

Jörg Vogt  
Institut für Züchtungsforschung an Obst

Identifizierung des für  
verschiedene Fruchttester  
hauptverantwortlichen  
Lipoxygenasegens des Apfels



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:  
Jörg Vogt  
Eibenstocker Straße 10  
01309 Dresden

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot [www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) (Bereich Veröffentlichungen).

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website [www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.  
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.  
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:  
[http:// www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) (Bereich Veröffentlichungen).

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under [http:// www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) (see Publications).

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation  
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische  
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

### **Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>

ISBN 978-3-95547-032-6  
DOI 10.5073/dissjki.2016.004

### **Herausgeber / Editor**

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland  
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

©Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2016

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

**Identifizierung des für verschiedene Fruchttester  
hauptverantwortlichen Lipoxygenasegens des Apfels**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt**

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden**

**von**

**Dipl. Biol. Jörg Vogt**

**geboren am 27.10.1985 in Dresden**

**Eingereicht am 24.11.2015**

Die Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2010 bis Oktober 2015  
am 'Institut für Züchtungsforschung an Obst' des Julius  
Kühn-Institutes angefertigt. Praktische Arbeiten wurden zwischen  
Juli 2010 und Dezember 2013 am 'Institut für Züchtungsforschung an  
Obst' des Julius Kühn-Institutes durchgeführt.



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis . . . . .	5
Tabellenverzeichnis . . . . .	8
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	10
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1 Der Kulturapfel . . . . .	13
1.1.1 Herkunft . . . . .	13
1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung . . . . .	13
1.2 Das Apfelaroma . . . . .	15
1.2.1 Biochemische Grundlagen . . . . .	15
1.2.2 Lipoxygenase-Stoffwechselweg in Pflanzen . . . . .	15
1.2.3 Abundanz der Lipoxygenase-Gene . . . . .	18
1.3 Lipoxygenase-Kandidatengen für Aroma . . . . .	19
1.4 Ziele der Arbeit . . . . .	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Pflanzenmaterial . . . . .	23
2.2 Benutzte Mikroorganismen . . . . .	24
2.3 Bestimmung des Fruchtaromas . . . . .	25
2.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken . . . . .	25
2.4.1 DNA-Isolation . . . . .	25
2.4.2 RNA-Isolation . . . . .	26
2.4.3 RNA-Reinigung . . . . .	26
2.4.4 DNase-Behandlung . . . . .	27
2.4.5 cDNA-Synthese . . . . .	27
2.4.6 Überprüfung der Qualität der RNA . . . . .	27
2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	28
2.4.8 Überprüfung potentieller DNA-Verunreinigung durch PCR mit <i>RNA-Polymerase II</i> -Primern . . . . .	28
2.4.9 PCR . . . . .	28
2.4.10 Reinigung von DNA-Material mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution . . . . .	30
2.4.11 Klonierung von PCR-Amplifikaten . . . . .	30
2.4.12 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	30
2.4.13 Bakterientransformation . . . . .	31
2.4.14 Plasmidpreparation . . . . .	31
2.4.15 Sequenzierung . . . . .	31

2.5	Bioinformatische Arbeiten . . . . .	31
2.5.1	Alignments und Sequenzvergleiche . . . . .	31
2.5.2	Phylogenetische Bäume . . . . .	32
2.5.3	Genidentifikation in einer Datenbank ( <i>gene mining</i> ) . . . . .	32
2.5.4	Primer . . . . .	32
2.5.5	Bestimmung des verlässlichsten Referenzgenes für die RT-PCR . . . . .	33
2.5.6	<i>in silico</i> Charakterisierung von Lipoxygenase-Genen . . . . .	33
2.5.7	Kartierung ( <i>mapping</i> ) . . . . .	34
2.5.8	Assoziationsanalyse . . . . .	35
2.5.9	Proteinmodellerstellung ( <i>structural modeling</i> ) . . . . .	35
2.5.10	Analyse von Proteinmodellen . . . . .	35
2.5.11	Grafikbearbeitung . . . . .	35
2.6	Künstliche Infektion mit Pathogenen . . . . .	36
2.6.1	Infektion mit Apfelschorf . . . . .	36
2.6.2	Infektion mit Feuerbrand . . . . .	37
2.6.3	Infektion von Apfelpflanzen mit Blutläusen . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Bioinformatische Analysen . . . . .	41
3.1.1	Sequenzanalyse . . . . .	41
3.1.2	Ermittlung der Genposition im Genom ( <i>mapping</i> ) . . . . .	48
3.1.3	Funktionelle Motive und Produktspezifität . . . . .	50
3.1.4	Subzelluläre Lokalisierung . . . . .	53
3.2	Klonierung von Lipoxygenase-Genen des Apfels . . . . .	54
3.3	Expressionsanalyse . . . . .	56
3.3.1	Lipoxygenase-Expression in verschiedenen Geweben . . . . .	56
3.3.2	Lipoxygenase-Expression während der Fruchtentwicklung . . . . .	56
3.3.3	Qualität der Proben-Normalisierung . . . . .	59
3.3.4	Randnotiz: Lipoxygenase-Expression bei Pathogenbefall . . . . .	60
3.4	Genetische Assoziation zwischen Aromastoffen und Kandidatengenen . . . . .	63
3.5	Analyse sortenspezifischer <i>LOX1:Md:1a</i> - Sequenzunterschiede und Strukturmodellierung . . . . .	66
3.5.1	Kodierende Sequenz . . . . .	68
3.5.2	Bewertung der Strukturmodellierung . . . . .	69
3.5.3	Analyse der Strukturmodelle des <i>LOX1:Md:1a</i> -Proteins . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Überblick über die Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels . . . . .	73
4.1.1	Anzahl der Apfel-Lipoxygenase-Gene . . . . .	73
4.1.2	Verteilung der Lipoxygenase-Gene im Genom des Apfels und die wahrscheinliche Expansion der Genfamilie . . . . .	73
4.1.3	Biochemische Funktion der Lipoxygenasen . . . . .	75
4.1.4	Verlässlichkeit von <i>in silico</i> -Ergebnissen . . . . .	75

4.2	<i>MdLOX1a</i> - das wichtigste Lipoxygenase-Frucharomagen des Apfels . . .	76
4.2.1	Kandidatengenexpression im Klimakterium . . . . .	76
4.2.2	Hinweise auf Funktionen in mehreren Stoffwechselwegen . . . . .	77
4.2.3	Sortenspezifische Expressionsunterschiede . . . . .	78
4.2.4	Assoziationsanalyse . . . . .	79
4.3	Schlussfolgerung . . . . .	81
4.4	Weiterführende Arbeiten . . . . .	81
4.4.1	LOX-abhängige Hexanalproduktion und Pathogene . . . . .	82
4.4.2	Entwicklungsphysiologische Funktionen . . . . .	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>87</b>
6.1	Zusätzliche Abbildungen . . . . .	87
6.2	Zusätzliche Tabellen . . . . .	90
6.3	Lösungen und Medien . . . . .	99
6.3.1	Medien . . . . .	99
6.3.2	Lösungen und Puffer . . . . .	99
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
	<b>Liste der Veröffentlichungen</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>117</b>
	<b>Erklärungen</b>	<b>119</b>





