuffer zunächst für 5 min bei 30 °C mit 500  $\mu\text{M}$  Inhibitor inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion (5 min, 37 °C) durch Zugabe des Substrats

(500  $\mu\text{M}$ ) gestartet. Die Reaktion wurde mit 800  $\mu\text{l}$  Folchlösung abgestoppt und die GDIBOA-Umsetzung über HPLC analysiert.

### **Enzymtest der Substrate mit Produktstandard**

Für die Substrate Geniposid, Daidzin, Phlorizin, Genistin und *trans*-Zeatin-O-Glukosid (*t*ZOG) lag das entsprechende Aglukon als Standard für die HPLC-Quantifizierung vor. Für die Untersuchung der Umsetzung dieser Substrate wurden 2  $\mu\text{g}$  BGLU mit je 500  $\mu\text{M}$  Substrat 200  $\mu\text{l}$  Citratpuffer 10 min (Daidzin, Genistin) oder 30 min (Geniposid, Phlorizin, *t*ZOG) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. Methanol abgestoppt und 10 min bei 17500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die HPLC-Analyse eingesetzt.

### **Enzymtests der Substrate ohne Produktstandard**

Für die Substrate deren Umsetzung aufgrund von fehlenden Aglukonstandards nicht über HPLC quantifiziert werden konnte (Dhurrin, Arbutin und die Iridoide Oleuropein und Harpagid) wurde die Bildung von Glukose durch Glukose Oxidase- Assay gemessen. 2  $\mu\text{g}$  BGLUs wurden mit 500  $\mu\text{M}$  Substrat in 200  $\mu\text{l}$  Citratpuffer 5 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bei 85°C für 5 min inaktiviert. Die Umsetzung wurde mit dem Glukose (GO) Assay Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers gemessen.

Um die katalytischen Parameter der LgGLU1 und CoGLU für die Substrate Dhurrin und Oleuropein zu bestimmen, wurden 2 $\mu\text{g}$  Protein mit Konzentrationvariationen 0,175 mM, 0,35 mM, 0,7 mM 1,4 mM, 2,8 mM und 5,8 mM Oleuropein bzw. 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM Dhurrin eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in Citratpuffer pH 5,5 bei 37°C für 5 min durchgeführt und im Anschluss hitzeinaktiviert. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten und die Ezymparameter wurden mit dem GraphPad Prism Version 4.03 in non-linearer Regression bestimmt.

## **2.8 Identifikation von POR Sequenzen aus dem *C. orientalis***

### **Transkriptom**

*C. orientalis* POR Kandidaten aus dem Transkriptom mit findorfs command in usearch v11 (Edgar, 2010) identifiziert und anhand eines Vergleichs mit einem Hidden Markov Modell der bekannten PORs gefiltert. Dabei identifizierte, lückenhafte, transkriptionelle Sequenzen dienten als Basis für den Entwurf von Primern (Tabelle 4), anhand deren die vollständige Sequenz aus genomischer DNA synthetisiert und sequenziert wurde. Die entsprechenden Kandidaten wurden mit der NAPDH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase Datenbank (Jensen und Møller, 2010) angeglichen und verifiziert.

## 2.9 Phylogenetische Analysen

Für die phylogenetische Analyse der Enzymklassen Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase, UDPG-anhängige Glykosyltransferasen und  $\beta$ -Glukosidasen wurden je ein Datensatz zusammengetragen, der die entsprechenden Sequenzen aus *A. thaliana* und *O. sativa* enthält. Sequenzen aus den *L. galeobdolon* und *C. orientalis* Transkriptomen wurden hinzugefügt. Der Datensatz der BGLU enthält außerdem Sequenzen, die mit einer PSI-BLAST Suche (BLOSUM62, max E-value 0,005, Altschul, 1997) aus der UniRef100 Datenbank als Homologe zu *LgGLU1* identifiziert wurden. Der Datensatz der P450 betrug 638 Sequenzen, die UGTs 233 Sequenzen und der BGLU Datensatz bestand aus 870 Sequenzen. Diese Sequenzen wurden jeweils unter Verwendung von MUSCLE 3.5.31 (Edgar, 2004) angeglichen. Alignment Spalten mit mehr als 20% Lücken wurden mit der trimAl v1.2 Software (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) entfernt. Die Phylogenetischen Bäume wurden mit dem Programm RAxML 8.2.10 (Stamatakis, 2014) unter Verwendung des PROTCATJTTF Modells im fast bootstrap Modus (-f a Option) mit 100 bootstrap Proben berechnet. Die abgeleiteten Topologien von Bäumen die mit alternativen Methoden berechnet wurden (Bayesian Ansatz) zeigten keine großen Abweichungen, weswegen RAxML für alle Auswertungen verwendet wurde. Die Bäume wurden mit Hilfe der iTOL Software (Letunic und Bork, 2016) grafisch dargestellt und nach Organismus eingefärbt (Monokotyledonen in grün, Dikotyledonen in rot).

### 3 Ergebnisse

Benzoxazinoide sind Sekundärmetabolite, welche in Gräsern (Poaceae) (Barnes und Putnam, 1987; Niemeyer *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2001; Zúñiga und Massardo, 1991), aber auch in einzelnen dikotyledonen Spezies vorkommen. Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind die Dikotyledonen *C. orientalis* und *L. galeobdolon*. Die Charakterisierung der am BX Biosynthesewege beteiligten Enzyme in diesen Pflanzen ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die Benzoxazinoidbiosynthese ist für Gräser etabliert und in Dikotyledonen unterschiedlich gut aufgeklärt. Bei *C. orientalis* sind *CoBx1*, *CoBx8* und die spezifische Glukosidase *CoGlu* bekannt (Dick *et al.*, 2012; Schullehner *et al.*, 2008) und lediglich die Funktionalisierung durch Hydroxylierung ist nicht aufgeklärt. Bei *L. galeobdolon* ist dagegen nur *Bx1* bekannt. Die jeweils unbekanntenen Gene sollten in dieser Arbeit isoliert werden. Die Strategie hierzu war die Untersuchung von Kandidatengenen auf der Basis des Transkriptomts beider Pflanzen. Im Fall von *C. orientalis* wurden P450 Enzyme für die Hydroxylierungen postuliert. Zur Eingrenzung der potentiellen Kandidaten lagen Expressionsdaten vor. Im Fall von *L. galeobdolon* war bereits eine funktionsbasierte Enzymreinigung der Glukosyltransferase erfolgt und damit Peptidsequenzen vorhanden. Diese sollten mit den RNA-Sequenzdaten verglichen werden um Kandidatengene zu definieren. Die Analyse der *L. galeobdolon* BGLU basierte ebenfalls auf Transkriptomdaten.

#### 3.1 Untersuchung von *C. orientalis* P450-Enzymen

Schullehner *et al.*, 2008 postulierten, dass Cytochrom P450- abhängige Monooxygenasen (P450) an der Benzoxazinoid Biosynthese in *C. orientalis* beteiligt sein könnten. Dies sollte bestätigt werden. Im Anschluss sollten im Transkriptom gefundene P450-Gene auf eine Funktion in der DIBOA-Biosynthese untersucht werden. Kriterium für die Auswahl der Kandidaten waren Expressionsdaten in den drei Organen Blüte, Blatt und Wurzel. Die aus dem *de novo*-Assembly von Transkripten gewonnenen Gensequenzen waren in diesem Fall durch die gewebespezifisch exprimierten Sequenzen verifiziert.

##### 3.1.1 Hydroxylierung von Intermediaten der DIBOA-Synthese durch *Consolidia orientalis* Mikrosomen

Um aktive P450-Enzyme in funktionellem Komplex mit der POR zu erhalten, wurden Mikrosomen aus jungen Blättern und Knospen von acht Wochen alten *C. orientalis* Pflanzen und vier Tage alten Maiskeimlingen extrahiert (siehe 2.4.7). Um die Qualität der Mikrosomen zu bestimmen, wurde der Umsatz von Zimtsäure zu Cumarsäure bestimmt (siehe 2.7.1). Sie betrug für Maismikrosomen  $67,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . *C. orientalis* Mikrosomen waren weniger effizient ( $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Die isolierten Mikrosomen wurden für Analysen mit

unterschiedlichen Intermediaten aus der DIBOA-Biosynthese von Mais verwendet (Abbildung 3). Die resultierenden Produkte wurden anschließend über HPLC detektiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Benzoxazinoid Aktivität der Mikrosomen aus Mais und *C. orientalis*. Mikrosomen wurden mit 500  $\mu$ M Substrat bei 30°C für 5-30 Minuten inkubiert. n.d.: nicht detektierbar.

Produkt (500 $\mu$ M)	Substrat (nmol/min*mg)					
	Indol		Indolinon		HION	
	<i>Z. mays</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>Z. mays</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>Z. mays</i>	<i>C. orientalis</i>
Indolinone	9,46	(+)	-	n.d.	-	n.d.
HION	2,06	n.d.	3,13	n.d.	-	n.d.
HBOA	0,355	n.d.	n.d.	n.d.	6,3	n.d.
DIBOA	n.d.	n.d.	1,286	n.d.	1,76	n.d.

Mikrosomen aus Mais setzten die Substrate NADPH-abhängig um. Bei Zugabe von Indol werden alle Intermediate bis zu 2-Hydroxy-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-3-on (HBOA) gebildet. Bei Einsatz von Indolin-2-on oder HION (3-Hydroxyindolin-2-one) war auch das Produkt DIBOA nachweisbar. Im Vergleich dazu konnte in Ansätzen mit Mikrosomen aus *C. orientalis* nur mit dem Substrat Indol ein Produkt in NADPH-abhängiger Reaktion detektiert werden. Dessen Retentionszeit entspricht der von Indolinon. Das Produkt wurde jedoch in so geringen Mengen gebildet, dass es weder quantifiziert noch durch Absorptionsspektrum und LC-MS bestätigt werden konnte.

Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Schullehner *et al.*, 2008. Damit ist neben Indol sehr wahrscheinlich auch Indolin-2-on ein Intermediat der DIBOA-Biosynthese in *C. orientalis*. Diese beiden Substrate wurden in der Analyse von P450-Enzymen eingesetzt.

### 3.1.2 Identifikation der P450 Kandidaten aus dem Transkriptom

79 vollständige P450-Kandidaten Sequenzen wurden in zuvor generierten Transkriptomdaten identifiziert (Dick, 2010). Für diese wurde aus Blättern, Blüten und Wurzeln Gesamt-RNA isoliert, in gleichen Mengen vereinigt und durch Random-priming cDNA Sequenzdaten gewonnen. Aus den 18-20 Millionen erzeugten paired-end-reads wurden Contigs generiert. Parallel wurde auch aus jedem Gewebe einzeln cDNA gewonnen und sequenziert.

Um aus dem Bestand von 79 putativen P450-Genen Kandidaten-Gene für die heterologe Expression auszuwählen, wurde die Anzahl der jeweiligen Sequenz-„reads“ in den Transkriptomen von Blättern, Wurzeln und Blüten bestimmt, es wurde das Transkriptionsmuster erstellt (Abbildung 4). In Mais folgt die Expression des Benzoxazinoid

„branch point“-Gens *ZmBx1* dem Muster des Enprodukts in Organen und während der Entwicklung. Die Expression von *ZmBx2* und der weiteren P450-Enzymen der Biosynthese läuft parallel dazu (Frey *et al.*, 1995). Die Glukosyltransferase und die Glukosidase zeigen ein davon abweichendes generelleres Expressionsprofil. In *C. orientalis* werden höchste Expressionswerte von *CoBx1* jeweils in der Blüte erreicht, während in der Wurzel geringe Expression stattfindet (Abbildung 4). Putative P450-Enzyme der DIBOA-Biosynthese von *C. orientalis* sollten ein zu *CoBX1* analoges Expressionsmuster aufweisen.

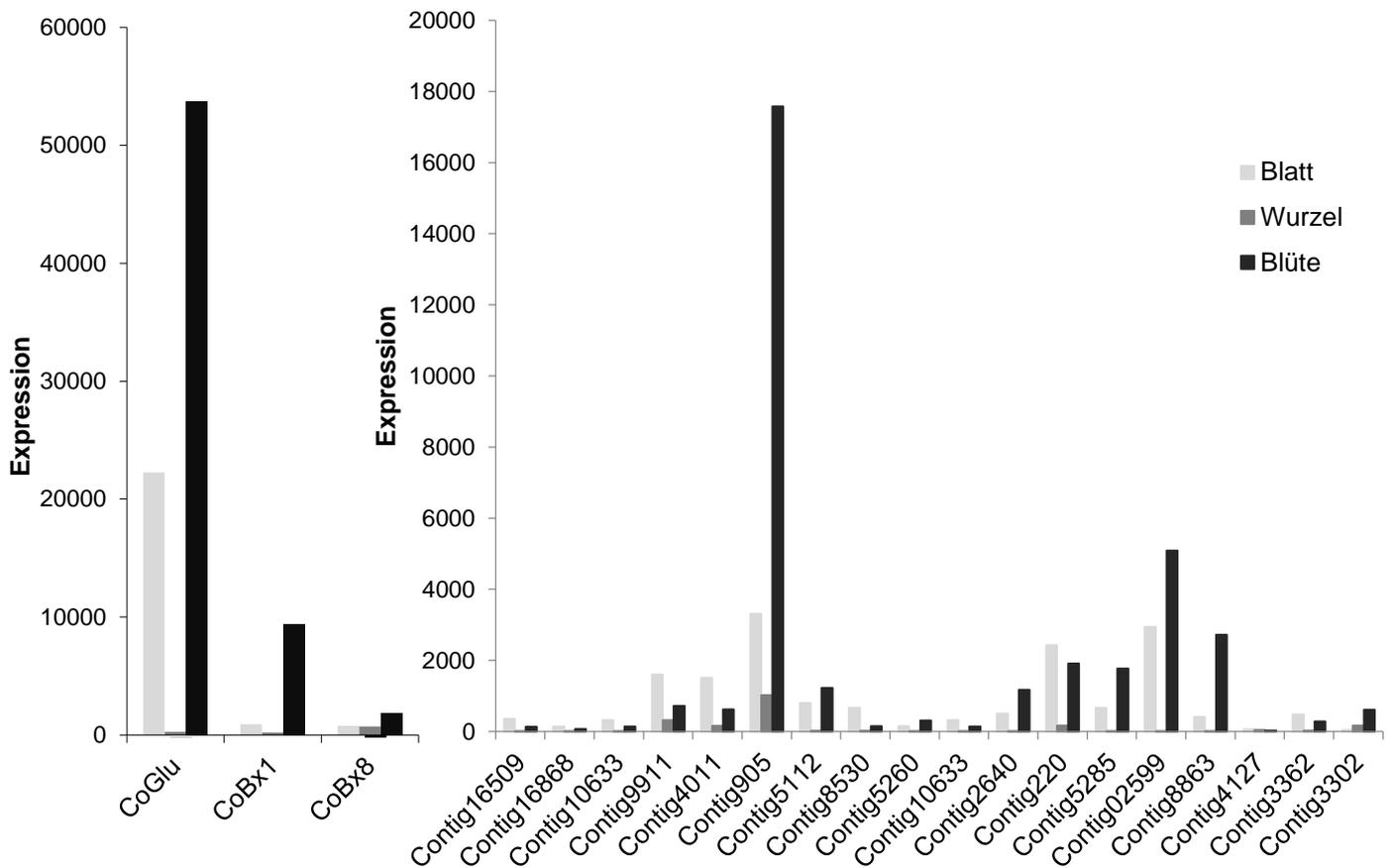


Abbildung 4: Transkript-Level definierter *Bx*-Gene und ausgewählter *P450*-Gene von *C. orientalis*.

Ein zusätzliches Kriterium für die Definition der Kandidatengene war die Annotation der Gensequenzen als Enzyme des Sekundärmetabolismus. Zusätzlich wurden alle Mitglieder der P450-Subfamilien in Betracht gezogen, wenn ein Vertreter ein erwartetes Expressionsmuster aufwies (Tabelle 14). Die unter den Kandidaten vertretenen Familien CYP77, CYP82 und CYP80 sind alle Teil des CYP71 Clans, der in den Pflanzen das größte Set an P450-Enzymen umfasst, und denen Funktionen im Sekundärmetabolismus zugeschrieben werden. So zeigte Contig8863, annotiert als CYP80B-Gen, nahe phylogenetische Verwandtschaft mit drei weiteren CYP80 Enzymen aus *C. orientalis* (Contig4127, Contig3362, Contig3302) deren relativen Expressionsniveaus jedoch nicht dem erwarteten Muster entsprachen (Abbildung 4).

Tabelle 14: P450-Kandidaten für die Benzoxazinoidbiosynthese in *C. orientalis*. \*Vorhergesagte Funktionen des Sekundärmetabolismus

Contig Name	CYP Klassenzuordnung	Vorhergesagte Funktion
Contig905	CYP82D47	Hämthiolat Monooxygenase
Contig5112	CYP77A3	Lipidmetabolismus
Contig8530	CYP82C	*8-Methoxypsoralen als Substrat
Contig5260		*Alkanhydroxylase
Contig2640	CYP86A22	Acyl-CoA omega-Monooxygenase
Contig8863	CYP80B	*(S)-N-Methylcoclorin 3'-Hydroxylase Isozym 1
Contig5285	CYP77A3	Fettsäureepoxidase, hoch konserviert
Contig02599	CYP77A3	Fettsäureepoxidase, hoch konserviert
Contig01885		Alkanhydroxylase
Contig4127	CYP80B	*(S)-N-Methylcoclorin 3'-Hydroxylase Isozym 2
Contig3362	CYP80B	*(S)-N-Methylcoclorin 3'-Hydroxylase Isozym 2
Contig3302	CYP80B	*(S)-N-Methylcoclorin 3'-Hydroxylase Isozym 2

Basierend auf diesen Kriterien wurde die Anzahl der Kandidaten auf zwölf reduziert (Tabelle 14).

Contigs 8530, 5260, 5285 und 02599 (Tabelle 14, grau hinterlegt) wurden bereits im Vorfeld untersucht (Dick, Barkowski unveröffentlicht) und zeigten keine Indol- oder Indolin-2-on-Hydroxylierung. Die restlichen Kandidaten wurden in Hefeexpressionsvektoren kloniert und heterolog exprimiert.

### 3.1.3 Expression der P450-Enzyme in Hefe

#### Eingesetzte NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen.

Der Hefestamm Wat11, der die induzierbare Cytochrom-P450-Oxidoreduktase AtP<sub>OR</sub>1 trägt, stellt das Standardexpressionssystem für pflanzliche P450s dar. Die Kandidatengene wurden in das Galaktose-induzierbare Expressionsvektorsystem (pGREG, pYeDP60) kloniert. WAT11 kann parallel mit verschiedenen pGREG-Vektoren die unterschiedliche Selektionsmarker tragen, transformiert werden (Jansen *et al.*, 2005). Die POR liefert nicht nur die Elektronen für die P450-Reaktionen sondern wird auch als Aggregationskern für die Bildung der Enzymkomplexe diskutiert. Um optimale P450-Aktivität für die *C. orientalis* Enzyme zu gewährleisten wurde die *C. orientalis* POR identifiziert und in Hefe kloniert. Dazu wurden POR Kandidaten aus dem *C. orientalis* Transkriptom mit findorfs command in

usearch v11 (Edgar, 2010) identifiziert und anhand eines Vergleichs mit einem Hidden Markov Modell der bekannten PORs gefiltert. Es wurden die beiden Kandidaten CoPOR12 und CoPOR14 identifiziert (Daniel Lang, persönliche Mitteilung). Ein multiples Alignment mit der Pflanzen NAPDH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase Datenbank (Jensen und Møller, 2010) und die Generierung einer Maximum Likelihood Phylogenie in RAxML (Stamatakis, 2014) zeigten, dass diese beiden eng miteinander verwandt sind. Außerdem sind sie phylogentisch nah verwandt zu einer Ferrihämoprotein Oxidoreduktase aus *Eschscholzia californica* Cham. (Ec\_CPR2) (Abbildung 5). Phylogenetische Analyse pflanzlicher PORs (Liste der PORs für Phylogenie im Anhang) zeigte, dass die *A. thaliana* PORs und die *C. orientalis* PORs unterschiedlichen Kladen angehören. CoPOR14 als höchst exprimiertes Gen wurde ausgewählt und in den pGREG504 Hefeexpressionsvektor kloniert. Die Koexpression mit den P450-Kandidaten erfolgte im BY4741 Hefestamm der keine Pflanzen POR besitzt.

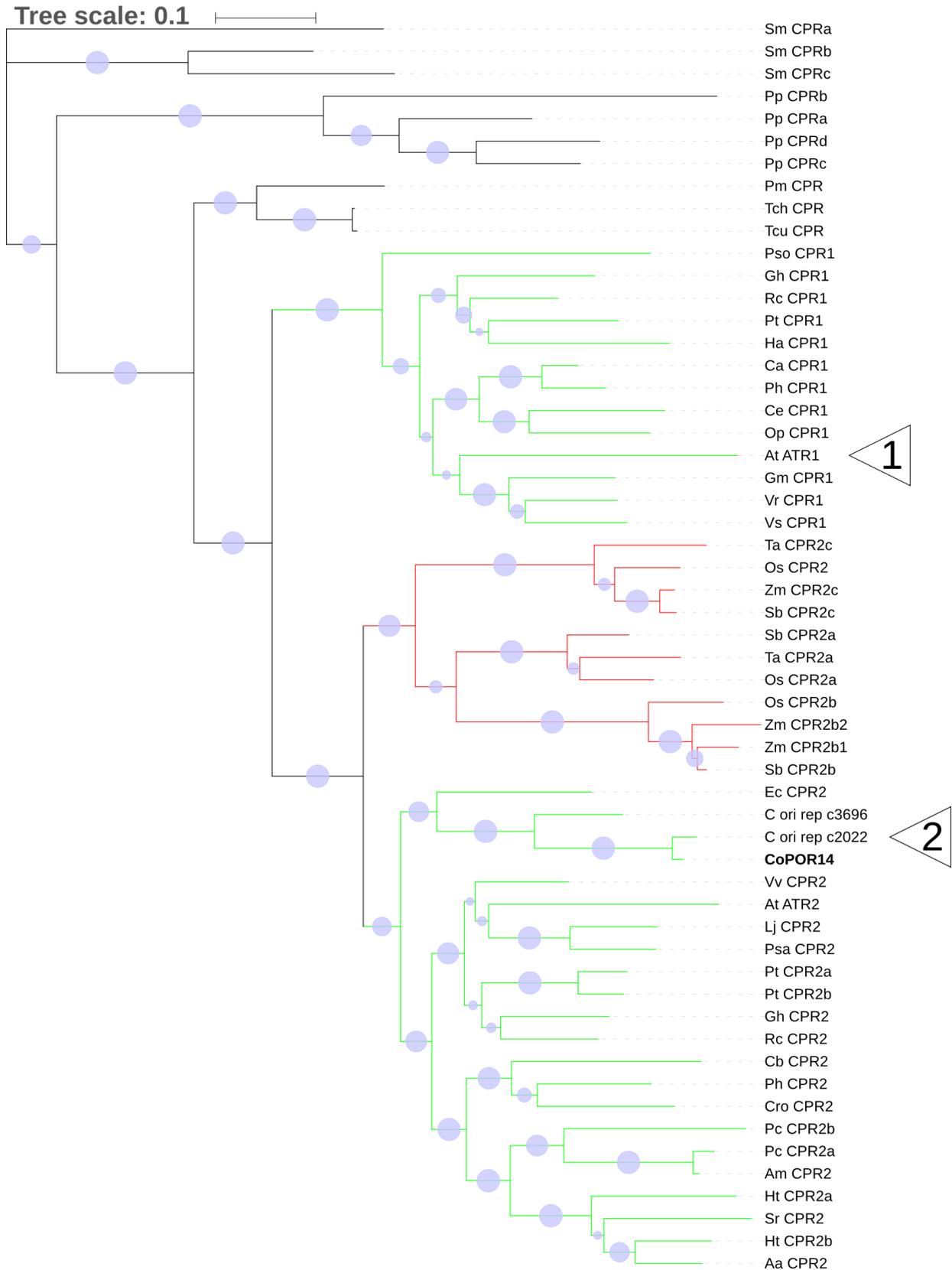


Abbildung 5: Phylogenie der PORs aus verschiedenen Pflanzen. Die Contigs C ori rep c3696 und C ori rep c2022 wurden aus dem Transkriptom mit findorfs identifiziert und mit einem HMM gefiltert (2). Basierend auf den lückenhaften, transkriptionalen Daten von C ori rep c2022 wurden Primer entworfen, und das vollständige CoPOR14 aus genomischer DNA isoliert und sequenziert (2). Das multiple Sequenz-Alignment und die Phylogenie wurden mit RAxML berechnet. AtPOR1 ist mit (1) markiert.

## Codonoptimierung

Um die Translation der *C. orientalis*-Gene im Hefesystem durch Angleichung des Codon-Gebrauchs zu verbessern, wurde bei den P450-Kandidaten Contig8863 und Contig4127 eine Optimierung der DNA-Sequenz auf die Hefecodonpräferenz durchgeführt. Es wurden jeweils ca. 500bp der Nukleotidsequenz am 5'-Ende modifiziert (siehe 2.2.6). Unmodifizierte und modifizierte Enzyme wurden in den verschiedenen Hefesystemen analysiert (Tabelle 15). Die funktionelle Isolierung der Mikrosomen wurde durch Bestimmung der Cytochrom C Reduktaseaktivität gezeigt.

## Substrate

Wie in 3.1.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass Indol Intermediat der BX-Biosynthese in *C. orientalis* ist und dass Indolin-2-on eventuell ein weiteres Substrat ist. Daher wurden beide Substrate auf Hydroxylierung durch Hefemikrosomen untersucht. Zusätzlich wurden die weiteren Intermediate des Biosynthesewegs in Mais, HION und HBOA, mindestens in einem Ansatz mit allen exprimierten Kandidaten getestet. Weitere Indolderivate sind als Ausgangssubstrat oder Intermediat denkbar. Ein Beispiel dafür ist Isatin, welches in der Indigobiosynthese von Pflanzen verwendet wird. Isatin wurde ebenfalls als Substrat eingesetzt. Das volle Substratspektrum erfasst damit Indol, Indolin-2-on, HION, HBOA und Isatin.

## Kombination von Genen im Hefesystem

Laursen *et al.*, 2016 vermuten, dass P450-Enzyme in einem sogenannten Metabolon organisiert sind. So wird zum Beispiel für die Dhurrinsynthese in der Mohrenhirse ein Komplex bestehend aus zwei P450 Enzymen vermutet, an dem auch die UGT und die Reduktase beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit alle P450-Kandidaten aus *C. orientalis* auch in Kombination mit CoBX8 im Hefesystem exprimiert (Tabelle 15). Enzyme der CYP80B-Subfamilie wurden auch in Kombination in Hefe exprimiert

Tabelle 15: Schema der Enzym-Kombinationen in heterologer Expression. Die Kandidaten wurden entweder in WAT11 mit der Arabidopsis-Reduktase oder in BY4741 mit CoPOR14 co-exprimiert. Außerdem erfolgte die Kombination von Kandidatengen. Alle Kandidaten und -Kombinationen wurden mit der UGT CoBX8 kombiniert. CYP80B Enzyme sind grau hinterlegt.

	Einzelgenexpression in Hefe mit den Reduktasen		Co-Expression der Einzelgene mit anderen Konstrukten			
	WAT11	pGREG504 CoPOR14	Contig4127	Contig3362	Contig3302	CoBX8
<b>Contig905</b>	x	x				x
<b>Contig5112</b>	x	x				x
<b>Contig2640</b>	x	x				x
<b>Contig01885</b>	x	x				x
<b>Contig8863</b>	x	x	x	x	x	x
<b>Contig4127</b>	x	x		x	x	x
<b>Contig3362</b>	x	x	x		x	x
<b>Contig3302</b>	x	x	x	x		x

Alle Mikrosomen wurden auf Hydroxylierung des Substratspektrums getestet. In der Analyse wurden die Bedingungen in Bezug auf Inkubationszeit und Substratkonzentrationen variiert (siehe 2.7.2). Für keines der Konstrukte und keine Kombination konnte Aktivität in Enzymassays für ein Substrat nachgewiesen werden.

## 3.2 Analysen zur Identifizierung von *Bx*-Genen in *L. galeobdolon*

### 3.2.1 Verifizierung von Gen-Assemblierungen des Transkriptoms

Bisher ist in der BX-Biosynthese von *L. galeobdolon* nur das Gen *Bx1* (*Lglg1*) charakterisiert (Schullehner *et al.*, 2008). In dieser Arbeit sollen die spezifische  $\beta$ -Glukosidase sowie die UDPG-abhängige Glukosyltransferase isoliert und charakterisiert werden. Die Identifikation beider Gene basierte auf den Transkriptomdaten. Der Datensatz war zu Beginn der Arbeiten vorhanden aber noch nicht analysiert. RNA war aus Blättern, Blüten und Adventivwurzeln gewonnen worden, in gleichen Mengen vereinigt und durch Random-priming cDNA wurden die Sequenzdaten gewonnen. Aus den 18-20 Millionen erzeugten paired-end-reads wurden Contigs generiert (2.2.8, Sapna Sharma, persönliche Mitteilung). Um die Qualität der Datenbank abschätzen zu können, wurden in diesen nach den Sequenzen der bereits isolierten *L. galeobdolon* Gene *Lglg1* und *Lglg2* gesucht (Schullehner *et al.*, 2008). Die Sequenzen waren vollständig und fehlerfrei vorhanden und somit wies der Datensatz

ausreichende Qualität für eine Genidentifizierung auf. 30 UDP-Glukosyltransferasen (UGTs) und vier  $\beta$ -Glukosidasen (BGLUs) wurden im Transkriptom identifiziert.

Die Kandidatengene wurden mittels PCR mit Blatt-cDNA als Matrize isoliert. Sequenzierung der PCR-Amplifikate zeigte Unterschiede zu den Kandidatengen-Sequenzen in der Transkriptom-Analyse auf. Diese könnten auf unterschiedliche Allele eines Gens, unterschiedlicher Gene oder auf Artefakte in der Assemblierung zurückzuführen sein. Aus diesem Grund sollten die aus dem Transkriptom entnommenen Kandidatensequenzen der BGLU und UGT durch zusätzliche unabhängige Sequenzanalyse verifiziert werden. Hierzu wurden die cDNA-Assemblierungsenden mittels 5' und 3' RACE und dem AIMS-Verfahren überprüft. (siehe Verfahren zur Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden 2.2.4.3) Zusätzlich wurden genomische Sequenzen durch paired-end read Sequenzierung gewonnen (siehe 2.2.9) und dienten zur Überprüfung der Contigs über die Gesamtlänge.

Anhand von 5'RACE und AIMS wurden die Sequenzen der ersten drei BGLU Kandidaten insbesondere im Bereich des Transkriptionstarts und des 3'Endes überprüft. So konnte die Qualität der Transkriptomdaten in diesen Bereichen bestätigt und die Sequenzen verifiziert werden (Abbildung 6).

**LgGLU1**

```
GAACCCGCAT AATTTCTCTT GTCTTCTTAT AACTAGTACG TAGGGGGCCA AACCAAATTA ATATCAGGAA AATTAACCT
GCATGCTAAT TAATTAGGAA TCAGCAATGC CATTGCCAAC TCAAACCTAT TACTTACTCG CTTTTCTTTT TCTTGTAATC
ATCATAAGTG CTGCAAAATCC CACATTGGAA TCTAAATGTG ATTGCTTCCA TTCATCCTTC AACCGTCGAA TCTTTCCTGC
TGATTTTGTG TTCGGCGCAG CATCATCGGC TTTTCAGGTC GAAGGTGCAT TTAAGGAAAA TGGAAGGGC CCAAGTA...
```

**LgGLU2**

```
TGGTCCCTTG ACCACGCGTA TCGATGTCGA CGAGATGAGT CCTGAAAGCT CAACCGAGTT TTGGGAACTC CGACGAATGA
TAACGAGGCT TTGCTCGTGA AAATCCGAAT TACAATGAAG GAAACTTTTG GCATACACTC ACGAGAGGAG GTAGTGAGGA
AGTTTGATAT CAGAAATCAA TCAAGATTAA TGGGGATTCT TGTGTTTTTT GTGGTAATTT GTTCAGCATT TGCAACCACA
GCTTTTGAT ATAAGTACGA CTTAGCTGAA TTCAATCGAA GTGGCTTCC ACCTGGCTTT CTTTTGGAG CTGCTTC...
```

**LgGLU3**

```
CAAAATTTGA TGCAAATAAG GTTGGATATA TTCAAAATGT TGGAAAATA ATAAAACATT TAACAAAATT ATCATATATA
TCCCAATGAA GGTAAGGTC TTTAAACCAT AGTTTATTG TCTATAAATA GATATGATAT TGTGTACCA CTTCACTCAA
TATTCAGACA CACCTTCAA CTTTGAAGAT CAGGCAAGCC TCAGTACTTT TGTTCCTTTG TGTTTACACT TTCGCTCTCA
TAAATGCTT CGCTATAATT CACGAGGAGA ATGGATGGCC GGAATCCACG GTGGAGTTCG ACATGGGAGG GCTGAGC...
```

**LgGLU4**

```
CCTCCACAT TCTCTATCCA CATCTCTTCC TCTCTCGATT ATTATTCAGT TTCAGTTTCA GTTCTTACCA CATATATAAA
CTTTGAAGGT CGAAAATAAA ATAAAGAAA GAATGTTTGA GAGGAAAGGT TTAATATTTG GATTTATTAT TGTGGTGTTT
GGTGCAATTT CAAATATATG TGAATGTGAT GGTGAGAACA TCAGTAGAGC AAGTTTCCA AAGGGCTTTG TTTTGGGAC
TGCATCTTCT GCTTATCAGT ATGAAGGAGC TGTTAAAGAG GATGGAAGGG GTCAAACAAT ATGGGACACA TTTGCTC...
```

Abbildung 6: 5'-Bereich der vier *LgBGLU* Kandidaten aus dem *L. galeobdolon* Transkriptom. Das Startcodon ist mit einem Rechteck markiert. Das zweite inframe Startcodon bei *LgGLU3* ist mit einem gestrichelten Rechteck markiert. Unterstrichene Abschnitte bei *LgGLU1*, *LgGLU2* und *LgGLU3* konnten durch 5'RACE und AIMS bestätigt werden. Sequenzabschnitte in schwarzer Schrift konnten anhand der genomischen Sequenzierung bestätigt werden.

Für die Verifizierung des vierten BGLU Kandidaten, sowie der Kandidaten der UGTs aus *L. galeobdolon*, wurden die Transkriptomsequenzen manuell mit dem erzeugten

genomischem Datensatz verglichen. Dieser wurde basierend auf der Methode von Howard III *et al.*, 2014 generiert. Dazu wurde genomische DNA isoliert, mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen mit 4-Basen-Erkennungssequenzen (siehe 2.2.9) fragmentiert und dem Standardverfahren zur Paired-end-Sequenzierung (Illumina HiSeq2500) unterzogen. Bei diesem Verfahren ist die Genomabdeckung gering und eventuell durch einen Bias der Verteilung von Restriktionsstellen ungleich verteilt. Ein Ausgleich wurde durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme erreicht, Ungleichverteilung ist aber auch erwünscht, da davon ausgegangen werden kann, dass vor allem repetitive Sequenzen Fragmente von für die Sequenzierung unbrauchbarer Größe liefern. Die Sequenzen wurden nicht für ein *de novo* Alignment benutzt, es wurden „reads“ (126 bp ohne Adaptor-Sequenz pro Fragment-Ende) übereinstimmend mit den ausgewählten Contigs identifiziert. Beide Enden eines „reads“ wurden genutzt um die Sequenzen zu verlängern. Die so erhaltenen genomischen Contigs wurden mit der Zielsequenz aus dem Transkriptom verglichen (Abbildung 7).

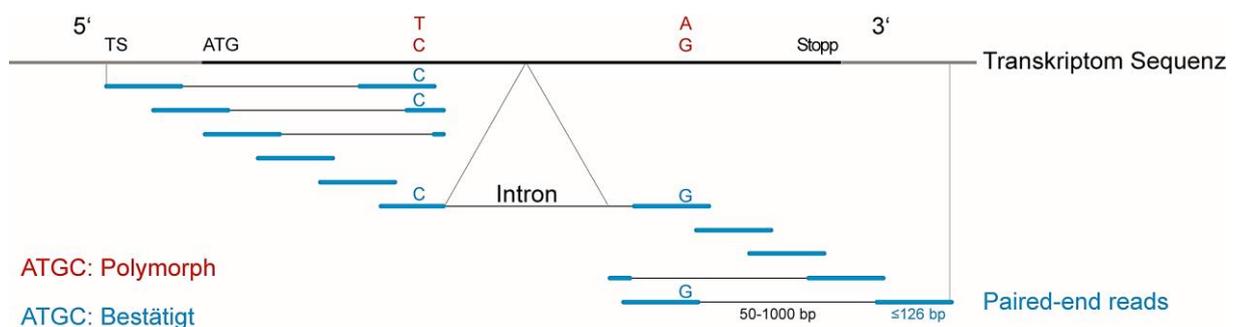


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Alignment der Illumina HiSeq 2500 paired-end reads nach Howard III *et al.*, 2014. Ungenauigkeiten an 5' Ende, Transkriptionsstart (TS) und Startcodon (ATG), und 3' Ende konnten aufgefüllt werden, Polymorphe Basenpaare konnten bestätigt werden und Introns wurden lokalisiert.

Durch die Analyse konnte sowohl das „in frame“ Startcodon von *LgGLU3*, sowie Transkriptionsstarts und Stopps aller vier BGLU Kandidatensequenzen verifiziert werden (Abbildung 7, schwarzgedruckte Sequenzabschnitte). Einzelne Nukleotide, die im Transkriptom nicht eindeutig bestimmbar waren, konnten verifiziert werden und auch die Lage von Introns konnte bestimmt werden (Vollständige, verifizierte Sequenzen im Anhang).

Die Sequenzen der vier BGLU Kandidaten waren somit bestätigt und konnten für Klonierung und Expression verwendet werden. Auch für die UGT Kandidaten konnten Bereiche am 5' Ende der Gensequenzen um den Transkriptionsstart (TS) sowie am 3' Ende der Kandidatensequenzen bestätigt werden.

### 3.2.2 Enzyme der Detoxifizierung und Bioaktivierung der Benzoxazinoide in *L. galeobdolon*

Für *L. galeobdolon* werden hauptsächlich zwei Sekundärmetabolitklassen beschrieben, Benzoxazinoide und Iridoide (Alipieva *et al.*, 2003; Schullehner *et al.*, 2008). Beide Metabolitenklassen, gehört zu den Zwei-Komponenten-Abwehrstoffen, das heißt die Metabolite werden durch Glykosylierung stabilisiert und aktiviert durch BGLUs. Hauptvertreter der BX ist in *L. galeobdolon* 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIBOA), bzw. sein Glukosid; an Iridoiden findet sich in den Lamiales hauptsächlich Harpagid. Dies wurde in den vorgenommenen Analysen bestätigt (Tabelle 16). Aus schockgefrorenen Blättern wurden die Metabolite in glykosyliertem Zustand isoliert, Aglukone wurden nach Inkubation bei Raumtemperatur isoliert. Die Quantifizierung erfolgte durch HPLC und LC-MS.

Tabelle 16: Konzentration der Metaboliten in unverletzten *L. galeobdolon* Material und nach Hydrolyse. \*nicht analysierbar

Metabolit	Konzentration [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG]	
	nativ	nach Hydrolyse
GDIBOA	9,49	0,01
DIBOA	0,04	3,94
Harpagid	0,43	na*

Dabei zeigte sich, dass das Benzoxazinoid GDIBOA in höchsten Konzentrationen vorkommt (Tabelle 16). Seine Konzentration war 20-fach höher, als die des Iridoids (ca.  $9.5 \mu\text{mol/g}$  Frischgewicht GDIBOA;  $0,4 \mu\text{mol/g}$  Frischgewicht Harpagid). Das Aglukon DIBOA konnte hingegen kaum in nativen Proben nachgewiesen werden. Wurde das Pflanzenmaterial vor der Probenentnahme zerrieben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, war das Glukosid nur noch in geringster Menge nachweisbar. Dies zeigt, dass DIBOA-UGT(s) und spezifische BGLU(s) in *C. orientalis* Blättern vorhanden sein müssen.

### 3.2.3 Untersuchung von *L. galeobdolon* UDP-Glukosyltransferasen

DIBOA-Glukosylierung wurde zuvor mehrfach gezeigt (Dick *et al.*, 2012; von Rad *et al.*, 2001). Enzymatische Daten von Rohextrakten aus *Z. mays*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon* mit DIBOA als Substrat bestätigten die UGT-Aktivität in Blättern (Tabelle 17).

Tabelle 17: Glykosylierung von DIBOA im Rohextrakte aus Benzoxazinoid-bildenden Pflanzen. 150-200  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden mit 500  $\mu\text{M}$  DIBOA und 1 mM UDPG bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 Minuten inkubiert.

Proteinextrakt	<i>L. galeobdolon</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>Z. mays</i>
Enzymaktivität [nmol/min*mg]	5,9	2,6	1,7

Bezogen auf die Gesamtproteinmenge wies der *L. galeobdolon*-Rohextrakt die höchste DIBOA-Glukosyltransferase-Aktivität auf.

### **3.2.3.1 Auswahl von UGT Kandidaten für die BX8-Funktion von *L. galeobdolon*.**

Die Benzoxazinoid-UDP-Glukosyltransferasen konnten bisher aus *Z. mays* (*ZmBX8* und *ZmBX9*, von Rad *et al.*, 2001) und *C. orientalis* (*CoBX8*, Dick *et al.*, 2012) nach funktioneller Reinigung in Kombination von Proteom- und Transkriptomdaten isoliert und charakterisiert werden. Für die DIBOA-UGT aus *L. galeobdolon* lagen Daten aus funktioneller Reinigung von UGT-Enzymen vor (Dick, 2010). Das gereinigte Protein wurde zur Peptid-Sequenzierung eingesetzt.

30 Kandidaten für UGTs konnten insgesamt im *L. galeobdolon* Transkriptom identifiziert werden. Die resultierenden Aminosäure-Sequenzen wurden mit den Peptidsequenzen der funktionellen Proteinreinigung verglichen (Julia Mergner, persönliche Mitteilung). Peptide aus der Enzymreinigung stimmen mit Sequenzen der Kandidaten UGT11, UGT27 und UGT28 überein.

### **3.2.3.2 Funktionstest von UGT Proteinen durch heterologe Expression**

Für die Expression der UDPG-abhängigen Glukosyltransferasen konnte auf etablierte Systeme zurückgegriffen werden. Einerseits standen für die heterologe Expression in *E. coli* zwei Vektorensysteme zur Verfügung, die eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch verschiedene Tags ermöglichen. Die stabile transgene Expression in *A. thaliana* würde eine Pflanzen-spezifische Modifikation gewährleisten, die allerdings bisher für UGTs nicht beschrieben wurde. Dennoch wurde die Expression von Kandidatengen auch in *A. thaliana* ausgeführt.

Für die Bestimmung der enzymatischen Funktion wurden die UGT Kandidaten UGT11, UGT27 und UGT28 rekombinant in *E. coli* mit N-terminalen His-Tag und GST-Tag exprimiert (siehe 2.4.5). Mit dem pGEX-4T1 Vektor exprimierte Enzyme tragen ein N-terminales GST-Tag, während die Aufreinigung der pET28a Konstrukte über His-Tag erfolgt. Die erfolgreiche Expression und Reinigung konnte jeweils durch SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abbildung 8, Beispiel Expression mit GST-Tag).

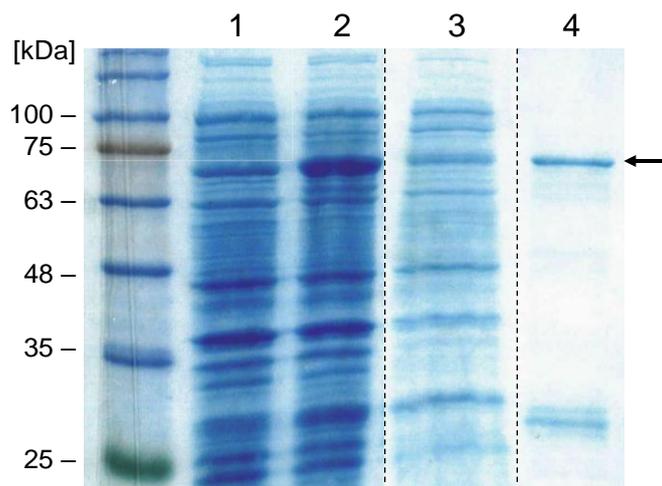


Abbildung 8: Heterologe Expression von UGT11 mit GST-Tag in *E. coli* BL21 DE3, analysiert durch PAGE. Die Bande des rekombinanten Proteins ist mit Pfeil markiert. Spur 1 Molekulargewichtsmarker, Spur 2 uninduziertes Gesamtzymbprobe, Spur 3 induziertes Gesamtzym, Spur 4 Durchlauf nach GST-Agarose Säule, Spur 5 Eluat der Reinigung.

In beiden bakteriellen Expressionssystemen gelang die Produktion der Enzyme. Außerdem wurden die Kandidatengene in die Pflanzentransformationsvektoren pBAR kloniert und transgene *A. thaliana* erzeugt (Tabelle 18). Die transkriptionale Expression in den transgenen Pflanzen konnte über RT-PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die heterolog exprimierte UGT-Kandidaten wurden in Enzymassays getestet.

Tabelle 18: Verschiedene Methoden der Expression für die *LgUGT*-Kandidaten

	<i>LgUGT11</i>	<i>LgUGT27</i>	<i>LgUGT28</i>
Expression His-Tag	x	x	x
Expression GST-Tag	x		
Transgene Expression in <i>A. thaliana</i>	x	x	

Die Analysen wurden mit Rohextrakt aus *L. galeobdolon* als Positivkontrolle durchgeführt. 5-50 µg gereinigtes Enzym wurde mit 500 µM DIBOA und 1 mM UDPG bei 37°C für 5-30 Minuten inkubiert. Dabei konnte für keinen der drei Kandidaten Aktivität nachgewiesen werden.

Für die Expression der UDPG-Glukosyltransferasen in transgenen *A. thaliana* kann der Nachweis der Aktivität durch DIBOA-UGT-Entgiftung von mit DIBOA angereichertem Medium erbracht werden (Dick *et al.*, 2012; von Rad *et al.*, 2001). Vier Tage alte transgene *A. thaliana* Keimlinge wurden in DIBOA-haltigem Medium auf ihre Entgiftungsfähigkeit untersucht. Die Keimlinge wurden in Konzentrationen von 0-1 mM DIBOA für 2-4 Tage inkubiert und ihre Vitalität evaluiert (Abbildung 9). Als Negativkontrolle wurden zum Vergleich

nicht-transgene *A. thaliana* Keimlinge herangezogen, als Positivkontrolle dienten transgene CoBX8 Pflanzen (Dick, 2010). Die UGT-exprimierenden Pflanzen unterschieden sich nicht von der Negativkontrolle.

