

Molekularbiologische Charakterisierung der Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels im Hinblick auf die Aromastoffproduktion in reifenden Früchten

Molecular characterization of the lipoxygenase gene family in apple (*Malus domestica* Borkh.) contributing to the production of flavour compounds in ripening fruits

Vogt, J., Dunemann, F.

Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,
Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst,
Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden
Kontakt: frank.dunemann@jki.bund.de

Zusammenfassung

Lipoxygenasen (LOXs) bilden wichtige Vorstufen für aromarelevante flüchtige Substanzen in reifen Früchten. Innerhalb des hier vorgestellten Projektes sollen Mitglieder der LOX-Genfamilie und deren Genprodukte im Kulturapfel umfassend identifiziert und charakterisiert werden. Es werden erste Ergebnisse aus bioinformatischen Sequenzuntersuchungen sowie zur PCR-basierten Klonierung vollständiger LOX-Gene des Apfels präsentiert. Das Projekt wird zum besseren Verständnis der Entstehung von Aromamustern bei Obstarten beitragen und über die Entwicklung eines funktionalen Markersystems für die Züchtung auch einen praktischen Anwendungsbezug besitzen.

Stichworte: Lipoxygenase, Aroma, Apfel (*Malus*)

Abstract

Lipoxygenases (LOXs) are important enzymes that provide among others precursors for fruity volatiles in ripe apples. During the project presented in this paper, LOX gene family members and their gene products will be identified and characterized in the cultivated apple. The subsequent article introduces the scientific background and presents some initial results of bioinformatic sequence studies as well as from PCR-based full-length cloning of LOX genes. Available *Malus* databases are screened for LOX nucleotide sequences, putative LOX genes will be mapped, temporal and spatial expression patterns determined in different fruit stages and candidate genes functionally characterized. The data will finally be used to develop functional markers to support molecular breeding and to enable a more efficient documentation of biodiversity of aroma patterns in *Malus* gene bank accessions, apple cultivars and breeding material.

Keywords: lipoxygenase, aroma, apple (*Malus*)

Einleitung und Zielstellung

Das durch flüchtige Inhaltsstoffe bedingte Aroma des reifen Apfels ist ein wichtiges Fruchtqualitätsmerkmal und hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Vermarktungschancen einer Apfelsorte. Es handelt sich dabei um ein biochemisch und genetisch sehr komplexes Merkmal, welches bislang kaum durch gezielte züchterische Strategien zu bearbeiten war und stattdessen eher als "Zufallsprodukt" der Züchtung galt. Für den Apfelzüchter stellt die Einkreuzung von Resistenzen, z.B. gegen Schorf oder Feuerbrand, eines der Hauptzuchtziele bei der Entwicklung neuer Sorten dar. Der Konsument dagegen trifft seine Kaufentscheidung überwiegend aufgrund sortenspezifischer Fruchteigenschaften, wozu auch das Aroma gehört. Auch deshalb konnten in der Vergangenheit gezüchtete resistente Sorten einschließlich der in Dresden-Pillnitz gezüchteten Sorten der „Re“-Serie, wie z.B. Rewena oder Rebella, bis heute die etablierten Marktsorten, wie z.B. Royal Gala, Braeburn, Elstar oder Golden Delicious, nicht verdrängen.

Der typische Geschmack einer Apfelsorte entsteht vor allem durch das Zusammenspiel von Zucker- und Säuregehalt mit typischen Fruchtaromen. Letztere setzen sich aus verschiedenen Schlüsselkomponenten, wie flüchtigen Aldehyden, Alkoholen und Estern, zusammen, die je nach Sorte qualitativ und quantitativ variieren. Fruchttester mit hoher Aromarelevanz, wie z.B. Hexylazetat, Butylazetat und 2-Methyl-Butylazetat, können dabei mehr als 80% der aromasignifikanten Substanzen ausmachen (Altisent et al., 2009).