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Top10 der europäischen Apfelproduktionsländer . . . . .	14
1.2	Weltweite und europaweite Apfelproduktion . . . . .	14
1.3	Ausgewählte Produkte der Lipoxygenasereaktion. . . . .	16
2.1	Schorfsymptome auf einem Apfelblatt . . . . .	36
2.2	Infektion mit <i>Erwinia amylovora</i> . . . . .	38
2.3	Infektion mit Blutläusen . . . . .	39
3.1	Ausschnitt eines Sequenzalignments zur Ermittlung der Intron-Exon-Grenzen von <i>MdLOX5a</i> in fingerprint-Ansicht . . . . .	42
3.2	Ausschnitt eines Sequenzalignments zur Ermittlung der Intron-Exon-Grenzen von <i>MdLOX6a</i> in fingerprint-Ansicht . . . . .	43
3.3	Phylogenetischer Baum der identifizierten LOX-Nukleotidsequenzen des Apfels . . . . .	45
3.4	Ausschnitt des Phylogramms von 25 Apfel-LOX- und 122 Angiospermen-LOX-Proteinsequenzen . . . . .	47
3.5	Positionen der identifizierten LOX-Gene im Genom des Apfels . . . . .	49
3.6	Primärstruktur eines typischen Lipoxygenaseproteins und Alignment konservierter Bereiche der Aminosäuresequenz . . . . .	51
3.7	Phylogenetischer Baum biochemisch charakterisierter Lipoxygenase-Proteine	52
3.8	Zelluläre Lokalisierung der LOX-Proteine . . . . .	53
3.9	Exprimierte LOX-Gene in verschiedenen Geweben . . . . .	57
3.10	Exprimierte LOX-Gene während verschiedener Fruchtstadien . . . . .	58
3.11	Expression der Apfelfene <i>MdExp2</i> und <i>MD-ACO1</i> . . . . .	59
3.12	Habitus einer mit <i>Erwinia amylovora</i> infizierten für Feuerbrand sehr anfälligen Apfelpflanze . . . . .	61
3.13	Habitus einer mit <i>Erwinia amylovora</i> infizierten für Feuerbrand wenig anfälligen Apfelpflanze . . . . .	61
3.14	Nekrotisches Blatt nach <i>Erwinia amylovora</i> -Infektion . . . . .	61
3.15	Exsudattropfen nach <i>Erwinia amylovora</i> -Infektion . . . . .	61
3.16	Keimende <i>Venturia inaequalis</i> -Sporen . . . . .	62
3.17	Kopplungskarten der vier Kopplungsgruppen mit kartierten LOX-Genen und QTLs . . . . .	64
3.18	Schematische Darstellung des Gens <i>MdLOX1a</i> . . . . .	67
3.19	Modell von LOX1:Md:1a . . . . .	71
3.20	Aktives Zentrum des LOX1:Md:1a-Modells . . . . .	72

*Abbildungsverzeichnis*

6.1	Karten der Kopplungsgruppe 7 von 'Prima' und 'Discovery' . . . . .	87
6.2	Ausgewählte Genannotationen nahe der MdLOX1/MdLOX7-Cluster . . .	88
6.3	Ausgewählte Genannotationen nahe der MdLOX5-Cluster . . . . .	89

# Tabellenverzeichnis

2.1	Apfelsorten für Pathogeninfektion . . . . .	24
3.1	Identitätswerte der Apfel-LOX-Gene und -Proteine . . . . .	46
3.2	Klonierte Lipoxygenase-Gene verschiedener Apfelsorten . . . . .	55
3.3	Kennwerte der klonierten <i>MdLOX1a</i> -Allele . . . . .	66
3.4	Variable Sequenzpositionen innerhalb der klonierten <i>MdLOX1a</i> -Allele . . . . .	67
3.5	Aminosäure-Polymorphismen der LOX1:Md:1a-Proteine . . . . .	69
3.6	Mittlere quadratische Standardabweichung der LOX1:Md:1a-Modelle . . . . .	69
6.1	Primer für Klonierung . . . . .	90
6.2	Primer für Sequenzierung . . . . .	91
6.3	Primer für RT-PCR . . . . .	92
6.4	Liste der biochemisch charakterisierten LOX-Proteine . . . . .	93
6.5	Akzessionsnummern der für die Identifizierung von mutmaßlich funktionellen LOX-Genen verwendeten LOX-Sequenzen . . . . .	94
6.6	Akzessionsnummern der für die Exon-Intron-Grenzenbestimmung verwendeten LOX-cDNA-Sequenzen . . . . .	96
6.7	Vorhersage der subzellulären Lokalisierung der abgeleiteten LOX-Proteine . . . . .	97
6.8	Kennwerte der QTLs in Regionen mit kartierten LOX-Genen . . . . .	98
6.9	Kennwerte der Hexanal-QTLs auf Kopplungsgruppe 7 . . . . .	98
6.10	Zusammensetzung des AGE-Ladepuffers . . . . .	100
6.11	Zusammensetzung des CTAB-Extraktionspuffers . . . . .	100

## Abkürzungsverzeichnis

AAT	Alkohol-Azyl-Transferase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i> , exprimiertes Sequenzteilstück
GWD	<i>genome-wide duplication event</i> , genomweites Duplikationsergebnis
HPL	Hydroperoxydlyase
Indel	<i>insertion deletion polymorphism</i>
kbe	koloniebildende Einheiten
KODA	9,10-ketol-octadecadienoic acid
LG	<i>linkage group</i> , Kopplungsgruppe
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
LOX	Lipoxygenase
MDP	<i>Malus domestica protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSA	<i>multiple sequence alignment</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	<i>quantitative real time-PCR</i>
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , mittlere quadratische Standardabweichung
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>

## Abkürzungsverzeichnis

SSR	<i>simple sequence repeat</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
UTR	untranslatierte Region



# 1 Einleitung

## 1.1 Der Kulturapfel

### 1.1.1 Herkunft

Der Kulturapfel (*Malus × domestica* BORKH., Syn. *Malus pumilla* MILL.) gehört zu den Rosengewächsen und ist das wichtigste Baumobst der gemäßigten Breiten (Velasco et al., 2010). Nach Cornille et al. (2014) erfolgte die Entstehung des Kulturapfels in 4 Phasen:

- die Inkulturnahme von *Malus sieversii* (LEDEB.) M.ROEM. im Tien Shan Gebirge in Zentralasien
- die Verbreitung durch den Menschen westwärts entlang von großen Handelswegen, wie der Seidenstraße
- der Kontakt zu den Apfel-Arten *Malus orientalis* UGLITZK. und *Malus baccata* (L.) BORKH.
- die Ankunft in Europa und die Hybridisierung mit *Malus sylvestris* (L.) MILL., dem Holzapfel

Durch die Nutzung von molekulargenetischen Daten ist die Nomenklatur vieler Spezies im Umbruch. Ihre taxonomische Stellung wird an neue Erkenntnisse zu deren Artentstehung angepasst. Auf Basis molekulargenetischer Daten ergibt sich eine deutliche Unterscheidbarkeit von *Malus × domestica*-Kultivaren und *Malus sylvestris*-Akzessionen, womit der Holzapfel nur einen geringen Beitrag zum Genom des Kulturapfels beisteuert (Velasco et al., 2010). Wahrscheinlich wird die Taxonomie der Gattung *Malus* zukünftig erneut überarbeitet (Cornille et al., 2014). Momentan wird von 25 bis 47 Arten innerhalb der Gattung ausgegangen (Höfer und Meister, 2010). Allerdings sind nur Sorten der Hybridart *Malus × domestica* in Industrieländern marktwirtschaftlich bedeutend.