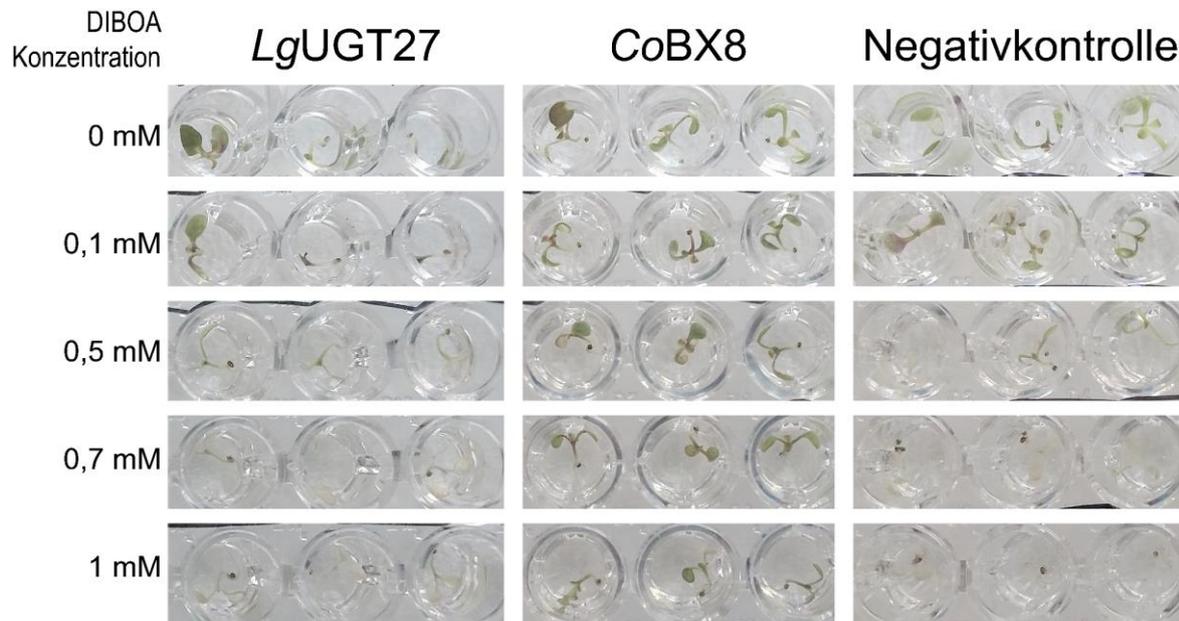


Abbildung 9: Entgiftungsversuch der transgenen Arabidopsis Keimlinge in DIBOA-haltigem Medium nach 4 Tagen. Negativkontrolle: nicht-transgene *A. thaliana* Keimlinge; CoBX8: Positivkontrolle

Für keinen der Kandidaten konnte ein Nachweis auf DIBOA-Glukosyltransferase Aktivität erbracht werden. *LgUGT11*, *LgUGT27* und *LgUGT28* können als DIBOA-Glukosyltransferase ausgeschlossen werden.

Für die weiteren 27 im Transkriptom identifizierte UGTs gibt es keine passenden Peptid-Sequenzen. Das *LgBX8*-Gen kann nicht aus dem Transkriptom oder nicht durch die Peptidsequenzen identifiziert werden.

### 3.2.4 Charakterisierung der *L. galeobdolon* BGLUs

Ein integraler Teil für die Wirksamkeit der BXs und der Iridoide in der Pflanzenabwehr ist die Aktivierung der Glukoside. Die beteiligten  $\beta$ -Glukosidasen spielen damit eine wichtige Rolle im Biosyntheseweg. *BGlus* bilden in Pflanzen Genfamilien, sie katalysieren Reaktionen des Primärstoffwechsels (Zellwandbiosynthese, Hormonhomeostase) und des Sekundärmetabolismus.

Im Folgenden wird die Charakterisierung der *L. galeobdolon*  $\beta$ -Glukosidasen und die Identifizierung von *LgGLU1* als GDIBOA-hydrolysierendes Enzym beschrieben. Teile der

Daten sind in Hannemann *et al.*, 2018 beschrieben und Abbildungen sind aus der Veröffentlichung übernommen.

### 3.2.4.1 Identifizierung von Benzoxazinoid-Glukosid $\beta$ -Glukosidase Kandidaten

Gensequenzen Kandidaten für die Benzoxazinoidglukosid  $\beta$ -Glukosidasen aus *L. galeobdolon* wurden aus den zuvor generierten Transkriptomdaten identifiziert

Basierend auf veröffentlichten BGLU-Sequenzen von Monokotyledonen und Dikotyledonen (Dick *et al.*, 2012; Rouyi *et al.*, 2014) wurden die Transkriptomdaten mit einer Blast-Suche nach mutmaßlichen *BGlu*-Genen durchsucht. Es konnten vier vollständige Gensequenzen mit der Bezeichnung *LgGlu1* bis *LgGlu4* identifiziert werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Charakteristika der BGLUs aus *L. galeobdolon*

Enzym	AS	SignalP-4.1 Signalpeptidvorhersage (vorhergesagte Schnittstelle)	Zucker Bindemotiv	Accession
		WoLF PSORT Vorhersage		
<i>LgGLU1</i>	532	JA (22/23) Sekretion	Glukose	MH271221
<i>LgGLU2</i>	501	JA (20/21) Zytoplasma/ Sekretion	Glukose	MH271222
<i>LgGLU3</i>	533 (515*)	Mito/Plastid (40) Mitochondrium JA* (16) Vakuole*	Mannose	MH271223
<i>LgGLU4</i>	504	JA (27/28) E.R.	Glukose	MH271224

Die Gensequenzen codierten Proteine einer Länge von rund 500 Aminosäuren. Für alle vier wurden Signalpeptide durch iPSORT und WoLF PSORT vorhergesagt (Bannai *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2007). *LgGLU1* und *LgGLU2* haben vermutlich Signalpeptide für den Transport aus der Zelle. WoLF PSORT gab eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum für *LgGLU4* an. *LgGLU3* unterschied sich von den anderen Kandidaten, es hatte zwei potentielle in-frame Startcodons und kann möglicherweise zwei Proteine codieren, die sich in 18 Aminosäuren Länge unterscheiden. Eine Lokalisation in Mitochondrien oder Plastiden

durch iPSORT und WoLF PSORT wurde für die längere Version vorhergesagt. Das kürzere Protein hat ein mutmaßliches Signalpeptid für den Transport in den Sekretionsweg oder die Vakuole.

Anhand des Vergleichs des aktiven Zentrums konnte eine Vorhersage über die Zuckerbindespezifität getroffen werden. Die bei Glukosidasen hochkonservierten Motive TFNEP und I/VTENG waren bei den drei Enzyme *LgGLU1*, *LgGLU2* und *LgGLU4* vorhanden. *LgGLU3* unterschied sich von den anderen Enzymen durch seine Mannosidase-Signatur L(S/A)ENG im aktiven Zentrum.

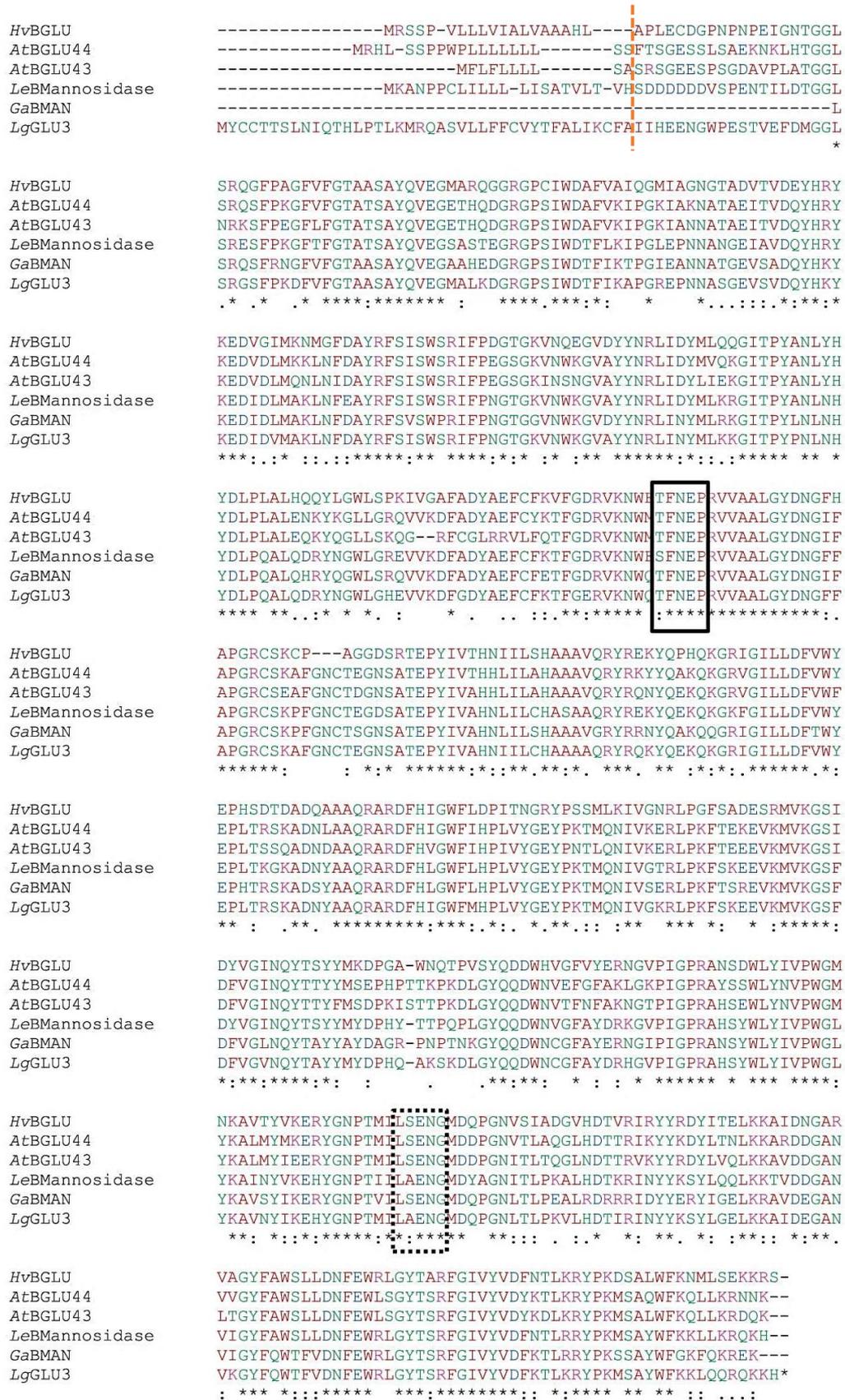


Abbildung 10: Alignment verschiedener Mannosidasen (*Hv*: *Hordeum vulgare*, *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Le*: *Lycopersicon esculentum*, *Ga*: *Genlisea aurea*, *Lg*: *Lamium galeobdolon*). Die rote gestrichelte Linie symbolisiert die Abspaltung des Signalpeptids am Aminoterminus in *LgBGLU3*. Der schwarzumrandete Bereich ist der konservierte Glutamatrest im katalytischen Zentrum in allen fünf

Enzymen (TFNEP). Der gestrichelt umrandete Bereich zeigt Region des katalytischen Glutamats welches die Mannosidasen charakterisiert (LSENG für *AfBGLU44*, 43 und *G. aurea*, *H. vulgare* Mannosidase, LAENG für *LgGLU3* und *L. esculentum* Mannosidase)

Das Alignment von *LgGLU3* mit biochemisch definierter Mannosidase (*AfBGLU44*, Xu *et al.*, 2004) zeigte die Übereinstimmung des Mannosidase-typischen Motivs im aktiven Zentrum (Abbildung 10). Andere putative Mannosidasen aus den Lamiales-Pflanzen weisen die gleiche Sequenz auf. Damit unterschied sich *LgGLU3* in diesem Punkt von den anderen *LgGLU* Genen. Alle vier  $\beta$ -Glukosidasen aus *L. galeobdolon* Blättern entsprachen in Bezug auf Aminosäurenlänge und -sequenz, einschließlich aktiven Zentrums und Lokalisationssignalen den bekannten BGLUs.

### 3.2.4.2 Expressionsdaten

Die Expression der vier *BGlu*-Gene aus *L. galeobdolon* wurde in verschiedenen Pflanzenorganen durch RT-PCR analysiert (Abbildung 11). In Blättern, Blüten und Wurzeln wurden die Expressionsniveaus mit dem „housekeeping“-Gen GAPDH normiert und sind im Folgenden in pg Transkriptmenge zu pg GAPDH-Menge angegeben. Das „steady-state“ Transkriptionslevel von *LgGlu1* lag in allen Organen bei 0,05 pg/pg. Auch die Expression von *LgGlu4* bewegte sich in diesem Rahmen. Von den vier Genen wies *LgGlu3* die höchsten Steady-State Transkriptlevel in den Blüten (0,3 pg/pg) und Wurzeln (0,4 pg/pg) auf. Für *LgGlu2* wurde das niedrigste Expressionsniveau für die Wurzel bestimmt, es liegt an der Nachweisgrenze. In Blüten und Blätter wurden für *LgGlu2* beträchtliche Transkriptmengen gefunden. Jedoch trat in Blättern eine extreme Variation der Transkriptniveaus auf; in einzelnen biologischen Replikaten wurde der Wert der GAPDH-Transkripte erreicht. Was diese Variabilität der Expression in den Blättern verursacht, ist unbekannt. *LgGlu1* wurde in allen Geweben in moderater Konzentration gefunden, Unterschiede waren nicht signifikant. Auf noch niedrigerem Niveau galt dies für *LgGlu4*.

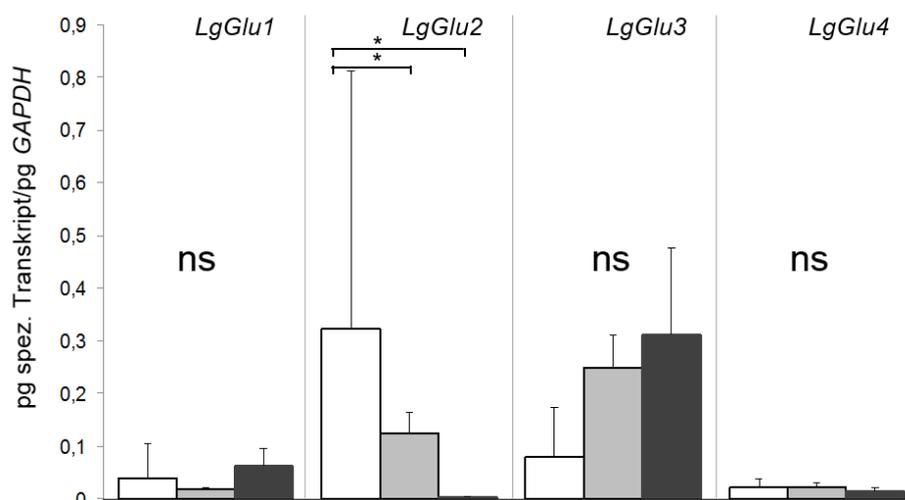


Abbildung 11: Steady State RNA-Level der *LgGlu*s. Expression in Blättern (weiße Balken), Blüten (hellgraue Balken) und Wurzeln (dunkelgraue Balken). Alle Werte sind auf GAPDH-Expression

normiert. Die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten für Blüte und Wurzel und neun Replikaten für Blätter sind dargestellt. Die Standardabweichung ist angegeben. Signifikante Unterschiede in den Geweben wurden für *LgGlu2* erhalten ( $p < 0,05$ ). Blätter und Blüten, Blätter und Wurzeln unterscheiden sich signifikant. Zwischen den Genen gibt es ebenfalls signifikante Unterschiede in Bezug auf Expression in den verschiedenen Geweben. Expression in den Blättern ist höher für *LgGlu2* im Vergleich zu den anderen Genen ( $p < 0,001$  *LgGlu1*, *LgGlu4*,  $p < 0,01$  für *LgGlu3*). *LgGlu3* hat die höchste mRNA Konzentration in den Blüten, der Unterschied ist signifikant im Vergleich zu *LgGlu1* und *LgGlu4* ( $p < 0,01$ ). Transkriptlevel in den Wurzeln sind für *LgGlu3* am höchsten, der Unterschied ist mit  $p < 0,05$  signifikant im Vergleich zu den anderen Genen. Statistische Analysen wurden mit R Suite durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA berechnet, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

Um einen möglichen Einfluss von mechanischer Schädigung auf die Genexpression zu untersuchen, wurden Blätter verwundet, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und RNA isoliert (Abbildung 12). Nur für *LgGlu4* wurde ein Einfluss von Verwundung auf das mRNA-Level nachgewiesen. Die RNA-Menge erreichte 6 Stunden nach der Schädigung einen Peak mit etwa 20-fach erhöhter Transkriptmenge.

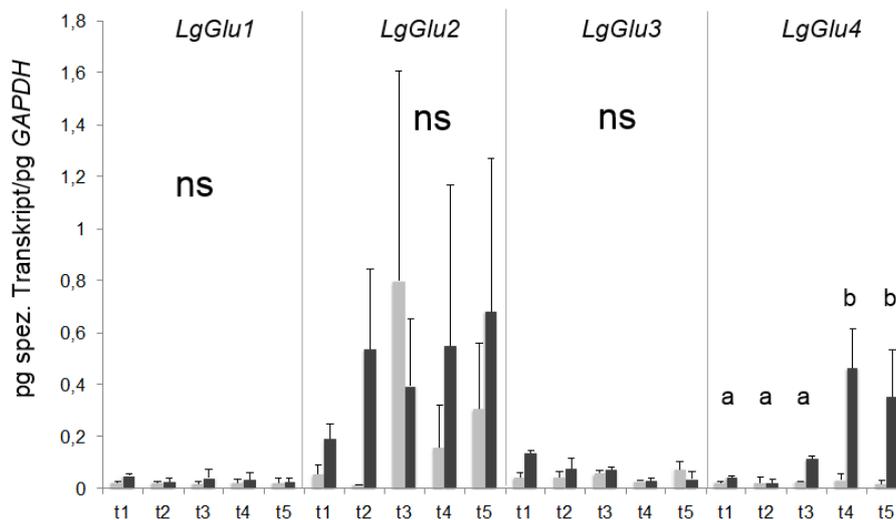


Abbildung 12: Steady State RNA-Level der *LgGlus* nach Verwundung. Hellgraue Balken, Kontrolle; dunkelgraue Balken, verwundete Blätter. Alle Werte sind auf GAPDH-Expression normiert. Die Mittelwerte von zwölf Replikaten werden angezeigt. Die Standardabweichung ist angegeben. t1: 2 min, t2: 30 min, t3: 60 min, t4: 240 min, t5: 360 min. Verwundung der Blätter verursacht signifikante Unterschiede im Fall von *LgGlu4*. Der Anstieg in den Transkriptleveln nach Verwundung zu den Zeitpunkten t4 und t5 ist signifikant ( $p < 0,001$ ). Statistische Analysen wurden mit R Suite durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA berechnet, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

### 3.2.4.3 Transgene Expression der $\beta$ -Glukosidase-Gene in *N. benthamiana*

Obwohl die  $\beta$ -Glukosidasen von monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen strukturell sehr konserviert sind, gibt es doch Unterschiede zwischen den Gruppen. BGLUs aus dikotyledonen Pflanzen sind meist nur in glykosylierter Form aktiv. Durch diese Modifikation wird ihre Stabilität erhöht (Morant *et al.*, 2008). In *E. coli* ist die korrekte Modifikation posttranslational nicht garantiert. *E. coli* ist daher kein zuverlässiges Expressionssystem für diese pflanzlichen Glukosidasen, das Protein ist oft inaktiv und unlöslich. Durch die transiente Expression *in planta* hingegen kann eine Glykosylierung der exprimierten Proteine

gewährleistet werden. Ein auf *Magnifection* basierendes Expressionssystem (Marillonnet *et al.*, 2005) wurde bereits erfolgreich in *N. benthamiana* zur Charakterisierung von CoGLU verwendet (Dick *et al.*, 2012). Die Expressionskonstrukte mit den identifizierten und verifizierten Sequenzen der BGLUs wurde mit diesem System durch Infiltration von Agrobakterien in die Pflanzen gebracht werden.

Bachmair *et al.*, 1986 zeigten, dass die Stabilität und Halbwertszeit eines Proteins auch von seiner N-terminalen Sequenz abhängt. Aminosäuresequenzen beginnend mit der Folge Methionin-Prolin oder Methionin-Arginin zeigten sich dabei als besonders kurzlebig. Diese N-terminale Sequenz findet sich bei den Kandidaten *LgGLU1* und *LgGLU3* (Abbildung 13, *LgGLU1* und *LgGLU3*). Um die transient exprimierten Enzyme in den Pflanzen zu stabilisieren, wurden jeweils modifizierte Versionen entworfen, synthetisiert und im Vergleich zu unmodifizierten Versionen getestet (Abbildung 13 modifiziert). Durch das zusätzliche Einfügen einzelner Alanin-Reste sollte die Halbwertszeit der Proteine bei Expression in Pflanzen erhöht werden.

Wie in 3.2.4.1 beschrieben, waren für *LgGLU3* zwei Aminosäuresequenz denkbar. Um die am N-Terminus verkürzte Variante zu untersuchen, wurde der Beginn der modifizierten Version von *LgGLU3* erst am zweiten in-frame Startcodon gesetzt. Die um 18 Aminosäuren kürzere Version des Enzyms sollte ebenfalls durch ein eingefügtes Alanin nach dem Startcodon stabilisiert werden.

<b>LgGLU1</b>	1	MPLPTQTYYL	LAFLEFLVIII	SAANPTLESK	CDCFHSSFNR	RIFPADFVFG	AASSAFQVEG	AFKENGKGPS
	71	MWDNFTHMCP	EKIKDHSNGD	IAIDSYHLYK	EDVKIARDLG	LDAYRISISW	PRILPGGKIE	AGVNQDGDIDY
	141	YNNLINELLA	NGIEPFVTLT	HLDIPLALQD	AYGGFLNSQI	VDFVDFANI	LFQQFGDRVK	NWITINEPWT
	211	LSVYGYANSY	FAPGRCSEWQ	QLGCTGGDSA	TEPYIVAHHQ	LLAHSALVNL	YKNKYQAWQK	GKIGITFASY
	281	WVFVPLDET	NLKAKDRALD	FMLGWFMPEL	TSGYYPESMK	MRVGDRLPEF	TENERKMMKG	SDFDFIGFNYY
	351	GAIYAFNKP	SSSSSYTTDA	EFEITGTRDG	KATGEQGRNT	SRIYIYPKGL	YQILKLFKER	YNDPLIYITE
	421	NGLDEANET	LEVSEAIKDN	MRKHYYDHL	CCLHKSIEED	ATNVKGYFVW	SLMDNFEWSA	GFSVRFGLNY
491	VDYKDKFLTR	YPKHSAMWFK	DFLSIQHNLP	MNLNSSKMLY	AM*			
<b>modifiziert</b>	1	<u>MA</u> PLPTQTY	YLLAFLEFLVI	IISAANPTLE	SKDCFHSSF	NRRIFPADFV	FGAASSAFQV	EGAFKENGKG
	71	PSMWDNFTHM	CPEKIKDHSN	GDIADSYHL	YKEDVKIARD	LGLDAYRISI	SWPRILPGGK	IEAGVNQDGI
	141	DYNNLINEL	LANGIEPFVT	LLHLDIPLAL	QDAYGGFLNS	QIVTDFVDFA	NILFQQFGDR	VKNWITINEP
	211	WTLVYGYAN	SYFAPGRCSE	WQQLGCTGGD	SATEPYIVAH	HQLLAHSALV	NLYKNKYQAW	QKKGIGITFA
	281	SYWVPLDET	NENLKAKDRA	LDFMLGWFM	PLTSGYYPES	MKMRVGDRLP	EFTENERKMM	KGSDFDFIGF
	351	YYGAIYAFN	PNSSSSSYTT	DAEFEITGTR	DGKAIGEQR	NTSRIYIYPK	GLYQILKLFK	ERYNDPLIYI
	421	TENGLDEAAN	ETLEVSEAIK	DNMRKHYYD	HLCCLHKSIE	EDATNVKGYF	VWSLMDNFEW	SAGFSVRFGL
491	NYVDYKDKFL	TRYPKHSAMW	FKDFLSIQHN	LPMNLNSSKM	LYAM*			
<b>LgGLU3</b>	1	MYCCTTSLNI	QTHLPTLKMR	QASVLLFFCV	YTFALIKCFA	IIHEENGWPE	STVEFDMGGL	SRGSFPKDFV
	71	FGTAASAYQV	EGMALKDGRG	PSIWDTFIKA	PGREPNNASG	EVSVDQYHKY	KEDIDVMAKL	NFDAYRFSIS
	141	WSRIFPNGTG	KVNWKGVAYY	NRLINYMMLK	GITPYPNLNH	YDLPQALQDR	YNGWLGHEVV	KDFGDYAEFC
	211	FKTFGERVKN	WQTFNEPRVV	AALGYDNGFF	APGRCSKAFG	NCTEGNSATE	PYIVAHNIIL	CHAAAAQRYP
	281	QKYQEKQKGR	IGILLDFVWY	EPLTRSKADN	YAAQRARDFH	IGWFMHPLVY	GEYPKTMQNI	VGKRLPKFSK
	351	EEVKMVKGSF	DFVGVNQYTA	YYMYDPHQAK	SKDLGYQQDW	NCGFAYDRHG	VPIGPRAHSY	WLYIVPWGLY
	421	KAVNYIKEHY	GNPTMILAEN	GMDQPGNLT	PKVLHDTIRI	NYKSYLGEL	KKAIDEGANV	KGYFQWTFVD
491	NFEWRLGYTS	RFGIVYVDFK	TLKRYPKMSA	YWFKKLQQRQ	KKH*			
<b>modifiziert</b>	1	<u>MA</u> RQASVLLF	FCVYTFALIK	CFAIIEHEENG	WPESTVEFDM	GGLSRGSFPK	DFVFGTAASA	YQVEGMALKD
	71	GRGPSIWDTF	IKAPGREPNN	ASGEVSVDQY	HKYKEDIDVM	AKLNFDAYRF	SISWSRIFPN	GTGKVNWKGV
	141	AYYNNRLINYM	LKKGITPYPN	LNHYDLQPAL	QDRYNGWLGH	EVVKDFGDYA	EFCFKTFGER	VKNWQTFNEP
	211	RVVAALGYDN	GFFAPGRCSK	AFGNCTEGNS	ATEPYIVAHN	IILCHAAAAQ	RYRQKYQEKQ	KGRIGILLDF
	281	VWYEPLTRSK	ADNYAAQRAR	DFHIGWFMHP	LVYGEYPKTM	QNIIVGKRLPK	FSKEEVKMKV	GSFDFVGVNQ
	351	YTAYMYDPH	QAKSKDLGYQ	QDWNCGFAYD	RHGVPIGPRA	HSYWLIVPW	GLYKAVNYIK	EHYGNPTMIL
	421	AENGMQDPGN	LTLPKVLHDT	IRINYYKSYL	GELKKAIDEG	ANVKGYFQWT	FVDNFEWRLG	YTSRFGIVYV
491	DFKTLKRYPK	MSAYWFKKLQ	QRQKKH*					

Abbildung 13: Aminosäuresequenzen von LgGLU1 und LgGLU3 mit Modifikationen. LgGLU1 wurde durch zwei Ala-Reste nach dem Start erweitert, Für LgGLU3 wurde eine Version erzeugt, die mit dem zweiten möglichen Startcodon (unterstrichen) beginnt und bei der zusätzlich ein Alanin (rot) eingefügt wurde.

Die Konstrukte wurden in das TMV Vektorsystem kloniert und in *N. benthamiana* transformiert. Unmodifizierte Versionen der Kandidaten im viralen Replikon-System führten zur Expression der entsprechenden Enzymen (LgGLU1, 2 und 4) als am höchstem exprimierte Enzyme in den infizierten Blättern (Abbildung 14). Die Expression von LgGLU3 war nicht erfolgreich. Auch die modifizierten Konstrukte von LgGLU3 führten nicht zur heterologen Expression. CoGLU wurde in den folgenden Analysen als Positivkontrolle parallel exprimiert und analysiert.

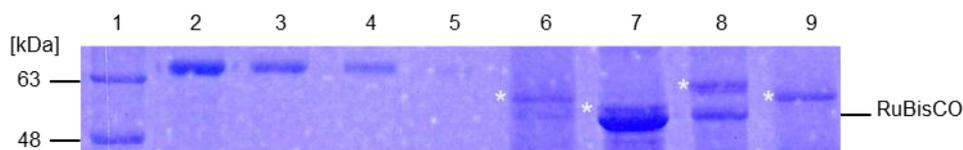


Abbildung 14: Heterologe Expression von Proteinen durch Magnifikation. Expression von LgGLUs in *Nicotiana benthamiana*, analysiert durch PAGE. Die rekombinanten Proteine sind mit Sternchen markiert. Die Position der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase ist angegeben. Definierte Mengen von BSA wurden zum Vergleich einbezogen. Spur 1 Molekulargewichtsmarker, Spur 2 bis 5 Rindereserumalbumin 2 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,1 µg. Spuren 6 bis 8 LgGLU1, LgGLU2, LgGLU4, Spur 9 CoGLU.

Definierte Mengen von Rinderserumalbumin (BSA) konnten herangezogen werden, um die heterologen Enzymmengen im Pflanzenextrakt zu bestimmen.

### **3.2.4.4 Charakterisierung der heterolog exprimierten BGLU Kandidaten**

Anhand von *para*-Nitrophenyl-Zuckern, artifiziellen Substraten deren *para*-Nitrophenol Abspaltung photometrisch nachweisbar ist, konnte die Affinität von  $\beta$ -Glykosidasen zu unterschiedlichen Sacchariden bestimmt werden. Die Hydrolyse des Substrats *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glukopyranosid (*p*NPG) zeigte die Funktionalität aller heterolog exprimierten Proteine als BGLUs (Tabelle 20).

Darauffolgend wurden die Enzyme auf die Spezifität gegenüber anderen Glykosiden unter Verwendung von *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranosid (*p*NPM), *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid (*p*NPF) und *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobiosid (*p*NPC) getestet. Keine der heterolog exprimierten *Lg*BGLUs hydrolysierte *p*NPM. Fucosidase-Aktivität wurde hingegen für *Lg*GLU2 und *Lg*GLU4 gezeigt. Während für *Lg*GLU4 diese Aktivität vernachlässigbar zu sein scheint, war die Fucosidaseaktivität von *Lg*GLU2 erhöht und erreicht etwa 25% der Glukosidaseaktivität. Die Cellobiose-Aktivität betrug bei allen getesteten Enzymen etwa ein Zehntel der für *p*NPG bestimmten Aktivität. Alle *Lg*GLU-Enzyme bevorzugten das Glukosid als Substrat.

Tabelle 20: Spezifische Aktivität von *L. galeobdolon* BGLUs mit verschiedenen Substraten.

Substrat Klasse	Substrat	Spezifische Aktivität [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]			
		LgGLU1	LgGLU2	LgGLU4	CoGLU
Artifizielle Substrate	pNPG	8660 ± 867	472 ± 33	5814 ± 395	13549 ± 1027
	pNPM	nd	nd	nd	nd
	pNPF	nd	114 ± 22	104 ± 34	nd
	pNPC	283 ± 11	22 ± 3	291 ± 116	523 ± 282
Benzoxazinoide	GDIBOA	34083 ± 892	86 ± 23	5 ± 2	40919 ± 1855
	GDIMBOA	492 ± 27	nd	nd	1002 ± 24
Iridoide	Oleuropein	7967 ± 598	580 ± 37	77 ± 1	2112 ± 553
	Harpagid	nd	nd	nd	nd
	Geniposid	71 ± 8	nd	nd	84 ± 28
Cyanogene Glycoside	Dhurrin	7139 ± 572	949 ± 69	340 ± 61	14122 ± 1085
Isoflavonoid Glukoside	Daidzin	2436 ± 104	53 ± 3	149 ± 16	4996 ± 446
	Phloridzin	65 ± 5	2 ± 1	nd	nd
	Genistin	1933 ± 146	nd	78 ± 26	1924 ± 1029
Hydrochinon Glukosid	Arbutin	nd	nd	nd	nd
Cytokinin Glukosid	tZOG	13 ± 1	nd	nd	61 ± 2

Um Hinweise auf die *in vivo*-Funktion der BGLUs zu erhalten wurde das Aktivitätsprofil der LgGLUs für repräsentative in Pflanzen vorkommende Glukoside aus verschiedenen Substanzgruppen erstellt. Benzoxazinoide (GDIBOA, GDIMBOA) und Iridoide (Oleuropein, Harpagid, Geniposid) sind Sekundärmetabolitklassen, die in Lamiales vorkommen (GDIBOA, Harpagid; Alipieva *et al.*, 2003; Schullehner *et al.*, 2008). Dhurrin ist ein cyanogenes Glukosid aus Sorghumhirsen. Die Dhurrinase findet man in Hirse und sie ist nah verwandt mit der BX BGLU *ZmGLU1* aus Mais. Dhurrin hemmt *ZmGLU1*, wird dabei aber selbst nicht hydrolysiert (Babcock und Esen, 1994). Für CoGLU wurde hingegen eine Dhurrin Hydrolyseaktivität nachgewiesen. Die Substrate Daidzin, Phloridzin und Genistin sind häufig verwendete Vertreter der Isoflavonoide (Ketudat Cairns und Esen, 2010; Morant *et al.*, 2008). Arbutin ist ein Hydrochinon. Das Cytokininglukosid *trans*-Zeatin-O-Glukosid (tZOG) ist ein Hormon, welches erstmals in Mais nachgewiesen wurde und welches durch *ZmGLU1* aus Mais hydrolysiert werden kann (Abbildung 15).

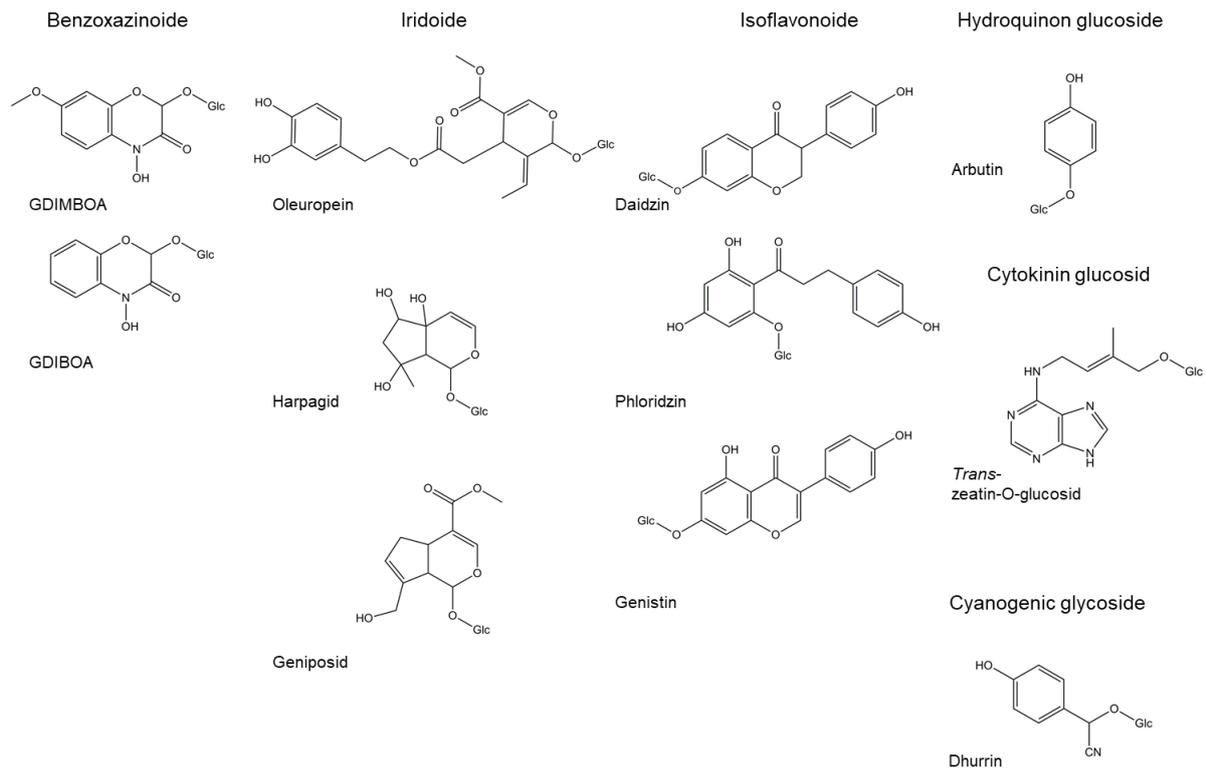


Abbildung 15: Analyierte Substrate der *L. galeobdolon*  $\beta$ -Glukosidasen. Glc: Glukosid.

Die Hydrolyse des Hydrochinons und der Cytokininglukoside war für alle *LgGLUs* nicht nachweisbar bzw. sehr gering (Tabelle 20). Die Glukosidaseaktivität von *LgGLU4* für jedes der getesteten Substrate betrug nicht mehr als 6% der *pNPG*-Aktivität, was vermuten lässt, dass kein Glukosid mit signifikanter Ähnlichkeit zu dem natürlichen Substrat vertreten war. Die Enzymaktivität für *LgGLU2* war für alle Substrate sehr gering, der Umsatz von *pNPG* betrug nur rund 5% im Vergleich zu den anderen *LgGLUs*. Relativ zur *pNPG*-Hydrolyse (100%, Abbildung 16) betrug die Aktivität mit Dhurrin als Substrat jedoch ca. 200% und mit dem Iridoid Oleuropein 120%. Dies ist ein Indiz, dass diese pflanzlichen Glukosid-Strukturen den *in vivo* Substraten ähneln.

*LgGLU1* wurde als *L. galeobdolon* Benzoxazinoidglukosidase identifiziert, da das Enzym eine signifikante enzymatische Aktivität bei der GDIBOA-Hydrolyse zeigte. Diese ist dreifach höher verglichen mit der *pNPG*-Hydrolyse (Abbildung 16).

Die enzymatische Aktivität von *LgGLU1* als GDIBOA-Hydroxylase (34  $\mu\text{mol}/\text{mg min}$ ) entsprach der CoGLU-Enzymaktivität (41  $\mu\text{mol}/\text{mg min}$ ). Beide dikotylen Benzoxazinoidhydroxylasen unterschieden zwischen den Substraten GDIBOA und 7-Methoxyderivat GDIMBOA (Tabelle 20) und beide wiesen eine wesentliche Aktivität mit Nicht-Benzoxazinoid-Substraten auf (Abbildung 16).

So waren die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme bei cyanogenen Glukosiden, Isoflavonoidglukosiden und (für *LgGLU1*) beim Iridoid Oleuropein signifikant höher als für

GDIMBOA. Für *LgGLU1* wie für *CoGLU* konnte Dhurrin-Hydrolyse gezeigt werden. Diese erfolgte mit ähnlicher Effizienz wie die von *pNPG* (7 und 9  $\mu\text{mol}/\text{mg min}$ ). *LgGLU1* und *CoGLU* zeigten außerdem Isoflavonoid-Glukosidase-Aktivität. *CoGLU* hatte im Gegensatz zu *LgGLU1* eine Präferenz für Daidzin (Tabelle 20, Abbildung 16). Ein signifikanter Unterschied zwischen *LgGLU1* und *CoGLU* war die Glukosidase-Aktivität mit dem Iridoid Oleuropein (Tabelle 20, Abbildung 16). Für *LgGLU1* entsprach die Oleuropein-Hydrolase-Aktivität ungefähr der *pNPG*-Aktivität (8  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ), für *CoGLU* betrug sie jedoch nur 15% (2  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ).

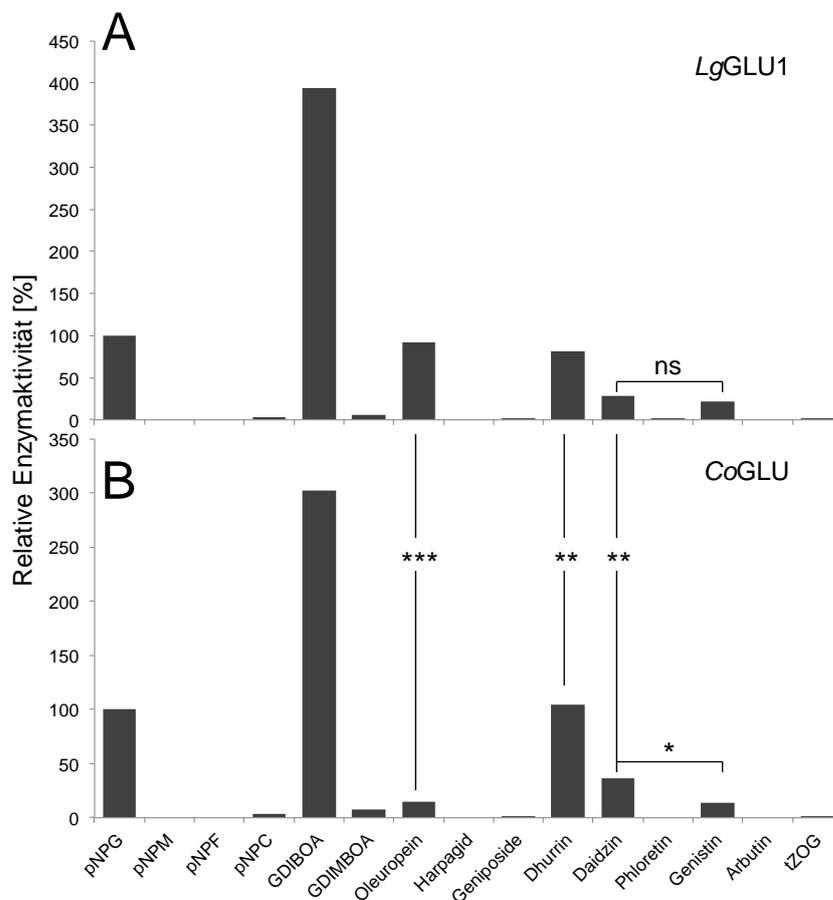


Abbildung 16: Substratpräferenz der GDIBOA-Glukosidasen *LgGLU1* und *CoGLU*. Enzymaktivität von *LgGLU1* (A) und *CoGLU* (B) mit verschiedenen künstlichen und natürlichen Glukosiden. Die Werte sind auf *pNPG*-Aktivität normiert. Die Aktivitäten der nicht-benzoxazinoid Substrate zeigten signifikante Unterschiede für *LgGLU1* und *CoGLU* (Oleuropein  $p < 0,001$ , Dhurrin  $p < 0,05$ , Daidzin  $p < 0,05$ ). Während *CoGLU* das Isoflavonoid Daidzin im Vergleich zu Genistin bevorzugt ( $p < 0,01$ ) kann keine signifikante Präferenz für *LgGLU1* festgestellt werden. Statistische Analysen wurden mit R Suite durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA berechnet, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

### 3.2.4.5 Vergleich der Glukosidase-Enzymaktivität von heterolog exprimierter *LgGLU1* und Protein-Rohextrakt von *L. galeobdolon* Blättern

Wenn *LgGLU1* essentiell für die GDIBOA-Hydrolyse in *L. galeobdolon* ist, müssen die katalytischen Daten des Enzyms mit den *in planta* gefundenen übereinstimmen.

Enzymrohextrakt aus *L. galeobdolon* (2.4.1) wurde daher auf BGLU-Aktivität untersucht. Zur Normierung wurde jeweils die GDIBOA-Hydrolyse-Aktivität (100%) eingesetzt (Abbildung 17). Die Charakteristika von *LgGLU1* entsprachen denen der  $\beta$ -Glukosidasen in den *L. galeobdolon*-Blättern. Einzig die im Rohextrakt gefundene hohe Mannosidaseaktivität konnte nicht durch die Aktivität von *LgGLU1* erklärt werden.

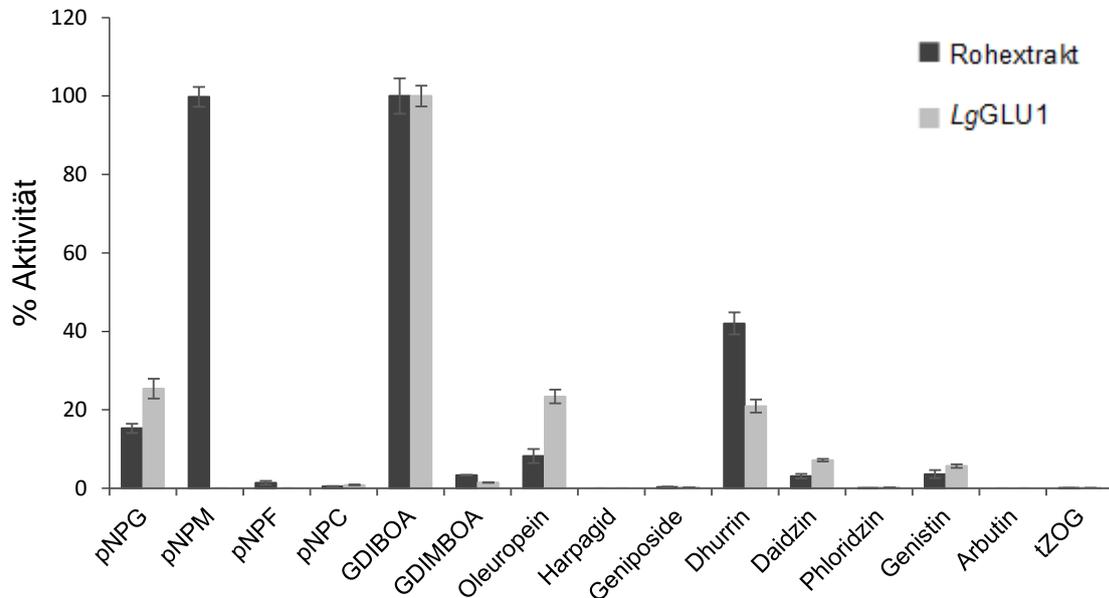


Abbildung 17: Vergleich der  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität von Rohextrakt und heterolog exprimiertem *LgGLU1* mit verschiedenen Substraten. Die Werte sind auf GDIBOA-Hydrolyse normiert. Rohextrakt dunkelgrau, *LgGLU1* hellgrau. Statistische Analysen wurden in R Suite bearbeitet. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA ausgeführt, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

Die optimalen Bedingungen für die GDIBOA-Hydrolyse wurden für *LgGLU1* und für den Rohextrakt bestimmt. Analysen wurden bei variierender Temperatur und für verschiedene pH-Werte durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein Optimum im leicht sauren Milieu (pH 5) und im Temperaturbereich von 30-40°C. Auch hier stimmten die Aktivität des Rohextrakts aus *L. galeobdolon* Blättern und des *LgGLU1* überein (Abbildung 18). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass weitere DIBOA-BGLUs in *L. galeobdolon* vorliegen, *LgGLU1* deckt aber die gefundene Enzymaktivität ab.