Die wichtigsten Aromastoffe des Apfels werden aus Primärmetaboliten über wenigstens vier verschiedene Biosynthesewege generiert (Schaffer et al., 2007), von denen zwei in die Bildung von Pflanzenestern involviert sind. Die Esterbildung aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure kann durch die enzymatische Wirkung von Lipoxygenasen und/oder durch β -Oxidation erfolgen, wobei Aldehyde wie Hexenal oder Hexanal und daraus entstandene Alkohole wesentliche Zwischenschritte darstellen (). Man geht mittlerweile davon aus, dass die Bereitstellung von Substraten im Vorfeld der Esterproduktion maßgeblich durch den Lipoxygenase-Stoffwechselweg beeinflusst wird.

Bei höheren Pflanzen wurden mittlerweile insgesamt weit mehr als 100 LOX-Gene als proteincodierende Sequenzen (coding sequences, CDS) oder Proteine beschrieben, die im Stoffwechsel sehr unterschiedliche Funktionen haben können. Die

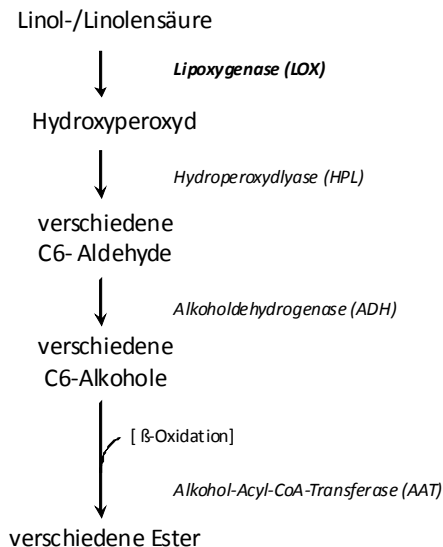


Abb. 1 Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg

Das namensgebende Enzym Lipoxygenase (LOX) katalysiert die erste Reaktion. Durch weitere enzymkatalysierte Reaktionen und Substrate aus anderen Stoffwechselwegen (z.B. β -Oxidation) entstehen am Ende verschiedene Pflanzenester (nach Schwab et al. 2008, vereinfacht).

Zahl der beteiligten LOX-Gene bei einzelnen Arten variiert zwischen fünf (*Arabidopsis thaliana* und Tomate) und kann bis zu etwa 20 (Sojabohne) oder noch mehr (Kartoffel) Familienmitglieder betragen. Auch beim Apfel wurden bereits mehrere LOX-Gene in Form von ESTs (EST, expressed sequence tag) beschrieben. Park et al. (2006) identifizierten anhand bioinformatischer Auswertung von EST-Banken des Apfels ein putativ in die Aromastoffsynthese involviertes LOX-Gen auf EST-Cluster MD187410, welches von Dunemann et al.

(2009) als Kandidatengen für einen bedeutsamen QTL-Cluster (QTL, quantitative trait locus) für diverse Esterkomponenten auf Chromosom 9 identifiziert wurde. Bei dem hier vorgestellten Projekt handelt es sich um ein von der DFG gefördertes Gemeinschaftsprojekt, an dem neben dem JKI-Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst (ZGO, Dresden-Pillnitz) auch das Institut für Biotechnologie der Naturstoffe der TU München (Prof. Dr. W. Schwab, D. Schiller) beteiligt ist. Das Ziel ist es, einen der entscheidenden Schritte bei der Aromastoffproduktion der Apfelfrucht in einem interdisziplinären Ansatz mit Hilfe von molekulargenetischen und biochemischen Verfahren zu untersuchen. Es soll dabei eine Charakterisierung von LOX-Genen vorgenommen werden, deren Produkte durch die Bereitstellung von Ausgangssubstraten maßgeblich die Bildung aromarelevanter Ester und damit das Aromamuster des reifen Apfels prägen. Am Ende des Projektes soll neben dem Erkenntnisgewinn bei grundsätzlichen Prozessen zur Entstehung von Aromamustern bei Rosaceen vor allem eine anwendungsbezogene Nutzung für neue züchterische Wege des "molecular breeding" beim Apfel stehen.