### 1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Der Apfel ist mit einem jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch von 25,9 kg das beliebteste Obst in Deutschland (BMELV-Statistisches Bundesamt, 2013). Die Anbaumenge in Deutschland ist seit 10 Jahren stabil und liegt bei etwa einer Megatonne pro Jahr (FAO, 2015). Im europäischen Ertragsvergleich steht Deutschland an vierter Stelle (siehe Abbildung 1.1). Entgegen der Stagnation der Produktionsmenge in Europa nimmt der weltweite Anbau in den letzten 20 Jahren stetig zu (Abbildung 1.2). Seine große Bedeutung für die menschliche Ernährung behielt der Kulturapfel über Jahrhunderte, weil fortwährend Pflanzen mit besseren Merkmalskombinationen selektiert wurden. Diese Sorten unterscheiden sich zum Beispiel in Merkmalen der Fruchtqualität.

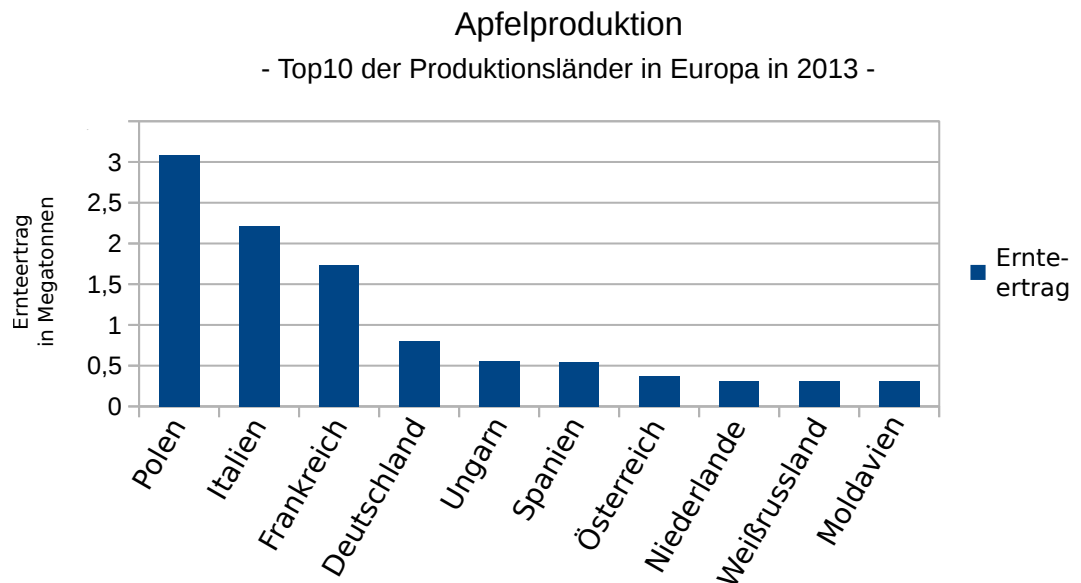


Abbildung 1.1: Die Top10 der europäischen Apfelproduktionsländer.  
Quelle: FAO (2015)

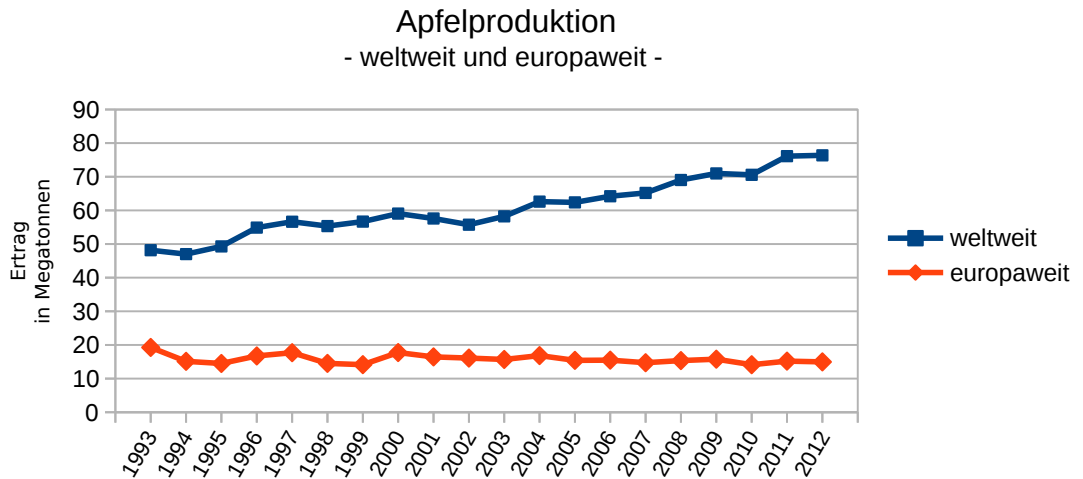


Abbildung 1.2: Die weltweite und europaweite Apfelproduktion der letzten 20 Jahre.  
Quelle: FAO (2015)



## 1.2 Das Apfelaroma

Das Aroma eines Apfels ist für den Verbraucher ein wichtiger Schlüsselfaktor der Fruchtqualität (Costa et al., 2013). Der Geschmack entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Geschmacksrezeptoren, ortho- und retronasaler Geruchswahrnehmung, Textur und optischem Eindruck, wobei der Geruch durch flüchtige chemische Stoffe vermittelt wird (Shepherd, 2006). Für den Verbraucher sind sensorische Eigenschaften wie Aroma, Saftigkeit und Festigkeit von größerer Bedeutung als beispielsweise Nährwert oder kontrolliert biologischer Anbau (Péneau et al., 2006). Die Vorliebe der Verbraucher kann sich allerdings unterscheiden - einige bevorzugen knackige, fruchtige Sorten, andere bevorzugen saftige, saure Äpfel (Harker et al., 2003). Das Apfelaroma ist eine komplexe Eigenschaft und die Entstehung der einzelnen Aromakomponenten bezieht viele Stoffwechselwege ein (Dunemann et al., 2012).

### 1.2.1 Biochemische Grundlagen

Bereits Cunningham et al. (1986) identifizierten 27 flüchtige Stoffe als typische Apfelaromen. Heute wird von etwa 20 Schlüsselaromastoffen ausgegangen, deren Synthesewege erforscht werden (für eine Übersicht, siehe Schwab et al., 2008). Die meisten Aromastoffe mit hohen Konzentrationen gehören zur Stoffgruppe 'Ester' (Dunemann et al., 2012; Rowan et al., 2009a; Altisent et al., 2009). Die Fruchtester werden hauptsächlich durch zwei verschiedene Stoffwechselwege synthetisiert. Verzweigt-kettige Fruchtester werden aus Isoleucin gebildet, wohingegen unverzweigt-kettige Fruchtester durch LOX (Lipoxygenase) und nachfolgende Enzyme im LOX-Stoffwechselweg aus Fettsäuren gebildet werden (Dunemann et al., 2012; Rowan et al., 2009b). Wichtige Schlüsselkomponenten des Apfelfruchtromas, die Ester Butylacetat und Hexylacetat, werden durch den LOX-Stoffwechselweg synthetisiert (Rowan et al., 2009a; Song und Forney, 2008).