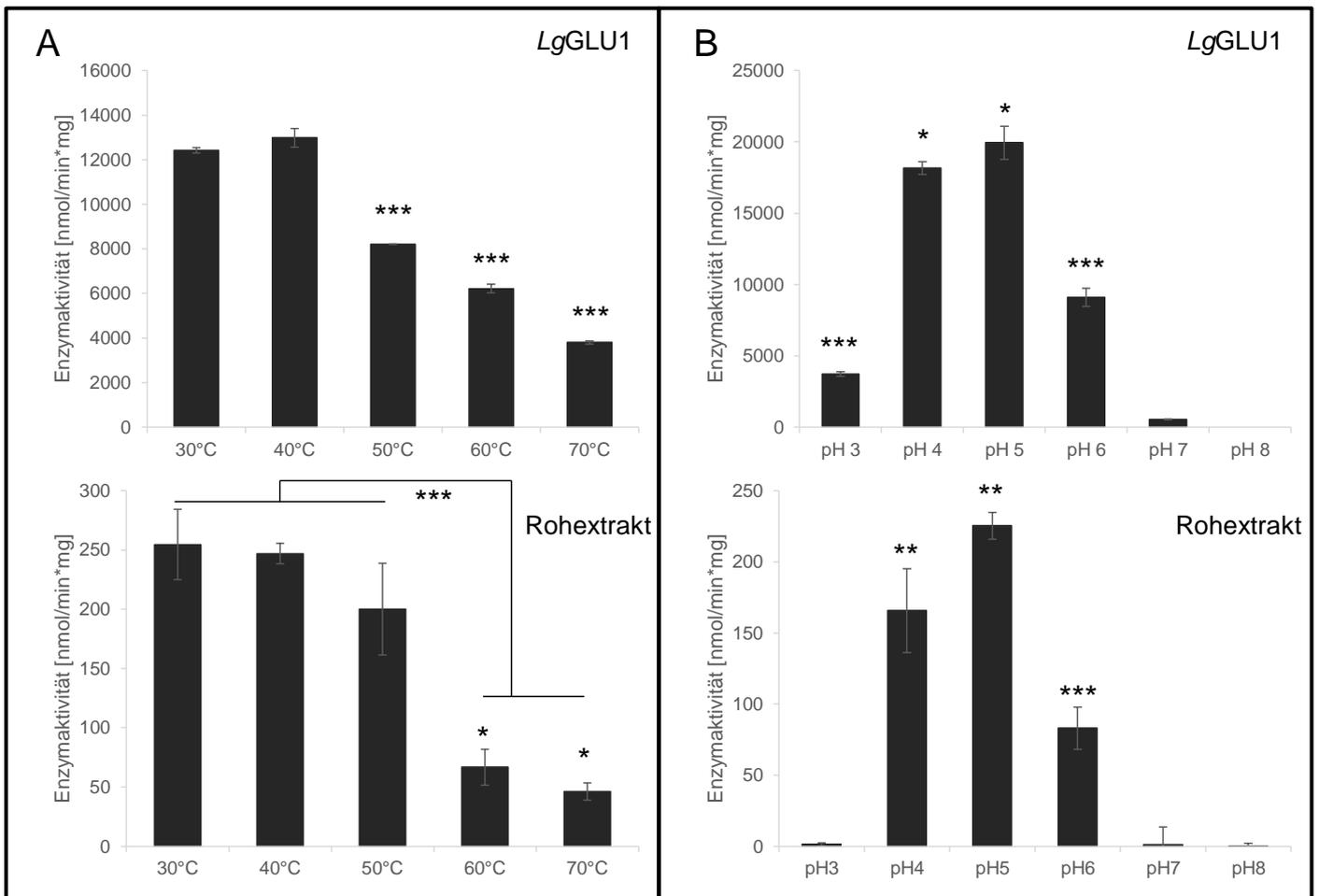


Abbildung 18: Vergleich von pH- und Temperaturoptima für die GDIBOA-Hydrolyse durch Rohextrakt und heterolog exprimiertes *LgGLU1*. (A) pH-Optima, (B) Temperaturoptima. Bei pH-Werten 4 und 5 war die Enzymaktivität in beiden Proteinproben am Höchsten ( $p < 0,001$ ) und Enzymaktivitäten sind signifikant reduziert durch Inkubation bei 60°C und 70°C ( $p < 0,001$ ). Statistische Analysen wurden in R Suite bearbeitet. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA ausgeführt, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

### 3.2.4.6 Kinetische Daten von *LgGLU1* und *CoGLU*

Zur Charakterisierung von *LgGLU1* wurden die kinetischen Parameter der heterolog exprimierten Enzyme für die Substrate GDIBOA, Dhurrin und das Iridoid Oleuropein bestimmt (siehe 2.7.4). *CoGLU* wurde zum Vergleich ebenfalls analysiert. Die Werte wurden im Bereich der linearen Umsatzgeschwindigkeit bestimmt. Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration beider Enzyme wurde analysiert (Abbildung 19).

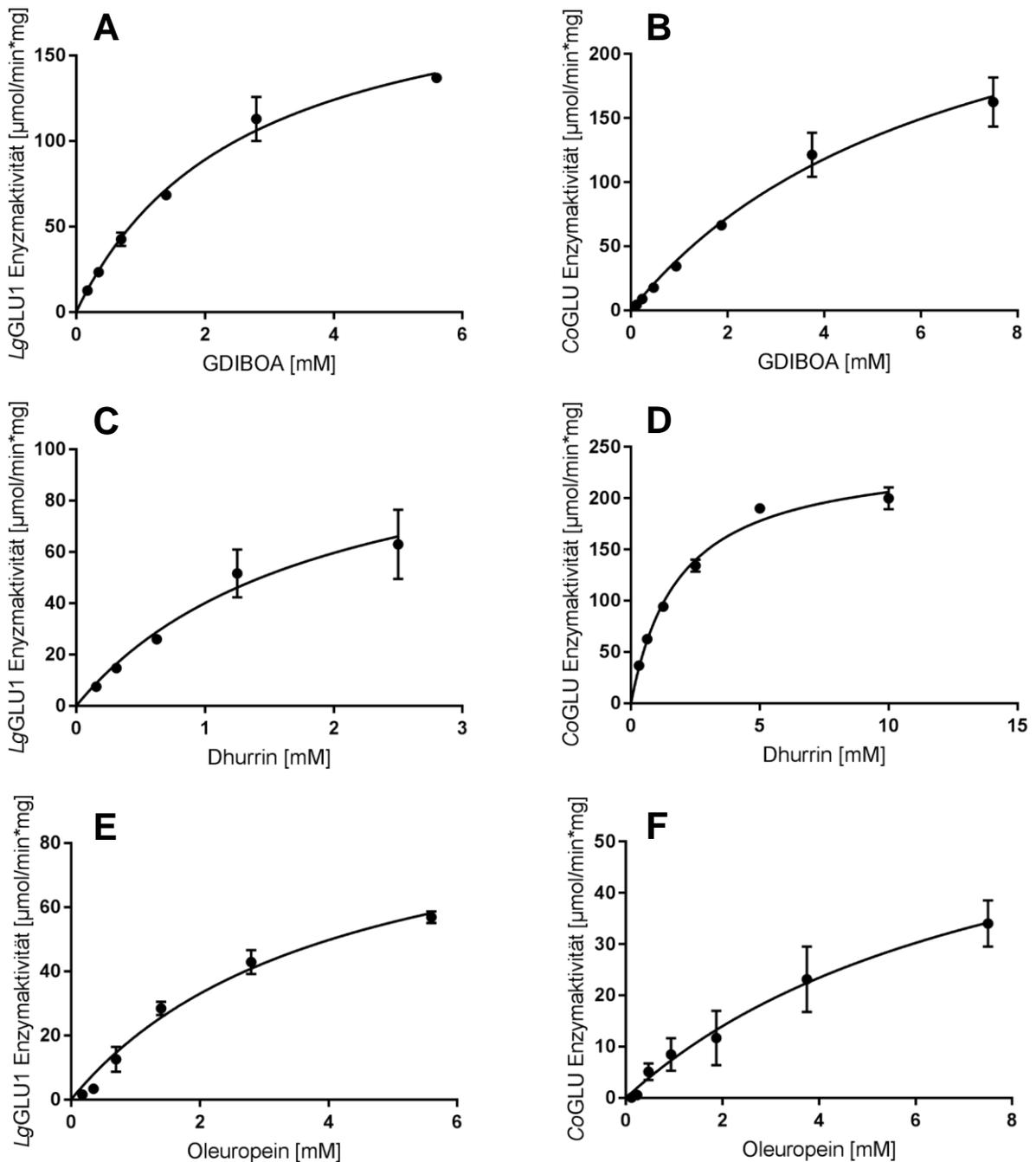


Abbildung 19: Michaelis-Menten-Enzymkinetiken für (A), (C), (E) *LgGLU1*; (B) (D), (F) *CoGLU* mit den Substraten GDIBOA (A), (B); Dhurrin, (C), (D); Oleuropein (E), (F). Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Für alle Substrate lagen die  $K_m$ -Werte im millimolaren Bereich (Tabelle 21). Die kinetische Konstante  $k_{\text{cat}} / K_m^{\text{GDIBOA}}$  für *LgGLU1* und *CoGLU* zeigte, dass beide Enzyme effizient GDIBOA hydrolysieren (Tabelle 21), die  $k_{\text{cat}} / K_m^{\text{GDIBOA}}$  Konstante von *LgGLU1* ist doppelt so hoch. Die Unterschiede in der Hydrolyse der Nicht-Benzoxazinoid-Substrate waren ausgeprägt. Die Dhurrin-Hydrolyse war aufgrund eines höheren  $k_{\text{cat}}$ -Wertes von *CoGLU* bei

identischer Affinität signifikant effizienter. Für Oleuropein hatte *LgGLU1* sowohl eine höhere Affinität als auch eine höhere Katalyserate.

Im Vergleich aller umgesetzten Substrate hat *LgGLU1* die höchste kinetische Konstante für GDIBOA. Der  $K_m$ -Wert von *LgGLU1* ( $2,5 \pm 0,3$  mM) wurde ähnlich auch für den *L. galeobdolon*-Rohextrakt ( $2,1 \pm 0,45$  mM) gemessen. Dies deutet erneut darauf hin, dass es sich bei *LgGLU1* um eine *L. galeobdolon* GDIBOA-Glukosidase handelt.

Tabelle 21: Steady-State-Konstanten von *LgGLU1* und *CoGLU* für verschiedene Substrate.

Substrat	<i>LgGLU1</i>			<i>CoGLU</i>		
	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat} / K_m$ [ $mM^{-1}s^{-1}$ ]	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat} / K_m$ [ $mM^{-1}s^{-1}$ ]
GDIBOA	$2,5 \pm 0,3$	$211,1 \pm 11,3$	81,6	$6,8 \pm 1,3$	$307,9 \pm 36,1$	45,3
Dhurrin	$1,9 \pm 0,7$	$112,5 \pm 22,6$	59,0	$1,9 \pm 0,2$	$236,5 \pm 6,9$	125,8
Oleuropein	$4,1 \pm 0,8$	$104,4 \pm 11,4$	25,5	$8,3 \pm 3,5$	$69,6 \pm 3,4$	8,4

### 3.2.4.7 Enzymatische Hemmung durch Konkurrenzsubstrate

Die Aktivität von Enzymen kann auch durch konkurrierende Substrate inhibiert werden. Diese Inhibition kann entweder irreversibel oder reversibel erfolgen. Die Inhibition von *LgGLU1* und *CoGLU* durch die Substrate Oleuropein und Dhurrin wurde untersucht, beide wurden umgesetzt, sind aber in den jeweiligen Pflanzen nicht nachweisbar. Außerdem soll die Auswirkung von Harpagid auf die GDIBOA-Hydrolyse bestimmt werden, ein Substrat welches in *L. galeobdolon* vorkommt, aber von keinem der beiden Enzyme umgesetzt wurde.

Um die Hemmung der GDIBOA-Hydrolyse der *LgGLU1* und *CoGLU* durch die Substrate Oleuropein, Dhurrin und Harpagid zu analysieren, wurden die Enzyme mit dem entsprechenden Substrat und GDIBOA gemeinsam inkubiert und die DIBOA-Bildung durch HPLC quantifiziert (siehe 2.6.1). Die Enzymaktivitäten der gemischten Ansätze wurden mit denen von nicht inhibierten Parallel-Ansätzen verglichen (Abbildung 20). Die Hemmung von *CoGLU* durch Dhurrin konnte bereits gezeigt werden (Dick *et al.*, 2012). Sie lag für beide Enzyme bei rund 50%. Ähnlich wie bei den Unterschieden in der Hydrolyse bei Einsatz als Substrat war das Ausmaß der Hemmung durch das Iridoid Oleuropein signifikant höher für *LgGLU1* (etwa 80%) im Vergleich zu *CoGLU* (etwa 50%). Harpagid hatte keinen Einfluss auf die GDIBOA-Hydrolyse durch *CoGLU*, hemmte jedoch die Aktivität von *LgGLU1* um 30%. *LgGLU1* zeigte damit für zwei Iridoide eine höhere Affinität als *CoGLU*. Die Hemmung der GDIBOA-Hydrolyse von *LgGLU1* durch das *L. galeobdolon*-endogene Iridoid Harpagid geringer als durch Oleuropein.

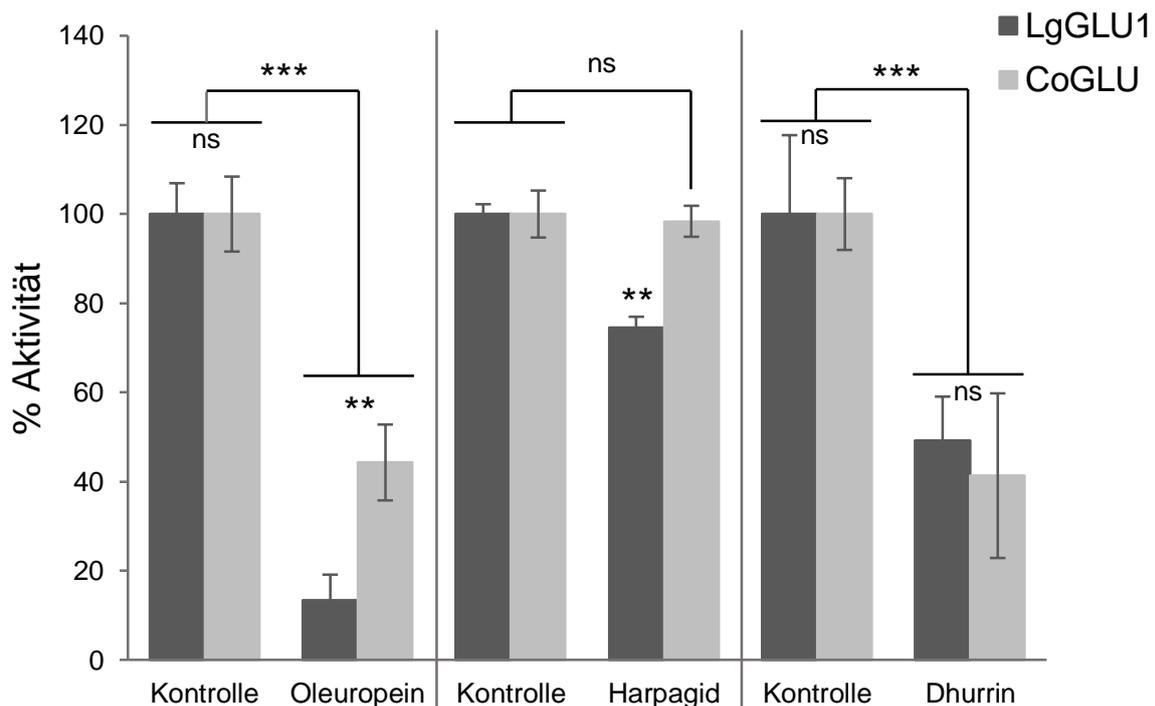


Abbildung 20: Hemmung der GDIBOA-Hydroxylierung durch Inkubation mit Oleuropein und Dhurrin. Dunkelgraue Säulen *LgGLU1*, hellgraue Säulen *CoGLU*. Die Mittelwerte von drei Wiederholungen und die Standardabweichungen sind angegeben. Die Werte sind in relativer Höhe zu der gemessenen Aktivität der entsprechenden Kontrolle. Die GDIBOA Hydrolyse war signifikant inhibiert durch Oleuropein, Dhurrin und Harpagid für *LgGLU1*. Die Inhibition durch Oleuropein war stärker bei *LgGLU1* als bei *CoGLU* (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). *CoGLU* wurde im Gegensatz zu *LgGLU1* durch Harpagid nicht signifikant gehemmt. Statistische Analysen wurden mit R Suite durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA berechnet, pairwise T-Test zeigte statistische Signifikanz.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *LgGLU1* und *CoGLU*  $\beta$ -Glukosidasen der GDIBOA-Hydrolyse sind. Beide akzeptieren und metabolisieren weitere fremde natürliche Substrate effizient. Das Substratspektrum der Enzyme überlappt, ist aber dennoch einzigartig für jede der beiden dikotylen GDIBOA-Glukosidasen.

### 3.3 Phylogenetische Untersuchung der *L. galeobdolon* Enzyme

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Enzymklassen der Biosynthese von Benzoxazinoiden  $\beta$ -Glukosidasen, Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, und die UDPG-abhängigen Glukosyltransferasen, sind jeweils Mitglieder großer Pflanzenfamilien. Durch phylogenetische Analysen sollte ein Einblick auf die Evolution dieser Genfamilien in *L. galeobdolon* und *C. orientalis* gewonnen werden. Für beide Pflanzen lag die Annotierung der entsprechenden Gene in den Transkriptom-Daten vor. Komplette Gen-Datensätze standen für Pflanzen mit veröffentlichten Genomsequenzen zur Verfügung und teilweise lagen biochemische Charakterisierungen vor. Von besonderem Interesse war die Phylogenie von Genen des Benzoxazinoid-Metabolismus.

### 3.3.1 Phylogenie der $\beta$ -Glukosidasen

In 3.2.4 wurde die *LgGLU1* als GDIBOA  $\beta$ -Glukosidase der *L. galeobdolon* identifiziert und charakterisiert. Auch für die *LgGLU2*, 3, 4 und *CoGLU* wurden enzymatische Profile erstellt. Die phylogenetische Verwandtschaft der Gene in der BGLU Superfamilie sollte bestimmt werden. Kürzlich veröffentlichte phylogenetische Analysen von BGLUs aus Pflanzen (Cao *et al.*, 2017; Rouyi *et al.*, 2014) waren dabei richtungsweisend. Hierbei wurden hauptsächlich als *BGLu* annotierte Sequenzen aus Organismen verwendet, deren vollständig sequenzierte Genome verfügbar waren (*A. thaliana*, *O. sativa*, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Glycine max* (L.) Merr., *Vitis vinifera* L., *Z. mays*). Dieser Datensatz wurde mit in den Datenbanken UniRef100 und UniProtKB annotierten Genen auf 870 Angiosperm-BGLU-Sequenzen erweitert. Darin sind die *Arabidopsis*- und *Oryza*- Sequenzen enthalten, die Rouyi *et al.*, 2014 nutzten um Kladen (gemischte *At/Os* und *At* oder *Os* spezifische) zu definieren. Funktional charakterisierte Enzyme im Datensatz könnten einen Hinweis auf die enzymatische Funktion eng verwandter Enzyme geben. Besonderes Interesse galt der Verwandtschaft der BX-BGLUs aus Gräsern, *C. orientalis* und *L. galeobdolon*.

Im somit erstellten phylogenetischen Baum konnten die meisten der durch Rouyi *et al.*, 2014 definierten Kladen identifiziert werden (Abbildung 21, detaillierte, markierte Abbildungen im Anhang). Diese *At/Os* Kladen wurden durch die weiteren Monokotyledonen- und Dikotyledonensequenzen erweitert (Kladen *At/Os* 1, 2, 4, 5, 6). Die monophyletischen Gruppen sind vermutlich Ergebnis früherer Genduplikation, welche vor der Trennung von Monokotyledonen und Dikotyledonen geschah. Sie lassen sich durch Enzyme mit grundlegenden Funktionen charakterisieren, wie zum Beispiel Mannosidasen (Klade *At/Os*4) oder Lignolasen (Klade *At/Os*5). Für die *At/Os*3 und 7 Gruppen konnten nur niedrige Bootstrap Werte für einen gemeinsamen Ursprung von Monokotyledonen- und Dikotyledonengen festgestellt werden (30% und 2%, Abbildung 21). Reine *Arabidopsis* Kladen (*AtI* und *AtII*) wurden durch BGLUs aus Brassicaceen erweitert. Außerdem wurden neue Kladen etabliert. Basierend auf der charakterisierten Funktion einzelner BGLUs in den Kladen, konnten diese z.B. der Transglukosidasenaktivität zugeordnet werden. Weitere unabhängige Kladen wurden definiert, die potentiell mit dem Sekundärmetabolismus in Verbindung stehen. Interessanterweise werden cyanogene Glukoside (CG) durch Enzyme hydrolysiert, welche entweder in einer reinen Dikotyledonenklade oder in der Benzoxazinoid-Dhurrin-Avenakosid Klade lokalisiert waren. Die Benzoxazinoid-Dhurrin-Avenakosid Klade enthält Monokot- und Dikot-BGLUs und besitzt damit Vorläufer, die vor der evolutionären Trennung dieser beiden Hauptklassen vorhanden waren. Damit sind die beiden CG-Kladen unabhängig evolviert.

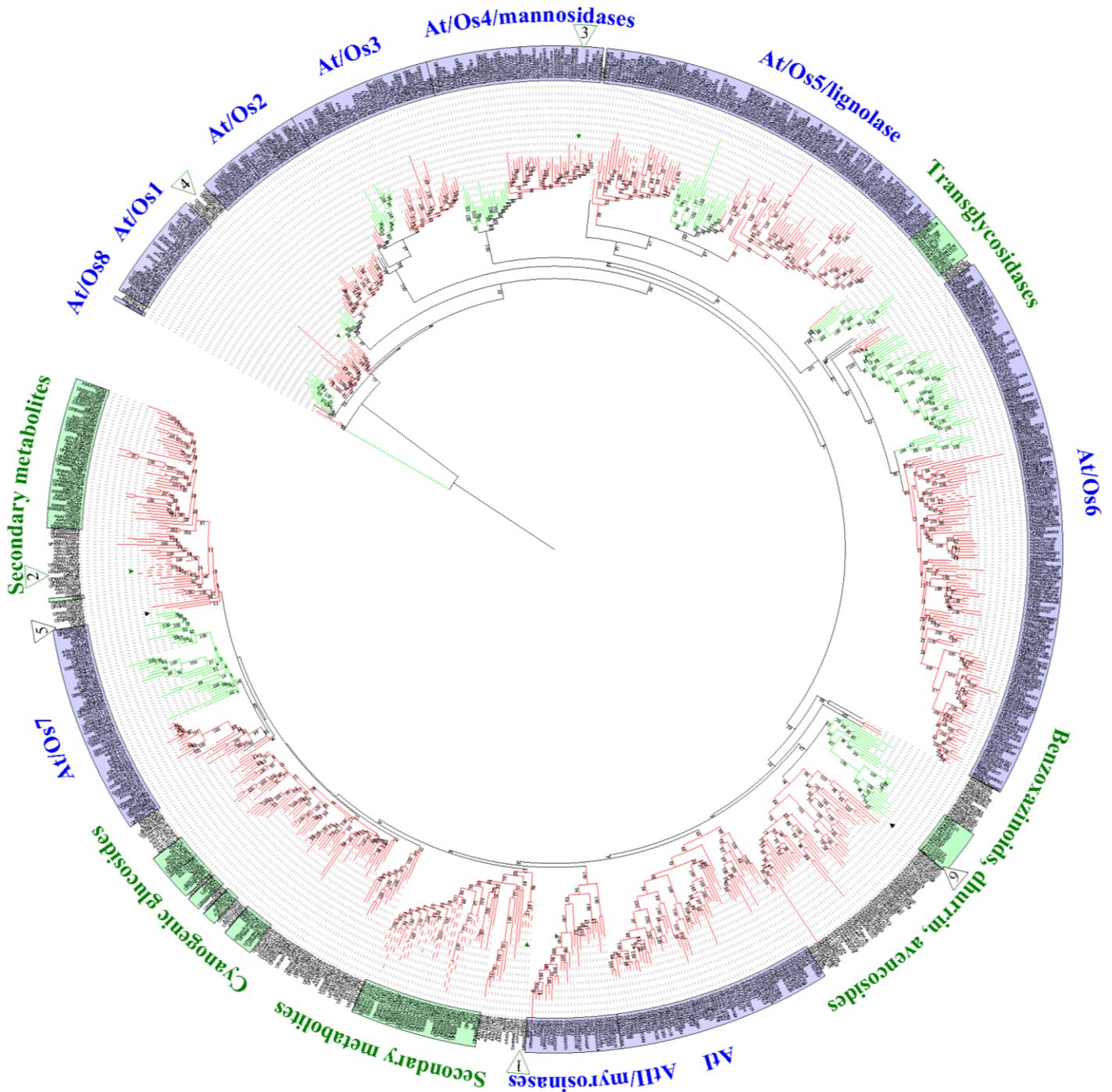


Abbildung 21: Phylogenetische Analyse der Pflanzen  $\beta$ -Glucosidasen. 870 Sequenzen, extrahiert aus den Datenbanken UniRef100 und UniProtKB und mit den definierten BGLU Sequenzen (siehe Abbildung 1, 2, 3 und 4 Anhang) komplementiert, wurden verwendet um den Phylogenetischen Baum zu berechnen. Das multiple Sequence-Alignment wurde mit MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) ausgeführt und der Baum mit RAxML 8.2.10 (Stamatakis, 2014) in 100 bootstrap Proben berechnet. Bootstrap Werte sind im Baum angegeben. Der Baum wurde mit OsBGLU36 (SFR2) gerootet. Die Farben entsprechen den Verwandtschaftsgruppe, Monokotyledonen sind grün angegeben und Dikotyledonen in rot. Die Identifier beziehen sich auf die UniProtKB und UniRef100 Datenbank. *A. thaliana*, *O. sativa* Enzyme und Enzyme mit der definierten Funktion werde mit systematischen Namen angegeben. Blau hinterlegte Namen gehören zu von Rouyi *et al.*, 2014 definierten At/Os und At Kladen. Kladen die Enzyme mit experimentell bestätigter Funktion enthalten, haben grün unterlegte Identifier. Die grünen Pfeile 1-4 zeigen die Positionen der *L. galeobdolon* Gene *LgGlu1* bis *LgGlu4*. Die schwarzen Pfeile zeigen auf *CoGLU* (5) und *ZmGLU* (6).

*L. galeobdolon* BGLUs fanden sich in unterschiedliche Kladen eingeordnet. *LgGLU3* lag in der At/Os4/Mannosidasen Klade (Abbildung 3, Anhang) und innerhalb dieser Gruppe einer Unterklade aus BGLUs von anderen Lamiales zugeordnet. *LgGLU4* ist ebenfalls ein Mitglied einer distinkten Lamiales-Klade (Abbildung 4, Anhang), aber keines der dazugehörigen Enzyme konnte bisher funktional charakterisiert werden. Außerdem hat die Verbindung dieser Klade mit anderen monophyletischen Gruppen nur geringe Bootstrapwerte (4%, Abbildung 21) und gibt keinen Hinweis auf mögliche Substrate der Enzyme in der Klade. *LgGLU1* und *LgGLU2* finden sich in Kladen die funktionell durch Enzyme des sekundären Metabolismus charakterisiert sind (Abbildung 1 und 2, Anhang). Beide sind außerdem mit weiteren Lamiales BGLUs verknüpft. In der monophyletischen Gruppe von *LgGLU2* fand sich die Furcatinhydrolase aus *Viburnum furcatum* Blume ex Hook.f & Thomson. Die *LgGLU1* Klade war mit der Gruppe, die Enzyme des Raucaffricin- und Strictosidinmetabolismus enthält, verknüpft (Barleben *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2012). Die biochemisch charakterisierte Oleuropein-Glukosidase *OeGLU* aus *Olea europea* L. ist ebenfalls ein Mitglied der Lamiales-Untergruppe. Obwohl die Bootstrapwerte relativ gering sind, kann spekuliert werden, dass die *LgGLU1*-Klade und die *OeGLU*/Sekundärmetabolismus BGLU Klade einen gemeinsamen evolutionären Vorgänger teilen.

*CoGLU* und eine *Delphinium grandiflorum* L. BGLU, charakterisiert als Acyl-Glukose-abhängige Anthocyanin Glukosyltransferase, etablieren eine Ranunculaceae-spezifische monophyletische Gruppe, die keine unterstützte Verbindung mit den anderen Gruppen hat. Die Analyse zeigte, dass die Kladen, die GDIBOA-Glukosidasen enthalten, sich keine nahe Verwandten teilen, also unabhängig voneinander evolviert sind. Dies gilt für Monokot- und Dikotgene aber auch innerhalb der Dikotyledonen. Die Gräser-Benzoxazinoidglukosidasen (*ZmGLU1*, *ZmGLU2*, *TaGLU1*, *TaGLU2*, *TaGLU3* und *ScGLU*) finden sich alle in derselben monophyletischen Klade. Monokotyledonen BXBGLUs und jede der Dikot-BXBGLUs Glukosidasen sind Ergebnis eine unabhängige Evolution.

### 3.3.2 Phylogenie der P450-Enzyme

Auch für die P450-Enzyme wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. 638 Sequenzen konnten dabei für den Stammbaum verwendet werden. Auch hier wurde der gesamte Datensatz an annotierten P450-Enzymen aus *A. thaliana* (234 Sequenzen, Paquette *et al.*, 2009) und *O. sativa* (299 Sequenzen, Nelson *et al.*, 2004) verwendet. Pseudogene wurden ausgeschlossen. 46 aus dem *C. orientalis* Transkriptom isolierte P450-Kandidaten isoliert, sowie 59 Sequenzen aus dem *L. galeobdolon* Transkriptom wurden ebenfalls einbezogen. Außerdem wurden dem Datensatz die an der DIBOA-Synthese in Mais beteiligten P450-Enzyme *ZmBX2* bis *ZmBX5* hinzugefügt. P450-Familien enthalten Enzyme mit mindestens 40% Aminosäurehomologie, bei Subfamilien sind es mehr als 55%.

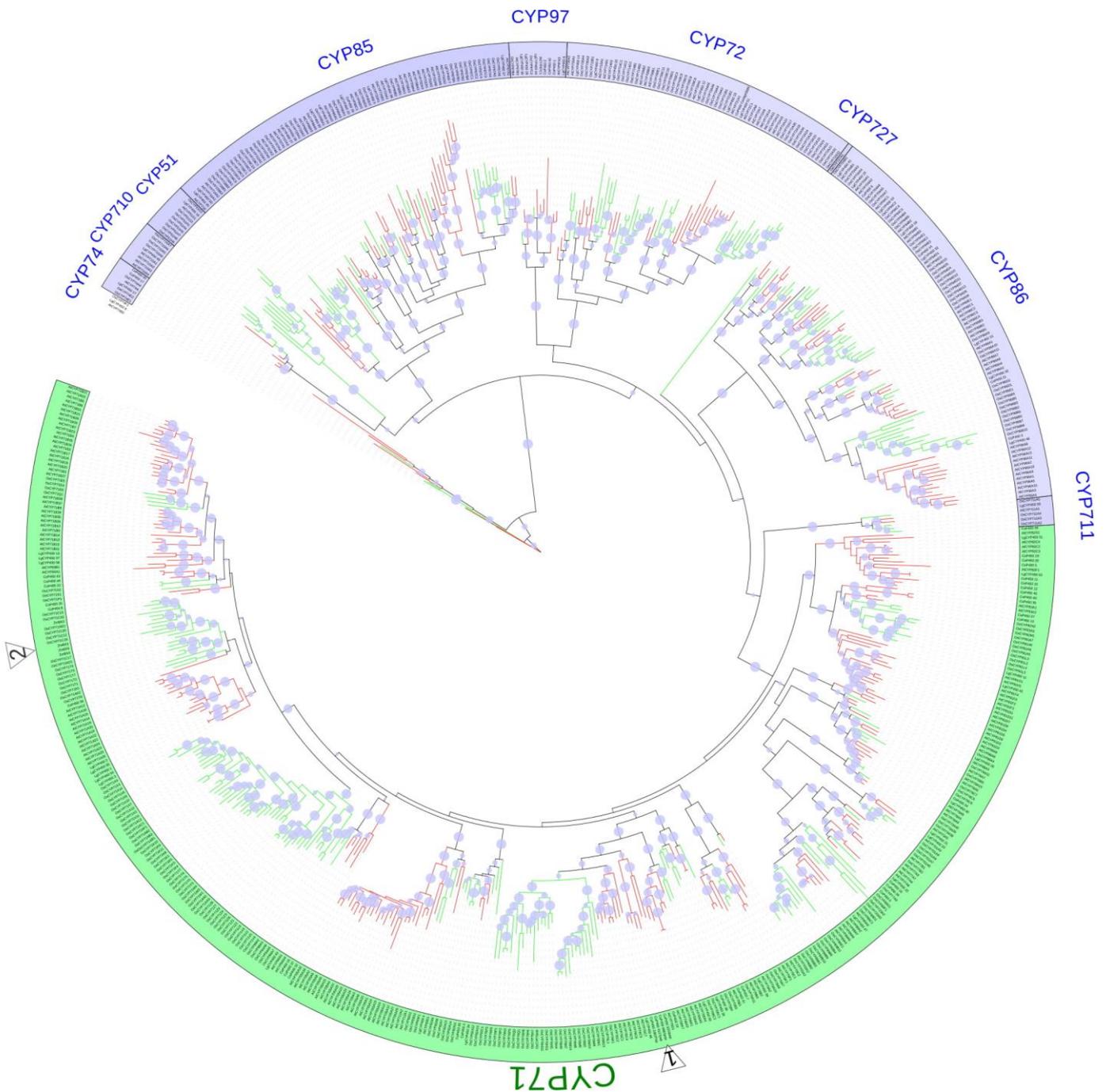


Abbildung 22: Phylogenetische Analyse der P450-Enzyme aus *A. thaliana*, *O. sativa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon*. 638 Sequenzen, bestehend aus *A. thaliana* und *O. sativa* Sequenzen (Nelson *et al.*, 2004; Paquette *et al.*, 2009), komplementiert mit den isolierten Sequenzen aus *L. galeobdolon* und *C. orientalis* und den *ZmBX* Sequenzen, wurden verwendet um den phylogenetischen Baum zu berechnen. Der Pfeil (1) beschreibt die Position der CYP80 P450-Kandidaten aus *C. orientalis*, (2) zeigt die Klade der Mais BX-Enzyme. Grün Monokotyledonen, rot Dikotyledonen.

Entsprechend der Annotation der Reis- und Arabidopsissequenzen wurden die Gene unterschiedlichen CYP-Familien zugeordnet (Abbildung 22), im resultierenden Stammbaum fanden sich alle definierten Familien wieder (Nelson *et al.*, 2004).

Die Kladen CYP72, CYP85 und CYP86 bestehen im Gegensatz zu CYP74, CYP710, CYP51, CYP97, CYP727 und CYP711 aus mehreren CYP-Familien und sind jeweils nach der mit der niedrigsten Nummer, den zuerst beschriebenen, benannt. Die Familien CYP710 (Aminosäurebiosynthese), CYP51 (Sterolbiosynthese), CYP85 (u.a. Brassinosteroid-Biosynthese), CYP74 (Lipoxygenase-Syntheseweg), CYP727, CYP97, CYP72 (Plastiditäre Isoprenoide), CYP711 (Carotinoid-basierend Phytohormone) und CYP86 (Fettsäure-Elongation und Flavonoid/Anthocyan-Biosynthese) sind in allgemeine Stoffwechselwege der Pflanzen eingebunden. Im Stammbaum wurde dies durch das gleichmäßige Auftreten von Vertretern der Monokotyledonen und Dikotyledonen unterstrichen. Die CYP71 Klade ist die Klade mit den meisten Mitgliedern und sie wird dem Sekundärmetabolismus zugeschrieben. Wie in der Phylogenie der BGLUs (Abbildung 21), waren die Sekundärmetabolismus-assoziierten Enzyme in einer eigenen Klade (Bootstrapwerte 100). P450-Enzyme von *L. galeobdolon* waren in Familien der Basisbiosynthesen vertreten (23 Enzyme). Deren Anteil ist für *C. orientalis* P450 geringer (9 Sequenzen) und der größte Teil wurde in die CYP71-Klade eingeordnet (31 Sequenzen). Für *L. galeobdolon* fanden sich in dieser „Sekundärmetaboliten“-Klade rund die Hälfte der Enzyme (21). Auffallend war, dass *C. orientalis* P450-Enzyme oft in Unterkladen auftraten. Ein Beispiel sind die Vertreter der CYP80B-Familie (Abbildung 5, Anhang). Für *L. galeobdolon* fanden sich nur zwei solche Unterkladen, die restlichen Sequenzen finden sich einzeln verteilt im Baum. In der Analyse ergab sich für die CYP71-Klade eine Unterklade, die die P450-Enzyme BX2 –BX5 einschließt (Abbildung 6, Anhang) und in drei eng verwandten Kladen jeweils Enzyme von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* enthält. Allerdings war für eine gemeinsame Wurzel der Subkladen der Bootstrap- Wert zu gering. Aufgrund der Expressionsanalysen wurden die in dieser Verwandtschaft gefundenen Enzyme nicht als Kandidaten für die enzymatische Analyse (3.1.2) ausgewählt.

### 3.3.3 Phylogenie der UGTs

Auch für die UGTs wurde die Berechnung eines phylogenetischen Baumes von Sequenzen aus Monokotyledonen (*O. sativa*) und Dikotyledonen (*A. thaliana*) im Kontext mit Enzymen aus *L. galeobdolon*, und den BX-UGTs BX8 und BX9 von *Z. mays* und *C. orientalis* durchgeführt. 121 *A. thaliana* Sequenzen wurden aus der CAZy Datenbank entnommen (Coutinho *et al.*, 2003), 80 Reis UGTs stammen aus der Rice GT Database beschrieben von (Cao *et al.*, 2008). Im *L. galeobdolon* Transkriptom wurden 30 UGTs annotiert und ebenfalls dem Datensatz hinzugefügt.

Ross *et al.*, 2001 und (Caputi *et al.*, 2012) beschrieben die Gruppierung der UGTs in Gruppen A-N für *A. thaliana* und *O. sativa*. Diese Gruppen blieben der Berechnung erhalten (Abbildung 23). Die Gruppen A, D, F, G und L wurden Sekundärmetabolismus zugeordnet.

Enzyme der Gruppe A wurden mit Anthocyanin- oder Soyasponin-Glykosylierung in Verbindung gebracht, Enzyme der Gruppe D wurden als Terpenoid-, Flavonoid- und Benzoat-Biosynthesen charakterisiert, UGTs der Gruppe F glykosylieren Anthocyane und Flavonole, Gruppe G-Enzyme Terpenoide, Cyanogene und *trans*-Zeatin. Gruppe L Enzyme akzeptieren Limanoide, Anthocyane und weitere Substrate (Caputi *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2001). Den verbliebenen Gruppen wurden bisher keine Funktionen zugeordnet. Die Benzoxazinoid UGTs aus Mais *ZmBX8/9*, nach dem standardisierten Nomenklatorsystem (Mackenzie *et al.*, 1997) UGT710E, findet sich in der Gruppe H (Abbildung 22 (1), Abbildung 7 Anhang). In dieser Gruppe befinden sich auch UGT76C1 und UGT76C2 aus *A. thaliana*. Diese Enzyme sind Pflanzenhormonglukosyltransferasen, sie glykosylieren Cytokinine (Hou *et al.*, 2004). Die Gruppe H bildet die zweitgrößte Gruppe in *A. thaliana*. *CoBX8* (UGT85N1 nach dem standardisierten Nomenklatorsystem (Mackenzie *et al.*, 1997)) findet sich in Gruppe G (Abbildung 22 (2), Abbildung 7 Anhang).

*L. galeobdolon* UGTs wurden in alle Gruppen gefunden und traten auch in der Sterol- und Scopoletin-UGT-Gruppe auf. Unter den 30 aus dem *L. galeobdolon* identifizierten UGT Sequenzen befand sich mit *LgUGT10* auch die putative Monogalactosyldiacylglycerolsynthase von *L. galeobdolon*.

Die untersuchten *L. galeobdolon* UGT Kandidaten für die BX8-Funktion wurden in der Gruppe G und hier in der Verwandtschaft von *CoBX8* (*LgUGT27*, Abbildung 7 Anhang) und in der Gruppe I (*LgUGT28*) gefunden. In die Klade von *ZmBX8/BX9* wurden drei *LgUGTs* eingruppiert (Abbildung 7 Anhang). Sie waren nicht als Kandidaten für funktionelle Analyse heran gezogen worden, da für sie kein Hinweis aus der funktionellen Reinigung des Enzyms vorlag.

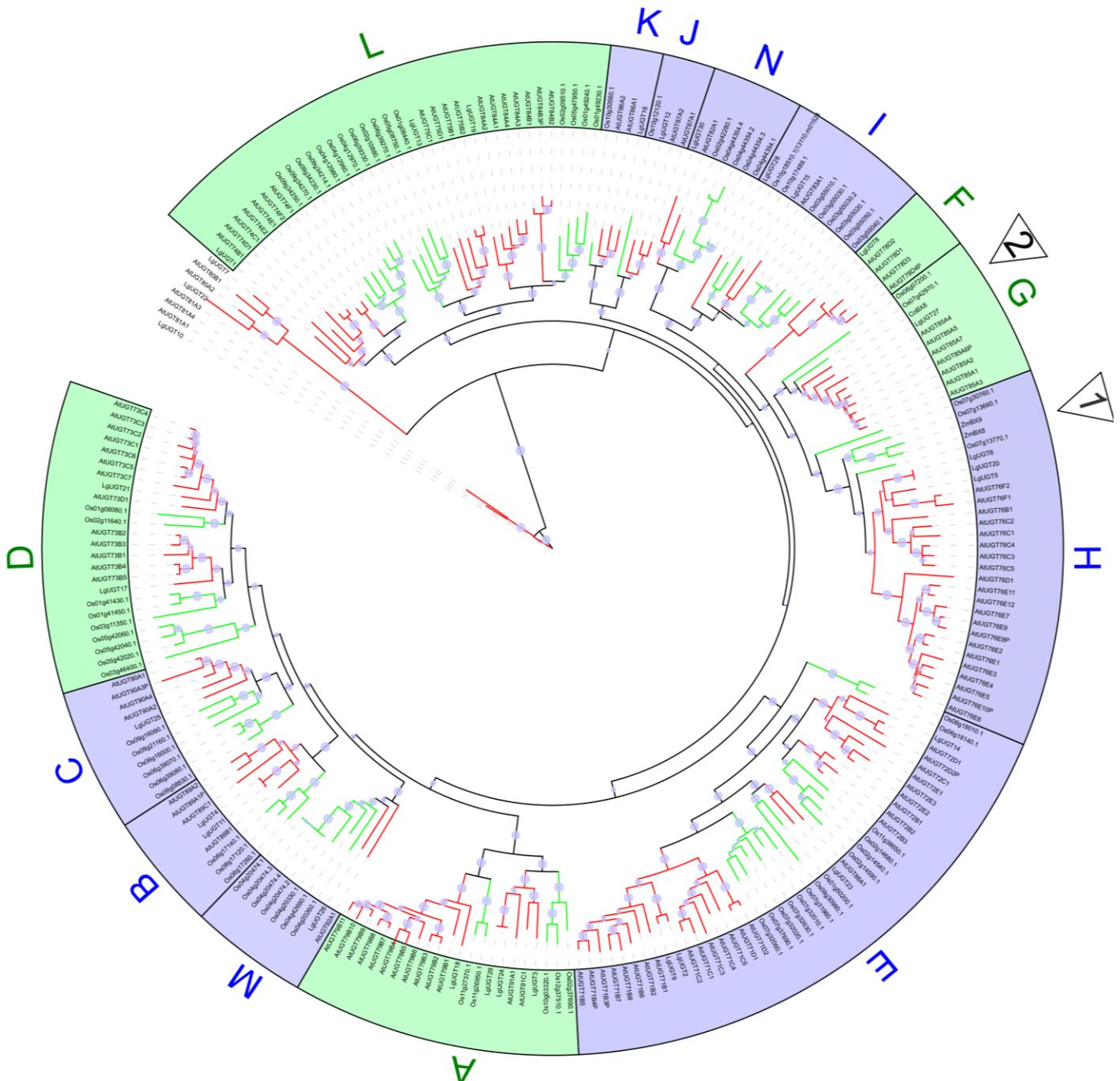


Abbildung 23: Phylogenie der UGTs aus *A. thaliana*, *O. sativa* und *L. galeobdolon*. *A. thaliana* Sequenzen wurden aus der Cazy Datenbank entnommen, *O. sativa* Sequenzen von (Cao *et al.*, 2008), *L. galeobdolon* Sequenzen wurden aus dem Transkriptom identifiziert. Das *C. orientalis* Enzym CoBX8 sowie die Mais UGTs ZmBX8 und ZmBX9 wurden zugefügt. (1) Markiert die Lage der *Z. mays* Enzyme, (2) die von CoBX8. Gruppen die dem Sekundärmetabolismus zugeordnet werden sind grün hinterlegt, nicht zuordnungsbar blau.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zwei-Komponenten-Systeme als Strategie der Pflanzenabwehr.

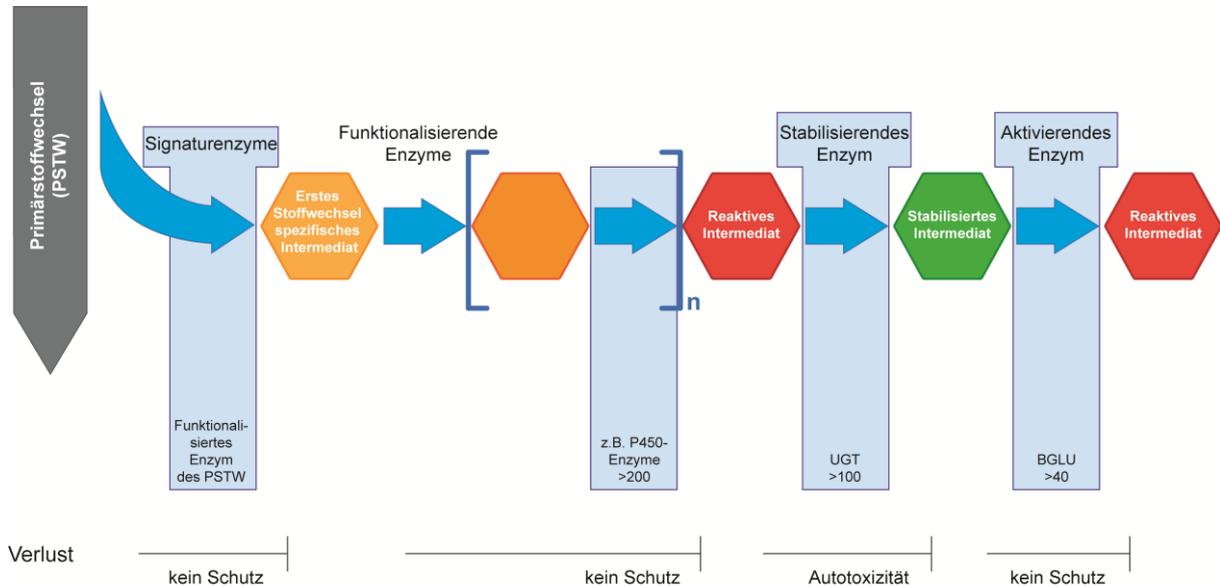


Abbildung 24: Organisation des Sekundärstoffwechselweges. Für die enzymatischen Funktionen sind Enzyme als Beispiele gegeben, eine Auswertung über die Folgen bei einzelem Verlust dieser und eine Abschätzung über die Größe des zu Verfügung stehenden Repertoires für anschließende sekundäre Rekrutierung werden abgebildet.

Pflanzen haben als eine Strategie der chemischen Verteidigung das sogenannte Zwei-Komponenten-Abwehrsystem evolviert (Morant *et al.*, 2008; Pentzold *et al.*, 2014b; Pentzold *et al.*, 2014a). Hierzu gehören auch die Benzoxazinoide. Das System besteht aus dem stabilisierten Intermediat, welches in dieser Form in subzellulären Kompartimenten (z.B. der Vakuole) eingelagert wird, und dem aktivierenden Enzym, welches räumlich getrennt gehalten wird. Erst bei Zerstörung der Zelle kommen beide in Kontakt und das toxische Intermediat entsteht. Der Biosyntheseweg im Zwei-Komponenten-System kann formal in verschiedene Blöcke (Abbildung 24) unterteilt werden. Der Abzweig vom Primärstoffwechsel findet durch das Signaturenzym statt. Dadurch wird das erste Stoffwechsel-spezifische Intermediat erzeugt, welches dann durch eine Reihe an funktionalisierenden Enzymen zum reaktiven Metabolit modifiziert wird. Stabilisierung und Reaktivierung bilden die komplementären abschließenden Module.