Im Folgenden werden erste Ergebnisse zur bioinformatischen Sequenzanalyse von Mitgliedern der LOX-Genfamilie des Apfels dargestellt sowie erste erfolgreiche Ansätze zur Klonierung von vollständigen LOX-Genen im *Malus*-Genom präsentiert.

Material und Methoden

Bioinformatische Untersuchungen

Für die homologie-basierte Suche nach LOX-Sequenzen wurde ein BLAST der „Apple Genome v1.0“- Sequenzdatenbank durchgeführt (Velaso et al., 2010). Als Suchsequenz wurden die von Schaffer *et al.* (2007) beschriebenen LOX-Sequenzen verwendet. Die Erstellung von Alignments wurde mit MUSCLE (Edgar, 2004) durchgeführt. Eine Identitätsmatrix wurde durch das Programm ClustalX 2.0.11 (Larkin et al., 2007) unter Standardeinstellungen errechnet. Ein Phylogramm ausgewählter LOX-Sequenzen inklusive der *bootstrap*-Werte wurde durch MEGA4 (Tamura et al., 2007) erstellt. Das erhaltene Phylogramm wurde durch den in MEGA4 implementierten Tree Explorer dargestellt.

Die Berechnung von Proteinstrukturmodellen der LOX-Genprodukte wurde mit SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006; <http://swissmodel.expasy.org>) durchgeführt. SWISS-MODEL ist eine web-basierte Umgebung zur Erzeugung von Strukturmodellen auf Basis von Protein-Struktur-Homologien. Es wurde die Option *automated mode* als Einstellung gewählt. Der *automated mode* prüft die PDB Datenbank automatisch auf die am besten geeignete Vorlage für die Berechnung. Als Vorlagen wurden die Strukturen „1k3“ und „1no3“ genutzt. Die eingegebenen Sequenzen waren zuvor durch Klonierung und Sequenzierung ermittelt worden.

Die Visualisierungssoftware für molekulare Strukturdaten, PyMol, wurde für die Darstellung der Modelle benutzt (Schrödinger, 2010). Die Werte für die mittlere quadratische Standardabweichung (root mean square deviation, RMSD) wurden durch den in PyMol implementierten *align*-Algorithmus berechnet.

PCR-gestützte Klonierung vollständiger LOX-Gene

Das Pflanzenmaterial für die DNA-Isolierung wurde von der Sorte Golden Delicious aus der *Malus*-Genbank des ZGO (Dresden-Pillnitz) in Form von jungen Blättern entnommen. Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit dem Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex) durchgeführt.

Für die Amplifizierung von LOX-Gensequenzen wurden PCR-Primer auf Basis verschiedener bioinformatisch identifizierter LOX-Akzessionen der Golden Delicious-Genomsequenz erstellt und mit NetPrimer optimiert (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). Die bisher für die LOX-Genklonierung verwendeten Primer sind mit ihrer Sequenz und Annealingtemperatur in

Tabelle 1 aufgelistet. Die PCR wurde mit Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 3 min 93°C, 35x (30 sek 93°C, 30 sek Primerannealingtemperatur, 4 min 72°C), 10 min 72°C. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitex) aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigten Fragmente wurden für die Klonierung mittels des CloneJET™ PCR Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Vom Ligationsmix wurden 2,5 µl für die Transformation von 50 µl kompetenter *E. coli*-Bakterien des Stamms JM109 (Promega) verwendet.

Die Transformation wurde nach dem Protokoll des Herstellers der transformations-kompetenten Zellen durchgeführt. Zur Feststellung positiver Klone wurde eine Kolonie-PCR mit pJET1.2 Sequenzierprimern nach Protokoll des CloneJet-Kits durchgeführt. Von ausgewählten positiven Klonen wurde eine Plasmidisolierung mit dem Invisorb® Spin Plasmid Mini *Two* (Invitex) durchgeführt. Die Plasmide wurden durch die Firma Eurofins-MWG-Operon (Ebersberg) sequenziert. Aufgrund der Länge der klonierten Fragmente wurde ein Primerwalk auf Basis selbst erstellter Primer durchgeführt. Die Sequenzen der Primerwalk-Primer sind in dieser Arbeit hier nicht angegeben.