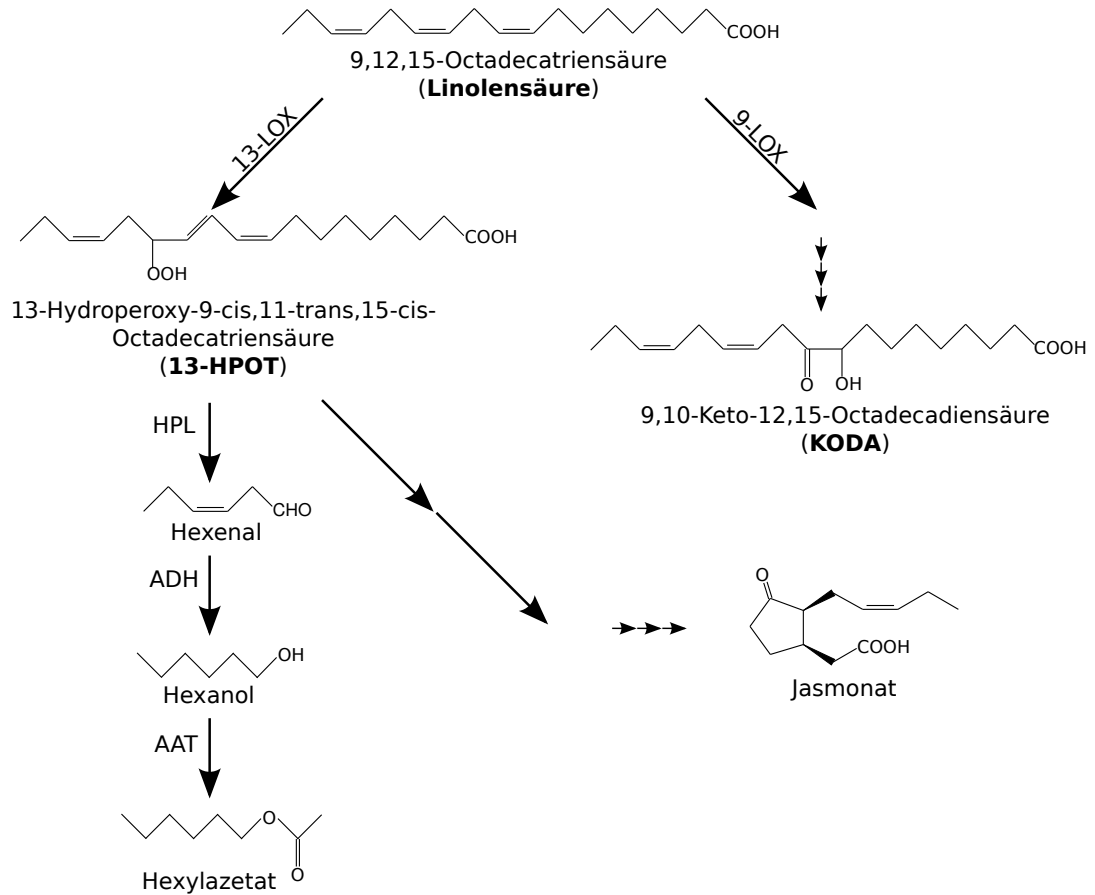
### 1.2.2 Lipoxygenase-Stoffwechselweg in Pflanzen

An der Bildung eines unverzweigt-kettigen Esters (Abbildung 1.3) sind vier Enzyme des Lipoxygenasestoffwechselweges beteiligt:

- LOX,
- HPL (Hydroperoxydlyase),
- ADH (Alkoholdehydrogenase) und
- AAT (Alkohol-Azyl-Transferase).

LOXs sind eisenhaltige Dioxygenasen, deren Eisen-Ion nicht als Häm-Komplexverbindung vorliegt und welche die Verbindung von molekularem Sauerstoff mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren (Feußner und Wasternack, 2002). Unter den pflanzlichen LOXs sind zwei Typen bekannt, einige LOXs oxidieren bevorzugt das C9-Atom (9-LOX), andere bevorzugt das C13-Atom des Kohlenstoffrückgrades der Fettsäure (13-LOX) und produzieren entsprechend die (9S)- und (13S)-Hydroperoxy-Derivate (9- bzw. 13-HPOD bei Linolsäure, 9- bzw. 13-HPOT bei Linolensäure) (Schwab et al., 2008). Auch LOXs mit

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3: Ausgewählte Produkte der Lipoxygenasereaktion.** Aus ungesättigten Fettsäuren (hier Linolensäure) werden durch das Enzym Lipoxygenase Vorstufen für wichtige Sekundärmetabolite gebildet. Aus 13-LOX-Produkten entstehen Vorstufen für Signalstoffe der Stressantwort (z. B. Jasmonate), aber durch Umsetzung mittels Hydroperoxid-Lyase (HPL), Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) und Alkohol-Azyl-Transferase (AAT) auch viele Aromaester (z. B. Hexylacetat) und *green leaf volatiles* (z. B. Hexenal und Hexanol). Die Aktivität von 9-LOXs zeigt einen empirischen Zusammenhang mit Pathogenresistenz und wird in Verbindung gebracht mit der Bildung von Stoffen der entwicklungsphysiologischen Regulation (hier KODA). (Abbildung nach Schwab et al., 2008; Kittikorn et al., 2011).

Mischaktivität sind bekannt (Palmieri-Thiers et al., 2009; Liu und Han, 2010; Cho et al., 2012). LOXs mit dualer Positionsspezifität der Oxygenierung produzieren die beiden Produktisomere (9- und 13-HPOD/HPOT) in einem Verhältnis von unter 10:1 (Hughes et al., 2001). Die LOX CsLOX1 aus der Teepflanze produziert beide Produkte im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 und zeigt keine Positionsspezifität (Liu und Han, 2010).

Die verschiedenen HPL-Isoformen können die 9- und 13-Hydroperoxy-Derivate der mehrfach ungesättigten Fettsäuren spalten und dadurch flüchtige Aldehyde bilden (Schwab et al., 2008). Bei Apfel wurde bisher nur 13-HPL-Aktivität nachgewiesen (Noordermeer et al., 2000). Das Enzym ADH reduziert das Aldehyd zu einem Alkohol (Schwab et al., 2008).