Pflanzenfamilien können häufig durch Sekundärmetabolitklassen charakterisiert werden, wenn diese derselben Klasse zugeordnet sind. Während das jeweilige Signaturenzym spezifisch für die verschiedenen Metabolitklassen ist und oft ein neo-funktionalisiertes Enzym aus dem Primärstoffwechsels darstellt (Moghe *et al.*, 2017; Ober und Hartmann, 2000), werden die nachfolgenden Schritte bei unterschiedlichen Sekundärmetaboliten durch gleiche Enzymklassen ausgeführt. Die Aufgabe der Funktionalisierung übernehmen häufig

P450-Enzyme, die das erste stoffwechselspezifische Intermediat durch Hydroxylierung modifizieren. Stabilisierung erfolgt überwiegend durch UGTs und die Aktivierung durch BGLUs. Diese Enzyme sind jeweils durch Genfamilien in den Pflanzen vertreten. Speziell die Proliferation der P450-Enzyme wird mit der Entstehung der Landpflanzen und der damit verbundenen Bildung von Sekundärmetaboliten in Verbindung gebracht (Mizutani, 2012; Mizutani und Ohta, 2010). Um die 200 P450 Gene finden sich durchschnittlich im Pool einer Art. Manche Sekundärmetaboliten kommen neben ihrer charakteristischen Anwesenheit in einer Pflanzenfamilie auch noch verstreut in einzelnen Spezies nicht verwandter Familien vor. Die Benzoxazinoide werden z. B. wie beschrieben in vielen Gräsern nachgewiesen und finden sich ausserdem in einzelnen Dikotyledonen. Dieses Verbreitungsmuster kann durch konvergente Evolution in den Spezies oder durch monophyletischem Ursprung des Biosynthesewegs bei Verlust während der evolutionären Genese von Pflanzenordnungen und -familien erklärt werden. Die Aufklärung des BX-Biosynthesewegs in den beiden Dikotyledonen *C. orientalis* und *L. galeobdolon* sollte dessen evolutionären Ursprung klären. Der Verlust eines Elements der Biosynthese-Module (Abbildung 24) in der evolutionären Entwicklung der Pflanzenfamilie hätte unterschiedliche Konsequenzen. Werden Signaturenzym oder funktionalisierende Enzyme funktionslos, ist die chemische Abwehr verloren. Verlust des stabilisierenden Enzyms ist schädlich für die Pflanze und der Schaden kann durch Gewinn einer Ersatzfunktion oder durch Inaktivierung des gesamten Biosynthesewegs ausgeglichen werden. Geht das aktivierende Enzym verloren, bleiben die metabolischen Kosten der Biosynthese, ohne dass ein Schutz geliefert wird. Man kann davon ausgehen, dass auch in diesem Fall der Biosyntheseweg entweder verloren geht oder ein passendes aktivierendes Enzym rekrutiert wird. Es wurde gezeigt, dass das Signaturenzym BX1 der BX-Biosynthese, ein Homolog der Alpha-Untereinheit der TSA ist und in den drei Dikotyledonen *A. squarrosa*, *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und den Gräsern konvergent entstanden ist (Schullehner *et al.*, 2008). Allerdings zeigte sich auch, dass nur wenige Aminosäureaustausche benötigt werden, um einem TSA-Enzym BX1-Funktion zu vermitteln. TSA2 von *Arabidopsis thaliana* hat zum Beispiel ebenfalls die Fähigkeit wie BX1 freies Indol zu bilden (Schullehner *et al.*, 2008). Ein entwicklungsbedingter Verlust von Genen in zuvor etablierten monophyletischen BX-Biosynthesewegen in Mono- und Dikotyledonenpflanzen führte also vielleicht nicht gleich zum Verlust des Syntheseweges. Durch sekundäre Rekrutierung eines anderen Gens mit polyphyletischem Ursprung aber flexibler Funktion könnte der Verlust ausgeglichen worden sein. Auch die DIBOA-UDP-Glukosyltransferase CoBX8 und die spezifische Glukosidase CoGLU zeigten eine von den entsprechenden Enzymen der Gräser unabhängige Evolution (Dick *et al.*, 2012). Wiederum kann dies das Ergebnis einer sekundären Rekrutierung aus dem Pool der jeweiligen Genfamilien sein. Letzte Gewissheit über die Phylogenie der BX-Biosynthese kann daher

erst die Aufklärung aller Schritte liefern. Daher wurden für *C.orientalis* P450-Gene untersucht, die Kandidaten für die Funktionalisierung von Indol in der Biosynthesekette sind.

## 4.2 Analyse von *C. orientalis* P450-Enzymen

79 vollständige P450-Sequenzen konnten im Transkriptom von *C. orientalis* identifiziert werden. Davon wurden zwölf Kandidaten ausgewählt, basierend auf dem Kriterium, dass ihre Transkriptmengen in Blatt, Blüte und Wurzel dem Expressionsmuster von *CoBx1* in eben diesen Geweben entsprechen (siehe Abbildung 4). Diese Übereinstimmung der Gen-Transkriptdaten von *Bx1* und *Bx2-Bx5* wurde in *Z. mays* gefunden. Die zwölf Kandidaten wurden im Hefesystemen exprimiert und mit verschiedenen Substraten getestet (siehe Tabelle 15). Die Kandidaten wurden in Hefestämmen in Kombination mit der *A. thaliana* ATR1 Reduktase oder im neu etablierten Hefestamm mit der *C. orientalis* CoPOR14 analysiert. Das System mit der homologen Reduktase sollte sicherstellen, dass ein funktioneller Reduktase-P450-Komplex gebildet werden kann. Zusätzlich wurde die DIBOA-UGT CoBX8 (Dick *et al.*, 2012) in Hefe exprimiert. Für die Dhurrin-Biosynthese wurde gezeigt, dass die Glukosyltransferase mit P450-Enzymen und Reduktase einen funktionellen Komplex bilden, das sogenannte Metabolon (Laursen *et al.*, 2016). Da im Biosyntheseweg von *C. orientalis* in Analogie zu den Gräsern mehrere P450-Enzyme postuliert werden und ihre Interaktion im Metabolon für die enzymatische Aktivität notwendig sein könnte, wurden auch die Kombination der P450-Kandidaten miteinander erzeugt (Tabelle 15). Trotz dieser umfassenden Analysen konnte keine Aktivität der P450-Kandidaten mit einem getesteten Substrat nachgewiesen werden. Entweder wurden nicht die richtigen Kandidaten untersucht oder die Reaktionsbedingungen, einschließlich der gewählten Substrate, waren nicht adäquat. Schullehner *et al.*, 2008 konnten in Inhibitionsassays ebenfalls zeigen, dass durch Inkubation mit dem P450-Enzym-Inhibitor 1-Aminobenzotriazol der Einbau von radioaktivmarkierten Kohlenstoff in DIBOA vermindert. Der analoge Versuch mit dem Dioxygenase-Inhibitor Prohexadion führte zu keiner signifikanten Verminderung der DIBOA-Biosynthese. Daraus lässt sich schließen, dass P450-Enzyme an der BX-Biosynthese beteiligt sind. Die getesteten Enzyme wurden anhand ihrer Expressionsmuster ausgewählt. Jedoch gibt es in Organismen häufig eine Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Menge (Greenbaum *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2016). Abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzenzelle können z. B. in Mais Protein und Transkriptmenge korrelieren oder auch nicht (Ponnala *et al.*, 2014). Auch die Daten für die *BXGlu* der beiden Dikotyledonen deuten darauf hin, dass dieses Auswahlkriterium nicht immer zutrifft. *CoGlu* hat Transkriptmengen im Bereich des Housekeeping-Enzyms GAP C in verschiedenen Geweben (Dick *et al.*, 2012), *LgGlu1* ist zwar auch konstitutiv exprimiert aber die Konzentration erreicht nur etwa 5% des GAPDH-Wertes (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu ist die *LgGLU1* Proteinmenge hoch. Sekundärmetabolite können in Zielgewebe transportiert werden. Für Glukosinolate

(GS) wurde dies nachgewiesen (Chen *et al.*, 2001; Ellerbrock *et al.*, 2007). Dies kann als wesentlicher Vorgang für die BX-Biosynthese in den Dikotyledonen ausgeschlossen werden, da Schullehner *et al.*, 2008 mittels Isotopenmarkierung Indol als Intermediat der DIBOA-Synthese in *C. orientalis* nachgewiesen haben und gezeigt haben, dass in Blüten und Blättern im Gegensatz zu Wurzeln *de novo*-Biosynthese stattfindet. Der Umsatz von Indol durch isolierte Mikrosomen in einer NADPH-abhängigen Reaktion konnte für *C. orientalis* gezeigt werden (Schullehner *et al.*, 2008, diese Arbeit Tabelle 13). Damit ist Indol als Intermediat identifiziert. Jedoch war die Menge des in beiden Arbeiten nachgewiesenen Produkts gering, so dass die Identität nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens wurde angenommen, dass Indolin-2-on gebildet wird. Damit wäre nach Indol das zweite mit dem Biosyntheseweg in den Gräsern übereinstimmende Intermediat gefunden. Wegen der geringen Produktmenge ist nicht ausgeschlossen, dass ein Artefakt oder Nebenprodukt identifiziert wurde. Abweichung von den bekannten Biosyntheseschritten würde konvergente Evolution des Stoffwechselwegs bedeuten. Die aus *C. orientalis* isolierten Mikrosomen wurden parallel mit Maismikrosomen durch Umsatz von Zimtsäure zu Cumarsäure auf ihre Vitalität getestet. In diesen Ansätzen unter identischen Inkubationsbedingungen bestanden Aktivitätsunterschiede in den Präparationen der beiden Pflanzenspezies. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass für P450-Reaktionen der BX-Biosynthese in *C. orientalis* nicht optimale Versuchsbedingungen verwendet wurden. Der Nachweis von Hydroxlierungen im Hefesystem könnte daran gescheitert sein, dass die Analysebedingungen nicht optimal waren, dass falsche Substrate eingesetzt wurden, dass der Nachweis eines unbekanntes Produkts nicht gelang oder dass nicht die P450-Enzyme des Biosynthesewegs untersucht wurden.

### **4.3 Analyse der BX-Biosynthese in *L. galeobdolon***

#### **4.3.1 LgBX8 konnte nicht identifiziert werden.**

Die Kenntnis der BX-Biosynthese in *L. galeobdolon* sollte durch Isolierung und Charakterisierung der involvierten UGT LgBX8 und der  $\beta$ -Glukosidase erweitert werden.

Im erstellten *L. galeobdolon* Transkriptom wurden 30 Sequenzen für UGTs identifiziert. Zusätzlich gab es Peptidsequenzen aus der funktionellen Reinigung der *L. galeobdolon* DIBOA-UGT (Dick, 2010; Bernhard Küster, Julia Mergner, persönliche Mitteilung). Drei im Transkriptom identifizierte UGTs (UGT11, UGT27, UGT28) stimmten in hohem Maße mit den gefundenen Peptiden überein. Die Proteine wurden in *E. coli* heterolog exprimiert und über His- oder GST-Tag aufgereinigt. Gelelektrophorese bestätigte die Reinigung von Proteinen der erwarteten Masse im nativen Ansatz (2.4.2 Material und Methoden, Abbildung 8 Ergebnisse). Für keinen Kandidaten konnte DIBOA-Glukosylierung nachgewiesen werden. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Inkubationsbedingungen der Analysen

unzureichend waren, da sie für die funktionelle Reinigung des Proteins erfolgreich angewandt wurden. Es ist kein allgemein von UGTs akzeptiertes Substrat bekannt, daher konnte nicht nachgewiesen werden, dass die bakterielle Expression und die Aufreinigung zu einem funktionellen Protein geführt hatte. Als alternativer Ansatz wurde die heterologe Expression in transgener *A. thaliana* gewählt. Für die DI(M)BOA glukosylierenden Enzyme *ZmBX8*, *ZmBX9* und *CoBX8* wurde gezeigt, dass sie transgener *A. thaliana* Toleranz gegen die BX-Aglukone vermittelt (Dick *et al.*, 2012; von Rad *et al.*, 2001). Dies war im Ansatz mit den *L. galeobdolon* UGTs nicht der Fall. Es muss davon ausgegangen werden, dass die BX-UGT *LgBX8* nicht unter den untersuchten Kandidaten war. Möglicherweise war dieses Enzym in der funktionellen Proteinreinigung nur in geringen Mengen enthalten, so dass keine indikativen Peptide identifiziert wurden. Alternativ könnte *LgBx8* nicht im Transkriptom vertreten gewesen sein. 30 UGTs stellen nur rund ein Viertel des in Pflanzen erwarteten UGT Pools dar. Da für *L. galeobdolon* keine Genomsequenz vorliegt, konnten keine zusätzlichen Vergleichssequenzen heran gezogen werden.

#### **4.3.2 Die BGLU *LgGLU1* hydrolysiert GDIBOA.**

Vier putative  $\beta$ -Glukosidase Gene von *L. galeobdolon* wurden durch *de novo* Assemblierung im Transkriptom identifiziert. Sie wurden in Bezug auf das Expressionsmuster und durch heterologe Expression der Enzyme (*LgGLU1*, *LgGLU2*, *LgGLU4*) auch in ihrer Substratspezifität charakterisiert.

Die Aminosäuresequenz von *LgGLU3* zeigt das für  $\beta$ -Mannosidasen charakteristische Aminosäuremotiv L(S/A)ENG anstelle von I/VTENG im aktiven Zentrum. Dieses Motiv positioniert die Zuckereinheit des Substrats in Nähe der Glutamatreste, die als Nukleophile und allgemeine Säure/Base Katalysten in der Reaktion fungieren (Czjzek *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2004). Mannosidasen spielen eine Rolle bei Zellwandmodifikationen, die bei Zellteilung aber z.B. auch bei Interaktion mit mikrobiellen Pathogenen erfolgten. Dazu passt, dass *LgGlu3* hohe Expressionslevel in allen untersuchten Organen, Wurzeln, Blüten und Blättern, zeigte. Ubiquitäre Expression wurde auch für die Reis und *A. thaliana* Mannosidasen *OsBglu7* (Ketudat Cairns *et al.*, 2015) und *AtBglu44* (Xu *et al.*, 2004) beschrieben. In Reis zeigte nur die Mannosidase diese gleichmäßig hohe Expression. Trotz vielfältiger Ansätze schlug die heterologe Expression von *LgGLU3* fehl, die Ursache ist unklar. *LgGlu3* kann zwei verschiedene Proteine bilden, die sich auch in der vorhergesagten subzellulären Lokalisation unterscheiden (siehe Abbildung 13). Für beide Isoenzyme wurden Ansätze zur heterologen Expression gemacht. Für die Isoform mit längerer N-terminalen Sequenz wird ein Transport in Mitochondrien vorhergesagt, für die kürzere Isoform eine Lokalisation in der Vakuole. Dies ist im Gegensatz zur subzellulären Lokalisation im sekretorischen Pfad, der für die anderen

drei *L. galeobdolon* BGLUs favorisiert wird. Möglicherweise ist das transiente Expressionsystem in *N. benthamiana* deshalb im Fall von *LgGLU3* nicht effizient.

Die enzymatische Funktion von *LgGLU1* wies sie als GDIBOA Glukosidase aus. Es wurde gezeigt, dass die optimalen Temperatur- und pH- Bedingungen für die GDIBOA-Hydrolyse durch Proteinrohextrakt aus *L. galeobdolon* Blätter durch heterolog exprimierte *LgGLU1* übereinstimmen. Außerdem ergaben sich identische  $K_m^{GDIBOA}$  Werte (siehe Tabelle 21). Neben GDIBOA akzeptierte *LgGLU1* verschiedene Metabolite aus unterschiedlichen Substanzfamilien (siehe Tabelle 20). Dieselben Glukosidaseaktivitäten wurden im Rohextrakt aus *L. galeobdolon* Blättern gefunden. Die einzige im Rohextrakt nachgewiesene Glykosidaseaktivität, die nicht auch *LgGLU1* aufweist, ist Mannosehydrolyse (Tabelle 20). Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass weitere BGLUs im untersuchten Material aktiv sind, ausreichend für Hydrolyse des Spektrums an untersuchten Substraten sind aber die Aktivitäten von *LgGLU1* und einer Mannosidase, die eventuell von *LgGLU3* repräsentiert wird. Die Transkriptionsanalysen zeigten, dass *LgGLU1* moderat in allen Geweben exprimiert ist. Wenn man die enzymatische Aktivität heterolog exprimierten *LgGLU1*s und die GDIBOA-Glukosidase-Aktivität im Rohextrakt zueinander in Beziehung setzt, ergibt sich, dass *LgGLU1* rund 1 % des Gesamtproteins in den Blättern ausmacht. Auch wenn dieser Wert eventuell aufgrund geringerer Enzymaktivität bei heterologer Expression zu hoch sein könnte, bleibt eine Diskrepanz zwischen Transkript- und Proteinmenge. Ein Grund hierfür könnte die Stabilität von  $\beta$ -Glykosidasen sein.

Die *in planta* Funktion von *LgGLU2* und *LgGLU4* konnte nicht bestimmt werden, obwohl die heterologe Expression erfolgreich war und Glukosidaseaktivität verifiziert werden konnte. *LgGLU4* akzeptierte keines der natürlichen Substrate, die getestet wurden, im gleichen Maß, wie das künstliche generelle Substrat *pNPG*. In phylogenetischen Analysen ist *LgGLU4* einer unabhängigen Klade unbestimmter Funktion zugeordnet (siehe Abbildung 21). Als einziges *LgGlu*-Gen zeigt *LgGlu4* bei Verwundung ein Ansteigen des Transkriptlevels, daher könnte das Enzym an Reparatur- oder Verteidigungsreaktionen beteiligt sein. Zellobiosehydrolyse, die für die ebenfalls verwundungsinduzierbare *OsBGLU4* bestimmt wurde (Rouyi *et al.*, 2014), kann aufgrund der getesteten Substrate (siehe Tabelle 20) jedoch ausgeschlossen werden. Sekundärmetabolite zweier Klassen, das cyanogene Glukosid Dhurrin und das Iridoid Oleuropein werden durch *LgGLU2* im gleichen Maß wie *pNPG* hydrolysiert. Dieses Aktivitätsspektrum könnte ein Indikator dafür sein, dass *LgGLU2* eine Funktion im Sekundärmetabolismus hat. Das intrinsische Iridoid Harpagid wurde als Substrat vermutet, jedoch zeigte sich, dass keine Hydrolyse durch *LgGLU2* stattfindet. Das Repertoire der vorliegenden BGLUs beinhaltet also ein Enzym das wahrscheinlich dem

Zellwandmetabolismus zuzuschreiben ist, *LgGLU3*, und mit der DIBOA-BGLU *LgGLU1* ein Enzym der chemischen Abwehr.

Expressionsanalysen von unterschiedlichen Mitgliedern der Reis *OsBglu* Familie durch Ketudat Cairns *et al.*, 2015 und Cao *et al.*, 2008 zeigten ein für Gewebe und Umweltbedingungen spezifisches Expressionsmuster der individuellen *Bglus*. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Expressionsatlas der *AtBGLUs* im *A. thaliana* eFP browser überein (Winter *et al.*, 2007). Der Größte Teil der *A. thaliana* und Reis *Bglus* wird im Samen transkribiert. Höchstens 10 der 40 Mitglieder in der Genfamilie sind signifikant in Blättern und anderen vegetativen Geweben exprimiert. Damit bilden die vier *L. galeobdolon* Gene *LgGlu1* bis *LgGlu4* wahrscheinlich einen substantiellen Teil der *LgBglu* Gene, die in Blättern exprimiert werden.

#### **4.3.3 Substratpräferenzen der BXBGLUs aus Monokotyledonen und Dikotyledonen.**

Während in Weizen- und Maiskeimlingen fast ausschließlich das 7-Methoxyderivat (G)DIMBOA nachgewiesen wird, finden sich in Roggen in Sprossen hauptsächlich (G)DIBOA und in den Wurzeln hauptsächlich (G)DIMBOA. Neben *A. squarrosa* und *Aphelandra auriantiacca* (Scheidw.) Lindl., die Spuren von 7-Methoxybenzoxazinoiden zeigen, wird in Dikotyledonen hauptsächlich DIBOA als Endprodukt der BX Biosynthese gefunden (Sicker *et al.*, 2000). Diese Unterschiede im Vorkommen der Substrate spiegeln sich in den Präferenzen der entsprechenden Glukosidasen wieder. *ZmGLUs* und *TaGLUs* sind hauptsächlich effektiv mit GDIMBOA (Oikawa *et al.*, 1999; Sue *et al.*, 2000). *ScGLU* zeigt keinen Unterschied zwischen diesen beiden Glukosiden (Sue *et al.*, 2006) und beide Dikotyledonen-BXBGLUs, *LgGLU1* und *CoGLU* haben nur geringe GDIMBOA Glukosidaseaktivität. Eine zweite auffällige Gemeinsamkeit der Dikotyledonen Enzyme ist der vergleichsweise hohe  $K_m$ -Wert für die präferierten Substrate mit rund 2 mM, er liegt bei den Gräserenzymen bei 0,1 bis 0,4 mM. Zieht man die Substratkonzentration von mehr als 10 mM, die in den Pflanzen vorkommt (Tabelle 16 Ergebnisse, Niculaes *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2015) in Betracht, ist die niedrigere Substrataffinität nicht limitierend. Die Enzym Effizienzen der Mais, Roggen, *L. galeobdolon* und *C. orientalis* Enzyme liegen im selben Bereich ( $k_{cat}/K_m$  ungefähr 100 [mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>])(siehe Tabelle 21, Cicek *et al.*, 2000; Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006).

Allgemein wird für BGLUs oft die Hydrolyse verschiedener Substraten nachgewiesen. Nebenaktivitäten wurden von Ketudat Cairns *et al.*, 2015 unterteilt in „Multitasking“ und „Moonlighting“. Die duale Aktivität von *ZmGLU* kann „Multitasking“ zugeordnet werden, da die Hydrolyse der Cytokine *tZOG* und GDIMBOA mit ähnlicher Effizienz erfolgt und davon ausgegangen werden kann, dass beide Substrate in einigen Geweben zur selben Zeit

vorliegen. Keine der Dikotylen BXBGLUs setzte Cytokinine um. Glukosidaseaktivität mit Substraten, die nicht in den entsprechenden Pflanzen vorkommen, kann als „Moonlighting“ angesprochen werden. Obwohl Isoflavonoide keine in den jeweiligen Spezies vorkommende Sekundärmetabolite sind, teilen sich die Dikotyledonenenzyme CoGLU, LgGLU1 und das Roggen-Enzym ScGLU Isoflavonoid Glukosidaseaktivität (siehe Tabelle 20, Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006). Darüberhinaus zeigten LgGLU1, CoGLU und ZmGLUs gemeinsam eine Interaktion mit dem cyanogenen Glukosid (CG) Dhurrin, was bei den Dicotyledonen-Enzymen zu dessen Hydrolyse und im Fall der Maisenzyme zur Inhibition der Enzymaktivität führt. CG bestehen aus dem alpha-Hydroxynitril-Aglukon und einem Zuckerrest und bilden eine weiterverbreitete Zwei-Komponenten-Abwehr im Pflanzenreich (Bak *et al.*, 2008). Die Biosynthese der CGs ist vermutlich mehrfach unabhängig entstanden (Tako *et al.*, 2010). Man kann spekulieren, dass die unabhängig generierten CG-BGLUs eine Enzymstruktur aufweisen die ebenfalls einen geeigneten unabhängigen Ausgangspunkt für die Evolution der heutigen BXBGLUs in Monokotylen und Dikotylen bildeten.

Bemerkenswert ist, dass der größte Unterschied zwischen den GDIBOA-BLGLUs LgGLU1 und CoGLU in der Effizienz der Hydrolyse des Iridoids Oleuropein und in dessen Funktion als Inhibitor der GDIBOA-Hydrolyse besteht. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass beide Dikotylen-BXBGLUs sich in jeweils familienspezifischen Kladen einordnen. Die Diversifizierung der BGLUs entspricht der Entwicklung der Ranunculaceae und Lamiales. Die Iridoid Oleuropein-Glukosidase OeGLU aus *Olea europaea* L. (Velázquez-Palmero *et al.*, 2017) ist ein Mitglied einer großen Lamiales-Klade, die, wenn auch mit niedrigen Bootstrapwerten, mit der LgGLU1 Klade assoziiert ist. Akzeptanz und Hydrolyse von Iridoiden scheint bei BGLUs der Lamiales-Klade tendenziell angelegt zu sein. Iridoide sind Sekundärmetabolite die speziell in den Lamiales nachgewiesen werden, in den Ranunculaceae wurden sie dagegen bisher nicht beschrieben (Watson und Dallwitz, 1992). Die bei CoGLU gefundene Hydrolyse von Iridoiden (siehe Tabelle 20) ist also nicht mit der biologischen Funktion in der Pflanze verbunden, sondern eher eine zufällige Eigenschaft („Moonlighting“).

#### 4.4 Enzympromiskuität und Evolution von Biosynthesewegen.

Evolution eines Biosynthesewegs ist abhängig vom Beitrag der synthetisierten Verbindungen zur Vitalität des Organismus. Im Fall der Zwei-Komponenten-Abwehrsysteme widerstreiten zwei Eigenschaften der Fixierung der Synthesekette. Offensichtlich ist die Autotoxizität der Intermediate schädlich, Reduzierung der Reaktivität dagegen verringert die Effizienz der Abwehr und zur gleichen Zeit bleiben die metabolischen Kosten erhalten. Daher ist die BGLU Funktion, die die stabilisierten Metabolite im Falle eines Angriffs durch Herbivore und Pathogene aktiviert, eine notwendige Komponente um das Abwehrsystem „rentabel“ zu

machen. Ein direkter Nachweis für die Bedeutung der BGLUs für effiziente Abwehr wurde durch die transgene Expression der *SbDHR* aus Sorgum in Gerste gegeben. Dadurch wurde in der Gerste die Hydrolyse des vorhandenen cyanogenen Glukoside Epiheterodendrin ermöglicht (Nielsen *et al.*, 2006). In Gerste fehlt eine entsprechende Glukosidase (Nielsen *et al.*, 2002). Die transgen etablierte Cyanogenese führte zum Anstieg der Resistenz gegen das Pathogen *Blumeria graminis* (Nielsen *et al.*, 2006). Horowitz, 1945 entwickelte das Konzept der retrograden Evolution von Biosynthesewegen. Dabei wird die Bedeutung des letzten Schritts für die Etablierung des gesamten Stoffwechselwegs betont. Der Glukosidase, welche die unverzichtbare letzte Reaktion in der Zwei-Komponenten-Abwehr darstellt, würde eine grundlegende Rolle zugeteilt werden. Begünstigt wird die Rekrutierung der abschließenden Komponente des Abwehrsystems dadurch, dass BGLUs eine substantielle Substrat-Promiskuität (Ketudat Cairns *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2012) aufweisen. Solch eine Substratambiguität von Enzymen wurde als Basis für die Proliferation von Stoffwechselwegen vorgeschlagen (Jensen, 1976). Latente Substrat-Umwandlung kann vermutlich ohne die Originalfunktion zu beeinflussen vorliegen und ist nicht unter Selektionsdruck (Aharoni *et al.*, 2005). Weitere Mechanismen zur Rekrutierung neuer Enzymfunktionen sind Genduplikation und Neo-Funktionalisierung (Moghe *et al.*, 2017; Ober und Hartmann, 2000). Plastizität in Bezug auf die letztendliche *in planta* Enzymfunktion wird in der Gräser-Linie der BXBGLUs demonstriert. *ZmGLUs*, *TaGLUs*, *ScGLUs*, *AsGLU* und *SbDHR* haben monophyletischen Ursprung (Abbildung 21., Dick *et al.*, 2012) und die Enzymphylogenie folgt der phylogenetischen Verwandtschaft der Spezies. Jedoch werden durch diese Enzyme die unterschiedlichen Substrate BXs, CGs und Saponine hydrolysiert. Ein ähnlicher Fall des Zuschneidens homologer Gene auf unterschiedliche Funktionen wird in *Lotus japonicus* L. gefunden. *L. japonicus* produziert cyanogene und nicht-cyanogene Hydroxynitrilglukoside (HNGs). Die Enzyme *LjBGD2*, 3 und 4 zeigen differentielle Expression in Blättern und Blüten und haben dabei unterschiedliche Substratspektren. *LjBDG4* ist blütenspezifisch und hydrolysiert ausschließlich nicht-cyanogene  $\gamma$  und  $\beta$ -HNGs (Lai *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2014).

Obwohl *LgGLU1* „zweitbeste“ katalytische Werte für das Substrat Oleuropein aufwies, war die Hydrolyse des intrinsischen Iridoids Hapargid für das heterolog exprimierte Enzym und die Blattrohextrakte nicht nachweisbar. Die Beispiele von produktiven/nicht-produktiven Substratpaaren, *LgGLU1* und GDIBOA/Harpagid, *ZmGLU* und GDIMBOA/Dhurrin, und *LjBDG4* und  $\gamma$ - und  $\beta$ -HNG/ $\alpha$ -HNGs, deuten auf eine weitere Facette in der Evolution der Sekundärmetabolitsynthesen hin, den Ausschluss von Hydrolysen bestimmter in der Pflanze vorliegender Substrate und damit der Selektion eines einzigen Abwehrmetaboliten in bestimmten Spezies. Wechselseitiger Ausschluss von Sekundärmetabolitklassen ist in Pflanzen weit verbreitet (Wink, 2003) und wird oft der Limitierung der verteilbaren

Intermediate zugeschrieben, die im Primärmetabolismus generiert werden. So schließen sich z.B. in *Hordeum* Gramin und Benzoxazinoide gegenseitig aus, da beide mit der Tryptophanbiosynthese verknüpft sind (Grün *et al.*, 2005). Die Beschränkung auf eine toxische Verbindung, die dann relativ massiv gebildet werden kann könnte generell evolutionär von Vorteil sein und damit die Diskriminierung von Substraten durch die ursprünglich promisköse aktivierende BGLU auslösen.

#### 4.5 Die Phylogenien der an der BX-Biosynthese beteiligten Enzyme

*C. orientalis* und *L. galeobdolon* sind keine Modellpflanzen, Genomsequenzen sind nicht vorhanden. Wenige Gene wurden isoliert und charakterisiert. Um für diese Pflanzen Einblick in die Organisation der Genfamilien von P450-Enzymen, UGTs und BGLUs zu erhalten, die generell an pflanzenspezifisch Biosynthesen (Zellwand, Hormonhomeostase, Sekundärmetabolismus) beteiligt sind und Gegenstand der Untersuchungen der BX-Biosynthese im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind, wurden phylogenetische Analysen ausgeführt.

Für die P450 bestand der Datensatz aus rund 640 Sequenzen, wovon je ca. 50 aus *L. galeobdolon* und *C. orientalis* stammten. Der Datensatz wurde durch die annotierten *A. thaliana* und *O. sativa* Sequenzen komplettiert, welche jeweils mehr als 200 Sequenzen besitzen. Die P450-Gene *ZmBx2-ZmBx5* waren zusätzlich in die Analyse einbezogen. *C. orientalis* und *L. galeobdolon* Sequenzen fanden sich gleichmäßig im Baum verteilt und obwohl die Datensätze vermutlich nicht vollständig waren, gab es keine Über- oder Unterrepräsentanz in einer Familie. Im Klan CYP71, der der Sekundärmetabolit-Biosynthese zugeordnet ist, war *C. orientalis* mit 32 und *L. galeobdolon* mit 24 Sequenzen vertreten. Wie aufgrund der Expansion der P450-Gene während der Evolution der Landpflanzen zu erwarten (Mizutani und Ohta, 2010), fanden sich für *C. orientalis* und *L. galeobdolon* jeweils eng verwandte P450-Enzyme, die auf rezente Familien/Ordnungs-spezifische Genduplikationen hinweisen. Die Genduplikationen, die zu solchen Kladen führen, kann die Enzyme von Syntheseketten generieren. Da dies für die P450-Gene der Gräser gefunden wurde, waren solche Subkladen in den Dikotyledonen von besonderem Interesse und wurden auch in die enzymatische Analyse einbezogen (CoCYP Contigs 8863, 4127, 3362, 3302). *ZmBx3-ZmBx5* bilden eine Subklade, *ZmBx2* stellt eine Verbindung dieser Sequenzen zu Reis-P450-Enzymen her und alle diese Gene finden sich in einer Gräser/Monocot-Klade, die eine Dikotyledonen-Schwester-Klade hat (siehe Abbildung 22 (2), Abbildung 6 Anhang). In diese ist CoP450\_36 eingruppiert und assoziiert mit dieser Dikotyledonen-Klade fand sich eine Klade von fünf *L. galeobdolon* Enzymen (CoP450\_8, CoP450\_22, CoP450\_25, CoP450\_43, CoP450\_44). In der weitem Verwandtschaft der Mais-BX-Gene befanden sich damit sowohl *C. orientalis* als auch *L. galeobdolon* P450-Enzyme.

Diese sechs Gene könnten interessant für die Suche nach den BX-modifizierenden Enzymen sein. Fünf sind jedoch davon auszuschließen (contig03598 (CoP450\_25), contig02073 (CoP450\_8), C\_ori\_rep\_c23033 (CoP450\_43), C\_ori\_rep\_c23776 (CoP450\_44), contig03110 (CoP450\_22), Abbildung 6, Anhang), da die Expression weitgehend auf die Wurzel beschränkt ist. BX-Biosynthese wurde aber mit Gegenwart von BX korreliert und *C. orientalis* Wurzeln enthalten keine BX. Dieser Ausschluss gilt nicht für Contig06447 (CoP450\_36, Abbildung 6, Anhang), das Expressionsmuster ist jedoch unpassend und das Gen wurde nicht berücksichtigt weil die Expression in der Blüte zu gering ist. Die Verwandtschaftsbeziehung zu den *ZmBx*-Genen macht das Gen attraktiv, aber die Sequenz ist unvollständig und es ist fraglich ob die Beziehung bestehen bleibt, wenn die Vollsequenz vorliegt, derzeit ist die Unterstützung der Eingruppierung bei Bootstrap-Analyse gering. Dennoch sollte die Sequenz vervollständigt werden und die enzymatische Aktivität geprüft werden.

Die meisten der Spezies-spezifischen Subkladen von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* zeigten keine enge Verwandtschaft mit Ausnahme von Sequenzen in der der CYP97-Klade in der interessanterweise beide Spezies vertreten waren. Enzyme dieser Kategorie sind am Carotenoidmetabolismus beteiligt (Tian *et al.*, 2004). CYP80B Enzyme sind in unterschiedlichen Spezies mit dem Sekundärmetabolismus verknüpft, sie haben Funktion im Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolismus (Alcantara *et al.*, 2005; Desgagné-Penix und Facchini, 2012; Frick *et al.*, 2007; Pauli und Kutchan, 1998). Für CYP77A3 Enzyme (Vorkommen *Glycine max*) wurden bisher keine spezifischen Funktionen beschrieben.

In der Phylogenie der UGTs fällt auf, dass oft Monokotyledonen und Dikotyledonen-Schwesterkladen zu finden waren. Wie zuvor beschrieben (Dick *et al.*, 2012) waren die UGTs BX8 von *C. orientalis* und *Z. mays* in unterschiedlichen Kladen (H und G) zu finden und zeigten damit unabhängige Evolution, basierend auf unterschiedlichen Vorläufergenen, die schon vor der Trennung von Monokotyledonen und Dikotyledonen präsent waren. Die 30 identifizierten *L. galeobdolon* UGT-Gene waren über alle UGT Klassen verteilt, auch in der H-Klade fanden sich Vertreter. Zwei der *A. thaliana* Gene aus der H Gruppe sind bisher untersucht, es handelt sich um UGT76C1 und UGT76C2 welche Aktivität gegenüber Cytokinin zeigen (Hou *et al.*, 2004). Dagegen wurde keine *L. galeobdolon* UGT der G-Klade identifiziert. Die UGTs 11,27 und 28 die funktionell untersucht wurden waren in Gruppen G und I zu finden (siehe Abbildung 23). Da das *LgBx8*-Gen nicht identifiziert werden konnte, kann keine Aussage über die evolutionäre Beziehung der BXUGT gemacht werden, ein mit CoBX8 phylogenetisch eng verwandtes Enzym war nicht prominent im Transkriptom vertreten.

Die phylogenetische Analyse der BGLUs zeigt monophyletischen Ursprung für Enzyme des allgemeinen Stoffwechsels. Sie ordnet die vier in Blättern exprimierten *L. galeobdolon* Gene, übereinstimmend mit der wahrscheinlichen biochemischen Funktion, dem Primärmetabolismus (*LgGlu3*), und dem Sekundärmetabolismus zu (*LgGlu1*, *LgGlu2*). *LgGlu4* findet sich in einem Klan von Enzymen mit unklarer Funktion. Die Phylogenie belegt, dass Enzyme des BX-Metabolismus keine rezente gemeinsame Wurzel haben.

Mit der Identifizierung von *LgGLU1* als GDIBOA-Glukosidase in dieser Arbeit, liegen für die letzte Reaktion im BX-Metabolismus, wie auch für das Signaturenzym BX1, die Sequenzen von Gräsern und von unverwandten Dicotyledonen-Spezies vor. Für beide ergibt die phylogenetische Analyse einen monophyletischen Ursprung innerhalb der Gräser (Frey *et al.*, 2009; Grün *et al.*, 2005) und konvergente Evolution zwischen Gräsern und Dicotyledonen und innerhalb der Dicotyledonen (Abbildung 21, Dick *et al.*, 2012; Frey *et al.*, 2009). Auch wenn der Ursprung der unterschiedlichen Kladen jeweils unscharf ist (siehe Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23), sprechen die Daten eindeutig gegen eine rezente gemeinsame Evolution der BXGLUs.

Die konvergente Evolution der an der BX Biosynthese beteiligten Gene wurde durch unterschiedliche geeignete Vorläufergene ermöglicht. Parallelevolution der BX-Biosynthese in Monokotyledonen und Dicotyledonenpflanzen ist wahrscheinlich. Ein ursprünglich monophyletische Ursprung, kann aber mit den vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen.

## 5 Zusammenfassung

Benzoxazinoide sind Sekundärmetabolite die hauptsächlich in den Poaceen vorkommen und Funktionen in Verteidigung und Allelopathie erfüllen. In *Z. mays* ist die Biosynthese dieser speziellen Metabolite vollständig aufgeklärt, in den Gräsern erfolgt sie mit orthologen Enzymen. Durch das Signaturenzym des Stoffwechselweges BX1 wird Indol gebildet, welches durch vier konsekutive im ER verankerte P450 Enzyme (BX2-BX5) zum reaktiven aber auch autotoxischen DIBOA modifiziert wird. Dieses Molekül wird von den Glukosyltransferasen (UGTs) BX8/BX9 glukosyliert und damit stabilisiert (GDIBOA). In Mais erfolgen weitere Modifizierungen zum Produkt GDIMBOA. Benzoxazinoide sind Vertreter der chemischen Zwei-Komponenten-Abwehrstrategie der Pflanzen, die auf der Biosynthese eines potentiell toxischen Produkts und des aktivierenden Enzyms in getrennten Kompartimenten basiert. Die Glukoside werden in die Vakuole eingelagert und sind dort vor der plastidären spezifischen  $\beta$ -Glukosidase geschützt. Bei Verletzung der Pflanzenzelle durch Herbivor- oder Pathogenbefall wird das reaktive Aglukon durch den nun gegebenen Kontakt mit der Glukosidase erzeugt.

Benzoxazinoide werden außer in den Poaceen auch in einigen Dikotyledonen-Spezies gebildet. GDIBOA findet sich unter anderem in *Consolida orientalis* (Ranunculaceen) und in *Lamium galeobdolon* (Lamiaceen). Diese sporadische Verbreitung macht die Benzoxazinoid-Biosynthese zu einem Modell für die Untersuchung der Evolution von Sekundärmetabolit-Biosynthesen. Mögliche Mechanismen sind konvergente (wiederholte) oder monophyletische Evolution. Der evolutionäre Zusammenhang spiegelt sich in der phylogenetischen Verwandtschaft der beteiligten Enzyme wider. Die BX Biosynthese in Dikotyledonen war bisher nur zum Teil aufgeklärt. Für *C. orientalis* wurden CoBX1, CoBX8 (UGT) und CoBGLU identifiziert. Zur Komplettierung des Biosynthesewegs sollten in dieser Arbeit die spezifischen P450-Enzyme isoliert werden. Für *L. galeobdolon* lag lediglich das Signaturenzym LglGL1 vor, UGT BX8 und DIBOA-BGLU sollten identifiziert werden.

Grundlage für die Isolierung der Gene waren Transkriptom-Daten. In keinem Fall wurde darin die für die Genfamilien erwartete Anzahl von Genen annotiert. Die Einbindung der annotierten Gene in die phylogenetische Analysen der pflanzlichen P450s, UGTs und BGLUs wies jedoch *L. galeobdolon* und *C. orientalis* Gene in allen jeweiligen Genkladen auf. Ausgehend von 79 annotierten P450-Genen wurden 8 Kandidaten aus dem *C. orientalis* Transkriptom aufgrund ihres Expressionsmusters für die Analyse ausgewählt. Trotz Einsatz unterschiedlicher heterologer Expressionssysteme konnte keine für die DIBOA-Biosynthese spezifische Enzymaktivität entdeckt werden. Zusätzlich zu Transkriptomdaten lagen für die Isolierung der UGT BX8 aus *L. galeobdolon* Peptidsequenzen aus funktioneller Reinigung

vor. Drei Kandidatengene wurden identifiziert aber für keines konnte bei heterologer Expression DIBOA-Glukosylierungsaktivität gemessen werden.

Im *L. galeobdolon* Transkriptom wurden vier BGLUs annotiert. *LgGLU1* erwies sich als GDIBOA-spezifische Glukosidase und die kinetischen Parameter konnten bestimmt werden. Die Daten des heterolog exprimierten Gens und der Enzymaktivität des Rohextraktes stimmen überein. Wie die entsprechenden Enzyme *CoGLU* von *C. orientalis*, *ZmGLU* von *Z. mays* und *ScGLU* von *S. cereale* hydrolysiert *LgGLU1* verschiedene auch in den jeweiligen Pflanzen nicht vorkommende Substrate. Übereinstimmend mit *CoGLU* besteht die höchste Aktivität für GDIBOA. Die beiden BGLUs der Dikotyledonen weisen signifikante Unterschiede in der Hydrolyse von Dhurrin, Isoflavonoiden und Iridoiden auf. Während die BGLUs der Gräser monophyletischen Ursprung haben, zeigen *LgGLU1* und *CoGLU* jeweils unabhängige Evolution von jeder anderen Benzoxazinoid-Glukosidase.

Die Identifizierung der *L. galeobdolon* GDIBOA-Glukosidase vervollständigt die Information über ersten und letzten Schritt der Benzoxazinoid-Biosynthese in drei Pflanzenfamilien. Die etablierte Biosyntheseschritte ging jeweils von unterschiedlichen geeigneten Vorläufergenen aus. Wiederholte Evolution der gesamten BX-Biosynthese ist damit wahrscheinlich. Ein monophyletischer Ursprung, Verlust von Genen und sekundäre Requirierung kann aber mit den vorliegenden Daten nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

## Summary

Benzoxazinoids are secondary metabolites widespread in the grasses functioning in defense and allelopathy. Their biosynthetic pathway is well established in *Z. mays*, equivalent enzymes of the benzoxazinoid biosynthesis in grasses are orthologous. The signature enzyme *ZmBX1* mediates the formation of Indol which is subsequently modified by four consecutive ER membrane bound P450s (*ZmBX2-ZmBX5*) yielding reactive as well as autotoxic DIBOA. Glucosyltransferases (UGTs) *ZmBX8* and *ZmBX9* glucosylate the compound for deactivation and stabilization (GDIBOA). In maize GDIBOA is further modified to form the product GDIMBOA. Benzoxazinoids are representatives of the chemical two-component-defence system in plants, which fundamentally consists of the biosynthesis of a potentially toxic product and the activating enzyme in separate compartments. The glucosides are stored in the vacuole where they are protected from specific plastid  $\beta$ -glucosidases. On cell disruption due to herbivore or pathogen attack, both the glucoside and the glucosidase are released and thus defence can be activated.

Benzoxazinoids are also produced in some scattered species of the dicots, for example *C. orientalis* (Ranunculaceae) and *L. galeobdolon* (Lamiaceae). This sporadic distribution makes the benzoxazinoid biosynthesis a good model for evolution of secondary metabolite

biosynthesis. Possible mechanisms are either convergent (repeated) or monophyletic evolution. The evolutionary context is reflected in the phylogenetic relationship of the involved enzymes. The BX biosynthesis in dicots has only been partially elucidated so far. In *C. orientalis* CoBX1, CoBX8 and CoBGLU have been identified. For completion of the biosynthetic pathway specific P450 enzymes were to be isolated. In *L. galeobdolon* only the signature enzyme was known so far. Candidates for UGT BX8 and DIBOA-BGLU were intended to be identified.

In both plant species transcriptome data served as a basis for the isolation of the genes. In all datasets fewer than the expected number of genes were annotated. However, integration of the annotated genes into phylogenetic analyses of plant P450s, UGTs and BLUs uncovered *L. galeobdolon* and *C. orientalis* genes in all respective clades. Beginning with 79 annotated P450 genes eight candidates were chosen for analysis from the *C. orientalis* transcriptome based on their transcription pattern. Although different heterologous expression systems were employed no enzyme activity in DIBOA biosynthesis could be detected. In addition to the transcriptome data, sequences of functionally purified peptides were available for the isolation of the UGT BX8 from *L. galeobdolon*. Three candidates were identified but DIBOA glucosylation activity could not be detected.

Four BGLUs were annotated in the *L. galeobdolon* transcriptome. *LgGLU1* proved to be the GDIBOA specific glucosidase and the kinetic parameters could be determined. The data of the heterologously expressed gene and the enzyme activity of the crude extract coincide. Similarly to respective enzymes *CoGLU* of *C. orientalis*, *ZmGLU* of *Z. mays* and *ScGLU* of *S. cereale*, *LgGLU1* hydrolyses various substrates, some not even occurring in the respective plants. Likewise to *CoGLU*, its highest activity is with GDIBOA. However, both of the dicot BGLUs display significant differences in the hydrolysis of Dhurrin, Isoflavonoids and Iridoids. While the BGLUs of the grasses are of monophyletic origin, the *LgGLU1* and *CoGLU* both appear to be a product of independent evolution between each other and every other benzoxazinoid glucosidase.

Identification of the *L. galeobdolon* GDIBOA glucosidase completes the information about the first and the last step of the benzoxazinoid biosynthesis in those three plant families. The established biosynthetic steps employed different suitable precursor genes. Repeated evolution of the whole BX biosynthesis is therefore probable. A monophyletic origin, due to loss of genes and secondary recruitment is unlikely, but can not completely be excluded from the data.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R., Facchini, P.J., 2005. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant physiology* 138 (1), 173–183. 10.1104/pp.105.059287.
- Alipieva, K.I., Taskova, R.M., Evstatieva, L.N., Handjieva, N.V., Popov, S.S., 2003. Benzoxazinoids and iridoid glucosides from four *Lamium* species. *Phytochemistry* 64 (8), 1413–1417.
- Altschul, S., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25 (17), 3389–3402. 10.1093/nar/25.17.3389.
- Angiosperm Phylogeny Group, 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181 (1), 1–20. 10.1111/boj.12385.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814), 796–815. 10.1038/35048692.
- Babcock, G.D., Esen, A., 1994. Substrate specificity of maize  $\beta$ -glucosidase. *Plant Science* 101 (1), 31–39. 10.1016/0168-9452(94)90162-7.
- Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A., 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science (New York, N.Y.)* 234 (4773), 179–186.
- Bailey, B.A., Larson, R.L., 1989. Hydroxamic Acid Glucosyltransferases from Maize Seedlings 1. *Plant physiology* 90 (3), 1071–1076.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., Werck-Reichhart, D., 2011. Cytochromes p450. *The arabidopsis book* 9, e0144. 10.1199/tab.0144.
- Bak, S., Paquette, S.M., Morant, M., Morant, A.V., Saito, S., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Jørgensen, K., Osmani, S., Hamann, T., Simonsen, H.T., Pérez, R.S., van Heeswijck, T.B., Jørgensen, B., Møller, B.L., 2008. Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochem Rev* 7 (1), 209. 10.1007/s11101-007-9063-3.
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14 (2), 115–132. 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115:AID-YEA204>3.0.CO;2-2.

- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., Miyano, S., 2002. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18 (2), 298–305. 10.1093/bioinformatics/18.2.298.
- Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J., Stöckigt, J., 2007. Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloid family. *The Plant Cell* 19 (9), 2886–2897. 10.1105/tpc.106.045682.
- Barnes, J.P., Putnam, A.R., 1987. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *Journal of chemical ecology* 13 (4), 889–906. 10.1007/BF01020168.
- Barrett, M., 1995. Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. *Drug metabolism and drug interactions* 12 (3-4), 299–315.
- Barry, D., Alfaro, D., Darrah, L.L., 1994. Relation of European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Leaf-Feeding Resistance and Dimboia Content in Maize. *Environmental Entomology* 23 (1), 177–182. 10.1093/ee/23.1.177.
- Baumeler, A., Hesse, M., Werner, C., 2000. Benzoxazinoids-cyclic hydroxamic acids, lactams and their corresponding glucosides in the genus *Aphelandra* (Acanthaceae). *Phytochemistry* 53 (2), 213–222.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R., 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20 (6), 1195–1197. 10.1007/BF00028908.
- Becker, D.M., Guarente, L., 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in enzymology* 194, 182–187.
- Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J.P., Durst, F., 1998. CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochemical and biophysical research communications* 243 (3), 688–693. 10.1006/bbrc.1998.8156.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7 (6), 1513–1523.
- Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B., Vaistij, F.E., 2006. Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual review of plant biology* 57, 567–597. 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105429.
- Bradford, M.M., 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. 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- Bravo, H.R., Copaja, S.V., San Martín, J., 2004. Contents of 1,4-benzoxazin-3-ones and 2-benzoxazolinone from *Stenandrium dulce* (Nees). *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 59 (3-4), 177–180.
- Bullock, W.O., 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* 5, 376–379.
- Cabello-Hurtado, F., Zimmerlin, A., Rahier, A., Taton, M., DeRose, R., Nedelkina, S., Batard, Y., Durst, F., Pallett, K.E., Werck-Reichhart, D., 1997. Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) in wheat. *Biochemical and biophysical research communications* 230 (2), 381–385. 10.1006/bbrc.1996.5873.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., Henrissat, B., 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 326 (Pt 3), 929–939.
- Campos, F., Atkinson, J., Arnason, J.T., Philogène, B.J., Morand, P., Werstiuk, N.H., Timmins, G., 1989. Toxicokinetics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Journal of chemical ecology* 15 (7), 1989–2001. 10.1007/BF01207432.
- Cao, P.-J., Bartley, L.E., Jung, K.-H., Ronald, P.C., 2008. Construction of a rice glycosyltransferase phylogenomic database and identification of rice-diverged glycosyltransferases. *Molecular plant* 1 (5), 858–877. 10.1093/mp/ssn052.
- Cao, Y.-Y., Yang, J.-F., Liu, T.-Y., Su, Z.-F., Zhu, F.-Y., Chen, M.-X., Fan, T., Ye, N.-H., Feng, Z., Wang, L.-J., Hao, G.-F., Zhang, J., Liu, Y.-G., 2017. A Phylogenetically Informed Comparison of GH1 Hydrolases between *Arabidopsis* and Rice Response to Stressors. *Frontiers in plant science* 8, 350. 10.3389/fpls.2017.00350.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T., 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (15), 1972–1973. 10.1093/bioinformatics/btp348.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., Martens, S., 2012. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 69 (6), 1030–1042. 10.1111/j.1365-313X.2011.04853.x.
- Chapple, I.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of clinical periodontology* 24 (5), 287–296.

- Chaudhry, Q., Schröder, P., Werck-Reichhart, D., Grajek, W., Marecik, R., 2002. Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental science and pollution research international* 9 (1), 4–17.
- Chen, S., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Schulz, A., Halkier, B.A., 2001. Long-Distance Phloem Transport of Glucosinolates in Arabidopsis1. *Plant physiology* 127 (1), 194–201.
- Cicek, M., Blanchard, D., Bevan, D.R., Esen, A., 2000. The aglycone specificity-determining sites are different in 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize beta -glucosidase) and dhurrinase (Sorghum beta -glucosidase). *The Journal of biological chemistry* 275 (26), 20002–20011. 10.1074/jbc.M001609200.
- Cicek, M., Esen, A., 1999. Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) beta-glucosidases in *E. coli*. *Biotechnology and bioengineering* 63 (4), 392–400.
- Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16 (6), 735–743.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., Henrissat, B., 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of molecular biology* 328 (2), 307–317.
- Cuevas, L., Niemeyer, H.M., 1993. Effect of hydroxamic acids from cereals on aphid cholinesterases. *Phytochemistry* 34 (4), 983–985. 10.1016/S0031-9422(00)90698-8.
- Cuevas, L., Niemeyer, H.M., Jonsson, L.M.V., 1992. Partial purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside  $\beta$ -d-glucosidase from maize. *Phytochemistry* 31 (8), 2609–2612. 10.1016/0031-9422(92)83595-P.
- Cuevas, L., Niemeyer, H.M., Pérez, F.J., 1990. Reaction of dimboa, a resistance factor from cereals, with  $\alpha$ -chymotrypsin. *Phytochemistry* 29 (5), 1429–1432. 10.1016/0031-9422(90)80095-X.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D.R., Henrissat, B., Esen, A., 2000. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25), 13555–13560. 10.1073/pnas.97.25.13555.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W.P., Bevan, D.R., Henrissat, B., Esen, A., 2001. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGLu1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-D-thioglucoside. *Biochemical Journal* 354 (Pt 1), 37–46.

- Dafoe, N.J., Huffaker, A., Vaughan, M.M., Duehl, A.J., Teal, P.E., Schmelz, E.A., 2011. Rapidly induced chemical defenses in maize stems and their effects on short-term growth of *Ostrinia nubilalis*. *Journal of chemical ecology* 37 (9), 984–991. 10.1007/s10886-011-0002-9.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3 (9), 853–859. 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1 (4), 19–21. 10.1007/BF02712670.
- Desgagné-Penix, I., Facchini, P.J., 2012. Systematic silencing of benzylisoquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72 (2), 331–344. 10.1111/j.1365-313X.2012.05084.x.
- Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., Carlson, J.E., 1995. A [beta]-Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin. *Plant physiology* 107 (2), 331–339. 10.1104/pp.107.2.331.
- Dick, R., 2010. Evolution der Detoxifizierung und Bioaktivierung von Benzoxazinoid-Sekundärmetaboliten. Dissertation.
- Dick, R., Rattei, T., Haslbeck, M., Schwab, W., Gierl, A., Frey, M., 2012. Comparative Analysis of Benzoxazinoid Biosynthesis in Monocots and Dicots: Independent Recruitment of Stabilization and Activation Functions WOA. *The Plant Cell* 24 (3), 915–928. 10.1105/tpc.112.096461.
- Dixon, R.A., Strack, D., 2003. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* 62 (6), 815–816.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32 (5), 1792–1797. 10.1093/nar/gkh340.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (19), 2460–2461. 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Ellerbrock, B.L.J., Kim, J.H., Jander, G., 2007. Contribution of Glucosinolate Transport to Arabidopsis Defense Responses. *Plant Signaling & Behavior* 2 (4), 282–283.
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS one* 3 (11), e3647. 10.1371/journal.pone.0003647.

- Esen, A., 1992. Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.)  $\beta$ -Glucosidase. *Plant physiology* 98 (1), 174–182.
- Falk, A., Rask, L., 1995. Expression of a Zeatin-O-Glucoside-Degrading [ $\beta$ ]-Glucosidase in *Brassica napus*. *Plant physiology* 108 (4), 1369–1377. 10.1104/pp.108.4.1369.
- Frangne, N., Eggmann, T., Koblischke, C., Weissenböck, G., Martinoia, E., Klein, M., 2002. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H(+)-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant physiology* 128 (2), 726–733. 10.1104/pp.010590.
- Franke, R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., Chapple, C., 2002. The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30 (1), 33–45.
- Franková, L., Fry, S.C., 2013. Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. *Journal of experimental botany* 64 (12), 3519–3550. 10.1093/jxb/ert201.
- Frear, D.S., 1995. Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides. *Drug metabolism and drug interactions* 12 (3-4), 329–357.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., Gierl, A., 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science (New York, N.Y.)* 277 (5326), 696–699.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., Gierl, A., 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Molecular & general genetics : MGG* 246 (1), 100–109.
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., Gierl, A., 2009. Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70 (15-16), 1645–1651. 10.1016/j.phytochem.2009.05.012.
- Frick, S., Kramell, R., Kutchan, T.M., 2007. Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic engineering* 9 (2), 169–176. 10.1016/j.ymben.2006.10.004.
- Friebe, A., Roth, U., Kück, P., Schnabl, H., Schulz, M., 1997. Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Phytochemistry* 44 (6), 979–983. 10.1016/S0031-9422(96)00677-2.

- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P., 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in plant science* 10 (11), 542–549. 10.1016/j.tplants.2005.09.007.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 350, 87–96.
- Gómez-Anduro, G., Cenicerros-Ojeda, E.A., Casados-Vázquez, L.E., Bencivenni, C., Sierra-Beltrán, A., Murillo-Amador, B., Tiessen, A., 2011. Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant molecular biology* 77 (1-2), 159–183. 10.1007/s11103-011-9800-2.
- Grayer, R.J., Harborne, J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry* 37 (1), 19–42. 10.1016/0031-9422(94)85005-4.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M., 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology* 4 (9), 117. 10.1186/gb-2003-4-9-117.
- Grombacher, A.W., Russell, W.A., Guthrie, W.D., 1989. Resistance to first-generation European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and DIMBOA concentration in midwhorl leaves of the BS9 maize synthetic. *Journal of the Kansas Entomological Society (USA)*.
- Grubb, C.D., Zipp, B.J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F., Abel, S., 2004. Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40 (6), 893–908. 10.1111/j.1365-313X.2004.02261.x.
- Grün, S., Frey, M., Gierl, A., 2005. Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66 (11), 1264–1272. 10.1016/j.phytochem.2005.01.024.
- Guengerich, F.P., 2001. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (6), 611–650. 10.1021/tx0002583.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual review of plant biology* 57, 303–333. 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228.
- Hamilton, R.H., 1964. A Corn Mutant Deficient in 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One with an Altered Tolerance of Atrazine. *Weeds* 12 (1), 27. 10.2307/4040633.

- Handrick, V., Robert, C.A.M., Ahern, K.R., Zhou, S., Machado, R.A.R., Maag, D., Glauser, G., Fernandez-Penny, F.E., Chandran, J.N., Rodgers-Melnik, E., Schneider, B., Buckler, E.S., Boland, W., Gershenzon, J., Jander, G., Erb, M., Köllner, T.G., 2016. Biosynthesis of 8-O-Methylated Benzoxazinoid Defense Compounds in Maize. *The Plant Cell* 28 (7), 1682–1700. 10.1105/tpc.16.00065.
- Hanhineva, K., Rogachev, I., Aura, A.-M., Aharoni, A., Poutanen, K., Mykkänen, H., 2011. Qualitative characterization of benzoxazinoid derivatives in whole grain rye and wheat by LC-MS metabolite profiling. *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (3), 921–927. 10.1021/jf103612u.
- EIGENE VEROEFFENTLICHUNG: Hannemann, L., Lucaciu, C.R., Sharma, S., Rattei, T., Mayer, K.F.X., Gierl, A., Frey, M., 2018. A promiscuous beta-glucosidase is involved in benzoxazinoid deglycosylation in *Lamium galeobdolon*. *Phytochemistry* 156, 224–233. 10.1016/j.phytochem.2018.10.012.
- Harborne, J.B., 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural product reports* 18 (4), 361–379.
- Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M.L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A.R., Smrcek, S., Werck-Reichhart, D., 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental science and pollution research international* 9 (1), 29–47. 10.1007/BF02987315.
- Hashimoto, Y., Shudo, K., Okamoto, T., Nagao, M., Takahashi, Y., Sugimura, T., 1979. Mutagenicities of 4-hydroxy-1,4-benzoxazinones naturally occurring in maize plants and of related compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 66 (2), 191–194. 10.1016/0165-1218(79)90066-1.
- Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F., Croteau, R., 2000. Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* 379 (1), 127–136. 10.1006/abbi.2000.1864.
- Helliwell, C.A., Poole, A., James Peacock, W., Dennis, E.S., 1999. Arabidopsis ent-Kaurene Oxidase Catalyzes Three Steps of Gibberellin Biosynthesis. *Plant physiology* 119 (2), 507–510.
- Horowitz, N.H., 1945. On the Evolution of Biochemical Syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 31 (6), 153–157. 10.1073/pnas.31.6.153.

- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue), W585-7. 10.1093/nar/gkm259.
- Hou, B., Lim, E.-K., Higgins, G.S., Bowles, D.J., 2004. N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 279 (46), 47822–47832. 10.1074/jbc.M409569200.
- Howard III, T.P., Hayward, A.P., Tordillos, A., Fragoso, C., Moreno, M.A., Tohme, J., Kausch, A.P., Mottinger, J.P., Dellaporta, S.L., 2014. Identification of the maize gravitropism gene *lazy plant1* by a transposon-tagging genome resequencing strategy. *PloS one* 9 (1), e87053. 10.1371/journal.pone.0087053.
- Huffaker, A., Pearce, G., Veyrat, N., Erb, M., Turlings, T.C.J., Sartor, R., Shen, Z., Briggs, S.P., Vaughan, M.M., Alborn, H.T., Teal, P.E.A., Schmelz, E.A., 2013. Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (14), 5707–5712. 10.1073/pnas.1214668110.
- Hughes, J., Hughes, M.A., 1994. Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* 5 (1), 41–49.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Chapple, C., 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (18), 10045–10050.
- Huo, C., An, D., Wang, B., Zhao, Y., Lin, W., 2005. Structure elucidation and complete NMR spectral assignments of a new benzoxazolinone glucoside from *Acanthus ilicifolius*. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* 43 (4), 343–345. 10.1002/mrc.1529.
- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A., Bowles, D.J., 2001. Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 276 (6), 4350–4356. 10.1074/jbc.M006185200.
- Jakubowska, A., Kowalczyk, S., 2004. The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl-beta-D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *Journal of experimental botany* 55 (398), 791–801. 10.1093/jxb/erh086.

- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., Whiteway, M., 2005. Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* 344, 43–51. 10.1016/j.gene.2004.10.016.
- Jensen, K., Møller, B.L., 2010. Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71 (2-3), 132–141. 10.1016/j.phytochem.2009.10.017.
- Jensen, R.A., 1976. Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual review of microbiology* 30, 409–425. 10.1146/annurev.mi.30.100176.002205.
- Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M., Gierl, A., 2008. Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant physiology* 146 (3), 1053–1063. 10.1104/pp.107.111237.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J.-I., Schäffner, A.R., Saito, K., 2003. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 278 (45), 43910–43918. 10.1074/jbc.M303523200.
- Jones, P., Vogt, T., 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213 (2), 164–174. 10.1007/s004250000492.
- Jones, P.R., Moller, B.L., Hoj, P.B., 1999. The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* 274 (50), 35483–35491.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Picheansoonthon, C., Yamasaki, K., 2001. Megastigmane, aliphatic alcohol and benzoxazinoid glycosides from *Acanthus ebracteatus*. *Phytochemistry* 58 (5), 811–817.
- Karp, F., Mihaliak, C.A., Harris, J.L., Croteau, R., 1990. Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Archives of biochemistry and biophysics* 276 (1), 219–226.
- Ketudat Cairns, J.R., Esen, A., 2010.  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (20), 3389–3405. 10.1007/s00018-010-0399-2.
- Ketudat Cairns, J.R., Mahong, B., Baiya, S., Jeon, J.-S., 2015.  $\beta$ -Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 241, 246–259. 10.1016/j.plantsci.2015.10.014.

- Kim, Y.W., Kang, K.S., Kim, S.Y., Kim, I.S., 2000. Formation of fibrillar multimers of oat beta-glucosidase isoenzymes is mediated by the As-Glu1 monomer. *Journal of molecular biology* 303 (5), 831–842. 10.1006/jmbi.2000.4130.
- Klein, M., Weissenböck, G., Dufaud, A., Gaillard, C., Kreuz, K., Martinoia, E., 1996. Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *The Journal of biological chemistry* 271 (47), 29666–29671.
- Klun, J.A., Guthrie, W.D., Hallauer, A.R., Russell, W.A., 1970. Genetic Nature of the Concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy 2H-1,4-benzoxazin- 3(4H)-one and Resistance to the European Corn Borer in a Diallel Set of Eleven Maize Inbreds<sup>1</sup>. *Crop science* 10 (1), 87. 10.2135/cropsci1970.0011183X001000010032x.
- Ko, J.H., Kim, B.G., Hur, H.-G., Lim, Y., Ahn, J.-H., 2006. Molecular cloning, expression and characterization of a glycosyltransferase from rice. *Plant cell reports* 25 (7), 741–746. 10.1007/s00299-006-0119-4.
- Koncz, C., Schell, J., 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molec Gen Genet* 204 (3), 383–396. 10.1007/BF00331014.
- Lai, D., Abou Hachem, M., Robson, F., Olsen, C.E., Wang, T.L., Møller, B.L., Takos, A.M., Rook, F., 2014. The evolutionary appearance of non-cyanogenic hydroxynitrile glucosides in the *Lotus* genus is accompanied by the substrate specialization of paralogous  $\beta$ -glucosidases resulting from a crucial amino acid substitution. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79 (2), 299–311. 10.1111/tpj.12561.
- Lai, D., Pičmanová, M., Abou Hachem, M., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Møller, B.L., Rook, F., Takos, A.M., 2015. *Lotus japonicus* flowers are defended by a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase with highly restricted expression to essential reproductive organs. *Plant molecular biology* 89 (1-2), 21–34. 10.1007/s11103-015-0348-4.
- Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.
- Laursen, T., Borch, J., Knudsen, C., Bavishi, K., Torta, F., Martens, H.J., Silvestro, D., Hatzakis, N.S., Wenk, M.R., Dafforn, T.R., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Hamberger, B., Møller, B.L., Bassard, J.-E., 2016. Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. *Science (New York, N.Y.)* 354 (6314), 890–893. 10.1126/science.aag2347.

- Le Bouquin, R., Skrabs, M., Kahn, R., Benveniste, I., Salaün, J.P., Schreiber, L., Durst, F., Pinot, F., 2001. CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the omega-alcohol and to the corresponding diacid. *European journal of biochemistry* 268 (10), 3083–3090.
- Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., Mundy, J., 1995. Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed  $\beta$ -Glucosidase. *The Journal of biological chemistry* 270 (26), 15789–15797. 10.1074/jbc.270.26.15789.
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research* 44 (W1), W242-5. 10.1093/nar/gkw290.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K., Bowles, D.J., 2001. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 276 (6), 4338–4343. 10.1074/jbc.M007447200.
- Lim, E.-K., Bowles, D.J., 2004. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *The EMBO journal* 23 (15), 2915–2922. 10.1038/sj.emboj.7600295.
- Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R., 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165 (3), 535–550. 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D490-5. 10.1093/nar/gkt1178.
- Long, B.J., Dunn, G.M., Bowman, J.S., Routley, D.G., 1977. Relationship of Hydroxamic Acid Content in Corn and Resistance to the Corn Leaf Aphid1. *Crop science* 17 (1), 55. 10.2135/cropsci1977.0011183X001700010016x.
- Long, B.J., Dunn, G.M., Routley, D.G., 1975. Relationship of Hydroxamic Acid Content in Maize and Resistance to Northern Corn Leaf Blight1. *Crop science* 15 (3), 333. 10.2135/cropsci1975.0011183X001500030015x.
- Lupien, S., Karp, F., Wildung, M., Croteau, R., 1999. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. *Archives of biochemistry and biophysics* 368 (1), 181–192. 10.1006/abbi.1999.1298.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J.,

- Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Nebert, D.W., 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7 (4), 255–269.
- Mallikarjuna, N., Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S., Chandra, S., 2004. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *J Appl Entomology* 128 (5), 321–328. 10.1111/j.1439-0418.2004.00834.x.
- Maresh, J., Zhang, J., Lynn, D.G., 2006. The innate immunity of maize and the dynamic chemical strategies regulating two-component signal transduction in *Agrobacterium tumefaciens*. *ACS chemical biology* 1 (3), 165–175. 10.1021/cb600051w.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology* 23 (6), 718–723. 10.1038/nbt1094.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S., 1999. A Gene Encoding the Cytokinin Enzyme Zeatin O-Xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*1. *Plant physiology* 120 (2), 553–558.
- Matsuba, Y., Sasaki, N., Tera, M., Okamura, M., Abe, Y., Okamoto, E., Nakamura, H., Funabashi, H., Takatsu, M., Saito, M., Matsuoka, H., Nagasawa, K., Ozeki, Y., 2010. A novel glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *The Plant Cell* 22 (10), 3374–3389. 10.1105/tpc.110.077487.
- Mauricio, R., 1998. Costs of resistance to natural enemies in field populations of the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *The American naturalist* 151 (1), 20–28. 10.1086/286099.
- Meihls, L.N., Handrick, V., Glauser, G., Barbier, H., Kaur, H., Haribal, M.M., Lipka, A.E., Gershenzon, J., Buckler, E.S., Erb, M., Köllner, T.G., Jander, G., 2013. Natural variation in maize aphid resistance is associated with 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside methyltransferase activity. *The Plant Cell* 25 (6), 2341–2355. 10.1105/tpc.113.112409.
- Meyer, U.A., 1996. Interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450: consequences for drug interactions. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 69 (3), 203–209.
- Miller, K.D., Guyon, V., Evans, J.N., Shuttleworth, W.A., Taylor, L.P., 1999. Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-

- galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *The Journal of biological chemistry* 274 (48), 34011–34019.
- Mizutani, M., 2012. Impacts of diversification of cytochrome P450 on plant metabolism. *Biological & pharmaceutical bulletin* 35 (6), 824–832.
- Mizutani, M., Ohta, D., 2010. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual review of plant biology* 61, 291–315. 10.1146/annurev-arplant-042809-112305.
- Moghe, G.D., Leong, B.J., Hurney, S.M., Daniel Jones, A., Last, R.L., 2017. Evolutionary routes to biochemical innovation revealed by integrative analysis of a plant-defense related specialized metabolic pathway. *eLife* 6. 10.7554/eLife.28468.
- Morant, A.V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S.M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B.L., Bak, S., 2008. beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69 (9), 1795–1813. 10.1016/j.phytochem.2008.03.006.
- Morrone, D., Chen, X., Coates, R.M., Peters, R.J., 2010. Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *The Biochemical journal* 431 (3), 337–344. 10.1042/BJ20100597.
- Müller, T.M., Böttcher, C., Morbitzer, R., Götz, C.C., Lehmann, J., Lahaye, T., Glawischnig, E., 2015. TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE-Mediated Generation and Metabolic Analysis of Camalexin-Deficient *cyp71a12 cyp71a13* Double Knockout Lines. *Plant physiology* 168 (3), 849–858. 10.1104/pp.15.00481.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* 2 (4), 279–289.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and cell biology* 12 (1), 1–51. 10.1089/dna.1993.12.1.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1), 1–42.
- Nelson, D.R., Schuler, M.A., Paquette, S.M., Werck-Reichhart, D., Bak, S., 2004. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes

- and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant physiology* 135 (2), 756–772. 10.1104/pp.104.039826.
- Niculaes, C., Abramov, A., Hannemann, L., Frey, M., 2018. Plant Protection by Benzoxazinoids—Recent Insights into Biosynthesis and Function. *Agronomy* 8 (8), 143. 10.3390/agronomy8080143.
- Nielsen, K.A., Hrmova, M., Nielsen, J.N., Forslund, K., Ebert, S., Olsen, C.E., Fincher, G.B., Møller, B.L., 2006. Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. *Planta* 223 (5), 1010–1023. 10.1007/s00425-005-0158-z.
- Nielsen, K.A., Olsen, C.E., Pontoppidan, K., Møller, B.L., 2002. Leucine-derived cyano glucosides in barley. *Plant physiology* 129 (3), 1066–1075. 10.1104/pp.001263.
- Niemeyer, H.M., 2009. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one: key defense chemicals of cereals. *Journal of agricultural and food chemistry* 57 (5), 1677–1696. 10.1021/jf8034034.
- Niemeyer, H.M., Pesel, E., Franke, S., Francke, W., 1989. Ingestion of the benzoxazinone dimboa from wheat plants by aphids. *Phytochemistry* 28 (9), 2307–2310. 10.1016/S0031-9422(00)97972-X.
- Nikus, J., Esen, A., Jonsson, L.M.V., 2003. Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) beta-glucosidase cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Physiol Plant* 118 (3), 337–345. 10.1034/j.1399-3054.2003.00118.x.
- Nishizaki, Y., Yasunaga, M., Okamoto, E., Okamoto, M., Hirose, Y., Yamaguchi, M., Ozeki, Y., Sasaki, N., 2013. p-Hydroxybenzoyl-glucose is a zwitter donor for the biosynthesis of 7-polyacylated anthocyanin in *Delphinium*. *The Plant Cell* 25 (10), 4150–4165. 10.1105/tpc.113.113167.
- Ober, D., Hartmann, T., 2000. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant molecular biology* 44 (4), 445–450.
- Oikawa, A., Ebisui, K., Sue, M., Ishihara, A., Iwamura, H., 1999. Purification and Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase Specific for 2,4-Dihydroxy- 7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) Glucoside in Maize. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 54 (3-4), 181–185. 10.1515/znc-1999-3-407.
- Opassiri, R., Hua, Y., Wara-Aswapati, O., Akiyama, T., Svasti, J., Esen, A., Ketudat Cairns, J.R., 2004. Beta-glucosidase, exo-beta-glucanase and pyridoxine transglucosylase

- activities of rice BGlU1. *The Biochemical journal* 379 (Pt 1), 125–131.  
10.1042/BJ20031485.
- Osbourn, A.E., 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell* 8 (10), 1821–1831.
- Özden, S., Özden, T., Attila, I., Küçükislamoglu, M., Okatan, A., 1992. Isolation and identification via high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of benzoxazolinone precursors from *Consolida orientalis* flowers. *Journal of Chromatography A* 609 (1-2), 402–406. 10.1016/0021-9673(92)80188-Z.
- Paquette, S., Møller, B.L., Bak, S., 2003. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* 62 (3), 399–413.
- Paquette, S.M., Jensen, K., Bak, S., 2009. A web-based resource for the Arabidopsis P450, cytochromes b5, NADPH-cytochrome P450 reductases, and family 1 glycosyltransferases (<http://www.P450.kvl.dk>). *Phytochemistry* 70 (17-18), 1940–1947.  
10.1016/j.phytochem.2009.08.024.
- Pauli, H.H., Kutchan, T.M., 1998. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcochlorine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 13 (6), 793–801.
- Pentzold, S., Zagrobelny, M., Roelsgaard, P.S., Møller, B.L., Bak, S., 2014a. The multiple strategies of an insect herbivore to overcome plant cyanogenic glucoside defence. *PloS one* 9 (3), e91337. 10.1371/journal.pone.0091337.
- Pentzold, S., Zagrobelny, M., Rook, F., Bak, S., 2014b. How insects overcome two-component plant chemical defence: plant  $\beta$ -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biol Rev* 89 (3), 531–551. 10.1111/brv.12066.
- Pérez, F.J., Niemeyer, H.M., 1989. Reaction of DIMBOA with amines. *Phytochemistry* 28 (7), 1831–1834. 10.1016/S0031-9422(00)97869-5.
- Pérez, F.J., Ormenoñuñez, J., 1991. Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): Possible role in allelopathy. *Journal of chemical ecology* 17 (6), 1037–1043. 10.1007/BF01402932.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science (New York, N.Y.)* 311 (5762), 808–811.  
10.1126/science.1118510.

- Piotrowska, A., Bajguz, A., 2011. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* 72 (17), 2097–2112. 10.1016/j.phytochem.2011.08.012.
- Plant Transformation Workshop, 2003.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., Urban, P., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in enzymology* 272, 51–64.
- Ponnala, L., Wang, Y., Sun, Q., van Wijk, K.J., 2014. Correlation of mRNA and protein abundance in the developing maize leaf. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 78 (3), 424–440. 10.1111/tpj.12482.
- Robineau, Batard, Nedelkina, Cabello-Hurtado, LeRet, Sorokine, Didierjean, Werck-Reichhart, 1998. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant physiology* 118 (3), 1049–1056.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E.-K., Bowles, D.J., 2001. Higher plant glycosyltransferases. *Genome biology* 2 (2), reviews3004.1-6.
- Rouyi, C., Baiya, S., Lee, S.-K., Mahong, B., Jeon, J.-S., Ketudat-Cairns, J.R., Ketudat-Cairns, M., 2014. Recombinant expression and characterization of the cytoplasmic rice  $\beta$ -glucosidase Os1BGLu4. *PLoS one* 9 (5), e96712. 10.1371/journal.pone.0096712.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* : Vol. 2, 2nd ed. Cold Spring Harbor, S.I.
- Sawada, S.'y., Suzuki, H., Ichimaida, F., Yamaguchi, M.-A., Iwashita, T., Fukui, Y., Hemmi, H., Nishino, T., Nakayama, T., 2005. UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers. Enzymology and phylogenetics of a novel glucuronosyltransferase involved in flower pigment biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 280 (2), 899–906. 10.1074/jbc.M410537200.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *The Journal of biological chemistry* 276 (39), 36566–36574. 10.1074/jbc.M104047200.
- Schuler, M.A., 1996. Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15 (3), 235–284. 10.1080/07352689609701942.

- Schullehner, K., Dick, R., Vitzthum, F., Schwab, W., Brandt, W., Frey, M., Gierl, A., 2008. Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants. *Phytochemistry* 69 (15), 2668–2677. 10.1016/j.phytochem.2008.08.023.
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., Gierl, A., 2000. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *International review of cytology* 198, 319–346.
- Siemens, D.H., Garner, S.H., Mitchell-Olds, T., Callaway, R.M., 2002. Cost of Defense in the Context of Plant Competition: *Brassica rapa* May Grow and Defend. *Ecology* 83 (2), 505. 10.2307/2680031.
- Skadhauge, B., Thomsen, K.K., Wettstein, D., 1997. The Role of the Barley Testa Layer and its Flavonoid Content in Resistance to *Fusarium* Infections. *Hereditas* 126 (2), 147–160. 10.1111/j.1601-5223.1997.00147.x.
- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., Dawson, J.H., 1996. Heme-Containing Oxygenases. *Chemical reviews* 96 (7), 2841–2888.
- Spiteller, P., Glawischnig, E., Gierl, A., Steglich, W., 2001. Studies on the biosynthesis of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) from 3-hydroxyindolin-2-one in *Zea mays*. *Phytochemistry* 57 (3), 373–376.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (9), 1312–1313. 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Stamp, N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly review of biology* 78 (1), 23–55.
- Stotz, H.U., Kroymann, J., Mitchell-Olds, T., 1999. Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (4), 268–272. 10.1016/S1369-5266(99)80048-X.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189 (1), 113–130.
- Sue, M., Ishihara, A., Iwamura, H., 2000. Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside  $\beta$ -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta* 210 (3), 432–438. 10.1007/s004250050029.
- Sue, M., Yamazaki, K., Yajima, S., Nomura, T., Matsukawa, T., Iwamura, H., Miyamoto, T., 2006. Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. *Plant physiology* 141 (4), 1237–1247. 10.1104/pp.106.077693.

- Takos, A., Lai, D., Mikkelsen, L., Abou Hachem, M., Shelton, D., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Wang, T.L., Martin, C., Rook, F., 2010. Genetic screening identifies cyanogenesis-deficient mutants of *Lotus japonicus* and reveals enzymatic specificity in hydroxynitrile glucoside metabolism. *The Plant Cell* 22 (5), 1605–1619. 10.1105/tpc.109.073502.
- Tartoff, K.D., Hobbs, C.A., 1987. Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* (9), 12.
- Taylor, L.P., Jorgensen, R., 1992. Conditional Male Fertility in Chalcone Synthase-Deficient *Petunia*. *Journal of Heredity* 83 (1), 11–17. 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111149.
- Tian, L., DellaPenna, D., Zeevaart, J.A.D., 2004. Effect of hydroxylated carotenoid deficiency on ABA accumulation in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 122 (3), 314–320. 10.1111/j.1399-3054.2004.00409.x.
- Tollrian, R., Harvell, C.D. (Eds.), 1999. The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 383 pp.
- Tzin, V., Hojo, Y., Strickler, S.R., Bartsch, L.J., Archer, C.M., Ahern, K.R., Zhou, S., Christensen, S.A., Galis, I., Mueller, L.A., Jander, G., 2017. Rapid defense responses in maize leaves induced by *Spodoptera exigua* caterpillar feeding. *Journal of experimental botany* 68 (16), 4709–4723. 10.1093/jxb/erx274.
- Urban, P., Cullin, C., Pompon, D., 1990. Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* 72 (6-7), 463–472. 10.1016/0300-9084(90)90070-W.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J., 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252 (5479), 169–170.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* 6 (9), 1191–1192. 10.1105/tpc.6.9.1191.
- Velázquez-Palmero, D., Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Hernández, M.L., Vaistij, F.E., Graham, I.A., Pérez, A.G., Martínez-Rivas, J.M., 2017. An Oleuropein  $\beta$ -Glucosidase from Olive Fruit Is Involved in Determining the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil. *Frontiers in plant science* 8, 1902. 10.3389/fpls.2017.01902.
- Vetten, N. de, ter Horst, J., van Schaik, H.-P., Boer, A. de, Mol, J., Koes, R., 1999. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome

- P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2), 778–783.
- Vogt, T., Jones, P., 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in plant science* 5 (9), 380–386.
- von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A., Frey, M., 2001. Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 28 (6), 633–642.
- Walkerpeach, C.R., Velten, J., 1994. Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems, in: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht, pp. 33–51.
- Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R.A.J., Withers, S.G., 1995. Identification of the Acid/Base Catalyst in *Agrobacterium faecalis* .beta.-Glucosidase by Kinetic Analysis of Mutants. *Biochemistry* 34 (44), 14554–14562. 10.1021/bi00044a034.
- Warnock, D.F., Hutchison, W.D., Tong, C.B., Davis, D.W., 2001. Evaluating maize for allelochemicals that affect European corn borer (*Lepidoptera*: Crambidae) larval development. *Crop science* 41 (6), 1761–1771.
- Watson, L., Dallwitz, M.J., 1992. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. *Nordic Journal of Botany* 14 (5), 486. 10.1111/j.1756-1051.1994.tb00638.x.
- Watzl, B., Rechenkammer, G., 2001. Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. Band 48. *Ernährungs-Umschau* 12. <https://www.ernaehrungs-umschau.de/print-artikel/10-12-2001-flavonoide/>.
- Weng, J.-K., Philippe, R.N., Noel, J.P., 2012. The rise of chemodiversity in plants. *Science (New York, N.Y.)* 336 (6089), 1667–1670. 10.1126/science.1217411.
- Wenger, K., Bigler, L., Suter, M.J.-F., Schönenberger, R., Gupta, S.K., Schulin, R., 2005. Effect of corn root exudates on the degradation of atrazine and its chlorinated metabolites in soils. *Journal of environmental quality* 34 (6), 2187–2196. 10.2134/jeq2004.0409.
- Werck-Reichhart, D., 1995. Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism. *Drug metabolism and drug interactions* 12 (3-4), 221–243.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S., Paquette, S., 2002. Cytochromes p450. *The arabidopsis book* 1, e0028. 10.1199/tab.0028.

- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 1 (6), REVIEWS3003. 10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L., 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in plant science* 5 (3), 116–123.
- Wink, J., Gandhi, J., Kroppenstedt, R.M., Seibert, G., Sträubler, B., Schumann, P., Stackebrandt, E., 2004. *Amycolatopsis decaplanina* sp. nov., a novel member of the genus with unusual morphology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54 (Pt 1), 235–239. 10.1099/ijs.0.02586-0.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64 (1), 3–19.
- Wink, M., Waterman, P.G., 1999. Chemotaxonomy in Relation to Molecular Phylogeny of Plants, in: Wink, M. (Ed.), *Biochemistry of plant secondary metabolism*, vol. 11. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 295–335.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provar, N.J., 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* 2 (8), e718. 10.1371/journal.pone.0000718.
- Withers, S.G., Warren, R.A.J., Street, I.P., Rupitz, K., Kempton, J.B., Aebersold, R., 1990. Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a retaining glycosidase. *J. Am. Chem. Soc.* 112 (15), 5887–5889. 10.1021/ja00171a043.
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D., An, M., 2001. Allelochemicals in Wheat (*Triticum aestivum* L.): Production and Exudation of 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One. *Journal of chemical ecology* 27 (8), 1691–1700. 10.1023/A:1010422727899.
- Xia, L., Ruppert, M., Wang, M., Panjekar, S., Lin, H., Rajendran, C., Barleben, L., Stöckigt, J., 2012. Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity. *ACS chemical biology* 7 (1), 226–234. 10.1021/cb200267w.
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D., Winkel, B., Mohamed, A., Cheng, C.-L., Shih, M.-C., Poulton, J., Esen, A., 2004. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant molecular biology* 55 (3), 343–367. 10.1007/s11103-004-0790-1.
- Zheng, L., McMullen, M.D., Bauer, E., Schön, C.-C., Gierl, A., Frey, M., 2015. Prolonged expression of the BX1 signature enzyme is associated with a recombination hotspot in

the benzoxazinoid gene cluster in *Zea mays*. *Journal of experimental botany* 66 (13), 3917–3930. 10.1093/jxb/erv192.

Zúñiga, G.E., Massardo, F., 1991. Hydroxamic acid content in undifferentiated and differentiated tissues of wheat. *Phytochemistry* 30 (10), 3281–3283. 10.1016/0031-9422(91)83193-O.



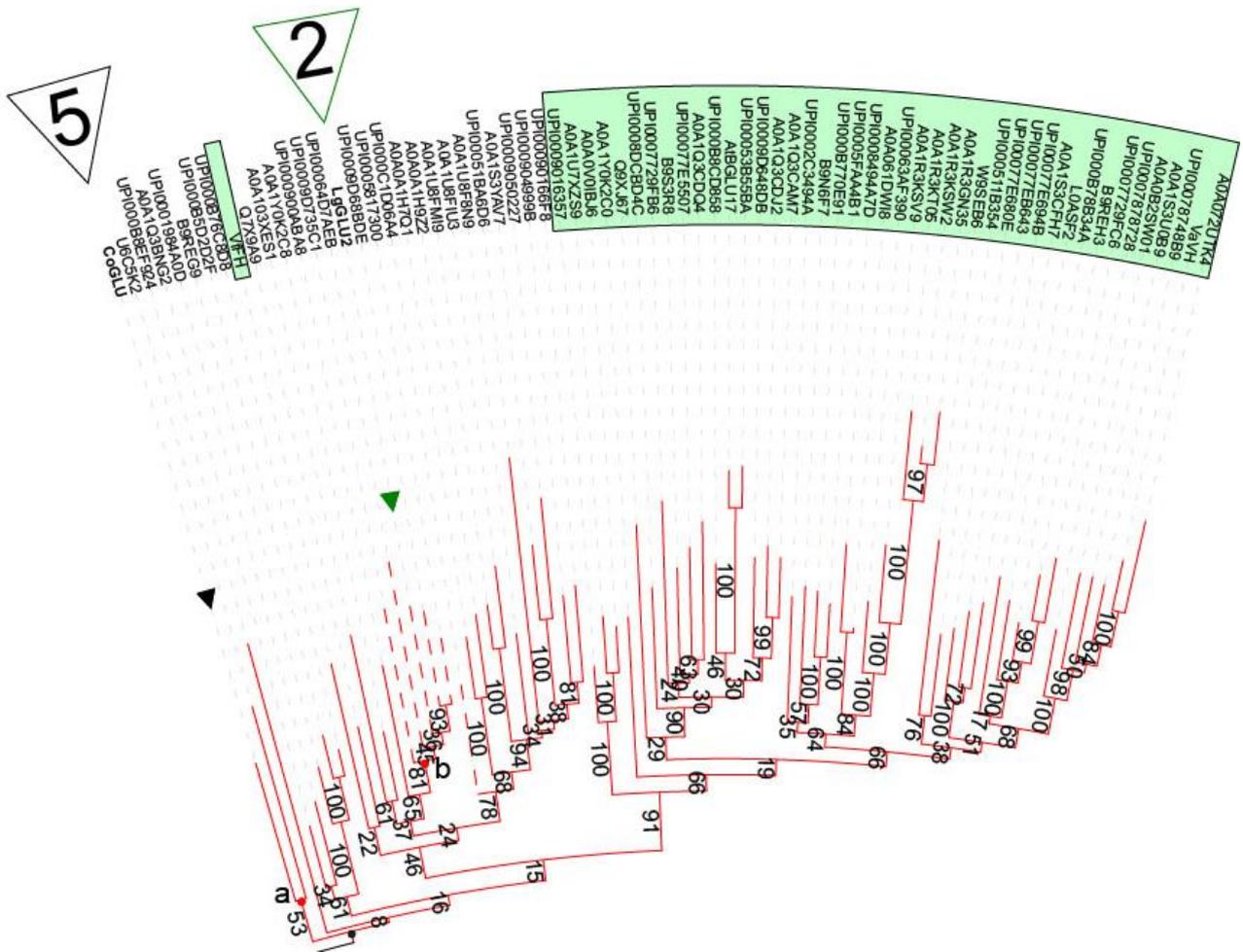


Abbildung 26: Detailansicht der CoGLU (schwarzes Dreieck) und LgGLU2 (grünes Dreieck) enthaltenden Kladen aus der BGLU Phylogenie. Die Kladen sind durch rote Punkte markiert. CoGLU bildet mit einer weiteren Ranunculaceen-Glukosidase eine Klade (a), LgGLU1 liegt in einer Lamiales-Klade (b). Der Bootstrap-Wert für einen gemeinsamen Ursprung (schwarzer Punkt) ist gering.



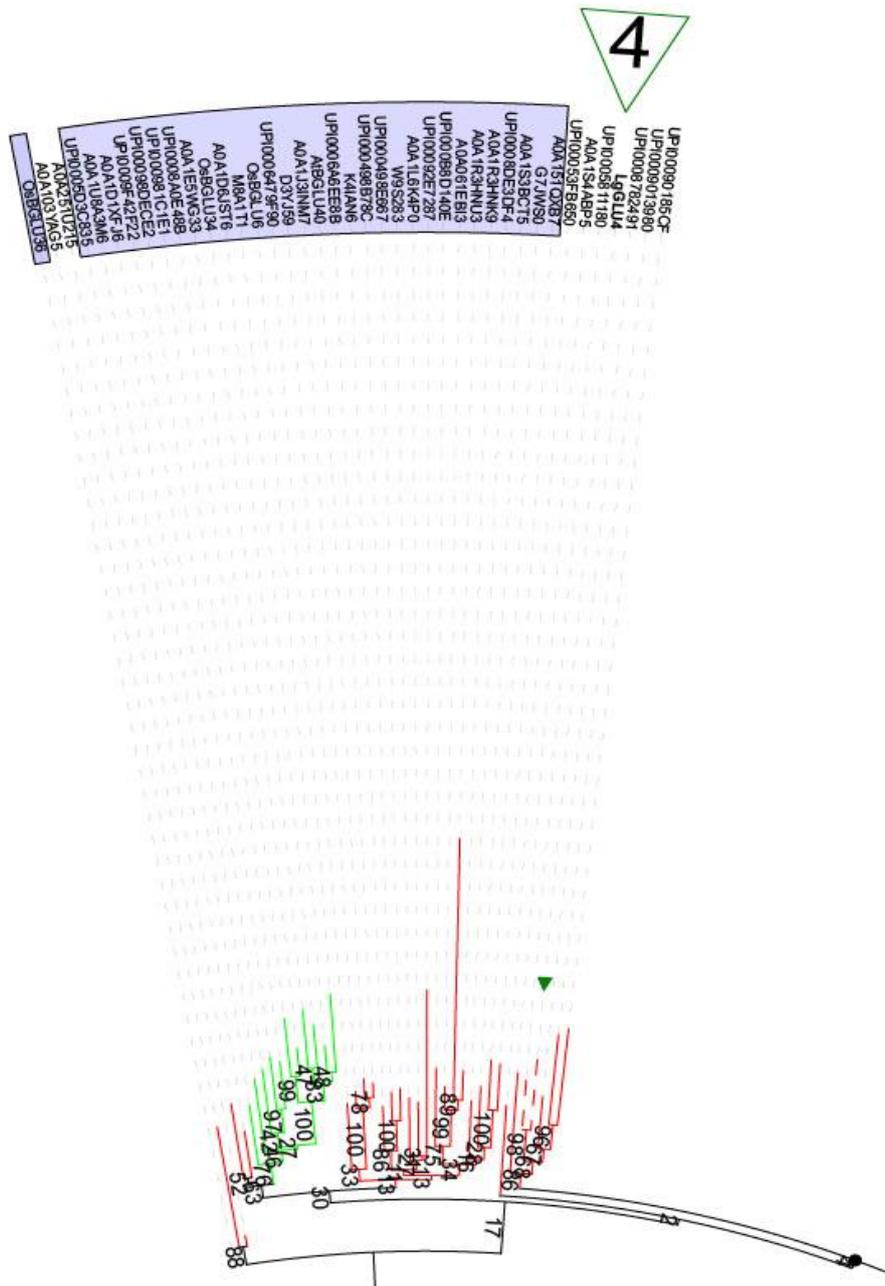


Abbildung 28: Detailansicht der *LgGLU4* enthaltenden Klade aus der BGLU Phylogenie. *LgGLU4* (grünes Dreieck) befindet sich in einer Lamiales-Klade. Die Verwandtschaft mit anderen Kladen ist unsicher, der Bootstrap-Wert der Wurzel (schwarzer Punkt, Wert 4) ist gering.



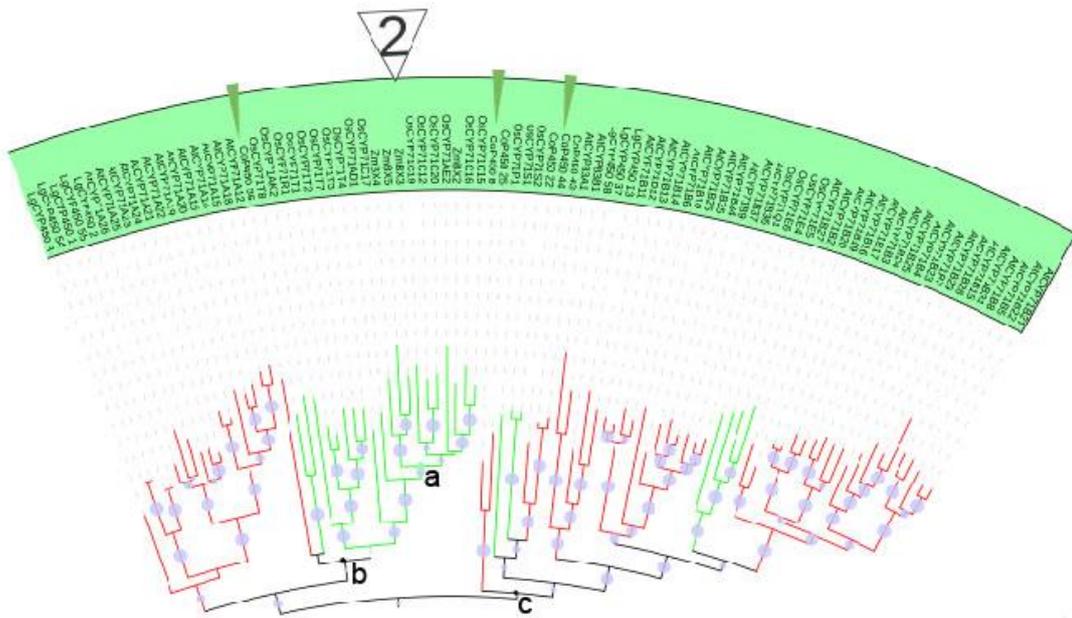


Abbildung 30: Detailansicht der *ZmBX*-Klade aus der P450 Phylogenie. BX2-BX5 liegen in einer Klade (a). *C. orientalis* Enzyme (grüne Dreiecke) finden sich in Kladen mit gemeinsamem Ursprung (b) und in einer Schwesterklade allerdings mit geringem Bootstraps Unterstützung (c).