Tab. 1 Primer für die PCR-Amplifizierung der Malus-LOX-Gensequenzen und die verwendete Annealingtemperatur

Primer	Primersequenz (5'-3')	Annealingtemperatur
lox1_for	tgaactttccatgcaaggttc	60 °C
lox1_rev	aaattgtgcaaatccagctt	60 °C
lox2_for	atcggggaattcggattcaaaattctcgac	60 °C
lox2_rev	atcatcggtacccaccaccctcaaaata	60 °C
lox7_for	atctccggtaccacctttctctctgtaac	64 °C
lox7_rev	accacctctagacacgagtgaatacaatgtagac	64 °C
lox8_for_b	cttctgttactgtaaagcattaaac	55 °C
lox8_rev	tccgagcacagctatcatataga	55 °C

Ergebnisse und Diskussion

Die kürzlich auf Basis der Apfelsorte Golden Delicious veröffentlichte vollständige Sequenz des *Malus*-Genoms (Velasco et al. 2010) wurde genutzt, um innerhalb der CDS-Sequenzdatenbank mittels BLAST nach Sequenzen zu suchen, die hohe Ähnlichkeit zu den von Schaffer et al. (2007) beschriebenen LOX-Genen (LOX1 bis LOX9) aufwiesen. Die Gene LOX4 und LOX9 wurden dabei nicht berücksichtigt, da LOX4 offensichtlich für eine andere Enzymgruppe codiert und LOX9 keinen offenen Leserahmen besitzt, also nicht funktionell zu sein scheint. Die erhaltenen Sequenzen wurden manuell überprüft, und nur jene mit annähernd der für LOX-ORFs (ORF, open reading frame, offener Leserahmen) typischen Länge von ca. 2,8 kb wurden in die weiteren Arbeiten einbezogen. Diese und die von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten LOX-ESTs wurden mit MUSCLE aligniert. Anschließend wurde mit dem Programm ClustalX eine Identitätsmatrix des Alignments berechnet (Abbildung 2). Innerhalb des durch das Programm MEGA4 erstellten Phylogramms (Abbildung 3) wird deutlich, dass einige der LOX-Sequenzen miteinander geclustert sind. Diese sind Mitglieder jeweils einer Gengruppe, genannt LOX1, LOX2, LOX3, LOX5/6, LOX7 und LOX8. Schaffer et al. (2007) beschrieben LOX5 und LOX6 als unterschiedliche Gene. Aufgrund der Daten aus der Identitätsmatrix (Abbildung 2) kann allerdings vermutet werden, dass diese zu einer gemeinsamen Gengruppe (LOX5/6) gehören, da sie sich mit einer Ähnlichkeit von 86% nur verhältnismäßig wenig voneinander unterscheiden. Auch Sequenzen, die zur LOX1-Gengruppe

zusammengefasst werden, haben untereinander eine recht hohe Ähnlichkeit von etwa 80%. Innerhalb der Gengruppen gibt es allerdings auch einige deutlich unterscheidbare Gene wie z. B. LOX8a und LOX8b.