In der Apfelfrucht ist die AAT *MdAAT1* im letzten Schritt der Estersynthese beteiligt (Dunemann et al., 2012). Durch das Enzym wird eine mit Coenzym A veresterte Azygruppe mit dem aus dem LOX-Stoffwechselweg entstandenen Hexanol verestert (Schwab et al., 2008). Die AAT-Aktivität korreliert mit der Menge von flüchtigen Fruchtestern (Li et al., 2006). Verschiedene Apfelsorten besitzen unterschiedliche Isoformen des AAT-Enzyms (Dunemann et al., 2012). Die Zustände einiger SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) innerhalb der Sequenz des *MdAAT*-Gens korrelieren mit der Menge von vier Fruchtestern (Dunemann et al., 2012). Neben den abschließenden, sind die einleitenden enzymatischen Reaktionen in Stoffwechselwegen wichtige Regulationsstellen für die Aromaproduktion im Apfel (Schaffer et al., 2007).

### Funktion von durch Lipoxygenase gebildeten Stoffen

Der erste Schritt des Stoffwechselweges, die LOX-Reaktion, hat durch die Positionsspezifität des Proteins großen Einfluss darauf, welche Funktion das schlussendliche Syntheseprodukt im pflanzlichen Metabolismus haben wird.

In der Sojabohne besitzen einige LOXs die Funktion von Speicherproteinen (Feußner und Wasternack, 2002). In Gurkenkeimlingen wird die Mobilisierung von Speicherfetten durch eine spezielle 13-LOX eingeleitet (Feussner et al., 1996).

Es werden unterschiedliche biologische Funktionen von mittelbar durch LOX gebildeten Stoffen vermutet. Die Genexpression von 9-LOXs wird in Tabak bei viraler Infektion induziert (Huang und Schwab, 2011) und *antisense*-Expression eines 9-LOX-Gens führt bei Infektion mit *Phytophthora parasitica* zu erhöhter Anfälligkeit (Rancé et al., 1998). Kittikorn et al. (2011) beschreiben KODA (9,10-ketol-octadecadienoic acid) als Derivat eines 9-LOX-Produktes und schreiben einer erhöhten KODA-Konzentration die Unterdrückung des *MdTFL1*-Gens zu, welches laut Hättasch et al. (2008) einen Einfluss auf die Blütenknospenentwicklung hat.

Die Beteiligung von LOX an der Synthese von Jasmonat ist lange bekannt (Vick und Zimmerman, 1987). Inzwischen ist der Syntheseweg detailliert aufgeklärt, 13-LOX bilden Vorstufen für Jasmonate (für eine Übersicht, siehe Wasternack, 2007). Jasmonate und Jasmonatderivate sind an der pflanzlichen Stressantwort sowie an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Beispielsweise ist die Doppelmutante von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, in der zwei redundante 13-LOX (LOX3, LOX4) mutiert sind, männlich steril und zeigt eine vom normalen Habitus abweichende Blütenstandsmorphologie

## 1 Einleitung

(Caldelari et al., 2011). Dieser vom Wildtyp abweichenden Entwicklung kann durch exogene Jasmonatapplikation entgegengewirkt werden (Caldelari et al., 2011).

Die durch 13-LOX gebildeten C6-Aldehyde und deren Alkoholderivate werden grundsätzlich als *green leaf volatiles* bezeichnet, weil deren Aroma oft mit dem Geruch von frisch gemähtem Gras verglichen wird (Matsui et al., 2006). Viele *green leaf volatiles* besitzen antimikrobielle Eigenschaften (Feußner und Wasternack, 2002). Diese Grünnoten sind außerdem ein wichtiger Bestandteil des Fruchtaromaprofils einiger Apfelsorten und Vorstufen für einige der als fruchtig wahrgenommenen Ester. Die Menge an aromarelevanten flüchtigen Estern, wie z. B. Hexylazetat und Butylazetat korreliert mit der LOX-Aktivität und lässt eine Rolle des LOX-Stoffwechselwegs in der Aromastoffproduktion vermuten (Altisent et al., 2009). Die starke LOX-Enzymaktivität während der Fruchtreife deutet darauf hin, dass der LOX-Stoffwechsel etwas zur Aromastoffsynthese beiträgt (Echeverría et al., 2004). Im Allgemeinen sind mehrere LOX-Isoformen für die vielfältigen Funktionen innerhalb verschiedener Gewebe einer Pflanze verantwortlich.

### 1.2.3 Abundanz der Lipoxygenase-Gene

Die Anzahl der LOX-Gene und der LOX-Proteinisoformentypen variiert in verschiedenen Pflanzenarten. Auf der Grundlage von klonierten Sequenzen des Tomaten-Transkriptoms wurden sechs unterschiedliche Gene beschrieben (Chen et al., 2004; Shen et al., 2014). Ebenfalls sechs LOX-Gene wurden im *Arabidopsis thaliana*-Genom gefunden (Bannenberget al., 2009). Der Wein, *Vitis vinifera*, besitzt mindestens 18 LOX-Gene (Podolyan et al., 2010). Eine ähnlich große Anzahl an LOXs sind bei Kartoffel und Soja gefunden worden (Liavonchanka und Feussner, 2006; Shin et al., 2008). Kürzlich wurden 23 Gene der LOX-Genfamilie der Birne auf Basis des sequenzierten Genomes von *Pyrus bretschneideri* identifiziert (Li et al., 2014). Neun Apfel-LOXs wurden von Schaffer et al. (2007) beschrieben.

Um mögliche Ursachen für die teilweise große Anzahl an LOX-Genen zu identifizieren, muss sich ein Überblick über die Genomorganisation verschafft werden.

### Exkurs: Das Genom des Apfels

Für die Entstehung des heute diploiden Genoms des Apfels wurden verschiedene Theorien formuliert. Nach Chevreau und Laurens (1987) postulierte Stebbins (1950) den Ursprung der 17 Chromosomen der Maloideae durch die Hybridisierung einer Art der Spiraeoideae mit 9 Chromosomen und einer Art der Prunoideae mit 8 Chromosomen. Die phylogenetische Analyse einzelner Gene und die Ergebnisse der Apfel-Genomsequenzierung bestätigen allerdings die Theorie, dass das Genom des Apfels durch ein GWD (*genome-wide duplication event*, genomweites Duplikationsereignis) hervorgegangen ist und dass genetisches Material eines Chromosoms bei Reorganisation des Genoms umverteilt wurde (Evans und Campbell, 2002; Velasco et al., 2010). Auch weit ältere GWDs wurden für Wein und Apfel nachgewiesen, sodass von einem hexaploiden Genomzustand des vorzeitlichen eudicotylen Vorfahrens ausgegangen wird (Velasco et al., 2010). Die vielfachen GWDs sind eine Erklärung für die große Genanzahl. Die über 57 000 identifizierten Gene

### 1.3 Lipoxygenase-Kandidatengen für Aroma

im Apfelgenom sind die höchste Anzahl, die bislang für eine Art beschrieben wurden (Velasco et al., 2010). Speziell an der Entwicklung der Frucht beteiligte Gene, beispielsweise *StMADS11*-Gene, sind vervielfacht (zwei Gene aktiv in *Arabidopsis thaliana*, 15 Gene aktiv in Apfel) (Velasco et al., 2010). Ein Beispiel aus dem Kohlenhydratmetabolismus: Der Apfel besitzt 71 Sorbitolmetabolismogene, bei anderen Pflanzen liegt die Anzahl zwischen 9 und 43 (Velasco et al., 2010). Dabei ist das Genom des Apfels mit geschätzten 742,3 Mbp relativ klein und dadurch ein wichtiger Modellorganismus für funktionale Genomstudien an ausdauernden, verholzten Bedecktsamern (Velasco et al., 2010; Han und Korban, 2008). Weiterhin besitzt die Arbeitsversion der Apfelgenomsequenz eine hohe Qualität (Feuillet et al., 2011). Die Gene des Apfels sind annähernd vollständig sequenziert, 98 % der nicht assemblierten Sequenzen sind repetitive Elemente (Velasco et al., 2010). Dies ermöglicht die umfassende Identifizierung einer Genfamilie.