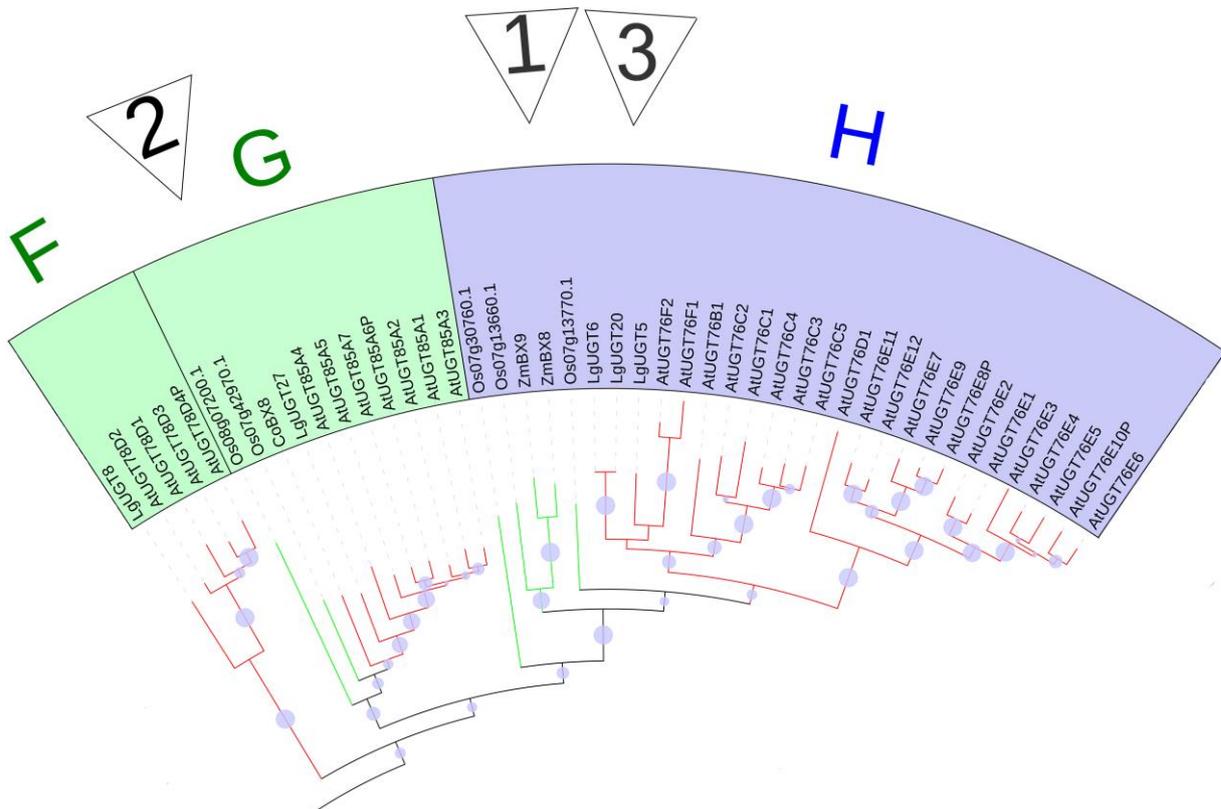


Abbildung 31: Detailansicht der *ZmBX*8/9 und *CoBX*8 enthaltenden Gruppen aus der P450 Phylogenie. *CoBX*8 und *LgUTG*27 gehören zur Gruppe G (Dreieck (2)), die Maisenzyme *ZmBX*8 und *ZmBX*9 werden in die Gruppe H eingeordnet (Dreieck (1)). In Gruppe H finden sich drei *L. galeobdolon* UGTs (Dreieck (3)).

## POR Datensatz

**Am\_CPR2:** NADPH Cytochrom P450 Reduktase [*Ammi majus*]; **At\_ATR1:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase ATR1 [*Arabidopsis thaliana*]; **At\_ATR2:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase (ATR2) [*Arabidopsis thaliana*]; **Aa\_CPR2:** Cytochrom P450 Reduktase [*Artemisia annua*]; **Ca\_CPR1:** putative Cytochrom Reduktase [*Capsicum annuum*]; **Cro\_CPR2:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase [*Catharanthus roseus*]; **Ce\_CPR1:** NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [*Centaurium erythraea*]; **Cb\_CPR2:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Solenostemon scutellarioides*]; **Ec\_CPR2:** NADPH-Ferrihämoprotein Oxidoreduktase [*Eschscholzia californica*]; **Gm\_CPR1:** NADPH-P450 Reduktase [*Glycine max*]; **Gh\_CPR2:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Gossypium hirsutum*]; **Gh\_CPR1:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Gossypium hirsutum*]; **Ht\_CPR2a:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase [*Helianthus tuberosus*]; **Ht\_CPR2b:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase [*Helianthus tuberosus*]; **Ha\_CPR1:** NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Hypericum androsaemum]; **Lj\_CPR2:** Cytochrom P450 Reduktase [*Lotus japonicus*]; **Op\_CPR1:** NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase [*Ophiorrhiza pumila*]; **Os\_CPR2a:** hypothetisches Protein Osl\_32371 [*Oryza sativa Indica Group*]; **Os\_CPR2b:** Os08g0243500 [*Oryza sativa (japonica Kultivargruppe)*]; **Os\_CPR2c:** OSJNBa0060D06.20 [*Oryza sativa (japonica Kultivargruppe)*]; **Pso\_CPR1:** NADPH-Ferrihämoprotein Oxidoreduktase [*Papaver somniferum*]; **Pc\_CPR2a:** NADPH Cytochrom P450 Reduktase [*Petroselinum crispum*]; **Pc\_CPR2b:** NADPH Cytochrom P450 Reduktase [*Petroselinum crispum*]; **Ph\_CPR1:** Cytochrom P450 NADPH-Reduktase [*Petunia x hybrida*]; **Ph\_CPR2:** Cytochrom P450 NADPH-Reduktase [*Petunia x hybrida*]; **Pp\_CPRa:** vorhergesagtes Protein [*Physcomitrella patens subsp. patens*]; **Pp\_CPRb:** vorhergesagtes Protein [*Physcomitrella patens subsp. patens*]; **Pp\_CPRc:** vorhergesagtes Protein [*Physcomitrella patens subsp. patens*]; **Pp\_CPRd:** vorhergesagtes Protein [*Physcomitrella patens subsp. patens*]; **Psa\_CPR2:** putative NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Pisum sativum*]; **Pt\_CPR2b:** NADPH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase isoform 3 [*Populus balsamifera subsp. trichocarpa x Populus deltoides*]; **Pt\_CPR2a:** NADPH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase isoform 2 [*Populus balsamifera subsp. trichocarpa x Populus deltoides*]; **Pt\_CPR1:** NADPH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase isoform 1 [*Populus balsamifera subsp. trichocarpa x Populus deltoides*]; **Pm\_CPR:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Pseudotsuga menziesii*]; **Rc\_CPR1:** Cytochrom P450, putativ [*Ricinus communis*]; **Rc\_CPR2:** Cytochrom P450, putativ [*Ricinus communis*]; **Sb\_CPR2c:** hypothetisches Protein SORBIDRAFT\_06g031110 [*Sorghum bicolor*]; **Sb\_CPR2a:** hypothetisches Protein SORBIDRAFT\_02g032640 [*Sorghum bicolor*]; **Sb\_CPR2b:** hypothetisches Protein SORBIDRAFT\_07g007640 [*Sorghum bicolor*]; **Sr\_CPR2:** NADPH Cytochrom P450 Reduktase [*Stevia rebaudiana*]; **Tch\_CPR:** Cytochrom P450 Reduktase [*Taxus chinensis*]; **Tcu\_CPR:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Taxus cuspidata*]; **Ta\_CPR2c:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Triticum aestivum*]; **Ta\_CPR2a:** Cytochrom P450 Reduktase [*Triticum aestivum*]; **Vs\_CPR1:** NADPH-Ferrihämoprotein Reduktase [*Vicia sativa*]; **Vr\_CPR1:** NADPH Cytochrom P450 [*Vigna radiata*]; **Vv\_CPR2:** hypothetisches Protein [*Vitis vinifera*]; **Zm\_CPR2c:** unbekannt [*Zea mays*]; **Zm\_CPR2b1:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Zea mays*]; **Zm\_CPR2b2:** NADPH-Cytochrom P450 Reduktase [*Zea mays*]; **Cre\_CPR:** *Chlamydomonas reinhardtii*; **Sm\_CPRa:** 152770:peptid; **Sm\_CPRb:** 401997:peptid-extended version; **Sm\_CPRc:** 181373:peptid-extended version; **C\_ori\_rep\_c3696:** [*Consolida orientalis*]; **C\_ori\_rep\_c2022:** [*Consolida orientalis*]; **CoPOR14:** [*Consolida orientalis*]

Abbildung 32: Eingesetzte Sequenzen für den POR-Stammbaum: Abkürzung, Funktion und Herkunft der CPRs.

## BGLU Datensatz

**M8AHP3:**  $\beta$ -Glukosidase 1 [*Aegilops tauschii*]; **M8AJU6:**  $\beta$ -Glukosidase, chloroplastisch [*Aegilops tauschii*]; **M8ALW0:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8B0L2:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8BM95:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8BUN9:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8BYG0:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8C6G7:** Putative cyanogene  $\beta$ -Glukosidase [*Aegilops tauschii*]; **M8C9Z1:**  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Aegilops tauschii*]; **M8CA49:**  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Aegilops tauschii*]; **M8CJ20:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **M8CJS1:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **N1QZZ1:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **N1R2Z1:** Lactase-phlorizin Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **R7W2D9:** Hydroxyisourate Hydrolase [*Aegilops tauschii*]; **UPI000989C5FD:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 7-artig [*Aegilops tauschii subsp. tauschii*]; **UPI00098A3715:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig isoform X1 [*Aegilops tauschii subsp. tauschii*]; **UPI00098A3751:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 32-artig isoform X2 [*Aegilops tauschii subsp. tauschii*]; **UPI00098BB296:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 5-artig isoform X1 [*Aegilops tauschii subsp. tauschii*]; **I7GSQ8:** Acyl-Glukose-abhängige anthocyanin 7-O-glucosyltransferase [*Agapanthus africanus*]; **U5DDI2:**  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Amborella trichopoda*]; **UPI0005D32C80:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Amborella trichopoda*]; **UPI0005D3C835:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Amborella trichopoda*]; **UPI0009C0AF8E:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22 isoform X1 [*Amborella trichopoda*]; **UPI0009C0C405:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 31 isoform X1 [*Amborella trichopoda*]; **UPI0009C11C9C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Amborella trichopoda*]; **A0A199UFS0:**  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Ananas comosus*]; **A0A199UGN3:**  $\beta$ -Glukosidase 22 [*Ananas comosus*]; **A0A199UIZO:**  $\beta$ -Glukosidase 31 [*Ananas comosus*]; **A0A199ULF1:**  $\beta$ -Glukosidase 1 [*Ananas comosus*]; **A0A199V544:**  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Ananas comosus*]; **A0A199VV19:**  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Ananas comosus*]; **UPI00098091B5:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Ananas comosus*]; **UPI000980BF06:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Ananas comosus*]; **UPI000980C37F:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 26-artig [*Ananas*

*comosus*]; **UPI000980E265**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 25 isoform X1 [*Ananas comosus*]; **UPI0009814286**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Ananas comosus*]; **UPI000981C1E1**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6-artig [*Ananas comosus*]; **UPI000981D410**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig isoform X1 [*Ananas comosus*]; **UPI0009820182**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22 isoform X1 [*Ananas comosus*]; **UPI0009824415**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig isoform X1 [*Ananas comosus*]; **A0A1D1XFJ6**:  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Anthurium amnicola*]; **A0A1D1XY59**:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Anthurium amnicola*]; **A0A1D1Y9S9**:  $\beta$ -Glukosidase 31 (Fragment) [*Anthurium amnicola*]; **A0A1D1ZF74**:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Anthurium amnicola*]; **A0A1D1ZG17**:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Anthurium amnicola*]; **IOJ3H0**:  $\beta$  Glukosidase [*Arabidopsis halleri*]; **D7LL70**: Glycosyl Hydrolase Familie1 protein [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29A3A7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29A65B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10 isoform X2 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29A69D**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29AB27**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 8 isoform X1 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29AEAF**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 5 isoform X2 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29C059**: Cluster: Myrosinase 1 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29C669**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29C686**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29D172**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29D521**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: putative Myrosinase 3 [*Arabidopsis lyrata*]; **UPI000A29E089**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 2 isoform X2 [*Arabidopsis lyrata*]; **AtBGLU1**:  $\beta$ -Glukosidase 1 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU10**:  $\beta$ -Glukosidase 10 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU11**:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU12**:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU13**:  $\beta$ -Glukosidase 13 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU14**:  $\beta$ -Glukosidase 14 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU15**:  $\beta$ -Glukosidase 15 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU16**:  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU17**:  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU18**:  $\beta$ -Glukosidase 18 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU19**:  $\beta$ -Glukosidase 19 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU2**:  $\beta$ -Glukosidase 2 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU20**:  $\beta$ -Glukosidase 20 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU21**:  $\beta$ -Glukosidase 21 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU22**:  $\beta$ -Glukosidase 22 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU23**:  $\beta$ -Glukosidase 23 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU24**:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU25**:  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU26**:  $\beta$ -Glukosidase 26 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU27**:  $\beta$ -Glukosidase 27 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU28**:  $\beta$ -Glukosidase 28 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU29**:  $\beta$ -Glukosidase 29 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU3**:  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU31**:  $\beta$ -Glukosidase 31 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU32**:  $\beta$ -Glukosidase 32 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU33**:  $\beta$ -Glukosidase 33 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU4**:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU40**:  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU41**:  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU42**:  $\beta$ -Glukosidase 42 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU43**:  $\beta$ -Glukosidase 43 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU44**:  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU45**:  $\beta$ -Glukosidase 45 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU46**:  $\beta$ -Glukosidase 46 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU47**:  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU5**:  $\beta$ -Glukosidase 5 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU7**:  $\beta$ -Glukosidase 7 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU8**:  $\beta$ -Glukosidase 8 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtBGLU9**:  $\beta$ -Glukosidase 9 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtMYR1**: Myrosinase 1 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtMYR2**: Myrosinase 2 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtMYR4**: Myrosinase 4 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtMYR5**: Myrosinase 5 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtTGG3**: Myrosinase 3 [*Arabidopsis thaliana*]; **AtTGG6**: Myrosinase 6 [*Arabidopsis thaliana*]; **A0A139ZPC7**: Glykosid Hydrolase-type flavonol glucosyltransferase [*Arabidopsis thaliana*]; **A0A178VBF2**: SRG2 [*Arabidopsis thaliana*]; **A0A119LTV7**:  $\beta$  Glukosidase 8 [*Arabidopsis thaliana*]; **UPI000786C1A8**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase [*Arachis duranensis*]; **UPI00078748B9**: Cluster: vicianin Hydrolase [*Arachis duranensis*]; **UPI0007878728**: Cluster: vicianin Hydrolase [*Arachis duranensis*]; **UPI0007884C90**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 isoform X1 [*Arachis duranensis*]; **UPI0007887F6E**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase isoform X1 [*Arachis duranensis*]; **UPI000788B843**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Arachis duranensis*]; **UPI000788C1A0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42 [*Arachis duranensis*]; **UPI000788E4D5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10 [*Arachis duranensis*]; **UPI000788FF10**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Arachis duranensis*]; **UPI00078928CB**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase [*Arachis duranensis*]; **UPI000A2C1744**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Arachis duranensis*]; **UPI000A2C29CB**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Arachis duranensis*]; **UPI0007AEF247**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 [*Arachis ipaensis*]; **UPI0007AF59B2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Arachis ipaensis*]; **UPI0007AFAF93**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Arachis ipaensis*]; **UPI0007AFB1A0**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase [*Arachis ipaensis*]; **UPI000A2B1858**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Arachis ipaensis*]; **UPI000A2B4A6B**: Cluster: putative disease resistance RPP13-artig protein 1 isoform X1 [*Arachis ipaensis*]; **UPI000A2B8B30**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Arachis ipaensis*]; **A0A0D6R2S3**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Araucaria cunninghamii*]; **Q5PXK2**: Myrosinase [*Armoracia rusticana*]; **UPI00098DEB8B**: Cluster: probable inactive  $\beta$ -Glukosidase 14 [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098DECE2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098DF041**: Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098DF0EB**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E226B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E2546**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig isoform X1 [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E2910**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig isoform X1 [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E332D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E3E0A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E3E25**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E5012**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E52D8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 31-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E5B05**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Asparagus officinalis*]; **UPI00098E63B2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Asparagus officinalis*]; **AsGLU1**:  $\beta$ -Glukosidase [*Avena sativa*]; **AsGLU2**:  $\beta$ -Glukosidase [*Avena sativa*]; **UPI00052FEAC9**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: lactase-phlorizin Hydrolase-artig [*Brachypodium distachyon*]; **UPI00052FEC4B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 2-artig isoform X2 [*Brachypodium distachyon*]; **UPI00052FF492**:

Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 5-artig isoform X1 [*Brachypodium distachyon*]; **UPI0004F14161**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 16-artig isoform X2 [*Brassica campestris*]; **UPI0004F15D8B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 29 isoform X3 [*Brassica campestris*]; **UPI0004F184F6**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3 isoform X5 [*Brassica campestris*]; **UPI0004F19150**: Cluster: Myrosinase-artig [*Brassica campestris*]; **Q9AWB5**: Myrosinase (EC 3.2.3.1) [*Brassica juncea*]; **A0A078F4B4**: BnaC03g36110D protein [*Brassica napus*]; **A0A078FJ58**: BnaC04g11830D protein [*Brassica napus*]; **A0A078FTP5**: BnaA07g08740D protein [*Brassica napus*]; **A0A078FVQ1**: BnaA01g27000D protein [*Brassica napus*]; **A0A078FYF4**: BnaC04g03720D protein [*Brassica napus*]; **A0A078G2D3**: BnaA04g19070D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GAH0**: BnaC04g49630D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GBJ8**: BnaA08g05540D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GFN2**: BnaC04g49660D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GFS8**: BnaC01g29940D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GIV8**: BnaC01g29950D protein [*Brassica napus*]; **A0A078GS87**: BnaC04g51140D protein [*Brassica napus*]; **A0A078G XK3**: BnaC01g40610D protein [*Brassica napus*]; **A0A078HHL6**: BnaA09g08470D protein [*Brassica napus*]; **A0A078H KR6**: BnaA06g18980D protein [*Brassica napus*]; **A0A078HMG3**: BnaA02g17610D protein [*Brassica napus*]; **A0A078HZ90**: BnaC04g22420D protein [*Brassica napus*]; **A0A078IC31**: BnaC04g03770D protein [*Brassica napus*]; **A0A078J5D3**: BnaA09g55500D protein [*Brassica napus*]; **A0A078J5J3**: BnaC01g43700D protein [*Brassica napus*]; **A0A078JGI2**: BnaA03g56280D protein [*Brassica napus*]; **UPI0006A6CF2D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 9 [*Brassica napus*]; **UPI0006AAA9A4**: Cluster: Myrosinase 4-artig [*Brassica napus*]; **UPI0006AB273E**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 16-artig isoform X1 [*Brassica napus*]; **UPI0006BE46E9**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 28-artig [*Brassica napus*]; **UPI0006BEBBA5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10 isoform X3 [*Brassica napus*]; **UPI0006BF3875**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 8-artig isoform X1 [*Brassica napus*]; **BNMYR1**: Myrosinase [*Brassica napus*]; **UPI0006A6CF32**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 16-artig isoform X1 [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **UPI0006A6EE8B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40 isoform X2 [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **UPI0006A6F4F2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 29-artig [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **UPI0006A741E3**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 2 isoform X8 [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **UPI0006A7440B**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X1 [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **UPI0006A7543C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42 isoform X1 [*Brassica oleracea* var. *oleracea*]; **A0A151QVT5**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) (Fragment) [*Cajanus cajan*]; **A0A151QXB7**:  $\beta$ -Glukosidase 6 (EC 3.2.1.21) [*Cajanus cajan*]; **A0A151RES0**: Lactase-phlorizin Hydrolase [*Cajanus cajan*]; **A0A151SRC3**:  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Cajanus cajan*]; **A0A151STP3**: Lactase-phlorizin Hydrolase [*Cajanus cajan*]; **A0A151TMJ8**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase [*Cajanus cajan*]; **A0A151U4H6**: Hydroxyisourate Hydrolase [*Cajanus cajan*]; **UPI00098D7DAC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Cajanus cajan*]; **UPI00098D7E60**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig isoform X2 [*Cajanus cajan*]; **UPI00098D8556**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X2 [*Cajanus cajan*]; **UPI00098D86BD**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: lactase-phlorizin Hydrolase-artig [*Cajanus cajan*]; **UPI00098D8BBD**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase-artig isoform X1 [*Cajanus cajan*]; **UPI00098DB65C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Cajanus cajan*]; **UPI00098DB785**: Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Cajanus cajan*]; **UPI00098DCA0D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Cajanus cajan*]; **UPI000539712B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Camelina sativa*]; **UPI0005397254**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 30 isoform X2 [*Camelina sativa*]; **UPI00053A0F8C**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: putative  $\beta$ -Glukosidase 5 [*Camelina sativa*]; **UPI00053A4956**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3 isoform X1 [*Camelina sativa*]; **UPI00053A5B62**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 [*Camelina sativa*]; **UPI00053A669F**: Cluster: Myrosinase 4-artig [*Camelina sativa*]; **UPI00053A74FF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1-artig [*Camelina sativa*]; **UPI00053B55BA**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17 isoform X1 [*Camelina sativa*]; **UPI00053BB6FC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 9 [*Camelina sativa*]; **UPI000900DC35**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1 isoform X3 [*Camelina sativa*]; **UPI0009012405**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig [*Camelina sativa*]; **UPI00090160B1**: Cluster: Myrosinase 4 [*Camelina sativa*]; **UPI0009017EDC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Camelina sativa*]; **UPI000901A667**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Camelina sativa*]; **A0A1Y0K2C0**:  $\beta$ -Glukosidase 2 GH1 Familie(Fragment) [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2C2**:  $\beta$ -Glukosidase 1 GH1 family [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2C8**:  $\beta$ -Glukosidase 9 GH1 family [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2C9**:  $\beta$ -Glukosidase 8 GH1 family [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2D0**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2D1**:  $\beta$ -Glukosidase 5 GH1 family [*Camellia sinensis*]; **A0A1Y0K2D3**:  $\beta$ -Glukosidase 7 GH1 family [*Camellia sinensis*]; **Q7X9A9**:  $\beta$ -primeverosidase (EC 3.2.1.149) [*Camellia sinensis*]; **A0A060PLD9**: Acyl-Glukose abhängige anthocyanin 7-O-glucosyltransferase [*Campanula medium*]; **G8E0P8**: Putative strictosidine  $\beta$ -D-Glukosidase (EC 3.2.1.105) [*Camptotheca acuminata*]; **A0A1U8F6G7**:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Capsicum annuum*]; **A0A1U8F8N9**: furcatin Hydrolase-artig isoform X1 [*Capsicum annuum*]; **A0A1U8FIU3**:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig isoform X2 [*Capsicum annuum*]; **A0A1U8FMI9**: LOW QUALITY PROTEIN: furcatin Hydrolase-artig [*Capsicum annuum*]; **A0A1U8FUJ5**:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Capsicum annuum*]; **A0A1U8HEL7**:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Capsicum annuum*]; **IpeGLU1**:  $\beta$ -Glukosidase [*Carapichea ipeacuanha*]; **C9WCQ0**:  $\beta$ -thioglycoside glucoHydrolase [*Carica papaya*]; **UPI000B8C7F3B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Carica papaya*]; **UPI000B8C8A70**: Cluster: Myrosinase 5-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8C8CCB**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 32-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8C92B5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8C9A14**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8C9C4F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8CA19E**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X1 [*Carica papaya*]; **UPI000B8CC19F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 [*Carica papaya*]; **UPI000B8CD858**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Carica papaya*]; **UPI000B8CEC57**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Carica papaya*]; **UPI000B8CF2CE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 32-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8CF813**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 31-artig [*Carica papaya*]; **UPI000B8D140E**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Carica papaya*]; **Q9M7N7**: Strictosidine  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.105) [*Catharanthus roseus*]; **A0A1Q3BG19**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3BM25**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus*

*follicularis*]; **A0A1Q3BNG2**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CAM7**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CDD6**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CDJ2**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CDQ4**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CID9**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3CS72**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **A0A1Q3DJD4**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Cephalotus follicularis*]; **CsF26G**: Furostanol Glykoside 26-O- $\beta$ -Glukosidase [*Cheilocostus speciosus*]; **UPI000B76C260**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B76C767**: Cluster: cyanidin 3-O-glucoside 5-O-glucosyltransferase (acyl-Glukose)-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B76FD6C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B780BD7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X1 [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B78B2BF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B78CDD5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B78EE6C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Chenopodium quinoa*]; **UPI000B7965ED**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42-artig [*Chenopodium quinoa*]; **A0A1S2XNY5**:  $\beta$ -Glukosidase 30-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2XNZ2**:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2YM29**:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2YMN7**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2YN34**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2YN80**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2Z364**:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2Z4T0**:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S2Z6U0**:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S3ECK0**: LOW QUALITY PROTEIN: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Cicer arietinum*]; **A0A1S3EEA9**:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Cicer arietinum*]; **Q700B1**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) (nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig precursor) [*Cicer arietinum*]; **A0A067GNY9**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Citrus sinensis*]; **UPI0003D6F06F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Citrus sinensis*]; **UPI0003D753CE**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Citrus sinensis*]; **UPI0003D76BF7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X2 [*Citrus sinensis*]; **CoGLU**:  $\beta$ -Glukosidase [*Consolida orientalis*]; **A0A1R3G6C7**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3GBW2**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3HF76**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3HLP0**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3ID38**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3IN71**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3IN88**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus capsularis*]; **A0A1R3G031**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3GN35**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3HN22**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3HNK9**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3HNU3**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3HSS7**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3IH45**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3J117**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3KBQ6**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3KC77**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3KSV9**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3KSW2**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **A0A1R3KT05**: Glykosid Hydrolase, Familie1 [*Corchorus olitorius*]; **CsBGlu12**:  $\beta$ -Glukosidase [*Crocus sativus*]; **A0A1S3B7N5**:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BCT5**:  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BNM6**:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BPA0**:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BPA3**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BVA7**:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BXW7**:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Cucumis melo*]; **A0A1S3BZR2**: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X3 [*Cucumis melo*]; **A0A1S3C4T0**:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S3CFH7**: vicinin Hydrolase-artig [*Cucumis melo*]; **A0A1S4DU36**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Cucumis melo*]; **UPI0002B49DC7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 25 isoform X1 [*Cucumis sativus*]; **UPI0005EC1410**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18 isoform X1 [*Cucumis sativus*]; **UPI0005ECF975**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Cucumis sativus*]; **Q9FVL4**: Silverleaf whitefly-induced protein 3 [*Cucurbita pepo*]; **A0A103XES1**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A103XI27**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A103XI35**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A103Y453**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A103YAG5**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A103YJN8**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A118JXZ6**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A118K119**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A118K2L1**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A124SBM9**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A124SBN0**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **A0A124SDY8**: Glykosid Hydrolase, katalytische Domäne-enthaltendes Protein [*Cynara cardunculus var. scolymus*]; **DnBGLU**: Isoflavonoid 7-O- $\beta$ -Apiosyl-Glukosidase [*Dalbergia nigrescens*]; **UPI0007EF7648**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X1 [*Daucus carota subsp. sativus*]; **UPI0007EF8011**: Cluster: cyanidin 3-O-glucoside 7-O-glucosyltransferase (acyl-Glukose)-artig [*Daucus carota subsp. sativus*]; **UPI0007EFB1EB**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Daucus carota subsp. sativus*]; **UPI0007F031B3**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Daucus carota subsp. sativus*]; **DgAA7GT**: Acyl-Glukose-abhängige Anthocyanin 7-O-Glukosyltransferase [*Delphinium grandiflorum*]; **U6C5K2**: Acyl-Glukose-abhängige anthocyanin glucosyltransferase [*Delphinium grandiflorum*]; **U6C7K7**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Delphinium*

*grandiflorum*]; **UPI0009F24666**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F2A367**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F3B47D**: Cluster: lactase-phlorizin Hydrolase-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F3F48F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 2-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F42F22**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F563A0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Dendrobium catenatum*]; **UPI0009F63FBC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Dendrobium catenatum*]; **DcAA5GT**: Acyl-Glukose-abhängige Anthocyanin 5-O-Glukosyltransferase [*Dianthus caryophyllus*]; **A0A1E5V3Z9**:  $\beta$ -Glukosidase 30 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5VCS4**: Putative inactive  $\beta$ -Glukosidase 14 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5VD16**:  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5VD50**:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5VI25**:  $\beta$ -Glukosidase 8 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5VVT9**:  $\beta$ -Glukosidase 32 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5WDG8**:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5WDL2**:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Dichantherium oligosanthes*]; **A0A1E5WG33**:  $\beta$ -Glukosidase 34 [*Dichantherium oligosanthes*]; **Q9ZPB6**: Cardenolide 16-O-glucoHydrolase [*Digitalis lanata*]; **A0A023MIF8**: Glykosid Hydrolase Familie1 (EC 3.2.1.-) [*Drypetes roxburghii*]; **UPI000C03AAD3**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI000C03F81A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig isoform X1 [*Durio zibethinus*]; **UPI000C043B45**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42-artig isoform X1 [*Durio zibethinus*]; **UPI000C04870E**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI000C04A71B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI000C054254**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI000C0547F1**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI000C0557DC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Durio zibethinus*]; **UPI00057A49B9**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 4 isoform X2 [*Elaeis guineensis* var. *Tenera*]; **UPI00057ABD43**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig isoform X3 [*Elaeis guineensis* var. *Tenera*]; **UPI00057B62C0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Elaeis guineensis* var. *Tenera*]; **UPI00094F8696**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18 isoform X1 [*Elaeis guineensis* var. *Tenera*]; **UPI000950332A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Elaeis guineensis* var. *Tenera*]; **A0A022RT37**: uncharakterisiertes Protein (Fragment) [*Erythranthe guttata*]; **UPI00064D7AEB**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Erythranthe guttata*]; **UPI00064E0865**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Erythranthe guttata*]; **A0A059D1K5**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Eucalyptus grandis*]; **UPI0005269729**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Eucalyptus grandis*]; **UPI0008A0BFAF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 isoform X1 [*Eucalyptus grandis*]; **UPI0008A0C2BD**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 isoform X1 [*Eucalyptus grandis*]; **UPI0008A0D4FE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Eucalyptus grandis*]; **K4HXV6**:  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Fragaria ananassa*]; **K4IAN6**:  $\beta$ -Glukosidase 1 [*Fragaria ananassa*]; **UPI0002C2EAB1**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0002C2ECDE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0002C2FCDE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0002C30E58**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0002C3494A**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0005C8B42C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **UPI0005CAACD2**: Cluster: raucassicine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]; **S8CG15**:  $\beta$ -mannosidase (Fragment) [*Genlisea aurea*]; **Q8S3J3**: Hydroxyisourate Hydrolase (HIU Hydrolase) (HIUHase) (EC 3.5.2.17) [*Glycine max*]; **UPI000719133F**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase-artig [*Glycine max*]; **UPI0007191F13**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X4 [*Glycine max*]; **A0A0B2SPS7**: Hydroxyisourate Hydrolase (EC 3.2.1.21) [*Glycine soja*]; **A0A0B2SW01**: Vicianin Hydrolase (EC 3.2.1.21) [*Glycine soja*]; **A0A0B0NH57**: Putative  $\beta$ -Glukosidase 41-artig protein [*Gossypium arboreum*]; **A0A0B0NI74**:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig protein [*Gossypium arboreum*]; **A0A0B0PXX0**:  $\beta$ -Glukosidase 46 [*Gossypium arboreum*]; **A0A1U8J6K9**:  $\beta$ -Glukosidase 43-artig [*Gossypium hirsutum*]; **A0A1U8KRF1**: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X3 [*Gossypium hirsutum*]; **A0A1U8LP78**: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Gossypium hirsutum*]; **A0A1U8PKE2**: putative  $\beta$ -Glukosidase 6 isoform X1 [*Gossypium hirsutum*]; **UPI00063AA5AD**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig isoform X2 [*Gossypium raimondii*]; **UPI00063AF390**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig isoform X2 [*Gossypium raimondii*]; **A0A251RYZ6**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Gossypium raimondii*]; **A0A251RZ19**: Putative  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Helianthus annuus*]; **A0A251S2S4**: Putative Glykosid Hydrolase Familie1 [*Helianthus annuus*]; **A0A251SY47**: Putative vicianin Hydrolase [*Helianthus annuus*]; **A0A251T182**: Putative furcatin Hydrolase [*Helianthus annuus*]; **A0A251T8W0**: Putative  $\beta$  Glukosidase 41 [*Helianthus annuus*]; **A0A251T905**: Putative  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Helianthus annuus*]; **A0A251U215**: Putative  $\beta$  Glukosidase 40 [*Helianthus annuus*]; **A0A251VAJ5**: Putative B-S Glukosidase 44 [*Helianthus annuus*]; **A0A251VE89**: Putative  $\beta$ -Glukosidase [*Helianthus annuus*]; **UPI000B8EF924**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig isoform X1 [*Helianthus annuus*]; **UPI000B8FA714**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Helianthus annuus*]; **UPI000B909DE2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Helianthus annuus*]; **UPI000B3F3C12**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig isoform X2 [*Herrania umbatica*]; **UPI000B3F4191**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Herrania umbatica*]; **UPI000B3F48FB**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Herrania umbatica*]; **HbGLU**:  $\beta$ -Glukosidase [*Hevea brasiliensis*]; **A1E2C0**:  $\beta$  Glukosidase [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B76C8D8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B76D606**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B770E91**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17-artig [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B77B086**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B781AFE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B78B34A**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig isoform X1 [*Hevea brasiliensis*]; **UPI000B79A801**: Cluster: raucassicine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Hevea brasiliensis*]; **A0A249Y721**:  $\beta$ -Glukosidase 30 [*Hylocereus polyrhizus*]; **UPI000900ABA8**: Cluster: furcatin Hydrolase-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI000900CE15**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI0009013980**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI0009016357**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI00090166F8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI00090185CF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI00090189F5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI000901BF79**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig [*Ipomoea nil*];

**UPI000901D2F5:** Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI000901E4A4:** Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Ipomoea nil*]; **UPI000901EA2F:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Ipomoea nil*]; **UPI0005FAA4B1:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17 isoform X1 [*Jatropha curcas*]; **UPI0005FAEA3E:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D648DB:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17-artig [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D6D93E:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D6FE3D:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D70BA3:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42 isoform X1 [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D72A0F:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase [*Jatropha curcas*]; **UPI0009D73518:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 18 [*Jatropha curcas*]; **UPI0008DCA106:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Juglans regia*]; **UPI0008DCA512:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Juglans regia*]; **UPI0008DCBD4C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17-artig [*Juglans regia*]; **UPI0008DCE9F9:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Juglans regia*]; **UPI0008DCF9AB:** Cluster: hydroxyisourate Hydrolase-artig isoform X1 [*Juglans regia*]; **UPI0008DD2C0C:** Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X3 [*Juglans regia*]; **UPI0008DD4344:** Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Juglans regia*]; **UPI0008DDB823:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42 isoform X1 [*Juglans regia*]; **UPI0008DE3DF4:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig isoform X2 [*Juglans regia*]; **LgGLU1:** LgBGLU1 [*Lamium galeobdolon*]; **LgGLU2:** LgBGLU2 [*Lamium galeobdolon*]; **LgGLU3:** LgBGLU3 [*Lamium galeobdolon*]; **LgGLU4:** LgBGLU4 [*Lamium galeobdolon*]; **A9Z0X2:** GlycosylHydrolase 1 [*Leucaena leucocephala*]; **LjBGD2:**  $\beta$ -Glukosidase 2 [*Lotus japonicus*]; **LjBGD4:**  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Lotus japonicus*]; **LjBGD7:**  $\beta$ -Glukosidase 7 [*Lotus japonicus*]; **UPI00090E0E95:** Cluster: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092E5216:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092E5761:** Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092E695F:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092E7287:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092EB959:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Lupinus angustifolius*]; **UPI00092EE66C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Lupinus angustifolius*]; **A0A200PPR6:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200PPR9:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200PPT8:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200Q851:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200Q863:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QJ97:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QJQ2:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QMH8:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QMI4:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QPQ4:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QY59:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QY64:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200QYT9:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200R4B3:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200R4B8:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200R4D8:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **A0A200R7R1:** Glykosid Hydrolase [*Macleaya cordata*]; **UPI0004986D7E:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Malus domestica*]; **UPI00049871AC:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Malus domestica*]; **UPI0004987808:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Malus domestica*]; **UPI0004988B9C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X1 [*Malus domestica*]; **UPI000498B78C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Malus domestica*]; **UPI000498D841:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Malus domestica*]; **UPI000498E667:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Malus domestica*]; **UPI000498F077:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig isoform X1 [*Malus domestica*]; **UPI0007ECD972:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Malus domestica*]; **UPI0007ED36EA:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 29-artig [*Malus domestica*]; **UPI0007ED3836:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig isoform X3 [*Malus domestica*]; **Q40283:**  $\beta$  Glukosidase [*Manihot esculenta*]; **UPI000B5D1006:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X3 [*Manihot esculenta*]; **UPI000B5D2D2F:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Manihot esculenta*]; **UPI000B5D5184:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig isoform X1 [*Manihot esculenta*]; **UPI000B5D5955:** Cluster: lactase-phlorizin Hydrolase-artig [*Manihot esculenta*]; **A0A072TY90:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072U160:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072U1Z0:** Glykosid Hydrolase Familieprotein [*Medicago truncatula*]; **A0A072UKL7:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072UKM3:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072UKP2:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072UTK4:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072UWP2:** cyanogene  $\beta$ -Glukosidase, putative [*Medicago truncatula*]; **A0A072V4Q7:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072V4T4:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072V574:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072V6Z1:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A0A072VAX5:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **A8TVQ0:**  $\beta$ -Glukosidase G1 (Glykosid Hydrolase Familie1 protein) [*Medicago truncatula*]; **G7IF65:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **G7JI09:** Glukose 6-phosphate/phosphate translocator 1 [*Medicago truncatula*]; **G7JN11:** cyanogene  $\beta$ -Glukosidase, putative [*Medicago truncatula*]; **G7JP63:** Glykosid Hydrolase Familie1 protein [*Medicago truncatula*]; **G7JWS0:**  $\beta$ -Glukosidase [*Medicago truncatula*]; **UPI000B931EDD:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Momordica charantia*]; **UPI000B932887:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Momordica charantia*]; **UPI000B932CC5:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Momordica charantia*]; **UPI000B932D95:** Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X3 [*Momordica charantia*]; **UPI000B93624C:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Momordica charantia*]; **UPI000B9378FC:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig [*Momordica charantia*]; **UPI000B938BA0:** Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Momordica charantia*]; **W9QD31:**  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Morus notabilis*]; **W9ROS8:** Putative  $\beta$ -Glukosidase 41 [*Morus notabilis*]; **W9RJA4:** Lactase-phlorizin Hydrolase [*Morus notabilis*]; **W9RR25:**  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Morus notabilis*]; **W9S283:**  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Morus notabilis*]; **W9S4I9:**  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Morus notabilis*]; **W9SBV6:**  $\beta$ -Glukosidase 42 [*Morus notabilis*]; **W9SEB6:**  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Morus notabilis*]; **W9T1Y1:**  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Morus notabilis*]; **Q9AXL6:**  $\beta$ -Glukosidase (Fragment) [*Musa acuminata*]; **UPI000511C7BC:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig isoform X1 [*Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*]; **UPI00051217FA:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 25-artig [*Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*]; **UPI0005122DE2:** Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*];

**UPI00051258DC:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Musa acuminata subsp. Malaccensis*]; **UPI0008A0B3F7:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18 isoform X1 [*Musa acuminata subsp. Malaccensis*]; **UPI0008A0E48B:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6-artig isoform X1 [*Musa acuminata subsp. Malaccensis*]; **A0A1U7Z6I7:**  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U7ZDV9:**  $\beta$ -Glukosidase 13-artig isoform X1 [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U7ZYL5:**  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U7ZYM5:**  $\beta$ -Glukosidase 44-artig isoform X1 [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U8A3M6:**  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U8ACW0:**  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U8ANI9:**  $\beta$ -Glukosidase 46 isoform X1 [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U8AYZ0:**  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1U8Q9N8:** cyanidin 3-O-glucoside 7-O-glucosyltransferase (Acyl-Glukose)-artig [*Nelumbo nucifera*]; **A0A1J6JTA1:**  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Nicotiana attenuata*]; **UPI000904987D:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Nicotiana attenuata*]; **UPI000904999B:** Cluster: furcatin Hydrolase-artig [*Nicotiana attenuata*]; **UPI0009050227:** Cluster: vicianin Hydrolase-artig isoform X1 [*Nicotiana attenuata*]; **A0A1U7VG58:**  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Nicotiana sylvestris*]; **A0A1U7XZS9:** vicianin Hydrolase-artig isoform X1 [*Nicotiana sylvestris*]; **A0A1U7Y0V3:**  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Nicotiana sylvestris*]; **A0A1S3YAV7:**  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Nicotiana tabacum*]; **A0A1S3YQ73:**  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Nicotiana tabacum*]; **A0A1S4ABP5:**  $\beta$ -Glukosidase 6-artig [*Nicotiana tabacum*]; **UPI00051BA6D6:** Cluster: furcatin Hydrolase-artig [*Nicotiana tomentosiformis*]; **UPI0008782491:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40 isoform X1 [*Nicotiana tomentosiformis*]; **A0A1J3CNM6:**  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3DCD1:** Myrosinase 2 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3DDT7:**  $\beta$ -Glukosidase 30 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3DVV2:** Myrosinase 4 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3FTA0:**  $\beta$ -Glukosidase 33 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3FXC8:**  $\beta$ -Glukosidase 42 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3H4T8:**  $\beta$ -Glukosidase 23 [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3INM7:**  $\beta$ -Glukosidase 40 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3JFM4:**  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3JQ20:**  $\beta$ -Glukosidase 10 (Fragment) [*Noccaea caerulescens*]; **A0A1J3K9W3:**  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Noccaea caerulescens*]; **OeGLU:** Oleuropein  $\beta$ -Glukosidase [*Olea europaea*]; **UPI000C1CD2A9:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1CD499:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1CD5DB:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1CDF37:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1CE60D:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1CFE1:** Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D0076:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D0316:** Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D06A4:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D08AD:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D0E43:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D1C80:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D1CB5:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig isoform X2 [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D1E47:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D1F23:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D256D:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D2C23:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D3489:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D4023:** Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D5317:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D5733:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D5B4F:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D687D:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D73AA:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D7A27:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D7E96:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D84FC:** Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **UPI000C1D88FC:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Olea europaea var. sylvestris*]; **A0A0A1H7Q1:**  $\beta$ -primeverosidase [*Ophiorrhiza pumila*]; **A0A0A1H9Z2:**  $\beta$ -primeverosidase [*Ophiorrhiza pumila*]; **A0A0A1HAP7:** Glukosidase [*Ophiorrhiza pumila*]; **J3L6Q8:**  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Oryza brachyantha*]; **UPI0003EAAC97:** Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 20-artig [*Oryza brachyantha*]; **UPI000776312D:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 29-artig [*Oryza brachyantha*]; **UPI00077636E4:** Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 3-artig [*Oryza brachyantha*]; **A0A0D9ZN42:** Pectinesterase [*Oryza glumipatula*]; **OsBGLU1:**  $\beta$ -Glukosidase 1 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU10:**  $\beta$ -Glukosidase 10 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU11:**  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU12:**  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU13:**  $\beta$ -Glukosidase 13 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU14:**  $\beta$ -Glukosidase 14 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU16:**  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU18:**  $\beta$ -Glukosidase 18 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU19:**  $\beta$ -Glukosidase 19 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU2:**  $\beta$ -Glukosidase 2 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU20:**  $\beta$ -Glukosidase 20 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU21:**  $\beta$ -Glukosidase 21 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU22:**  $\beta$ -Glukosidase 22 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU23:**  $\beta$ -Glukosidase 23 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU24:**  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU25:**  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU26:**  $\beta$ -Glukosidase 26 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU27:**  $\beta$ -Glukosidase 27 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU28:**  $\beta$ -Glukosidase 28 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU29:**  $\beta$ -Glukosidase 29 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU3:**  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU30:**  $\beta$ -Glukosidase 30 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU31:**  $\beta$ -Glukosidase 31 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU33:**  $\beta$ -Glukosidase 32 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU34:**  $\beta$ -Glukosidase 33 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU35:**  $\beta$ -Glukosidase 34 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU36:**  $\beta$ -Glukosidase 35 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU38:**  $\beta$ -Glukosidase 36 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU4:**  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU5:**  $\beta$ -Glukosidase 5 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU6:**  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU7:**  $\beta$ -Glukosidase 7 [*Oryza sativa*]; **OsBGLU8:**  $\beta$ -Glukosidase 8 [*Oryza sativa*]; **A0A0N7KJ80:** Os04g0474700 protein [*Oryza sativa*]; **A0A0POWLC5:** Os05g0366800 protein (Fragment) [*Oryza sativa*]; **Q0J0N4-2:**  $\beta$ -Glukosidase 30 (Os9bglu30) (EC 3.2.1.21) [*Oryza sativa*]; **Q7XPY5:** Putative  $\beta$ -Glukosidase 15 (Os4bglu15) (EC 3.2.1.21) [*Oryza sativa*]; **UPI0007753B41:** Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 9 isoform X1 [*Oryza sativa*]; **Q9XJ67:**  $\beta$ -Glukosidase