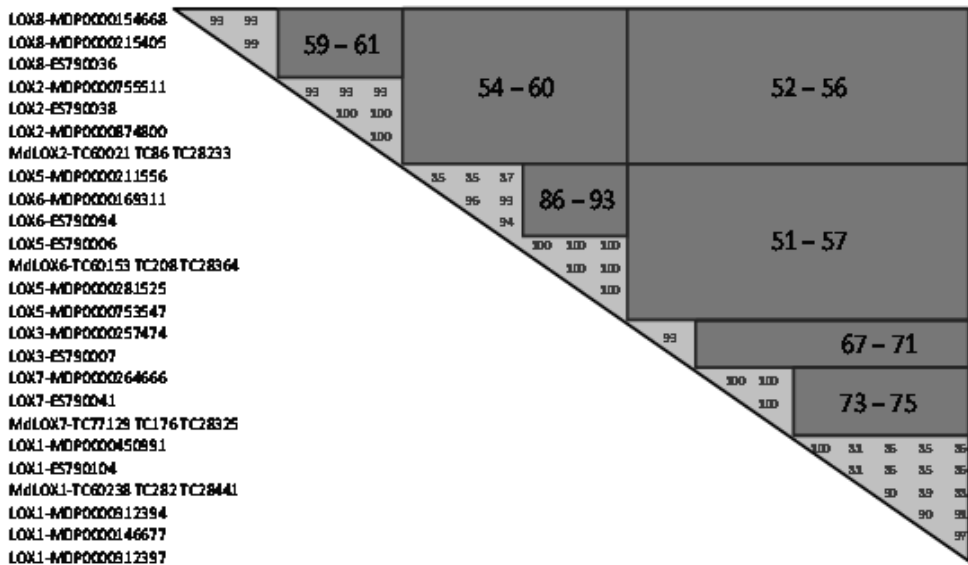


Abb. 2 Schematische Matrix der Ähnlichkeitswerte in % der ausgewählten Sequenzen. Einbezogen sind die durch BLAST ermittelten LOX-Sequenzen der *Malus*-CDS-Datenbank, sowie die von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten ESTs.

Auch stellen einige der Gene vermutlich verschiedene allelische Varianten dar, die durch spezifische SNPs (SNP, *single nucleotide polymorphism*) gekennzeichnet werden können. Alle dargestellten Sequenzen gehören mit mehr als 50% Ähnlichkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit in die gleiche Genfamilie.

Lipoxygenasen bilden aus Linol- und Linolensäure Hydroperoxyderivate. Dabei werden die Fettsäuren entweder am C9-Atom oder am C13-Atom durch das Einfügen einer Peroxygruppe oxidiert. Die Enzyme werden folglich als 9-LOX oder 13-LOX bezeichnet (Feussner et al., 2001).

Die Substratspezifität der LOX-Proteine wird maßgeblich durch zwei Aminosäurepositionen in räumlicher Nähe des katalytischen Zentrums bestimmt (Hornung et al., 1999). 9-LOX besitzen an dieser Stelle Threonin, gefolgt von Valin. Bei 13-LOX ist Valin durch die Aminosäuren Phenylalanin oder Histidin ersetzt, deren Seitenketten besonders groß sind. An der vorangehenden Position können Threonin, Serin oder Cystidin stehen.