Auch Kopplungsanalysen von Markern verschiedener Apfel-Nachkommenschaften erbrachten das Resultat, dass der Apfel 17 Kopplungsgruppen unterschiedlicher Länge besitzt, wobei jede Kopplungsgruppe theoretisch einem physisch vorhandenen Chromosom entspricht (Liebhard et al., 2003; N'Diaye et al., 2008). Genetische Genkarten werden auf Basis der vorhandenen oder nicht vorhandenen Kopplung möglichst vieler Marker innerhalb einer definierten Nachkommenschaft erstellt. Sie sind unverzichtbar für verschiedene biostatistische Methoden, wie die Kopplungsanalyse mittels QTLs (*quantitative trait loci*).

Die Struktur des Kulturapfelgenoms und die zum Teil große Anzahl an LOX-Genen im Genom anderer Pflanzen lässt vermuten, dass auch im Apfelgenom viele LOXs codiert sind.

### 1.3 Lipoxygenase-Kandidatengen für Aroma

Das Kandidatengen zu finden, das maßgeblich für Aroma verantwortlich ist, ist bei einer großen Genfamilie eine Herausforderung.

Bisher wurden lediglich neun Apfel-LOX-Gene aus Datenbanken mit ESTs (*expressed sequence tags*) identifiziert. Durch die statistische Auswertung von verschiedenen EST-Bibliotheken konnten Park et al. (2006) einen EST-Cluster identifizieren, welcher bei der Synthese von Aromastoffen eine bedeutende Rolle spielt. Das identifizierte Cluster MD187410 konnte bereits in vorangegangenen Studien von Dunemann et al. (2009) auf der Kopplungsgruppe 9 kartiert werden. Die Position liegt innerhalb eines Bereiches, in dem durch QTL-Analyse wichtige genetische Komponenten identifiziert wurden, die die Menge einiger Fruchtester beeinflussen (Dunemann et al., 2009). Ein QTL weist einen Bereich innerhalb des Genoms aus, der einen signifikanten Einfluss auf ein Merkmal ausübt. Wenn ein QTL nahe eines Kandidatengens mit bekannter katalytischer Funktion liegt, kann daraus auf die mögliche Beteiligung bei der Ausprägung des Merkmals geschlossen werden (Dunemann et al., 2012; Mellidou et al., 2012; Chagné et al., 2012b). Bis zu 350 flüchtige Substanzen wurden in Apfelfrüchten gefunden, die verschiedenen Stoffgruppen, wie z. B. Estern, Alkoholen und Aldehyden zugeordnet werden können (Rowan et al., 2009b; Song und Forney, 2008). In vorliegender Arbeit wurde sich auf wenige Schlüsselaromastoffe aus den Arbeiten von Dunemann et al. (2009) und Dunemann et al.

## 1 Einleitung

(2012) beschränkt. Zusammen mit Markerdaten können Assoziationen zwischen einem Marker und einem Aromastoff identifiziert werden. Diese Markerdaten wurden in vorangegangenen Studien ermittelt (HIDRAS Framework, 2010; Dunemann et al., 2009).

Die differentielle Expression verschiedener Gene in unterschiedlichen Geweben oder zu verschiedenen Zeitpunkten kann Vermutungen über die Funktion eines Genes stützen oder widerlegen. In Tomate sind verschiedene LOX-Isoformen in verschiedenen Reifestadien innerhalb einer Pflanze aktiv (Heitz et al., 1997; Chen et al., 2004). Für nahezu alle in der näheren Vergangenheit beschriebenen LOX-Gene, wurde entweder die gewebespezifische Expression oder die Veränderung der Expression während der Fruchtreife oder einer Stressreaktion bestimmt (z. B. Liu und Han, 2010; Podolyan et al., 2010; Santino et al., 2005). Die Expressionsanalyse mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) ist häufig die Methode der Wahl, um die differentielle Expression von LOX-Genen festzustellen (z. B. Liu et al., 2011; Marmey et al., 2007; Zhang et al., 2006; Santino et al., 2003). Es ist wahrscheinlich, dass Kandidatengene für Apfelaroma zur Fruchtreife eine veränderte Expression zeigen. In der Tomate wurde *TomLoxC* identifiziert, dessen Expression zum Reifezeitpunkt stark zunimmt (Heitz et al., 1997). Chen et al. (2004) stellten signifikant reduzierte Aromastoffkonzentrationen in Pflanzen fest, bei denen *TomLoxC*-Transkripte durch *antisense*-Konstrukte stark verringert wurden. Die Expression von bis zu drei verschiedenen Apfel-LOX-Genen ist zur Fruchtreife erhöht (Schaffer et al., 2007).

Bislang konnte noch nie auf so umfangreiches Sequenzmaterial des Apfels zurückgegriffen werden, um die LOX-Genfamilie zu untersuchen und Kandidatengene für Aroma zu identifizieren. Mithilfe der Apfel-Genomsequenz von Velasco et al. (2010) kann die Genfamilie vollständig erfasst und umfassend charakterisiert werden.

### 1.4 Ziele der Arbeit

Der Geschmack des Apfels ist eines der wichtigsten Fruchtmerkmale. Annähernd alle Sorten besitzen ein eigenes, komplexes Aromaprofil. Allein die Produktion der Schlüsselaromastoffe bezieht mehrere Stoffwechselwege ein. Die Identifizierung der beteiligten Gene ist die Grundvoraussetzung für das Verständnis der Aromastoffentstehung. Die zielgerichtete Züchtung einer Sorte mit einem speziellen Aroma ist schneller durch moderne Strategien möglich, beispielsweise der markergestützten Selektion oder transgenen und cisgenen Ansätzen. Dafür müssen die Zielgene und die allelbedingten phänotypischen Unterschiede bekannt sein. Für wenige andere Gene, die bei der Produktion von Schlüsselaromastoffen des Apfels beteiligt sind, ist die Rolle bei der Aromabildung bekannt. Allerdings gibt es bislang keine Erkenntnisse, die ein bestimmtes LOX-Gen eindeutig mit einer Funktion in der Fruchtaromaproduktion in Verbindung bringen.

Ziel der Arbeit ist es, das LOX-Gen des Apfels zu identifizieren, welches den hauptsächlichen Beitrag leistet für die Produktion von wichtigen Aroma-Schlüsselkomponenten, nämlich den unverzweigten Fruchtestern, Alkoholen und Aldehyden. Dazu werden

- die LOX-Gene des Apfels identifiziert.
- diese Gene und deren Genprodukte bioinformatisch charakterisiert, um z. B. Informationen über deren Funktionalität und Spezifität zu erhalten.