[*Persicaria tinctoria*]; **UPI0009E2078D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E22C18**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E23F04**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E47B97**: Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E48109**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 4 isoform X1 [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E58514**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI0009E5E4AE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Phalaenopsis equestris*]; **UPI000809B8EF**: Cluster: hydroxyisourate Hydrolase-artig isoform X3 [*Phaseolus angularis*]; **UPI00080A0EC6**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Phaseolus angularis*]; **UPI0004E573A2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 1-artig [*Phoenix dactylifera*]; **UPI0004E57689**: Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Phoenix dactylifera*]; **UPI0004E58B35**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 22-artig [*Phoenix dactylifera*]; **UPI0004E59DCC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 25 isoform X1 [*Phoenix dactylifera*]; **UPI000823587D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Phoenix dactylifera*]; **A0A076FNE3**:  $\beta$ -Glukosidase [*Picea glauca*]; **COPT85**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Picea sitchensis*]; **PcCBG**: Coniferin  $\beta$ -Glukosidase [*Pinus contorta*]; **Q1EMQ7**:  $\beta$ -Glukosidase (Fragment) [*Plantago major*]; **UPI00057A0184**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig [*Populus euphratica*]; **UPI00057A1695**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Populus euphratica*]; **UPI00057A4274**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Populus euphratica*]; **UPI00057AA99F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Populus euphratica*]; **UPI00057AD0B7**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Populus euphratica*]; **UPI00057ADFE0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Populus euphratica*]; **A0A1L6K415**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase Familieprotein [*Populus tomentosa*]; **A0A1L6K4P0**: Hydroxyisourate Hydrolase Familieprotein [*Populus tomentosa*]; **LOASE9**:  $\beta$ -Glukosidase [*Populus tomentosa*]; **LOASF2**:  $\beta$ -Glukosidase [*Populus tomentosa*]; **LOATL4**:  $\beta$ -Glukosidase [*Populus tomentosa*]; **B9H1F2**: Glycosyl Hydrolase Familie1 Familieprotein [*Populus trichocarpa*]; **B9N6F7**: Glycosyl Hydrolase Familie1 Familieprotein [*Populus trichocarpa*]; **UPI000B7AFB60**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Prunus avium*]; **UPI000B7AFD2C**: Cluster: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Prunus avium*]; **UPI00046D9FDE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Prunus mume*]; **UPI00046DDB09**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Prunus mume*]; **UPI0007C16787**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Prunus mume*]; **UPI0009AB57E8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Prunus persica*]; **UPI0009AB72C7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Prunus persica*]; **PsPH1**: Prunasin Hydrolase Isoform PH 1 [*Prunus serotina*]; **PsPH3**: Prunasin Hydrolase Isoform PH 3 [*Prunus serotina*]; **PsPH4**: Prunasin Hydrolase Isoform PH 4 [*Prunus serotina*]; **Q9M5X5**: Prunasin Hydrolase isoform PHA (EC 3.2.1.118) [*Prunus serotina*]; **UPI000510F3D9**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI000511766B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI000511B354**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI0008706562**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI000870717F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI0008707EEC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 30-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI0008708CCC**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40-artig [*Pyrus x bretschneideri*]; **UPI000859B88F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig isoform X1 [*Raphanus sativus*]; **UPI000859C632**: Cluster: Myrosinase MA1-artig [*Raphanus sativus*]; **UPI000859CE29**: Cluster:  $\beta$ -D-glucopyranosyl abscisate  $\beta$ -Glukosidase [*Raphanus sativus*]; **UPI000859D2FA**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3-artig [*Raphanus sativus*]; **UPI00085A0956**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 8-artig isoform X1 [*Raphanus sativus*]; **UPI00085A3620**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 10-artig [*Raphanus sativus*]; **UPI00085A8C78**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Raphanus sativus*]; **UPI00085A9F83**: Cluster: Myrosinase 4-artig [*Raphanus sativus*]; **RsRG**: Raucaffricine-O- $\beta$ -Glukosidase [*Rauvolfia serpentina*]; **RsSG**: Strictosidine-O- $\beta$ -D-Glukosidase [*Rauvolfia serpentina*]; **M9NGS2**: Scrictosidine- $\beta$ -D-Glukosidase (EC 3.2.1.105) [*Rauvolfia verticillata*]; **B9RAJ2**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9REG9**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9REH3**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9RM06**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9RWJ7**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9RXP7**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9S3R8**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **B9SAQ2**:  $\beta$ -Glukosidase, putative (EC 3.2.1.21) [*Ricinus communis*]; **UPI000772385C**: Cluster: LOW QUALITY PROTEIN:  $\beta$ -Glukosidase 18 [*Ricinus communis*]; **UPI0007728350**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Ricinus communis*]; **UPI0007729FB6**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Ricinus communis*]; **UPI0007729FC6**: Cluster: vicianin Hydrolase [*Ricinus communis*]; **UPI000772B5DE**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 [*Ricinus communis*]; **B1B611**:  $\beta$ -Glukosidase [*Rosa hybrid cultivar*]; **ScGLU**: DIBOA  $\beta$ -Glukosidase [*Secale cereale*]; **UPI0005811180**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Sesamum indicum*]; **UPI0005812DD4**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI00058141D0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Sesamum indicum*]; **UPI00058150F2**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI00058156CF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18 [*Sesamum indicum*]; **UPI000581588B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0005815F0E**: Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0005817300**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D63D74**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D64241**: Cluster: raucaffricine-O- $\beta$ -D-Glukosidase-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D68BDE**: Cluster: furcatin Hydrolase-artig isoform X2 [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D70BA6**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig isoform X2 [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D735C1**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Sesamum indicum*]; **UPI0009D799A3**: Cluster: uncharakterisiertes Protein LOC105164621 [*Sesamum indicum*]; **UPI000350A13D**: Cluster: probable inactive  $\beta$ -Glukosidase 14 isoform X2 [*Setaria italica*]; **UPI0006479F90**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 6-artig isoform X1 [*Setaria italica*]; **UPI000648D676**: Cluster: probable inactive  $\beta$ -Glukosidase 33 isoform X2 [*Setaria italica*]; **UPI0007199E18**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Setaria italica*]; **SaMYR1**: Myrosinase [*Sinapis alba*]; **A0A0V0IA09**: Putative  $\beta$ -Glukosidase 42-artig (Fragment) [*Solanum chacoense*]; **A0A0V0IBJ6**: Putative vicianin Hydrolase-artig [*Solanum chacoense*]; **A0A0V0IDM7**: Putative  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Solanum chacoense*]; **LeMside2**:  $\beta$ -Mannosidase [*Solanum lycopersicum*]; **UPI000532D754**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig isoform X2 [*Solanum lycopersicum*]; **UPI0008FED54A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig isoform X1

[*Solanum lycopersicum*]; **UPI0003D2438A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Solanum tuberosum*]; **UPI0003D28733**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig isoform X1 [*Solanum tuberosum*]; **SbDHR**: Dhurrinase [*Sorghum bicolor*]; **C5XFD2**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Sorghum bicolor*]; **Q93XR2**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase dhurrinase-2 [*Sorghum bicolor*]; **UPI000B425368**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Sorghum bicolor*]; **UPI000B4254A6**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 isoform X1 [*Sorghum bicolor*]; **UPI000B425C85**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 20 isoform X2 [*Sorghum bicolor*]; **UPI000B426518**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 5 isoform X1 [*Sorghum bicolor*]; **UPI000B8A954A**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 6 isoform X3 [*Spinacia oleracea*]; **UPI000B8B0919**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Spinacia oleracea*]; **UPI000B8B6A38**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Spinacia oleracea*]; **UPI000B8B80FA**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Spinacia oleracea*]; **UPI00053C0C2E**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 19-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C1149**: Cluster: Myrosinase 2-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C1708**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 33-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C179F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 33 [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C2138**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 23-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C3383**: Cluster: Myrosinase 4-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C5518**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13 [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C5889**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 27-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C5EE4**: Cluster: probable inactive  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C61AD**: Cluster: Myrosinase 5-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI00053C68FA**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 32-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI0008FD4F6E**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X1 [*Tarenaya hassleriana*]; **UPI0008FD5BC4**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 28-artig [*Tarenaya hassleriana*]; **A0A061DKQ3**:  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Theobroma cacao*]; **A0A061DWI8**: Vicianin Hydrolase, putative [*Theobroma cacao*]; **A0A061DYH1**:  $\beta$  Glukosidase 11 [*Theobroma cacao*]; **A0A061EBI3**:  $\beta$  Glukosidase 40 [*Theobroma cacao*]; **A0A061F822**:  $\beta$ -Glukosidase 45, putative [*Theobroma cacao*]; **A0A061GGG4**:  $\beta$  Glukosidase 46 isoform 3 (Fragment) [*Theobroma cacao*]; **A0A061GSL7**:  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Theobroma cacao*]; **UPI00084860A5**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 41 isoform X2 [*Theobroma cacao*]; **UPI000848F2C5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 47 isoform X4 [*Theobroma cacao*]; **UPI0008494A7D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Theobroma cacao*]; **A0A023VZJ5**: Linamarase (Fragment) [*Trifolium nigrescens subsp. meneghinianum*]; **TrBGLU78**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase [*Trifolium repens*]; **P26204**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Trifolium repens*]; **TaBGLU1**: DIMBOA  $\beta$ -Glukosidase 1A [*Triticum aestivum*]; **TaBGLU2**: DIMBOA  $\beta$ -Glukosidase 1B [*Triticum aestivum*]; **TaBGLU3**: DIMBOA  $\beta$ -Glukosidase 1C [*Triticum aestivum*]; **I3NM31**: Glyco\_hydro\_1 Domäne-enthaltendes Protein [*Triticum urartu*]; **M7YIF2**:  $\beta$ -Glukosidase 5 [*Triticum urartu*]; **M7YN29**:  $\beta$ -Glukosidase 31 [*Triticum urartu*]; **M7YW32**:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Triticum urartu*]; **M7ZDE0**:  $\beta$ -Glukosidase 3 [*Triticum urartu*]; **M7ZF56**:  $\beta$ -Glukosidase 25 [*Triticum urartu*]; **M7ZIZ4**:  $\beta$ -Glukosidase 8 [*Triticum urartu*]; **M7ZJI5**: Putative inactive  $\beta$ -Glukosidase 14 [*Triticum urartu*]; **M7ZKC1**:  $\beta$ -Glukosidase 32 [*Triticum urartu*]; **M7ZL30**:  $\beta$ -Glukosidase 16 [*Triticum urartu*]; **M7ZPS6**:  $\beta$ -Glukosidase 7 [*Triticum urartu*]; **M7ZWP1**:  $\beta$ -Glukosidase 22 [*Triticum urartu*]; **M7ZYC0**:  $\beta$ -Glukosidase 28 [*Triticum urartu*]; **M8A1T1**:  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Triticum urartu*]; **M8APV4**:  $\beta$ -Glukosidase 4 [*Triticum urartu*]; **I6ZQ42**: Putative strictosidine  $\beta$ -D-Glukosidase (EC 3.2.1.105) [*Uncaria tomentosa*]; **VfFH**: Furcadin Hydrolase [*Viburnum furcatum*]; **VaVH**: Vicianin Hydrolase [*Vicia sativa*]; **A0A1S3TC06**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3TT70**:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig isoform X1 [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3TTA6**:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3U0B9**: vicianin Hydrolase-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3ULE5**:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3VKM5**:  $\beta$ -Glukosidase 47-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3VUF3**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **A0A1S3VV16**: cyanogene  $\beta$ -Glukosidase-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **UPI000BE39D53**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Vigna radiata var. Radiata*]; **D3YJ59**:  $\beta$ -Glukosidase [*Vitis vinifera*]; **F6H7V7**:  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21) [*Vitis vinifera*]; **UPI00019837FF**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 isoform X1 [*Vitis vinifera*]; **UPI0001984A0D**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12 [*Vitis vinifera*]; **UPI00019856F8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18 isoform X1 [*Vitis vinifera*]; **UPI0008FEC3D7**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46 isoform X1 [*Vitis vinifera*]; **UPI0008FFC76C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Vitis vinifera*]; **A0A0C9QXL3**: TSA: Wollemia nobilis Ref\_Wollemi\_Transcript\_1304\_1922 transcribed RNA sequence [*Wollemia nobilis*]; **ZmGLU1**: DIMBOA  $\beta$ -Glukosidase [*Zea mays*]; **A0A1D6E653**:  $\beta$ -Glukosidase 47 [*Zea mays*]; **A0A1D6E8I7**:  $\beta$ -Glukosidase 32 [*Zea mays*]; **A0A1D6FCY4**:  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Zea mays*]; **A0A1D6G766**:  $\beta$ -Glukosidase 42 [*Zea mays*]; **A0A1D6IX82**:  $\beta$ -Glukosidase3 [*Zea mays*]; **A0A1D6IXD5**:  $\beta$ -Glukosidase2 [*Zea mays*]; **A0A1D6J2J3**:  $\beta$ -Glukosidase 17 [*Zea mays*]; **A0A1D6JST6**:  $\beta$ -Glukosidase 40 [*Zea mays*]; **A0A1D6L143**:  $\beta$ -Glukosidase [*Zea mays*]; **B6SKG0**: nicht-cyanogene  $\beta$ -Glukosidase [*Zea mays*]; **UPI00077E5507**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 17-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E59B5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 3-artig isoform X2 [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E5A51**: Cluster: furostanol Glykosid 26-O- $\beta$ -Glukosidase-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E5E66**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E680E**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E694B**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E6A42**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E7E3A**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 12-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E831F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E87E9**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077E8A05**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077EA032**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 46-artig [*Ziziphus jujuba*]; **UPI00077EB643**: Cluster: vicianin Hydrolase-artig [*Ziziphus jujuba*]; **A0A0K9P295**:  $\beta$ -Glukosidase, FamilieGH1 [*Zostera marina*]; **A0A0K9P435**:  $\beta$ -Glukosidase, FamilieGH1 [*Zostera marina*]; **A0A0K9PSM9**:  $\beta$ -Glukosidase, FamilieGH1 [*Zostera marina*]; **UPI00053F4A97**: Cluster: putative  $\beta$ -Glukosidase 6 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053F4C9F**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 18-artig [*Beta vulgaris*]; **UPI00053F65B5**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 24 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053F8D8C**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 44 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053FB650**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 40 isoform X1 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053FC94B**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 13 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053FCBC0**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 42 isoform X1 [*Beta vulgaris*]; **UPI00053FE3B8**: Cluster:  $\beta$ -Glukosidase 11 isoform X1 [*Beta vulgaris*];



Os05g08750.1: [*Oryza sativa*]; Os05g42020.1: [*Oryza sativa*]; Os05g42040.1: [*Oryza sativa*]; Os05g42060.1: [*Oryza sativa*]; Os05g47950.1: [*Oryza sativa*]; Os06g08830.1: [*Oryza sativa*]; Os06g16000.1: [*Oryza sativa*]; Os06g17120.1: [*Oryza sativa*]; Os06g17140.1: [*Oryza sativa*]; Os06g17260.1: [*Oryza sativa*]; Os06g18010.1: [*Oryza sativa*]; Os06g18140.1: [*Oryza sativa*]; Os06g39070.1: [*Oryza sativa*]; Os06g39080.1: [*Oryza sativa*]; Os06g39270.1: [*Oryza sativa*]; Os06g39330.1: [*Oryza sativa*]; Os07g13660.1: [*Oryza sativa*]; Os07g13770.1: [*Oryza sativa*]; Os07g30760.1: [*Oryza sativa*]; Os07g31960.1: [*Oryza sativa*]; Os07g32010.1: [*Oryza sativa*]; Os07g32020.1: [*Oryza sativa*]; Os07g32060.1: [*Oryza sativa*]; Os07g32630.1: [*Oryza sativa*]; Os07g37690.1: [*Oryza sativa*]; Os07g42970.1: [*Oryza sativa*]; Os08g07200.1: [*Oryza sativa*]; Os09g16090.1: [*Oryza sativa*]; Os09g21160.1: [*Oryza sativa*]; Os09g30980.1: [*Oryza sativa*]; Os09g34214.1: [*Oryza sativa*]; Os09g34230.1: [*Oryza sativa*]; Os09g34250.1: [*Oryza sativa*]; Os09g34270.1: [*Oryza sativa*]; Os10g03320.1: [*Oryza sativa*]; Os10g12120.1: [*Oryza sativa*]; Os10g17489.1: [*Oryza sativa*]; Os10g18510.1|13110.m01524: [*Oryza sativa*]; Os10g30560.1: [*Oryza sativa*]; Os11g26950.1: [*Oryza sativa*]; Os11g27370.1: [*Oryza sativa*]; Os11g38650.1: [*Oryza sativa*]; Os12g37510.1: [*Oryza sativa*]; CoBX8: [*Consolida orientalis*]; ZmBX8: [*Zea mays*]; ZmBX9: [*Zea mays*];

Abbildung 34: Eingesetzte Sequenzen für den UGT-Stammbaum: Abkürzung, Funktion und Herkunft der UGTs.

#### P450 Datensatz

AtCYP51G1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP701A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A5: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A6: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP702A8: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP703A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP704A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP704A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP704B1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A12: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A13: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A15: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A16: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A18: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A19: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A20: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A21: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A22: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A23: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A24: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A25: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A27: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A30: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A32: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A33: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A6: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A8: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP705A9: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A4: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A5: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP706A7: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP707A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP707A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP707A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP707A4: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP708A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP708A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP708A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP708A4: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP709B1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP709B2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP709B3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP710A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP710A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP710A3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP710A4: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP711A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP712A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP712A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP714A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP714A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP715A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP716A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP716A2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP718: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A12: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A14: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A15: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A16: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A18: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A19: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A20: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A21: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A22: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A23: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A24: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A25: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71A26: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B10: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B11: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B12: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B13: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B14: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B15: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B16: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B17: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B19: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B2: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B20: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B21: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B22: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B23: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B24: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B25: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B26: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B27: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B28: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B29: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B3: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B31: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B34: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B35: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B36: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B37: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B4: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B5: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B6: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B7: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B8: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP71B9: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP720A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP721A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP722A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP724A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A10: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A11: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A13: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A14: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A15: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A7: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A8: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72A9: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP72C1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP734A1: [*Arabidopsis thaliana*]; AtCYP735A1: [*Arabidopsis thaliana*];





Contig3362[*Consolida orientalis*]; **CoP450\_3302pep**: Contig3320[*Consolida orientalis*]; **LgCYP450\_1**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_2**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_3**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_4**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_5**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_6**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_7**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_8**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_9**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_10**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_11**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_12**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_13**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_14**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_15**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_16**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_17**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_18**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_19**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_20**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_21**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_22**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_23**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_24**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_25**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_26**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_27**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_28**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_29**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_30**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_31**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_32**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_33**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_34**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_35**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_36**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_37**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_38**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_39**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_40**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_41**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_42**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_43**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_44**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_45**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_47**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_48**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_49**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_50**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_51**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_52**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_53**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_54**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_55**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_56**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_57**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_58**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_59**: [*Lamium galeobdolon*]; **LgCYP450\_60**: [*Lamium galeobdolon*]; **ZmBX2**: BX P450[*Zea mays*]; **ZmBX3**: BX P450[*Zea mays*]; **ZmBX4**: BX P450[*Zea mays*]; **ZmBX5**: BX P450[*Zea mays*];

Abbildung 35: Eingesetzte Sequenzen für den CYP450-Stammbaum: Abkürzung, Funktion und Herkunft der P450s.

## Sequenzen

## LgGLU1

```

1 M P L P T Q T Y Y L L A F L F L V I I I
1 ATGCCATTGCCAACTCAAACCTTACTTACTCGCTTTTCTTTTCTTGTAAATCATCATA
21 S A A N P T L E S K C D C F H S S F N R
61 AGTGCTGCAAATCCCACATTGGAATCTAAATGTGATTGCTTCCATTATCCTTCAACCGT
41 R I F P A D F V F G A A S S A F Q V E G
121 CGAATCTTCTGCTGATTTTGTCTTCGGCGCAGCATCATCGGCTTTTTCAGGTCGAAGGT
61 A F K E N G K G P S M W D N F T H M C P
181 GCATTTAAGGAAAATGGGAAGGCCCAAGTATGTGGGATAATTTACACACATGTGTCCA
81 E K I K D H S N G D I A I D S Y H L Y K
241 GAAAAGATAAAGGATCATAGTAATGGAGACATAGCAATTGATTCCTACCATCTATAACAAG
101 E D V K I A R D L G L D A Y R I S I S W
301 GAAGATGTGAAGATTGCAAGAGATTTGGGTCTGGACGCCTACAGAATATCAATATCGTGG
121 P R I L P G G K I E A G V N Q D G I D Y
361 CCAAGGATATTGCCAGGCGGAAAGATTGAAGCAGGTGTGAATCAGGACGGGATCGATTAC
141 Y N N L I N E L L A N G I E P F V T L L
421 TACAACAATCTTATCAATGAACTCTTAGCTAATGGTATAGAGCCTTTTGTAAACCCTACTC
161 H L D I P L A L Q D A Y G G F L N S Q I
481 CATCTTGATATTCCACTAGCTTTGCAAGATGCATATGGTGGATTTCTTAATTCTCAAATT
181 V T D F V D F A N I L F Q Q F G D R V K
541 GTGACCGATTTTGTGGATTTTGCAAACATTCTGTTTCAGCAATTTGGCGATCGTGAAAG
201 N W I T I N E P W T L S V Y G Y A N S Y
601 AATTGGATCACAATAAACGAGCCCTGGACTTTGAGTGTATATGGTTATGCAAACAGCTAT
221 F A P C G R C S E W Q Q L G C T G D S A
661 TTTGCACGGGTCTGTTTTCAGAATGGCAGCAACTCGGTTGCACAGGGCGGACTCAGCC
241 T E P Y I V A H H Q L L A H S A L V N L
721 ACCGAACCCTACATTGTAGCTCACCACCAACTTCTTGCTCACTCTGCTCTTGTAATCTC
261 Y K N K Y Q A W Q K G K I G I T F A S Y
781 TACAAAAATAAATATCAGGCATGGCAAAGGGGAAGATTGGAATAACGTTTCGCTTCGTAT
281 W F V P L D E T N E N L K A K D R A L D
841 TGGTTCGTGCCATTGGACGAGACGAATGAGAACCTGAAGGCCAAGGATCGAGCCCTGGAT
301 F M L G W F M E P L T S G Y Y P E S M K
901 TTCATGCTTGGCTGTTTATGGAACCATTAACATCCGGATATTATCCGGAAAGCATGAAG
321 M R V G D R L P E F T E N E R K M M K G
961 ATGAGAGTGGGAGACAGATTGCCAGAATTTACAGAAAATGAAAGGAAGATGATGAAAGGG
341 S F D F I G F N Y Y G A I Y A F N K P N
1021 TCATTTGATTTTCATAGGATTCAACTACTATGGCGCTATTTATGCCTTCAACAAACCAAC
361 S S S S S Y T T D A E F E I T G T R D G
1081 TCATCTAGCTCCAGCTATACCACAGATGCAGAGTTCGAAATCACTGGGACGAGGGATGGA
381 K A I G E Q G R N T S R I Y I Y P K G L
1141 AAAGCGATAGGCGAACAAGGACGAAACACGAGCCGAATCTACATTTACCCCAAGGGGCTT
401 Y Q I L K L F K E R Y N D P L I Y I T E
1201 TATCAAATCTCAAACCTTTTAAAGAAAGATACAATGATCCACTGATTTATATCACCGAA
421 N G L D E A A N E T L E V S E A I K D N
1261 AATGGGCTCGATGAGGCAGCAAACGAGACGTTGGAAGTATCCGAGGCCATAAAAGACAAC
441 M R K H Y I Y D H L C C L H K S I E E D
1321 ATGAGGAAACACTACATTTATGATCATCTTTGTTGTCTGCATAAATCTATCGAGGAAGAT
461 A T N V K G Y F V W S L M D N F E W S A
1381 GCTACAAATGTGAAGGATATTTTGTGTGGTCGTTGATGGATAATTTTGTAGTGGTCTGCT
481 G F S V R F G L N Y V D Y K D K F L T R
1441 GGATTTTCGGTGCATTTGGGCTTAATTATGTGGATTACAAAGATAAATTTCTTGACAAGA
501 Y P K H S A M W F K D F L S I Q H N L P
1501 TATCCTAAACACTCTGCTATGTGGTTCAAAGATTTCTTATCGATCCAACACAACCTTACCC
521 M N L N S S K M L Y A M *
1561 ATGAATCTTAATTTCTTCAAAAATGTTGTATGCAATGTAA

```

## LgGLU2

1 M G I L V F F V V I C S A F A T T A F G  
1 ATGGGGATTCTTGTGTTTTTGTGGTAATTTGTTTCAGCATTTCGAACCACAGCTTTTGGGA  
21 Y K Y D L A E F N R S G F P P G F L F G  
61 TATAAGTACGACTTAGCTGAATTCGAAGTGGCTTTCCACCTGGCTTTCTTTTTTGGGA  
41 A A S S A Y Q F E G A A A E G G R G P S  
121 GCTGCTTCATCTGCCTATCAATTTGAAGGTGCTGCTGCTGAGGGAGGGAGAGGACCAAGT  
61 I W D T Y A H K I P A P I A D K S S G D  
181 ATCTGGGATACTTATGCTCACAAAATTCAGCGCCAATAGCTGATAAGAGCAGCGGAGAC  
81 V A N D F Y H R Y K E D V Q I M K Y L G  
241 GTGGCCAACGACTTTTATCATCGATATAAGGAGGATGTACAAATAATGAAATATCTAGGA  
101 L D A F R L S I S W P R I L P H G K L S  
301 TTGGATGCATTCAGGCTGTCAATTTCTTGGCCAAGGATTCTGCCTCATGGTAAACTAAGT  
121 R G V N K E G I A F Y N N V I N E L L A  
361 CGTGGAGTGAACAAAGAAGGGATTGCCTTTTACAACAATGTCATCAATGAGCTCCTTGCA  
141 K G I T P F V T I F H W D L P Q A L E D  
421 AAAGGTATAACCCCATTTGTGACAATATTCATTGGGACCTTCCACAAGCACTAGAAGAT  
161 E Y R G F L S P L I V D D F V D F A N I  
481 GAGTATAGAGGTTTTCTGAGTCCTCTCATTTGTGGATGATTTTGTAGATTTTGGCAACATC  
181 C F K E F G D R I K Y W I T V N E P F T  
541 TGCTTTAAGAATTTCGGTGATCGTATTAATATTTGGATTACAGTTAACGAACCATTTACC  
201 F I N G G Y D G G F I G N L A P G R C S  
601 TTCATAAACGGCGTTTATGACGGAGTTTTTATCGGAAACCTAGCGCCGGGAAGGTGCTCT  
221 K C S Q G N S A T E P Y I A G H H L L L  
661 AAATGCTCCCAAGGCAATTCAGCAACTGAACCTTATATTGCTGGTCATCATCTACTCCTT  
241 S H A A T V Q L Y N H K Y K A T Q K G E  
721 TCTCATGCTGCAACCGTACAACATATAACCACAAGTACAAGGCAACTCAAAGGGAGAA  
261 I G I T I V T H W F V P R T N S H A D H  
781 ATAGGAATAACAATAGTGACTCATTTGGTTTGTACCACGTACAAATCCCATGCCGATCAT  
281 E A A L R V L D F V Y G W F M H P V V Y  
841 GAAGCAGCTCTAAGAGTTCTTGATTTTGTATGGATGGTTTATGCATCCTGTTGTTTAT  
301 G E Y P L N M Q T N A G N R L P K F T K  
901 GGAGAATATCCATTAAATATGCAAACCAATGCGGGCAATCGACTGCCAAAATTCACTAAG  
321 E Q S E M L K G S Y D F I G M N Y Y T G  
961 GAGCAAAGTGAATGTTGAAGGGATCATATGATTTTATTGGAATGAATTACTACTGGA  
341 N Y A A H L S S R N G P V S S T S D Q M  
1021 AATTATGCAGCACATTTATCATCTCGTAATGGTCCTGTCAGCAGCACATCAGATCAAATG  
361 A N L T T D I N G V P I G N P T G I P I  
1081 GCAAATCTTACAACACTGATATCAACGGTGTACCTATTGGAAATCCAACAGGAATCCCCATA  
381 F F N Y A K G L A D L L I H T K K Y Y N  
1141 TTTTTTAACTATGCCAAAGGACTTGCTGATCTTCTAATCCACACCAAGAAATATTACAAT  
401 N P I I Y I T E N G I G D T A E V T L Q  
1201 AATCCTATCATTTACATTACAGAAAATGGTATTGGTGATACCGCTGAAGTTACCCTGCAG  
421 E K I N D P Q R I D F Y N H H L H A V Q  
1261 GAAAAAATTAATGACCACAAAGAATTGATTTCTACAACCATCATCTCCATGCTGTTCAA  
441 L A I A E G V K V K G Y I A W S F M D N  
1321 TTAGCAATTGCGGAAGGTGTGAAGGTGAAAGTTACATCGCATGGTCGTTTATGGACAAT  
461 F E W G S G Y T N R F G L I L V D Y Q N  
1381 TTTGAATGGGGTTTCGGGTTATACGAATCGGTTTCGGGCTGATCCTTGTGGATTACCAGAAT  
481 K L K R I P K R S A L W F K K C L A K V  
1441 AAACCTAAAAGGATTCCCAAAAGGTCAGCTCTTTGGTTCAAGAAATGCCTCGCTAAGGTT  
501 H \*  
1501 CACTAA

## LgGLU3

1 M Y C C T T S L N I Q T H L P T L K M R  
 1 ATGTATTGTTGTACCCTTCACTCAATATTCAGACACACCTTCCAACCTTTGAAGATGAGG  
 21 Q A S V L L F F C V Y T F A L I K C F A  
 61 CAAGCCTCAGTACTTTTGTCTTTTGTGTTTACACTTTTCGCTCTCATAAAATGCTTCGCT  
 41 I I H E E N G W P E S T V E F D M G G L  
 121 ATAATTCACGAGGAGAATGGATGGCCGGAATCCACGGTGGAGTTCGACATGGGAGGGCTG  
 61 S R G S F P K D F V F G T A A S A Y Q V  
 181 AGCAGAGGCAGCTTTCCTAAAGATTTTCGTCTTCGGGACGGCGGCTCCGCCTCAAGTG  
 81 E G M A L K D G R G P S I W D T F I K A  
 241 GAGGCATGGCCCTAAAGGACGGCCGAGGCCCCAGCATTGGGATACTTTCATCAAAGCA  
 101 P G R E P N N A S G E V S V D Q Y H K Y  
 301 CCTGGGCGTGAACCAACAATGCCTCGGGGAAGTGTGCGTGGACCAATATCATAAATAC  
 121 K E D I D V M A K L N F D A Y R F S I S  
 361 AAGGAGGACATTGATGTTATGGCAAAGCTAAACTTTGATGCCTACAGATTTTCTATTTCA  
 141 W S R I F P N G T G K V N W K G V A Y Y  
 421 TGGTCCAGAATATTTCCAAATGGAACGGAAAGGTGAATTGGAAGGGAGTTGCTTACTAT  
 161 N R L I N Y M L K K G I T P Y P N L N H  
 481 AATAGATTGATCAACTACATGCTCAAAAAGGTATCACCCCATATCCTAATCTGAATCAC  
 181 Y D L P Q A L Q D R Y N G W L G H E V V  
 541 TATGATCTTCTCAAGCGCTCCAGGATAGGTACAACGGGTGGCTTGGACACGAAGTGGTG  
 201 K D F G D Y A E F C F K T F G E R V K N  
 601 AAAGATTTTGGTGATTATGCTGAATTTCTGTTTTAAGACATTTGGGGAGAGAGTAAAGAAC  
 221 W Q T F N E P R V V A A L G Y D N G F F  
 661 TGGCAAACATTTAACGAGCCTAGAGTGGTCGCCGCACTTGGATACGATAATGGCTTCTTT  
 241 A P G R C S K A F G N C T E G N S A T E  
 721 GCACGGGGAGGTGCTCTAAAGCATTTCGGCAATTGCACTGAAGGCAACTCTGCTACTGAG  
 261 P Y I V A H N I I L C H A A A A Q R Y R  
 781 CCTTATATCGTTGCTCATAATATCATTTTTATGTCATGCGGCTGCTGCTCAGAGGTATCGC  
 281 Q K Y Q E K Q K G R I G I L L D F V W Y  
 841 CAGAAATACCAGGAAAAACAGAAAGGGAGGATTGGAATTTCTATTGGATTTTGTGGTAT  
 301 E P L T R S K A D N Y A A Q R A R D F H  
 901 GAGCCACTAACAAAGATCAAAAGCAGACAACCTATGCAGCTCAAAGGGCAAGAGACTTTCAC  
 321 I G W F M H P L V Y G E Y P K T M Q N I  
 961 ATAGGATGGTTTATGCATCCATTGGTGTATGGAGAGTATCCAAAACTATGCAGAATATA  
 341 V G K R L P K F S K E E V K M V K G S F  
 1021 GTAGGGAAAAGGCTACCAAAGTTCAGTAAAGAAGAAGTGAAGATGGTGAAGGGATCCTTT  
 361 D F V G V N Q Y T A Y Y M Y D P H Q A K  
 1081 GATTTTGTGGCGTAAATCAGTACACTGCATATTATATGTACGATCCACACCAGGCAAAA  
 381 S K D L G Y Q Q D W N C G F A Y D R H G  
 1141 TCAAAGGACTTAGGCTACCAGCAAGATTGGAATTGTGGATTTGCTTATGATCGTCATGGG  
 401 V P I G P R A H S Y W L Y I V P W G L Y  
 1201 GTGCCAATTGGGCCAAGGGCACACTCCTACTGGCTCTACATTGTTCCATGGGGTCTATAC  
 421 K A V N Y I K E H Y G N P T M I L A E N  
 1261 AAAGCTGTAAACTACATCAAAGAACATTATGGGAATCCTACCATGATTTTAGCTGAAAAT  
 441 G M D Q P G N L T L P K V L H D T I R I  
 1321 GGAATGGATCAACCAGGAAACCTCACACTCCCAAAAGTTTTGCATGACACTATAAGAATC  
 461 N Y Y K S Y L G E L K K A I D E G A N V  
 1381 AATTACTACAAAAGCTATTTAGGTGAGTTAAAGAAGGCGATAGACGAAGGCGCAAACGTG  
 481 K G Y F Q W T F V D N F E W R L G Y T S  
 1441 AAAGGCTACTTCCAATGGACATTCGTGGACAACCTTGAATGGAGGTTAGGTTATACGTGC  
 501 R F G I V Y V D F K T L K R Y P K M S A  
 1501 AGTTTGGAAATTGTGTACGTTGATTTCAAACCCCTCAAGAGGTACCCTAAGATGTCGGCT  
 521 Y W F K K L Q Q R Q K K H \*  
 1561 TATTGGTTCAAGAAGCTTCAACAGAGACAGAAGAAGCATTA

## LgGLU4

1 M L E R K G L I F G F I I V V F G A I S  
1 ATGTTGGAGAGGAAAGGTTTAATATTTGGATTTATTATTGTGGTGTGGTGGCAATTTCA  
21 N I C E C D G Q N I S R A S F P K G F V  
61 AATATATGTGAATGTGATGGTCAGAACATCAGTAGAGCAAGTTTTCCAAAGGGCTTTGTT  
41 F G T A S S A Y Q Y E G A V K E D G R G  
121 TTTGGGACTGCATCTTCTGCTTATCAGTATGAAGGAGCTGTTAAAGAGGATGGAAGGGGT  
61 Q T I W D T F A H T F G K V L D F S N A  
181 CAAACAATATGGGACACATTTGCTCATACTTTTCGGAAAAGTTCTCGATTTTAGCAATGCT  
81 D V A N D H Y H H Y N E D V Q L M K D M  
241 GATGTAGCAAATGACCATTACCACCCTACAACGAAGATGTACAATTGATGAAAGATATG  
101 G M D A F R L S I A W S R I Y P N G T G  
301 GGAATGGATGCCTTCAGATTATCTATTGCTTGGTCCAGAATTTATCCTAATGGAACAGGG  
121 K I N Q A G I D H Y N N V I N A L L A Q  
361 AAAATCAATCAAGCTGGAATTGATCATTACAACAATGTCATCAATGCTTTGCTAGCACAA  
141 G I E P Y V T L Y H W D L P Q S L E D R  
421 GGAATCGAGCCGTACGTGACACTCTATCACTGGGATCTCCCCAGAGTCTCGAAGACCGA  
161 Y T G W L N P Q S I K D F T T Y A E T C  
481 TACACAGGATGGCTCAACCCCTCAGAGCATAAAGGATTTACAAACGTATGCTGAAACGTGC  
181 F K E F G D R V K H W I T F N E P H T F  
541 TTTAAGGAATTTGGCGATAGGGTGAAGCACTGGATCACTTTCAACGAGCCCCATACTTTT  
201 A V G G Y D V G L Q A P G R C S I L L H  
601 GCCGTGCAAGGGTATGATGTGCGCCTGCAGGCGCCGCGCTGCTCCATCCTTCTTAC  
221 S F C R A G N S A T E P Y I V A H N V L  
661 TCGTTTTGTAGGGCCGAAATTCAGCAACCGAGCCTTATATAGTCGCCACAAACGTGCTT  
241 L A H A N V V D I Y K K I Y K T K Q H G  
721 CTTGCACACGCGAATGTGGTTCGACATTTACAAGAAAATATACAAAACAAAACAACACGGA  
261 S I G I T L D S F W Y E A A T N T S E D  
781 TCAATCGGGATAACTTTGGATTCCTTTTGGTACGAAGCGGCAACCAACACCTCAGAGGAC  
281 I Q A T Q R A I D F N L G W F I E P L I  
841 ATCCAAGCCACACAAAGAGCAATAGATTTTAACTTGGGCTGGTTCATTGAGCCTCTAATT  
301 V G E Y P K S M R D R V G N R L P I F S  
901 GTGGGAGAGTATCCGAAATCAATGAGGGATAGAGTCGGAAACAGGTTGCCAATATTTTCT  
321 T E Q S R Q V K G S F D F I G I N H Y T  
961 ACGGAGCAGTCGAGACAGGTGAAGGGTCTGTTTCGATTTTCATAGGCATAAATCACTACACA  
341 T W Y A S K D R I N L I G G L L N D S Q  
1021 ACGTGGTATGCAAGCAAAGACAGAATCAACTTAATTGGTGGTCTACTTAACGATTTCCCAA  
361 A D S G A F T F P M A I G K P T R D R A  
1081 GCAGACTCCGGCGCCTTTACTTTTCCAATGGCAATCGGAAAGCCTACACGTGACAGGGCA  
381 N S V W L Y I V P S G I R S L M N Y I R  
1141 AATTCTGTATGGTTGTATATTGTGCCTTCTGGGATAAGAAGTTTGATGAACTACATTCGA  
401 Q K Y G N P L V M I T E N G M D D G N K  
1201 CAAAAGTACGGAAATCCTCTTGTAATGATCACTGAAAATGGGATGGACGACGGAACAAG  
421 A F S S I K Q D T K R I K Y H N D Y L T  
1261 GCGTTTTCGTCCATCAAGCAAGATACGAAGCGGATCAAGTATCATAACGACTATTTGACA  
441 E L L A A I K E D G C N V R G Y F V W S  
1321 GAGTTATTAGCTGCTATAAAAGAAGATGGTTGCAATGTAAGAGGCTACTTTGTTTGGTCA  
461 M L D N W E W A G G Y G S R F G L Y Y V  
1381 ATGCTTGATAACTGGGAATGGGCAGGTGGATACGGTTCAGATTTGGGCTCTACTATGTT  
481 D F N D K L R K R Y A K D S V K W F K N  
1441 GATTTCAATGATAAGCTGAGGAAGAGATATGCAAAGATTCTGTAAAATGGTTTAAAAAC  
501 F L A S \*  
1501 TTCTTAGCTTCTTAA

## LgUGT11

1 M E A K N G R K A H V L A V A G P A Q G  
 1 ATGGAGGCAAAAAATGGCAGAAAAGCTCATGTTTTGGCAGTGGCAGGCCAGCTCAAGGC  
 21 H V K P L M K L C R Q I A K H G L K V T  
 61 CACGTTAAGCCGTTGATGAAACTGTGTAGGCAAATAGCCAAACACGGCCTTAAGGTGACC  
 41 L V N L Q S V H D K L V G E E D N I V Q  
 121 CTTGTAACTTACAGAGTGTCCATGATAAATTAGTGGGAGAAGAGGATAACATAGTACAA  
 61 M V S I P D V P I E E D K D D P F K K M  
 181 ATGGTCTCAATCCCAGATGTGCCAATCGAGGAAGATAAAGATGATCCCTTTAAGAAGATG  
 81 K N L R K T M P E S L K D L I Q G I N S  
 241 AAGAATCTGCGTAAAACTATGCCTGAATCGTTGAAAGATTTGATTTCAGGGGATTAATAGT  
 101 S S N P E E K I G F V I A D V M V E W L  
 301 TCTTCCAATCCGGAGGAGAAAAATTGGATTTGTGATTGCTGATGTTATGGTTGAGTGGTTA  
 121 M D T A A E M G A E P I L F S P T S A A  
 361 ATGGATACTGCGGCGGAGATGGGAGCGGAGCCGATACTTTTCTCGCCGACGTCCGCCGCC  
 141 F R A M M S R I P A L L E D G M L D L N  
 421 TTCCGCGCCATGATGTCTCGGATTCGGCGCTTCTAGAAGATGGGATGCTTGATCTAAAT  
 161 G N I E K C E K I T L S D D I P A W D K  
 481 GGAAATATCGAGAAATGTGAAAAGATTACGTTGTGCGGATGATATACCAGCTTGGGATAAA  
 181 D E F S W S F P H D P K T Q K S F F D L  
 541 GATGAGTTTTCTGGAGCTTTCCTCATGACCCAAAACTCAGAAGTCTTTCTTCGACTTG  
 201 I N P D R G K I I Q P K L H L I N T C Y  
 601 ATTAATCCTGACCGAGGAAAAATAATCCAACCAAGTTGCATCTAATTAACACTTGTAT  
 221 E L E S P A C D L R P N L L P V G P L L  
 661 GAACTTGAATCCCCGGCTTGTGATTTGAGGCCGAATTTACTGCCCGTTGGGCCATTACTT  
 241 E M N N S C N F Y P E D E S C L S W L D  
 721 GAGATGAATAATTCTTGCAATTTCTATCCAGAAGATGAATCTTGTTTAAGCTGGTTGGAC  
 261 T K L P E S V I Y V S F G S I A V V S Q  
 781 ACTAAACTACCAGAATCTGTGATTTATGTTTTCTTTTGGTAGCATAGCAGTTGTCTCTCAG  
 281 Q Q L D E L A L G L E L S G R A F L W V  
 841 CAACAACCTGGATGAGTTGGCACTCGGGCTCGAGCTCTCGGGCCGGGCTTTTCTGTGGGTC  
 301 V R P D L V N G L R A V Y P D G F L E R  
 901 GTGAGACCGGATCTTGTGAACGGGTTGCGGGCCGTGTACCCGGATGGATTCTGGAGAGG  
 321 V S G I G M I V E W A P Q E R V L F H P  
 961 GTGAGTGGGATTGGAATGATCGTCAATGGGCGCCTCAAGAAAGAGTACTTTTTTCATCCG  
 341 S V A C F L T H C G W N S I L E G L S K  
 1021 TCTGTGGCGTGTTTTTTAACGCACCTGCGGGTGGAACTCGATTCTGGAAGGTTTGAGTAAA  
 361 G V S F L C W P F F M D Q F H N Q N Y I  
 1081 GGTGTATCGTTTTCTTTGTTGGCCTTTTTTTCATGGATCAATTCATAACCAAAATTACATT  
 381 C D K W E A G L R V D G D G S G I R T R  
 1141 TGTGATAAGTGGGAGGCTGGATTAAGGGTTGATGGTGTGGAAGTGGGATTAGAACGAGG  
 401 N E I K E K I G M M F C N G D L K A N A  
 1201 AATGAAATTAAGGAAAAAATGGGATGATGTTTTGTAATGGCGATTTGAAGGCAAATGCA  
 421 M R L K E I F A K T V C E G G S S Y N N  
 1261 ATGAGATTGAAGGAAATTTGCAAAGACCGTATGTGAAGGGGGCTTCTTATAATAAT  
 441 F E R F I D Y L R K \*  
 1321 TTTGAGAGATTCATTGATTATCTTAGAAAATGA

## LgUGT27

1 M G S I S T Q H K P H A V C I P Y P A Q  
1 ATGGGTTCTATTTCTACTCAACACAAAACCCACGCGGTATGCATACCCTACCCAGCCAG  
21 G H V N P M L K L A K L L H H N G F H I  
61 GGCACGTCAACCCCATGCTTAAACTAGCCAAGCTACTCCACCACAACGGCTTCCACATC  
41 T F V N T D Y N H R R L L N S G G S S A  
121 ACCTTCGTCAACACCGACTACAACCACCGCCGCTCCTCAACTCCGGCGGATCCTCCGCC  
61 L H G L P D F R F A T I P D G L P F S D  
181 CTCCACGGCTCCCGGACTTCCGTTTTCGCCACCATTCCCGATGGCCTCCCCTTCTCCGAC  
81 A D A T Q D I P S L C V S T T T T C L E  
241 GCCGACGCCACCCAGGACATACCTTCTCTTTGTGTTTTCCACCACCACCACCTGCTTGGAG  
101 P F C D L L L E I K S S G G G V P P V S  
301 CCCTTCTGCGACCTGCTTTTGGAGATCAAAGCTCCGGCGGGGGCGTGCCGCCGGTGAGC  
121 C I V A D G E M S F T L K A A E R F G L  
361 TGCATAGTCGCCGATGGGGAGATGAGCTTACGCTGAAGGCGGCGGAGAGATTTGGGCTG  
141 P E V L F W T T S A C G L L G Y T Q Y R  
421 CCGGAGGTGCTGTTCTGGACCACAAGTGCTTGTGGACTCTTGGGGTATACGCAGTATCGT  
161 R L V E K G Y V P L Q D M S Q V T N G Y  
481 AGACTTGTGAGAAAAGGCTACGTCCCCTCTTCAAGACATGAGCCAGGTAACATAATGGGTAT  
181 L D T T V D W V P G I K N I Q L R D F P  
541 TTGGACACAACAGTTGATTGGGTTCCAGGAATCAAGAATATCCAACCTCAGAGATTTCCCA  
201 A F I R T T D P K D F M L N F K T Q E V  
601 GCTTTCATCAGAACTACTGATCCTAAAGACTTTCATGCTTAACTTTAAAACACAAGAGTT  
221 E A I P R A K A L I L N T F D A L E Q D  
661 GAGGCAATTTCCAGAGCGAAAGCTCTGATCCTCAACACCTTCGACGCATTGGAGCAAGAT  
241 V L N A L S D M F P T I H T V G P L Q L  
721 GTTTTGAATGCTCTCTCAGACATGTTTCCAACAATTCACACTGTGGGCCCTCTTCAACTC  
261 M M N H V H D Q T L D S I T S S L W K E  
781 ATGATGAATCATGTCCACGACAAACACTGGATTCCATCACCTCTAGCCTCTGGAAAGAA  
281 D F Q C I E W L D S K E P G S V V Y V N  
841 GACTTCCAGTGCATCGAATGGCTCGATTCTAAAGAGCCTGGATCTGTGGTCTACGTGAAT  
301 F G S I T V V T A Q Q L T E F A W G L A  
901 TTTGGCAGCATCACTGTGGTTACTGCTCAGCAGCTAACCGAATTCGCGTGGGGCCTAGCT  
321 N S N K Q F L W V I R P D I V A G E S A  
961 AATAGCAACAAAACAATTTCTTATGGGTTATCAGGCCTGATATAGTGGCAGGGGAATCGGCC  
341 L V P P E F V E K T K D R S L L I S W C  
1021 CTGGTGCCGCTGAATTTGTGGAAAAGACTAAAGATAGAAGCCTGCTGATCAGCTGGTGT  
361 P Q E Q V L K H P A I G G F L T H S G W  
1081 CCTCAGGAGCAGGTCCCTGAAACACCCTGCGATCGGAGGGTCTTGACGCACAGTGGATGG  
381 N S T L E S V I N G V P L I C W P F F A  
1141 AATTCGACTCTCGAAAGTGTATCAATGGGGTGCCCTGATTTGCTGGCCTTTCTTCGCA  
401 E Q Q T N C R F S C V E W E M G M E I D  
1201 GAGCAGCAGACGAATTGTCGGTTCAGCTGCGTGGAGTGGGAGATGGGAATGGAGATAGAC  
421 N D V K R D E V E F L V R E L M D G E K  
1261 AACGATGTGAAAAGAGACGAGGTGGAGTTTCTTGTGAGGGAGCTTATGGATGGAGAGAAG  
441 G K K M K E K A M E W K E K A E A A T V  
1321 GGAAAGAAAATGAAGGAGAAAGCGATGGAGTGAAGGAGAAAGCAGAAGCAGCAACTGTG  
461 P G G S S Y L N F E K L I K E L L L \*  
1381 CCTGGTGGTCTTCATACTTGAATTTTCAGAAAATGATCAAGGAGCTTTTGCTATAA