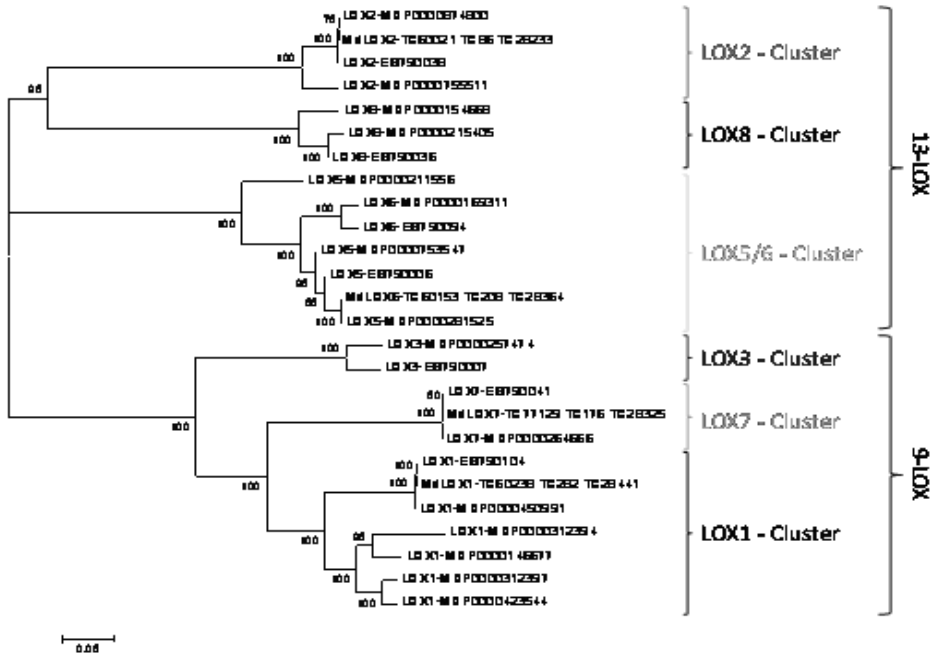


Abb. 3 Phylogramm der durch BLAST gefundenen LOX-CDS inklusive der von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten LOX-ESTs. Der *consensus*-Baum der ausgewählten LOXSequenzen aus *Malus x domestica* Borkh. verdeutlicht die Clusterung der Gengruppen LOX1, LOX3, LOX7 sowie von LOX2, LOX5/6 und LOX8. Die *bootstrap*-Werte für die Knoten sind angegeben. Die Gengruppen LOX1, LOX3 und LOX7 sind aufgrund ihrer Nukleotidsequenz 9-LOX-Mitglieder. Die Gengruppen LOX2, LOX5/6 und LOX8 gehören zur 13-LOX-Gruppe. Die Akzessionsnummern der Sequenzen sind in folgender Nomenklatur angegeben: TC = Tentative Cluster (DFCI apple gene index; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=apple>), ES = NCBI-GenBank-Akzessionsnummer (Schaffer et al., 2007) und MDP-Akzessionen aus CDS-Sequenzdatenbank (Apple Genome v1.0, Velasco et al., 2010).

Tab. 2 Einordnung der LOX-Gengruppen in die bestehende Klassifikation aufgrund der Aminosäuren an der für die Stereospezifität relevanten Position und des Vorhandenseins eines Chloroplast-Transit-Signalpeptides

Gengruppe	Aminosäuren an Position für Stereospezifität	Vorhandensein eines Chloroplast-Transit-Signalpeptides
9-LOX		
LOX1	TV	Nein
LOX3	TV	Nein
LOX7	II	Nein
13-LOX		
LOX2	CF	Ja
LOX5/6	TF (selten SF/CF)	Ja
LOX8	SY/SF	Ja

Das Vorhandensein eines N-terminal am Protein angehängten Chloroplast-Transit-Signalpeptides ermöglicht eine weitere mögliche Klassifizierung von Lipoxygenasen (Feussner und Wasternack, 2002). Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, besitzen LOX2, LOX5/6 und LOX8 dieses Signalpeptid. LOX1, LOX3 und LOX7 besitzen dieses Peptid nicht.

Auf Grundlage der bioinformatischen Sequenzvergleiche wurden zunächst die Gene LOX1 (MDP0000450991), LOX7 (MDP000264666) und LOX8b (MDP0000154668) für eine vollständige Klonierung ausgewählt. Das aus der LOX1-Gruppe ausgewählte Gen ist sehr wahrscheinlich mit jenem LOX-Gen identisch, welches bereits durch Dunemann et al. (2009) als Kandidatengen auf Chromosom 9 kartiert wurde und mit einer Reihe verschiedener QTLs für bedeutsame Fruchtester assoziiert war.

Die publizierten CDS-Sequenzen (MDP, *Malus x domestica* protein, Velasco et al., 2010) waren *in silico* aus genomischen Nukleotidsequenzdaten berechnet worden. Anhand dieser genomischen Sequenzdaten wurden Primer aus der 5'- und der 3'-untranslatierten Region der Gene erstellt. Die Gensequenz wurde durch PCR amplifiziert, das Amplifikat in einen Plasmidvektor kloniert und mit diesem anschließend *E. coli* transformiert. Auf die Präsentation von Nukleotidsequenzen der bereits klonierten und vollständig sequenzierten LOX-Gene LOX1, LOX7 und LOX8b (Gen-Nomenklatur noch vorläufig) wird an dieser Stelle verzichtet.