Weiterhin wird:

- die Genexpression möglichst vieler LOX-Gene untersucht, um zu ermitteln, welche in Früchten bzw. in der späten Phase der Fruchtreife aktiv sind.
- durch Assoziationsstudien geprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen Kandidatengenen und der Art und Menge verschiedener Fruchtester, Fruchtalkohole und Aldehyde vorliegt.
- ergänzend durch Sequenzvergleich und Proteinmodellierung überprüft, welche Mechanismen als Ursache für die sortenspezifische Unterschiede in der Aromastoffbildung wahrscheinlich sind.

Die Feststellung des bedeutendsten LOX-Gens bei der Produktion von Schlüsselaromastoffen würde noch bessere Möglichkeiten bieten zur zielgerichteten Sortenzüchtung mit Blick auf das Aroma durch moderne markerbasierte Züchtungsstrategien.





## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### - für die Klonierung

Aus den Apfelsorten 'Alkmene', 'Discovery', 'Golden Delicious', 'McIntosh', 'Royal Gala' und 'Prima' wurde DNA (*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) isoliert, um die gesamte kodierende Sequenz der LOX-Gene zu klonieren. Das Pflanzenmaterial stammt vom Versuchsfeld des Julius Kühn-Institutes Dresden-Pillnitz.

#### - für die Expressionsanalysen

Das Probenmaterial für die Expressionsanalysen der Sorten 'Golden Delicious' und 'McIntosh' stammt ebenfalls aus dem Versuchsfeld des JKI Dresden-Pillnitz. Für die gewebe-spezifischen Untersuchungen wurden Blüten zur Vollblüte 2011 gesammelt. Junge Blätter wurden im Frühjahr 2011 gesammelt, als die ersten Laubblätter vollständig entfaltet waren. Die Fruchtschale von reifen Äpfeln wurde im Herbst 2010 geschält, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Expressionsanalyse während der Fruchtentwicklung wurden 2011 aller 20 Tage Fruchtproben gesammelt. Zu den ersten beiden Probenahmezeitpunkten (Vollblüte, 20 Tage nach Vollblüte) wurden die ganze Blüte bzw. die vollständige kleine Apfelfrucht benutzt. Bei allen weiteren Probenahmezeitpunkten wurde nur die Fruchtschale gesammelt, denn die Aromastoffe werden bei Tomate und Apfel hauptsächlich in der Schale produziert (Defilippi et al., 2005; Ties und Barringer, 2012). Es wurden weiterhin reife Äpfel für 10 beziehungsweise 20 Tage bei Raumtemperatur und gekühlt bei  $8^{\circ}\text{C}$  gelagert, um die Expression bei kurzzeitiger Lagerung zu untersuchen. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Isolation der RNA (*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurde Material von zumindest 3 Proben gemischt und auf biologische Replikate bewusst verzichtet.

#### - für die Test-PCR auf Genspezifität der Primer

Es wurden DNA-Lösungen von folgenden 29 Sorten benutzt, um festzustellen, dass ein Primerpaar spezifisch für das Zielgen ist und mutmaßlich für alle Sorten des Kulturapfels nutzbar ist: 'Akane', 'Alkmene', 'Braeburn', 'Clivia', 'Cox Orange', 'Discovery', 'Elan', 'Elstar', 'Fiesta', 'Gala', 'Gloster', 'Golden Delicious', 'Granny Smith', 'Idared', 'Ingrid Marie', 'James Grieve', 'Jonamac', 'Jonathan', 'Kent', 'McIntosh', 'Monroe', 'Mutsu', 'Pilot', 'Pinova', 'Prima', 'Priscilla', 'Red Delicious', 'Sparta' und 'Weißer Winterkalvill'.

## 2 Material und Methoden

### - für die LOX-Genkartierung

Für die Bestimmung der Genposition in einer Kopplungskarte (notwendig für die QTL-Analyse von Fruchtaromastoffen) wurden DNA-Lösungen von 30 Individuen der sogenannten C3-Population benutzt. Die C3-Population besteht aus 150 F1-Pflanzen. Diese sind aus einer Kreuzung zwischen den Apfelsorten 'Discovery' und 'Prima' mit 'Discovery' als Mutterpflanze hervorgegangen. Die benutzten Genotypen tragen die Kennungen: D002, D004, D005, D006, D013, D016, D018, D024, D039, D041, D048, D058, D061, D070, D076, D078, D089, D092, D097, D102, D109, D119, D123, D125, D133, D165, D167, D175, D214 und D221. Diese Population wurde im JKI Dresden-Pillnitz gezüchtet und bereits in vorangegangenen Arbeiten benutzt (Dunemann et al., 2009, 2012).

### - für die Infektionsversuche

Über die für den jeweiligen Infektionsversuch verwendeten Sorten gibt Tabelle 2.1 Auskunft. Die Apfelpflanzen wurden im Winter 2011/2012 im JKI Dresden-Pillnitz veredelt. Als Unterlage wurde die Sorte 'M9' benutzt. Die Edelreißer stammen aus der Genbank des JKI Dresden-Pillnitz.

**Tabelle 2.1: Apfelsorten der Pathogeninfektionen.** Es wurde je eine anfällige und eine resistente Sorte für jeden Infektionsversuch benutzt.

Versuch	anfällige Sorte	resistente Sorte
<i>Erwinia</i> -Infektion	'Gala'	<i>Malus × robusta</i> 'Mr5'
<i>Eriosoma</i> -Infektion	'Gala'	'Northern Spy'
<i>Venturia</i> -Infektion	'Gala'	'Regia'

## 2.2 Benutzte Mikroorganismen

Für die Transformation mit Plasmiden mit inserierten Lipoxygenase-Genen wurden *Escherichia coli JM109*-Zellen (Promega, Mannheim, Deutschland) benutzt. Diese wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Infektionsversuch mit *Erwinia amylovora* wurde Ea222 benutzt, da dieser Erregerstamm die anfällige Sorte 'Gala' infiziert, am resistenten Genotyp *Malus × robusta* 'Mr5' andererseits keine Symptome sichtbar werden. Das Material entstammt der Sammlung des JKI Dresden-Pillnitz. Für die Apfelschorfinfektion wurde ein Isolat von Blättern der Akzession 821 von *Malus floribunda* hergestellt. Auf dieser Akzession kommt ausschließlich die Schorfrasse 7 vor. Für eine Übersicht zu den Schorfrassen, siehe Bus et al. (2009).

## 2.3 Bestimmung des Fruchtaromas

### Präparation der Proben

Für die Aromastoffanalyse wurden reife Apfelfrüchte von 85 Individuen der C3-Population in der Saison 2009 geerntet. Diese erstreckte sich je nach Sorte von Mitte August bis Mitte September. Eine repräsentative Anzahl von 8-10 typisch ausgebildeten Früchten wurde gewaschen, abgetrocknet und die Früchte nach Entfernung des Kerngehäuses in Scheiben geschnitten. Ein bis zwei Scheiben von 5-10 Äpfeln wurden mit einem Mixer püriert und nach Zugabe von Natriumchlorid (20 % w/v) zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde mit festem Natriumchlorid gesättigt und dadurch die enzymatische Aktivität weitestgehend gestoppt. Die präparativen Arbeiten wurden durchgeführt durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Frank Dunemann (damals tätig im JKI - Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz, heute tätig im JKI - Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen, Quedlinburg). Beschrieben sind diese Arbeiten durch Dunemann et al. (2009).