## LgUGT28

1 M E E E E E G R K A H V L A V A G P A Q  
 1 ATGGAAGAAGAAGAAGAGGGGAGAAAAGCTCATGTTTTAGCAGTGGCAGGCCAGCTCAA  
 21 G H V K P L M K L C R Q I A K H G L K V  
 61 GGCCACGTTAAGCCGTTGATGAACTGTGTAGGCAAATAGCCAAACACGGCCTTAAGGTG  
 41 T L V N L Q S V H D K L V G A A G K E D  
 121 ACGCTTGTTAACTTACAGAGTGTCCATGATAAATTAGTTGGTGCTGCCGAAAAGAGGAT  
 61 N I V Q M V S I P D V P I E E D K D D P  
 181 AACATAGTACAAATGGTCTCAATCCCAGATGTGCCAATCGAGGAAGATAAAGATGATCCC  
 81 F K K M K N L R K T M P E S L K D L I Q  
 241 TTTAAGAAGATGAAGAATCTGCGTAAAACATGCCTGAATCGTTGAAAGATTTGATTCCG  
 101 G I N S S S N P E E K I G F V I A D V M  
 301 GGGATTAATAGTTCTTCTAATCCGGAGGAGAAAATTGGATTTGTGATTGCTGATGTTATG  
 121 V E W L M D T A A E M G A E P I L F S P  
 361 GTTGAGTGGTTAATGGATACTGCGGCGGAGATGGGAGCGGAGCCGATACTTTTCTCGCCG  
 141 T S A A F R A M M S R I P A L L E D G M  
 421 ACGTCCGCCCTTCCGCGCCATGATGTCTCGGATTCCGGCGCTTCTAGAAGATGGGATG  
 161 L D L N G N I E K C E K I T L S D D I P  
 481 CTTGATCTAAATGAAAATATCGAGAAATGTGAAAAGATTACGTTGTCCGATGATATACCA  
 181 A W D K D E F S W S F P H D P K T Q K S  
 541 GCTTGGGATAAAGATGAGTTTTCTGGAGCTTTCCTCATGACCCAAAAACTCAGAAGTCT  
 201 F F D L I N P D R G K I I Q P K L H L I  
 601 TTCTTCGACTTGATTAATCCTGACCGAGGAAAAATAATCCAACCCAAGTTGCATCTAATT  
 221 N T C Y E L E S S A C D L R P N L L P V  
 661 AACACTTGTATGAACTTGAATCCTCGGCTTGTGATTTGAGGCCGAATTTACTGCCCGTT  
 241 G P L L E M N N S C N F Y P E D E S C L  
 721 GGGCCATTACTTGAGATGAATAATTCTTGCAATTTCTATCCAGAAGATGAATCTGTTTA  
 261 S W L D T K L P E S V I Y V S F G S I A  
 781 AGTGGTTGGACACTAAACTACCAGAATCTGTGATTTATGTTTCTTTTGGTAGCATAGCC  
 281 V V S Q Q Q L D E L A L G L E L S G R D  
 841 GTTGCTCTCAGCAACAACCTGGATGAGTTGGCACTCGGGCTCGAGCTCTCGGGCCGGAT  
 301 F L W V V R P D L V N G L R A V Y P D G  
 901 TTTCTGTGGGTTGTGAGACCGGATCTTGTGAACGGGTTGCGGGCCGTGTACCCGGATGGA  
 321 F L E R V N G I G M I V E W A P Q E R V  
 961 TTCTGGAGAGGGTGAATGGGATTGGAATGATCGTCAATGGGCGCCTCAAGAAAGAGTA  
 341 L F H P S V A C F L T H C G W N S I L E  
 1021 CTTTTTCATCCGTCTGTGGCGTGTTTTTTAACGCACTGCGGGTGGAACTCGATTCTGGAA  
 361 G L S K G V P F L C W P F F M D Q F H N  
 1081 GGTTTGAGTAAAGGGTACCCTTTCTTTGTTGGCCTTTTTTCATGGATCAATTCATAAC  
 381 Q N Y I C D K W E A G L R V D G D G S G  
 1141 CAAAATTACATTTGTGATAAGTGGGAGGCTGGATTAAGGGTTGATGGTGTGGAAGTGGG  
 401 I R T R N E I K E K I G M M F C N G D L  
 1201 ATTAGAACGAGGAATGAAATTAAGGAAAAAATTTGGGATGATGTTTTGTAATGGCGATTTG  
 421 K A N A M R L K E I C A K T V C E G G S  
 1261 AAGCAAATGCAATGAGATTGAAGGAAAATGTGCAAAGACCGTATGTGAAGGGGGCTCT  
 441 S Y N N F E R F I D Y L R K \*  
 1321 TCTTATAATAATTTTGGAGAGATTCATTGATTATCTTAGAAAATGA

## CoCYP450\_Contig905

1 M E S L N Q S Y P V I I C F W S F A L L  
1 ATGGAATCACTTAACCAATCTTATCCAGTGATTATTTGTTTCTGGAGCTTCGCATTGTTA  
21 L L L Y T M P I S W K R R R D M A P E P  
61 TTATTACTGTACACCATGCCCATATCATGGAAGAGAAGAAGGGATATGGCACCCGAACCG  
41 S G A W P L I G H L P L L M G H T L P Q  
121 TCGGGCGCATGGCCTCTGATAGGCCACCTGCCTCTGCTGATGGGTACACCTTACCACAG  
61 K T L G A L A D K Y G P V Y T I R L G L  
181 AAAACATTGGGGGCACTGGCCGATAAGTATGGCCCCGTTTACACCATTTCGTCTTGGTTTG  
81 R K V L V I N S W E A A K E C F T T N D  
241 CGTAAAGTATTGGTGATCAATAGCTGGGAGGCTGCCAAGGAATGCTTCACCACCAATGAC  
101 K A F A H R P S S V A L R I M G Y N N A  
301 AAGGCTTTTGCACACCGCCCCAGCTCGGTTGCCTTGAGGATCATGGGCTATAACAATGCC  
121 I L F Y A S Y G P Y W R E V R R I A I L  
361 ATACTCTTCTATGCTTCCTATGGCCCCACTGGCGCGAGGTTTCGCAGGATAGCCATATTG  
141 E L L S N R R I E L I K H I Q V S E V D  
421 GAACTTCTCTCAAATCGCCGGATTGAATTGATAAAGCACATCCAAGTCTCAGAAGTTGAC  
161 V S M R E L Y K M W Q A G S T D G G Y S  
481 GTGTCAATGAGAGAACTGTACAAAATGTGGCAAGCAGGTTCCACTGATGGCGGGTATTTCG  
181 L V E M K Q W F I D I N L N M I V R M V  
541 CTCGTGGAGATGAAACAGTGGTTCATTGACATAAATCTGAATATGATTGTGAGGATGGTT  
201 V G E R Y F G T R M D D D G I R F Q K A  
601 GTTGGTAAAAGATACTTCGGGACTAGGATGGACGATGACGGAATACGATTCCAGAAGGCC  
221 V H S F F H L V G L F V L S D A V P F L  
661 GTTCATTCCCTTCTTTCATTTGGTTGGGCTTTTTGTCTTGTCTGACGCGGTTCCGTTTTCTA  
241 G W L D F R K K E M K R T A K E L D R I  
721 GGGTGGTTGGATTTTAGGAAGAAAGAGATGAAAAGAACTGCAAAGAATGGACAGGATC  
261 M Q K W L D E H K Q K K L A G G G K G E  
781 ATGCAAAAATGGCTCGACGAACATAAACAGAAAAAACTAGCTGGTGGTGGGAAAGGCCGAG  
281 Q D F M D M M L S V L E D K K L P D F D  
841 CAAGATTTTCATGGACATGATGCTGTCCGTGCTTGAAGATAAAAAGCTCCCTGATTTTCGAC  
301 A D T I N K A V S M N M I F G G V D T I  
901 GCCGATACCATCAACAAGGCTGTCAGCATGAATATGATCTTTGGCGGCGTTCGACACTATA  
321 T V G L T W T F S L L I N N P R V L K K  
961 ACTGTGGGTCTAACCTGGACTTTTTTCGTTGCTGATAAACAATCCACGAGTTCTAAAGAAA  
341 A Q D E I E A T V G K H R P V G A L D V  
1021 GCCCAAGATGAAATTGAGGCAACAGTAGGAAAACATCGGCCGGTGGGGGCGTTAGATGTG  
361 E K L V Y L Q A I V K E S L R L Y P P S  
1081 GAGAAGCTAGTGTATCTCCAAGCAATAGTAAAAGAGTCATTACGTCTGTACCCACCCAGC  
381 P M P P Q H L T V E D C T V A G Y H V P  
1141 CCTATGCCGCCACAACATCTCACCGTGGAAAGATTGTACTGTGGCTGGCTACCACGTCCCA  
401 A G T C L V A N I W K I Q R D P R V W S  
1201 GCTGGCACATGCTTGGTGGCAAACATTTGGAAGATCCAACGAGATCCGCGCGTGTGGTCC  
421 D P C E F Q P E R F L G D G A N V D L R  
1261 GATCCTTGTGAGTTCAGCCTGAGAGGTTCCCTTGGGGACGGAGCAAATGTTGACCTTAGA  
441 G K N F E F I P F G A G R R Q C P G I S  
1321 GGAAGAATTTTGAGTTTATTCCTTTTCGGAGCCGGACGACGTCAATGCCCAGGAATTTCA  
461 Y A L Q V L N L V L A R L L Q G F D F K  
1381 TATGCACTTCAAGTACTCAACTTAGTATTAGCGCTGTGTTACAGGGTTTCGATTTCAAG  
481 T K S N Q A L D M T E S P G L T N M K A  
1441 ACCAAATCAAATCAAGCCCTGGACATGACTGAAAGCCCGGACTGACTAATATGAAAGCT  
501 T P I H V F I T P R L P S D L Y \*  
1501 ACTCCTATCCATGTATTTCATCACTCCTCGTCTCCCTTCGGATCTTTATTGA

## CoCYP450\_Contig5112

1 M A V F T S Y D H L F F G V I A F F I S  
1 ATGGCTGTGTTACCTCATATGATCACCTCTTCTTTGGGGTGATAGCCTTTTTTCATCTCT  
21 A I I L F V S T R S K S K T L N L P P G  
61 GCTATTATCCTCTTTGTCTCCACTAGGTCCAAGTCCAAGACCCTCAACCTCCCTCCTGGG  
41 P P G W P V V G N F F Q V A R S G K P F  
121 CCTCCCGGATGGCCTGTGGTGGGCAATTTCTTCCAGGTTGCCCGCTCCGGCAAACCGTTC  
61 F Q F V Q D M R K I Y G P I F T L K M G  
181 TTCCAGTTTGTCCAAGACATGAGGAAAATCTACGGGCCCATTTTCACTCTCAAGATGGGT  
81 T R T M I F I T S A E L A H E A L I E K  
241 ACCCGCACCATGATCTTCATCACCAGTCCAGGTTAGCCCACGAGGCGTTGATCGAAAAG  
101 A Q I F A S R P A E T P T R T I F S C N  
301 GCTCAGATTTTTGCCAGCCGGCCCGCCGAGACGCCACCCGGACTATATTTAGTGC AAC  
121 K F T V N A S V Y G P V W R S L R R N M  
361 AAGTTCACGGTGAATGCTTCCAGTATATGGACCGGTTTGGCGGTGCTGAGGCGCAATATG  
141 V Q G M L S T S R L K E F R P V R E S A  
421 GTGCAGGGGATGCTTAGTACAAGCCGGTTGAAGGAGTCCGACCCGTGAGGGAGTCGGCT  
161 M D K F I N R I R G E A E A N D G A V W  
481 ATGGACAAATTTATCAACCGGATCCGGGGTGAAGCCGAGGCAAATGATGGAGCGGTTTGG  
181 V L R N A R F A V F C I L L S M C F G V  
541 GTGCTGAGAAATGCCCGGTTTGCAGTGTTTTGTATACTTTTGTCCATGTGTTTTGGCGTC  
201 E M D E K T I V K I D E L M K S V L L I  
601 GAAATGGACGAGAAGACGATTGTTAAAATTGATGAGCTTATGAAATCAGTTTTACTCATT  
221 L T A K L D D Y L P I L S P F F S K H R  
661 CTCACGGCGAAGCTGGATGATTATTTACCCATTTTGTAGCCCGTTTTTCTCGAAGCACCGG  
241 K Q V M E V R E E Q L R T I V P L I N K  
721 AAACAAGTCATGGAGGTAAGGGAGGAGCAGCTCAGGACTATAGTCCCGCTCATTAAACAAG  
261 R R F A L K N P G S D P T G Q P F A Y H  
781 AGAAGATTGCTTTGAAAAACCCGGTTTCGGATCCTACCGCCAGCGTTTTGCTTACCTA  
281 D T L F D L T V E G R K S A P T D S E L  
841 GACACGCTTTTCGACCTCACCGTCGAGGGCGGAAATCCGCTCCAACAGACTCCGAGTTA  
301 V T L C S E L L N G G T D T T A T G I E  
901 GTCACCCTTTGCTCCGAGCTTCTAAACGGCGGAACGGACACAACCGCGACCGGTATCGAA  
321 W A I A R L I H N P K I Q S K L Y N E I  
961 TGGGCCATCGCCAGGCTGATCCACAACCCAAAGATCCAATCAAACCTCTACAATGAGATC  
341 K S T V G D R K V D E K D C E K M E Y L  
1021 AAATCCACGGTGGGTGATCGGAAGGTGGACGAGAAGGATTGTGAGAAAATGGAGTATCTC  
361 N A F T K E L L R K H P P T Y F S L T H  
1081 AATGCATTTACAAAGGAATTACTACGTAAACACCCCTCCGACTTACTTCTCCCTCACCCAT  
381 A V T Q P A K L G G Y D V P T D A T V E  
1141 GCTGTGACCCAGCCCGCTAAGCTGGGCGGGTACGACGTGCCACCGACGCGACCGTGGAG  
401 F Y L P T I S D D P N L W S N P E V F D  
1201 TTCTATTTACCAACCATTTTCGGATGATCCAAATTTGTGGTCCAACCCTGAAGTGTTCGAC  
421 P E R F L S G K E D A D I T G N R E I R  
1261 CCAGAGAGGTTCTTGTCCGGCAAAGAGGACCGGATATAACCGGTAACCGGGAGATAAGA  
441 M I P F F A G R R I C P G L A M A M T H  
1321 ATGATACCATTTGGAGCCGGGAGAAGAAATATGTCCTGGTTTGGCCATGGCAATGACCCAT  
461 V N L M I A R M V Q E F E W S A L P T Q  
1381 GTTAATTTGATGATAGCAAGGATGGTGCAAGAGTTTGTAGTGGAGTGCACTTCTACTCAA  
481 T E I D F T E K L E F T I V M K N S L Q  
1441 ACTGAGATCGACTTCACTGAGAAGTTGGAGTTCACTATAGTGATGAAGAACAGTCTTCAA  
501 A V A K P R H K \*  
1501 GCTGTGGCTAAGCCAAGACATAAATAG

## CoCYP450\_Contig2640

1 M H E W I A D N L R A C G G T Y Q T C I  
1 ATGCACGAATGGATAGCTGATAATCTCCGTGCTTGTGGAGGAAGCTTATCAAACCTGCATC  
21 C A I P F L A K K Q G L V T V T C D P K  
61 TGTGCCATTCCTTTCTTAGCCAAGAAACAAGGTCTCGTCACTGTACATGTGACCCCAA  
41 N L E H I L K T R F D N Y P K G P T W Q  
121 AACCTCGAGCACATACTAAAGACCAGGTTTGATAATTACCCGAAAGGCCAACTTGGCAA  
61 S V F H D L L G D G I F N S D G E T W L  
181 TCTGTGTTTCATGATTTGCTTGGTGATGGTATCTTCAACTCCGACGGTAAAACATGGCTG  
81 F Q R K T A A L E F T T R T L R Q A M G  
241 TTCCAGCGAAAACTGCTGCACTGGAGTTCACAACAAGAAGCTCTCCGTCAAGCTATGGGA  
101 R W V N R A I Q L R F C P I L K A A Q L  
301 CGGTGGGTGAATCGGGCAATCCAACTCAGATTTTGTCCGATCCTAAAAGCCGCGCAACT  
121 E S Q V I D L Q D L L L R L T F D N I C  
361 GAATCTCAGGTAATCGACCTTCAGGATCTGCTGCTGCGCTTAACATTTGATAATATTTGT  
141 G L A F G K D P Q T L A P G L P E N S F  
421 GGGTTGGCTTTCGGTAAGGACCCACAGACTCTAGCTCCAGGACTACCAGAAAATAGTTTT  
161 A S A F D R A T E A T L Q R F I L P E M  
481 GCGTCGGCATTGATCGAGCCACTGAGGCCACATTGCAGCGTTTTATTTTGGCCGAAATG  
181 V W K V R K W L G L G M E V K L T K S L  
541 GTATGGAAGGTAAGGAAATGGCTTGGCCTGGGCATGGAAGTCAAGTAAACAAAAGTCTT  
201 K H V E E Y L S T V I K T R K L E L A D  
601 AAACACGTGGAGGAGTATTTGTCCACTGTGATAAAAACACGCAAGCTCGAGCTAGCGGAT  
221 Q Q K T V P H D D L L S R F M K K K E S  
661 CAGCAGAAGACAGTCCCACATGATGACTTGTGTCTAGGTTTATGAAGAAAAGGAATCC  
241 Y S D T F L Q H V A L N F I L A G R D T  
721 TACTCGGATAACATTTCTTCAACATGTGGCGCTTAACTTCATCCTAGCTGGACGTGACACT  
261 S S V A L S W F F W L V T Q N P R V E K  
781 TCATCAGTTGCATTGAGTTGGTTTTTCTGGTTGGTTACTCAGAATCCTCGTGTGGAGAAA  
281 K L L E E I C S V L I E T R G E E T S K  
841 AAATTAAGGAGATCTGCAGCGTCTGATTGAAACGCGTGGTGGAGACATCCAAA  
301 W F D E P L L F E E V D R L N Y L K A A  
901 TGGTTTTGATGAGCCATTGTTGTTTCAAGAGGTGGACCGTCTGAATTACTTGAAGGCCGCA  
321 L S D T L R L Y P S V P E D S K Y V A K  
961 TTATCAGATACTGAGGCTCTACCCATCTGTTCCCTGAAGACTCCAAATATGTGGCCAAA  
341 D D V L P D G T F V P A G S A I T Y S I  
1021 GATGATGTGTTGCCAGATGGAACATTTGTGCCCTGCAGGGTCCGGGATAACGTATTCGATT  
361 Y S A G R M K S T W G E D C L E F K P E  
1081 TATTCGGCGGGGAGGATGAAGTCCACCTGGGGAGAAGATTGTTTGGAGTTTAAACAGAG  
381 R W L S S D E K R F E V Q D A F R F V A  
1141 AGGTGGTTGTCAAGTGATGAGAAAACGATTTGAGGTACAAGATGCGTTTTGATTTGTGGCA  
401 F N A G P R I C L G K D L A Y L Q M K S  
1201 TTTAATGCGGGACCAAGGATTTGTTTGGGCAAGGACTTAGCTTATTTACAAATGAAATCA  
421 I A A S V L L R H R L T V A E G H K V E  
1261 ATTGCAGCGTCCGTTCTACTGCGCCACCGGCTGACAGTAGCAGAAGGGCACAAGGTGGAA  
441 Q K M S L T L F M K Y G L M V N V H P R  
1321 CAGAAAATGTCGTTGACCTTGTATGAAGTATGGACTGATGGTTAATGTGCACCCCAGG  
461 D L T D I V E S I R L K R D N G V V N F  
1381 GACTTAACAGATATTGTAGAATCCATTCGCTGAAGCGTGATAATGGTGTGTTAACTTC  
481 N V S V N D C L D V D G V E G \*  
1441 AACGTCAGTGTTAATGACTGCTTGGATGTGGATGGCGTTGAAGGTTAG

## CoCYP450\_Contig01885

1 M K V M E V I G Y T E M I F A A F F G F  
 1 ATGAAGGTAATGGAGGTGATAGGGTACACAGAGATGATATTTGCTGCCTTTTTTGGTTTT  
 21 L L L H R F M Q N T L V P S W P L F G M  
 61 CTCCTTCTTCACCGTTTCATGCAAAACACACTTGTACCTAGCTGGCCCTCTTTGGCATG  
 41 L P S L V L S V L K N R L L D W L T E C  
 121 CTTCTTCACTAGTTCTCAGTGTCTCAAGAATCGCTTACTCGACTGGTTAACTGAGTGT  
 61 L S K G G G N L V F K G P W F A N M D M  
 181 TTATCGAAAAGGTGGCGGTAATCTTGTCTTCAAAGGGCCTTGGTTTGCTAACATGGACATG  
 81 L I T S D P A N I R H V L N T N F S N Y  
 241 TTGATCACAAGTGATCCCGCAAATATCCGCCATGTCTTGAATACCAATTTCTCCAATTAT  
 101 S R G G P E F K E A L E V L G D G I I T A  
 301 TCAAGAGGCTGAATTCAAAGAGGCTTTGGAAGTTCGGGAGATGGCATTATCACTGCA  
 121 D S D S W R N Q R K L G H Q L I H H A R  
 361 GATTTCAGATTCATGGCGAAATCAAAGAAAaCTTGGCCACCcAACTCATTACCCATGCCAGA  
 141 F Q T F L V Q T A C A K V E S G L I P V  
 421 TTTCAAACCTTTTCTAGTGCAGACTGCTTGTGCCAAGGTTGAGAGCGGGCTAATCCCTGTT  
 161 L A H L V E N D L A I D L Q D V F K R A  
 481 CTGGCACACCTAGTGGAGAACGATTTGGCAATAGACTTGCAGGACGTGTTTAAACGGGCC  
 181 M L D I T M S I L A G T D P G C L R I D  
 541 ATGCTTGACATAACGATGAGTATTCTTGTCTGGCACTGATCCCGGTTGTCTCAGGATTGAT  
 201 Q L S Q K C S Y V D A M D D A E E V I L  
 601 CAACTCAGTCAAAAAGTGTCTTACGTGCATGCCATGGATGATGCTGAAGAGGTGATATTA  
 221 Y R H T M P K F W W K L Q K L L G F G R  
 661 TACCGTCATACCATGCCAAAAGTTCTGGTGAAGCTGCAAAAAGTTGCTGGGTTTTGGTAGG  
 241 E K R H R D S L P C V E Q L I A L S I S  
 721 GAGAAAAGGCATAGGGATAGTTTGCCGTGTGTGCAACAGCTTATAGCCCTTTCAATTTCC  
 261 T K Q E G R N Q K E K E E N G A D L L T  
 781 ACAAACAAGAAGGAAGGAACCAAAAAGAAAGAAAGAAATGGTGCGGATTTGCTGACA  
 281 S Y L E V D D V F G S K S D K F L R D T  
 841 TCTTACTTGGAGGTAGATGATGTTTTTGGATCAAAAATCAGACAAGTTCCTTGAGAGACT  
 301 V A T F T G A G A S T V S A A L T W F F  
 901 GTGGCAACCTTCACGGGAGCTGGAGCAAGCACTGTGAGTGCCGCATTAACCTGGTTTTTC  
 321 W L V S Q N P E V E S K I L E E I Q R K  
 961 TGGCTTGTTCGCAGAACCCAGAGGTGGAGAGTAAGATTCTAGAAGAAATCCAgAGGAAA  
 341 A I P F S S S P M G G K V K I F N M E S  
 1021 GCTATTCCATTCTCATCCTCACCAATGGGCGGgAAAGTGAAGATTTTCAATATGGAAAGT  
 361 L K G L V Y L H G G L C E A L R L F S P  
 1081 CTGAAAGGACTAGTTtATtACATGGAGGTCTTTGTGAAGCTTTAAGACTCTTTTCACCA  
 381 V P L T H K R A I K P D I L P S G H R V  
 1141 GTGCCATTAACCTCATAAAAGAGCCATTAAGCCCCGACATTCTACCAAGTGGCCATAGAGTT  
 401 D S K I A I I P M F Y S V G R M E A V W  
 1201 GATTCCAAAATAGCAATCATTCGGATGTTTTATTTCAGTAGGGAGAATGGAAGCGGTTTGG  
 421 G Q N C L E F K P E R W I T T D G E I E  
 1261 GGGCAAAACTGCTTAGAATTCAAACCAGAGAGATGGATTACAACGGATGGAGAGATTGAG  
 441 Y V P S H K F I A F G S G P R G C L G K  
 1321 TATGTGCCCTCACATAAGTTCATTGCATTCGGCTCAGGACCGAGGGGCTGCTTAGGAAAG  
 461 E I S F T Q M R L I A A T V L Y N Y R V  
 1381 GAGATTTCCCTtACTCAGATGCGTCTGATTGCAGCGACAGTACTCTATAACTATCGAGTT  
 481 E V V D G H H I C Y K D A M V L F M K N  
 1441 GAAGTAGTGGATGGTCATCACATCTGCTATAAAGATGCAATGGTGTGTTtATGAAAAaT  
 501 G M K T R I K S R F \*  
 1501 GGCATGAAAACCTAGGATTAAAaGCAGATTCTA

## CoCYP450\_Contig8863

1 M E E S N L L Y Y L L L L L P P V L Y L  
1 ATGGAAGAGTCCAATCTCTGTACTATCTTCTCCTTCTTCCACCGGTTCTCTATCTC  
21 I F N R M K S S T N L P P G P F P W P V  
61 ATATTC AACCGCATGAAATCATCGACAAACCTTCCACCAGGTCCATTTCCATGGCCTGTC  
41 I G N L L N L G S K P H V S L A N L A A  
121 ATAGGCAACCTTCTCAACCTGGGAAGCAAACCTCATGTCTCCCTAGCCAACCTTAGCAGCA  
61 T H G P L M S L R L G T K L L V V G S S  
181 ACCCATGGCCCCCTCATGTCACTAAGACTCGGAACAAAGCTCCTCGTCGTGGGATCCTCT  
81 P C A A T E I L R N H D Q I F C A R S I  
241 CCTTGTGCAGCTACCGAAATCCTCAGAAACCATGACCAGATATTTTGCCTCGTTCCATA  
101 L H A V P A S P D R L Q L S M A W V D C  
301 CTCCATGCAGTCCCAGCCAGTCTGACCGACTACAATTATCGATGGCATGGGTGGACTGC  
121 N D Q W K H L R A L C R T E L L S S K M  
361 AACGACCAGTGGGAAGCACCTACGCGCCCTCTGTGCGACGGAATTGCTCTCCTCTAAAATG  
141 I E S Q A R I R D N K V A E M V E F L S  
421 ATTGAATCACAAAGCCAGGATTAGGGATAACAAAGTCGCGGAAATGGTGGAGTTCTTGTC  
161 T K E G R P V K I V D V V F V T V F N M  
481 ACCAAGGAAGGCAGACCGGTGAAGATTGTGGATGTTGTCTTTGTACCGGTTTTTAATATG  
181 L S C I F F S R D F M S L R E E S E D N  
541 TTGAGTTGTATATTTTTTCTCCAGGGATTTCATGAGTCTGAGGGAAGAGAGCGGAGACAAC  
201 R L W S I R K L M Q V L S A P N L A D  
601 CGGTTGTGGTCCATAAGGAAACTGATGCAGGTGCTTTCTGCTCCAAACTTGGCTGAC  
221 Y Y T L L S G L D L Q G Q N K T A R E I  
661 TATTACACGCTACTAAGTGGCTTGGATCTTCAAGGTCAAAAACAAAACGGCTAGGGAATA  
241 Y G E C S R I W Q D V M Q E R R V N K D  
721 TACGGCGAGTGCAGCCGAATATGGCAAGATGTCATGCAAGAAAGACGGGTGAATAAAGAT  
261 S S D V S R E R D F L D G L I D S G L R  
781 AGTTCAGATGTTTCAAGGGAGAGAGATTTCTTAGATGGTTTGATCGACAGCGGACTCCGC  
281 D D Q I N Y L L L E L F F A G A D T T N  
841 GACGACAAATCAACTACTTGCTCTTGGAAATTATTTTTCGCCGGTGCAGATAACAATA  
301 V T V E W A L A E L I K T P E A M R K V  
901 GTAACAGTCGAATGGGCACTGGCAGAGCTCATAAAAACCCAGAAAGCCATGAGGAAAGTT  
321 R F E L K A V V S A K I V K E S D L P L  
961 CGCTTCGAACTCAAGGCGGTCTGATCTGCAAAGATTGTTAAAGAGTCAGATCTGCCCTC  
341 L P Y L D S V I K E T L R L H P P A P F  
1021 CTTCTTACCTAGACTCGGTTATCAAGGAGACGCTCAGGTTACACCCTCCCGCACCGTTC  
361 S L P H R A A E T C K V M N Y T I P K D  
1081 TCCCTACCTCATCGCGCAGCTGAGACATGCAAGGTGATGAACTACACCATTCTAAGGAC  
381 T Q V L V N I W A I G R D P K F W E D P  
1141 ACACAGGTGTTGGTTAACATCTGGGCGATCGGTAGAGATCCCAAGTTCTGGGAGGACCCT  
401 V S F K P E R F L D S R M D F I S N N N  
1201 GTGAGTTTCAAGCCCGAACGATTTCTTGACTCGCGCATGGACTTCATCTCGAATAATAAC  
421 R Y A Y I P F G A G R R I C P G L P M A  
1261 CGCTACGCATACATACCATTGGGCGCTGGAAGAAGAATCTGTCCTGGACTCCCGATGGCA  
441 T K Q V T L I L A S L I Q S F D W Y L P  
1321 ACCAAGCAAGTGACCTTGATTCTTGCTAGTTTGATCCAAAGCTTTGATTGGTATCTCCCG  
461 G D G V K P T E L D M E E K F G M T L Q  
1381 GGTGACGGCGTAAAGCCTACTGAGCTAGACATGGAGGAGAAGTTTGGAAATGACTTTACAG  
481 K E K S L V L I P Q L R N I N G \*  
1441 AAGGAGAAGTCACTGGTACTCATTCTCAGCTGAGGAACATAAATGGTTA

## CoCYP450\_Contig4127

1 M E E T N L I Y Y L L L L L P P L L Y L  
 1 ATGGAAGAAACCAATCTTATCTATTATCTTCTCCTTCTTCCACCGCTTCTCTATCTC  
 21 I F N H T N S P K N L P P G P F P W P F  
 61 ATATTCAACCACACAAACTCACCAAAAAACCTCCCACCAGGTCCATTTCCATGGCCTTTC  
 41 I G N L L N L G K K P H I S L A R L S A  
 121 ATAGGCAACCTTCTCAATTTGGGAAAAAACCACACATCTCACTGGCCAGATTGTCAGCA  
 61 N H G P L I S L R L G T K L L V V G S S  
 181 AACCATGGCCCCCTCATCTCACTAAGACTAGGAACAAAGCTCCTTGTCGTGGGATCCTCT  
 81 A S A A I E I L R N H D Q I F S A R S I  
 241 GCTTCTGCAGCTATCGAAATCCTAAGGAACCATGACCAAATATTTTCCGCTCGATCCATA  
 101 P H A V P A W P D R L H L S M A W V D C  
 301 CCACATGCAGTGCCAGCTTGGCCTGACCGATTACATTTATCGATGGCATGGGTGGATTGT  
 121 N D Q W K Y L R A I C R T E L F S S K A  
 361 AACGATCAGTGGAAGTATTTACGGGCTATATGTGCAACAGAATTGTTCTCATCAAAGct  
 141 I E S Q A R I R N N K V L E L V E F L H  
 421 ATTGAATCACAAGCAAGGATTAGAAATAACAAGGTCTTGGAAATTGGTTGAATTCTTGCAC  
 161 A K K G V T V K I A D V V F V T V F N M  
 481 GCAAAGAAAGGTGTAACGGTGAAGATTGCAGACGTCGTTTTTGTACAGTTTTTAAaTATG  
 181 L S N I F M S K E F I N L Q E E G E D R  
 541 CTGAGTAATATATTTATGTGCAAAGAAatTcATTaATCTGCAGGAAGAGGGGGAGGATAGG  
 201 G L R A A V R K F M Q V L S A P N L A D  
 601 GGGTTGAGGGCAGCGGTGAGGAAATTTATGCAGGTGCTTTCTGCTCCAAATCTGGCAGAC  
 221 Y Y T I L S G L D L Q G Q N K R A R G I  
 661 TATTACACAATACTAAGTGGTTTTGGATCTTCAGGGTCAGAAcAAAAGGGCAAGGGGAATA  
 241 F D E I G G L W E D V I Q E R R G N K E  
 721 TTTGACGAGATCGgTGgATTGTGGGAAGATGTCATACAAGAAAGAAGGGGGAACAAAGAG  
 261 S D V S M E R D F L G G L I D S G I T N  
 781 AGTGATGTTTTCAATGGAGAGGGATTTCTTGGGTGGTTTTGATCGACAGTGGATTTACCAAT  
 281 E Q I S Y L F L E L F T A G S D T S T S  
 841 GAGCAAATCAGCTACTTGTTCCTGGAACTATTTACTGCAGGATCGGATACTAGTaCCTCA  
 301 T V E W E L A E L I K D Q K A M R K V R  
 901 ACAGTTGAGTGGGAACTGGCAGAGCTTATAAAaGATcaaaaaGCCATGAGAAAAGTTCG  
 321 F E L E T V L S T D E V V K E S D L P H  
 961 TTCGAACTCGAGACAGTATTGAGTACCGACGAGGTTGTTAAGGAGTCTGATCTACCTCAT  
 341 L P Y L H S V V K E T L R L H P A G P L  
 1021 TTACCTtACTTGCACTCAGTTGTCAAGGaGACTCTCAGGTTACACCCAgCTGGACcACTT  
 361 L I P H R A S K T C K V M N Y T I P K D  
 1081 CTCATACcTcACcGTGCCTCTAAGACATGCAAGGTGATGAATTACACAATTCAAAAGAC  
 381 T Q V L I N V W A I G R D P K T W K D P  
 1141 ACGCAGGTGTTGATTAATGTCTGGGCAATTGGAAGAGATCCCAAGACCTGGAAGACCCC  
 401 V T F N P K R F F D S C M E F N S R N H  
 1201 GTGACTTTCAATCCAAAACGATTTTTTGGATTCATGTATGGAATTCAACTCTAGAAATCAT  
 421 A Y I P F G A G R R I C P G L P M A A A K  
 1261 GCGTATATACCATTTGGTGCTGGAAGAAGAAATTTGTCCCAGACTCCCAATGGCCGCTAAG  
 441 Q V P L I L A S L I Q S F D W Y L P D E  
 1321 CAAGTTCCATTAATTTCTGCTAGTTTTGATCCAAAGCTTTGATTGGTATCTCCCAGATGAA  
 461 E N P T E L D M E E N F G I T L E K E K  
 1381 GAAAATCCTACTGAACTAGACATGGAAGAAAATTTCCGGATAACTTTAGAGAAGGAGAAG  
 481 P L L L I P K L R K T N D S S G C T N \*  
 1441 CCACTACTACTCATTCCTAAACTGAGGAAAACAAATGATTTCGTCTGGTTGTACCAACTGA

## CoCYP450\_Contig3362

1 M E E T K L L Y Y V I L L L P P F L Y L  
1 ATGGAAGAAACCAAACTCTTGATTATGTTATCCTTCTTCCACCATTCTCTACCTC  
21 I L N R I T S P K N L P P G P F P W P L  
61 ATACTCAACCGCATAACCTCACCAAAAAaCCTCCCACCAGGTCCATTTCCATGGCCTCTC  
41 I G N L L N L G N K P H V S L T N L A A  
121 ATAGGCAACCTTtCAACTTGGGAAACAAGCCACATGTCTCCCTAACCAACTTAGCAGCA  
61 T H G P L I S L R L G T K L L V V G S S  
181 ACCCATGGCCctCTCATATCACTAAGACTCGGAACAAAACCTCTCGTCGTGGGATCCTCT  
81 P S A A T E I L R T H D Q I F S A R S T  
241 CCTTCTGCAGCTACCGAAATCCTCAGAACCCATGACCAAATATTTCCGCTCGGTCCACA  
101 P Q A A P A W P D R L H L S M A W V D C  
301 CCACAGGCAGCCCCAGCTTGGCCTGACCGATTACATTTATCGATGGCATGGGTGGATTGC  
121 N D Q W K Y L R A I C R T E L F S S K A  
361 AATGACCAGTGGAAGTATTTACGGGCGATATGTGCAACAGAATTGTTCTCCTCAAAGCT  
141 I E S Q A R I R N N K V S E L V E F L H  
421 ATTGAATCACAAAGCAAGGATTAGAAAATAaCAAGGTCTCAGAATTGgTTGAATTCTTGCAT  
161 T K E G G V V K I A D V V F V T V F N M  
481 ACAAAGGAAGgAGGAGTGGTGAAGATTGCAGATGtCGTTTTTGTtACGGTTTTTAATATG  
181 L S S I F M S K D F I S L Q E E R E D I  
541 CtGAGTAGTATATTCATGTGCAAAAGATTTcATTAGTCTGCAGGAAGAGAGGGGAGATATT  
201 G L R A S V R M F A Q M L S A P N L A D  
601 GGGTTGAGGGCAtCAGTGAGGATGTTTGCAGATGCTTTCTGCTCCGAATCTGGCAGAC  
221 Y Y S I L S G L D L Q G Q N K R D R R I  
661 TATTACTCAATACTAAGTGGTTTTGGATCTTCAGGGTCAGAACAAGAGGGACAGGAGAATA  
241 F D E I S R M W V D V I Q E R R V I K D  
721 TTCGACGAGATCAGTCGCATGTGGgTAGATGTCATACAAGAAAGAAGAGTGATTAAGAT  
261 G D V S R E R D F L D G L V D S G F S D  
781 GGTGATGTTTCGAGGGAGAGGGATTTCTTGGATGGTTTTGGTTGATAGTGGATTTAGTGT  
281 E Q I N Y L F L E L L T A G S D T S T L  
841 GAGCAAaTCAACTACTTGTTCCTGGAACACTTACTGCAGGCTCGGATACTAGTACCTTA  
301 T V E W A L A E L I K D E E V M R K V R  
901 ACAGTTGAGTGGGCACTGGCAGAGCTTATAAAAaGaTGAAGAaGTCATGAGAAAAGTTCGC  
321 F E L E T V M S T E E V V K D S D L P R  
961 TTCGAACTCGAGACAGTTATGAGTACTGAGGAGGTTGTTAAAGATTCTGATTTGCCTCGC  
341 L P Y L H S V V K E T L R L H P P A P F  
1021 CTACCTTACCTGCACTCCGTTGTCAAGGAGACACTGAGATTACACCCACCTGCACCATT  
361 L L P H R A S K T C N V M N Y T I P K D  
1081 CTCCTACCTCATCGAGCCTCCAAAACATGCAATGTCATGAACTACACCATTCCAAAAGAC  
381 T Q V Y V N V W A I G R D P K V W D D A  
1141 ACGCAAGTGTATGTCAATGTCTGGGCGATTGGAAGAGACCCCAAGTTTTGGGACGACGCC  
401 M T F K P E R F L D S C M D F N S R N Q  
1201 ATGACATTCAAACCCGAGAGGTTTCTAGATTCATGTATGGATTTCAACTCTAGAAATCAG  
421 A Y I P F G A G R R I C P G L P M A A K  
1261 GCATACATACCGTTTTGGTGTGGAAGAAGAATCTGTCTGGACTCCCAATGGCGGCTAAG  
441 Q V P L I L A S L I Q S F D W C L P H E  
1321 CAAGTTCATTAATTCTCGCTAGTTTGATCCAAAGCTTTGATTGGTGTCTCCCACATGAA  
461 E N P T E L D M E E K F G I N L C K E I  
1381 GAAAATCCTACTGAGCTGGACATGGAAGAAAAGTTTTGGGATAAATTTATGCAAGGAGATA  
481 P L V L S P K L R K L N D \*  
1441 CCGCTAGTACTCTCTCCTAAACTGAGGAACTAAATGATTAA

## CoCYP450\_Contig3302

1 M E E T N L F Y C L L L L L L P L L Y L  
 1 aTGGAAGAAACCAATCTCTTCTACTGTCTTCTCCTTCTTCTTCTACCTCTCCTCTATCTC  
 21 I F S R I N S P R N L P P G P Y P W P V  
 61 ATATTCAGCCGCATCAACTCACCAAGAAACCTCCCACCAGGTCCCTATCCATGGCCTGTC  
 41 L G N F L N L G N K P H I S L A N L A A  
 121 CTGGGCAACTTTCTTAACTTGGGAAACAAACCACATATCTCACTGGCCAACCTTAGCAGCC  
 61 T H G P L I S L R L G T K L L V V G S S  
 181 ACCCATGGCCCCCTCATCTCACTAAGACTCGGAACAAAGCTTCTTGTCGTGGGTTCCTCT  
 81 P S A A T E I L K T H D R I F S A R T V  
 241 CCTTCTGCAGCCACCGAAATCCTCAAAACCCATGACCGGATATTTAGCGCTCGAACCGTA  
 101 P H A V P A Y P D R L H L T M T W P D C  
 301 CCACATGCAGTCCCAGCTTATCCAGACAGACTACACTTAAACGATGACATGgCCGGACTGC  
 121 N D G W K Y L R T L C R T E L F S S K A  
 361 AACGaCGGATGGAAGTACTTACGCACCTCTGTGTCGTACAGAGCTGTTTTtCATCTAAAGCA  
 141 I Q S Q A R I R E T K I S E L V E F L K  
 421 ATCCAATCACAAGCAAGGATCAGAGAGACGAAGATTTTCAGAGCTGGTGGAGTTTCTGAAA  
 161 T N E D R E V K I T E V V F V T V F N T  
 481 ACCAACGAAGATAGAGAGGTGAAGATTACAGAAGTGGTTTTTGTACGGTTTTTAATACG  
 181 L S S I L M S K E F V S F N E E E K E N  
 541 TTGAGTAGTATACTAATGTCGAAAGAATTCGTTAGTTTTTAACGAAGAAGAGAAGGAGAAT  
 201 G L R A C S R K F V Q I L S S P N L A D  
 601 GGGTTGAGGGCTTGTCCAGGAAATTTGTGCAGATTCTTTCTAGCCCCAACTTGGCCGAC  
 221 Y Y A I F S R L D L Q H Q H K R A K E T  
 661 TATTACGCCATATTTAGTCGCCTGGATCTTCAGCATCAACACAAAAGGGCTAAAGAAACA  
 241 F D E C C H I W E D V I Q E R R A N K N  
 721 TTCGATGAGTGTGTACATATGGGAAGATGTCATACAAGAAAGACGAGCGAATAAAAAA  
 261 S S D D L R E R D F L D I L I D S G F S  
 781 AGCAGTATGATTTGAGGGAGAGGATTTCTTGGATATTTTGATCGATAGTGGATTTAGC  
 281 D E R T N Y L I L E L V F A G V D T S T  
 841 GACGAGCGAACCAACTACTTGTATCTTGGAGTTAGTTTTTCGCAGGGGTGGATACTAGTACA  
 301 S T V E W A L A E L I K D P E A M R K I  
 901 TCAACAGTTGAATGGGCACTGGCAGAACTTATAAAAGATCCAGAAGCCATGAGAAAAaTA  
 321 R I E L E T L P S S E K V I K E S D L P  
 961 CGCATCGAGCTTGAGACTctAccAaGtTcCgAGAAGGTTATTTAAAGAGTCTGATCTGCCT  
 341 L L P Y L H S V V K E T L R L H P P A P  
 1021 CTTTACCTTACCTACACTCCGTTGTCAAGGAGACGCTCAGGTTACACCCACCCGCACCA  
 361 F L L P H R A T E T C K V M N Y T I P K  
 1081 TTTCTCCTACCTCATCGTGCAGCTGAAACTTGCAAGGTGATGAATTACACCATCCCTAAA  
 381 D T Q V F V N V W A I G R D P E V W D D  
 1141 GACACTCAAGTGTGTTGTCATGTCTGGCCATTGGAAGAGACCCCCGAGGTTTGGGATGAT  
 401 A M K F K P E R F L D S C M D F N S N K  
 1201 GCCATGAAATTCAGCCTGAAAGGTTTCTTGATTTCATGTATGGACTTCAACTCAAACAAa  
 421 D A Y I P F G A G R I C P G L P M A A  
 1261 GACGCGTATATACCATTTGGTGTGGAAGAAGAATCTGTCCCAGGACTCCCAATGGCTGCT  
 441 K Q V P L I L A N L I Q S F E W R L P H  
 1321 AaGCAaGtTCCATtGAtTcTtGCTAATCTGATCCAAAGCTTTGAGTGGCGTCTCCACAC  
 461 D E N P T E L D M E E K S G M T L H K E  
 1381 GATGAAAACTCTACTGAGCTAGACATGGAAGAGAAGTCTGGAATGACTTTACACAAGGAG  
 481 R P L V L I P K L R K I N A \*  
 1441 AGGCCGCTGGTACTCATTCCCTAAACTGAGGAAAATAAATGCGTAG

## 8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alfons Gierl dafür bedanken, dass er mir die Chance gegeben hat, die Doktorarbeit zu so einem spannenden Thema an seinem Lehrstuhl beginnen und sie unter seiner Aufsicht auch beenden zu können. Ich danke ihm für die durchgehende Unterstützung und die zahlreichen Anregungen und Denkanstöße während der gesamten Zeit.

Ganz besonders danke ich Dr. Monika Frey. Ich danke ihr für die fortwährende, ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und für die beständige, ausdauernde Unterstützung. Vielen Dank, dass du die Jahre immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattest und vielen Dank für die zahlreichen Anregungen und hilfreichen Ratschläge bei Aufgaben im Labor so wie beim Verfassen von wissenschaftlichen Vorträgen und Arbeiten.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilfried Schwab und Prof. Dr. Erwin Grill für die Begutachtung und Prüfung meiner Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an Prof. Dr. Chris-Carolin Schön richten, dafür, dass sie unsere Arbeitsgruppe an ihrem Lehrstuhl aufgenommen und uns Labore und Inventar, vor allem aber auch wissenschaftlichen Rat und Expertise und ein Umfeld zur Verfügung gestellt hat, in dem mir das Arbeiten sehr viel Freude bereitet hat.

Mein Dank gilt auch den Kollaborationspartnern Dr. Daniel Lang, Prof. Dr. Klaus Mayer, Dr. Sapna Sharma, Calin Rares Lucaciu, Prof. Dr. Thomas Rattei und Dr. Thomas Hoffmann für ihre Unterstützung bei verschiedenen Arbeiten.

Ich möchte mich bei den ehemaligen Genetikern in meinen Anfangstagen bedanken, vor allem bei Steffi, Teresa und Regina. Durch Euch habe ich mich von Beginn an Angekommen gefühlt.

Mein herzlicher Dank geht auch an meine langjährigen Kollegen der Arbeitsgruppe Genetik, Claudiu und Alexej, für die Kameradschaft im Laboralltag und für den vielen, wertvollen Input in wissenschaftlichen und laborpraktischen Fragen.

Ich danke ganz herzlich allen Mitgliedern des Lehrstuhls Pflanzenzüchtung, ganz besonders Willi, Katrin, Viktoriya, Stella, Sonja, Anne, Armin, Manfred und auch Melanie, so wie Amal, Sylwia und Stefan. Vielen Dank für die tolle Zeit!

Zu guter Letzt möchte ich mich unendlich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern und meiner Schwester, für die immerwährende Unterstützung und dass ihr mich zu dem Menschen habt werden lassen, der ich heute bin; und vor allem bei Tom, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und durch seine Geduld und seine große Unterstützung so viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten.....

Name Laura Hannemann  
Geburtsdatum und -ort 19.10.1988, Dachau

### Promotion.....

*Lehrstuhl für Genetik, später Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, TU München, seit 02/2015*

### Ausbildung und Studium.....

BIOCHEMIE (M.SC.)  
*Technische Universität München, 2011-2014*

MASTERARBEIT AM LEHRSTUHL FÜR VIROLOGIE  
*Technische Universität München, 10/2013-5/2014*

BIOCHEMIE (B.SC.)  
*Technische Universität München, 2008-2011*

BACHELORARBEIT AM LEHRSTUHL FÜR MIKROBIELLE ÖKOLOGIE  
*Technische Universität München, 05/2011 – 07/2011*

ALLGEMEINE HOCHSCHULREIFE  
*Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleißheim, 1999-2008*

### Veröffentlichungen.....

**Hannemann, L., Lucaciu, C.R., Sharma, S., Rattei, T., Mayer, K.F.X., Gierl, A., Frey, M., 2018.** *A promiscuous beta-glucosidase is involved in benzoxazinoid deglycosylation in *Lamium galeobdolon*.* *Phytochemistry* 156, 224–233. 10.1016/j.phytochem.2018.10.012.

**Niculaes, C., Abramov, A., Hannemann, L., Frey, M., 2018.** *Plant Protection by Benzoxazinoids—Recent Insights into Biosynthesis and Function.* *Agronomy* 8 (8), 143. 10.3390/agronomy8080143.