Ein wesentlicher Nachteil von bioinformatischen Methoden ist, dass Daten durch Computer generiert werden. Zweifellos sind Programme und Algorithmen den Naturgesetzen nachempfunden, allerdings ist deren Wahrheitswert stets kritisch zu betrachten. Die Verfügbarkeit von selbst generierten Sequenzierdaten gibt dem Wissenschaftler die Möglichkeit, Fehlerquellen auszuschließen oder deren Einfluss zu minimieren. Mit vertrauenswürdigen Nukleotidsequenzen können allerdings durch bioinformatische Programme sehr gute und wirklichkeitsnahe Ergebnisse generiert werden. Ein Beispiel dafür ist die Modellierung eines Proteins anhand seiner Aminosäuresequenz mittels des Computers durch eine Strukturvorlage.

In der RCSB protein data bank (PDB, www.pdb.org) existieren Röntgenstrukturdaten zu pflanzlichen LOX-Proteinen. Das den Lipoxygenasen aus Apfel ähnlichste Protein ist Lipoxygenase-3 aus *Glycine max* (Sojabohne). Mithilfe dieser Referenzstruktur wurde durch SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) die wahrscheinliche Proteinstruktur der bereits sequenzierten Gene LOX1, LOX7 und LOX8b berechnet (Abbildung 4). Diese drei haben im Modell eine ähnliche Struktur, die allerdings an einigen Stellen leicht abweicht (siehe Pfeile an Helices rechts unten in Abb. 4a oder Helix links oben in Abbildung 4b). Ein objektiver Wert für diese Abweichungen ist die mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD, root mean square deviation). Dieser Wert wird auch in anderen statistischen Auswertungen genutzt. Die RMSD-Werte zwischen den Modellen und dem Modell und seiner Vorlage sind als Matrix in Tabelle 3 angegeben. Ein Wert von 0 Å entspricht exakter Übereinstimmung, Werte zwischen 1,0 und 3,0 Å werden als entfernte strukturelle Verwandtschaft interpretiert, Werte über 3,0 Å zeigen keine strukturelle Verwandtschaft zueinander. Werte von maximal 0,25 Å weisen die modellierten LOX-Proteine als eng miteinander verwandt aus.

Die Bereiche, die innerhalb des Proteinmodells liegen, sind stärker konserviert. In Abbildung 4d ist dies beispielhaft gezeigt. Abgebildet ist ein aus 38 Aminosäuren bestehendes Motif innerhalb der drei sequenzierten Gene LOX1, LOX7 und LOX8b. Schwarz bzw. grau unterlegt sind Positionen, an denen identische oder ähnliche Aminosäuren stehen. Innerhalb dieser Region liegen fünf konservierte Histidine (*), die die Bindungsstellen des katalytisch wichtigen Eisenions sind (Steczko et al., 1992). Die hohe Konservierung innerhalb des Proteinmodells lässt vermuten, dass die Enzymaktivität der Genprodukte nicht eingeschränkt ist. Die Abweichungen an der Oberfläche von Proteinen müssen keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität haben.

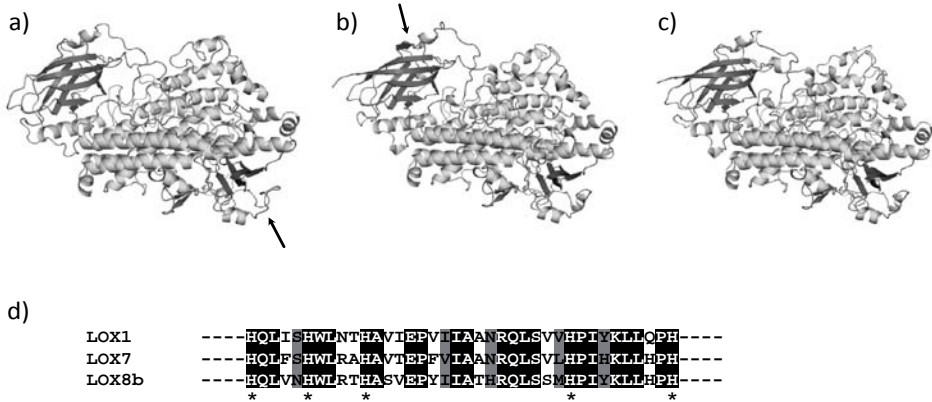


Abb. 4 Modelle der Genprodukte von LOX1 (a), LOX7(b) und LOX8b (c). Weithin abgebildet ist das in allen bekannten LOX-Proteinen stark konservierte Motiv von 38 Aminosäuren Länge (d). Die * geben die für die Komplexierung des Eisen-Ions wichtigen Histidine an. Die Modelle wurden durch SWISS-MODEL errechnet. Als Vorlagen wurden die Strukturen lik3 (LOX1) und lno3 (LOX7, LOX8b) verwendet. Schwarz unterlegt sind gleiche Aminosäuren an der jeweiligen Position, grau unterlegt sind Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften.

Tab. 3 Matrix von RMSD-Werten in Ångström der errechneten LOX-Proteinmodelle zueinander und zu deren jeweiliger Modellvorlage.

	LOX1	LOX7	LOX8b	Modellvorlage
LOX1	-	0,247	0,238	0,070
LOX7		-	0,039	0,086
LOX8b			-	0,086

Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse stellen eine Momentaufnahme des im Juli 2010 begonnenen Forschungsprojektes dar. Daher können die präsentierten vorläufigen Ergebnisse nur einen Ausschnitt aus der Gesamthematik des Vorhabens demonstrieren.

Weitere Untersuchungen zur möglichst vollständigen Erfassung der Lipoxygenase-Genfamilie in *Malus x domestica* werden u. a. auch die Anwendung eines mit Hidden-Markov-Modellen arbeitenden Programms für Analysen der Golden Delicious-Sequenzdaten-bank einbeziehen. Weiterhin sollen Transkriptionsanalysen der identifizierten Gene und beim Projektpartner in München Untersuchungen zur heterologen Expression und Charakterisierung der LOX-Proteine folgen. Erst danach kann abgeschätzt werden, welche grundsätzlichen neuen Erkenntnisse und praktischen Anwendungen sich aus den Ergebnissen ableiten lassen. Eine mögliche Anwendung könnte die Entwicklung und von funktionalen LOX-Genmarkern auf SNP-Basis sein. Ein solches Markersystem könnte den Züchtungsfortschritt bei der erwünschten Kombination von Resistenz- und Fruchtqualitäts-eigenschaften erheblich effizienter gestalten.

Danksagung: Die beschriebene Arbeit wird gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Projekts DU180/5-1.

Literatur

- Altisent, R, G. Echeverria, J. Graell, L. Lopez, I. Lara. (2009): Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of „Fuji“ apple. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4305-4312
- Arnold K., L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, 2006: The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.
- Dunemann, F., D. Ulrich, A. Boudichevs kaia, C. Grafe, W.E. Weber. (2009): QTL mapping of aroma compounds analyzed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Mol. Breeding* **23** (3), 501-521
- Edgar, R.C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32** (5), 1792-1797
- Feussner, I., H. Kühn , C. Wasternack. (2001): Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* **6** (6), 268-273
- Feussner, I., C. Wasternack. (2002): The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 275-297
- Hornung, E., M. Walther, H. Kühn, I. Feussner. (1999): Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (7), 4192-4197
- Larkin, MA, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez *et al.* (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** (21), 2947-2948
- Park, S., N. Sugimoto, M.D. Larson, R. Beaudry, S. Van Nocker. (2006): Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol.* **141** (3), 811-824
- Schaffer, R. J., E. N. Friel, E. J. F. Souleyre, K. Bolitho, K. Thodey, S. Ledger, J. H. Bowen, J. H. Ma, B. Nain, D. Cohen *et al.* (2007): A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* **144** (4), 1899-1912
- Schrödinger, L. L. C. (2010): The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Schwab, W., R. Davidovich-Rikanati., E. Lewinsohn. (2008): Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **54** (4), 712-732
- Steczko, J., G. P. Donoho, J. C. Clemens, J. E. Dixon and B. Axelrod. (1992): Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* **31** (16), 4053-4057
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. (2007): MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24** (8), 1596-1599
- Velasco, R., A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S. K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss *et al.* (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.), *Nat. Genet.* **42** (10), 833-839