### Gaschromatographische Analyse

Von diesem Überstand wurden die flüchtigen Aromakomponenten mittels *headspace solid phase microextraction* (HS-SPME) mit einer 100 µm Polydimethylsiloxan Fibrille (Supelco, Bellefonte, PA, USA) durch einen MPS2 autosampler der Firma Gerstel (Mülheim, Deutschland) gesammelt. Die ausführliche Beschreibung der Durchführung der Aromastoffanalyse des Apfels durch Trennung mittels einer polaren Säule und Bestimmung mit GC-FID und GC/MS sowie die Datenverarbeitung mit Mustererkennung (holistischer Ansatz) wurde von Schulz et al. (2003), Dunemann et al. (2009) und Ulrich et al. (2011) beschrieben. Da das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit auf Aromastoffen liegt, die durch LOX gebildet werden, wurden die Werte von 15 ausgewählten Aromastoffen für die QTL-Analyse benutzt. Durchgeführt wurden die analytischen Arbeiten durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Detlef Ulrich (JKI - Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Quedlinburg). Freundlicherweise stellten mir Herr Dr. Frank Dunemann und Herr Dr. Detlef Ulrich die Daten für meine Untersuchungen zur Verfügung.

## 2.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.4.1 DNA-Isolation

Das DNA-Material für

- die Klonierung der LOX-Gene in ihrer gesamten Länge,
- die Gradienten-PCR,
- die Positivkontrollen von PCR- und RT-PCR-Experimenten und
- die Überprüfung der Primer für die RT-PCR auf Genspezifität

wurde aus jungen Blättern mittels des Invisorb Plant Mini Kits (Invitek, Berlin, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in entionisiertem Wasser gelöst

## 2 Material und Methoden

und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Arbeitslösungen mit einer Konzentration von  $20\text{ ng}/\mu\text{l}$  wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2 RNA-Isolation

Die RNA wurde durch ein modifiziertes Isolationsprotokoll gewonnen, bei dem ein 3-fach CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Puffer genutzt wird. Die RNA wird durch die Fällung in einer Lithiumchlorid-Lösung selektiv konzentriert (Liao et al., 2004). Es wurden stets mehrere Blätter beziehungsweise Schalenstücke mehrere Äpfel einer Sorte mit Mörser und Stößel in flüssigen Stickstoff zerrieben und die benötigte Menge des Pulvers für die RNA-Isolation benutzt.

Isolationsprotokoll:

- $750\ \mu\text{l}$  CTAB-Extraktionspuffer mit  $32\ \mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol versetzen
- auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzen
- Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern
- $100\text{ mg}$  in  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß aufnehmen
- vorgewärmten CTAB-Extraktionspuffer zugeben
- stark schütteln, bis Pflanzenmaterial komplett resuspendiert ist
- Inkubation im Schüttler ( $1000$  Rotationen pro Minute,  $65^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ min}$ )
- Zugabe von  $1$  Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung ( $24:1$ )
- invertieren ( $10\text{ min}$ )
- Zentrifugation ( $10\text{ min}$ ,  $12\ 000\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- wässrige Phase (oben) entnehmen, in neues  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von  $1$  Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung ( $24:1$ )
- invertieren ( $10\text{ min}$ )
- Zentrifugation ( $10\text{ min}$ ,  $12\ 000\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- wässrige Phase (oben) entnehmen, in neues  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von  $0,5$  Volumen Lithiumchlorid-Lösung ( $8\text{M}$ )
- Lagerung ( $4^{\circ}\text{C}$ , über Nacht)

### 2.4.3 RNA-Reinigung

Die RNA wurde durch Chloroform-Isoproamylalkohol-Ausschüttelung von organischen und anschließend durch mehrfaches Waschen mit wässrigen Alkohollösungen von wasserlöslichen Stoffen gereinigt.

Reinigungsprotokoll:

- Zentrifugation ( $30\text{ min}$ ,  $12\ 000\text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- Flüssigkeit verwerfen
- Zugabe  $500\ \mu\text{l}$   $0,05\%$  Natriumlaurylsulfat-Lösung
- invertieren
- Zugabe  $500\ \mu\text{l}$  Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung ( $24:1$ )
- invertieren ( $30\text{ s}$  per Hand)

- Zentrifugation (10 min, 12 000 g, 4 °C)
- wässrige Phase (oben) entnehmen, in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe 2 Vol 100 % Ethanol
- invertieren
- Lagerung (2 h, -20 °C)
- Zentrifugation (30 min, 12 000 g, 4 °C)
- wiederhole 3-mal:
  - Pellet waschen (70 % Ethanol, 500 µl, -20 °C)
  - Zentrifugation (5 min, 12 000 g, 4 °C)
- Pellet waschen (100 % Ethanol, 500 µl, -20 °C)
- Zentrifugation (10 min, 12 000 g, 4 °C)
- Pellet in einer Vakuumzentrifuge trocknen (5 min)
- Zugabe 30 µl DEPC-behandeltes Wasser
- Rücklösen (5 min)

### 2.4.4 DNase-Behandlung

Um mögliche DNA-Verunreinigungen in der RNA-Lösung zu entfernen, wurde die DNase-Behandlung mit DNase I (RNase-free) (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Eine Lösung mit 5 µg RNA wurden mit der entsprechenden Menge an DNase und Enzympuffer nach den Vorgaben der Herstellers behandelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol und sofortiger Reinigung ab Anstrich 5 des oben abgedruckten Reinigungsprotokolls um mögliche Auswirkungen durch Inhaltsstoffe des Puffers auf nachfolgende Arbeitsschritte zu vermeiden.

### 2.4.5 cDNA-Synthese

Benötigte Lösungen von cDNA (*complementary DNA*) wurden aus RNA-Lösungen hergestellt. Dafür wurde das Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers benutzt. Um selektiv eukaryotische mRNA (*messenger RNA*) als Matrize für die cDNA-Synthese zu benutzen, wurden *oligo-dT*-Primer benutzt. Die Reaktion wurde durch Hitzebehandlung gestoppt. Die Verdünnungen der cDNA-Lösungen für die Expressionsanalyse wurden anhand der Transkriptabundanz des stabilsten Referenzgens normalisiert.

### 2.4.6 Überprüfung der Qualität der RNA

#### - durch photometrische Bestimmung

1 µl RNA-Lösung wurde mit 4 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Von der verdünnten Lösung wurden 2 µl mit dem NanoDrop-Gerät (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) analysiert. Es wurde die mitgelieferte Software genutzt, um die Konzentration der RNA in Lösung zu bestimmen. Weiterhin wurden die Quotienten der optischen Dichte bei 230 nm und 260 nm und bei 260 nm und 280 nm ermittelt und ausgewertet. Der Wert für den Quotienten „260 nm / 230 nm“ sollte der Wert zwischen 2,0 und 2,2 und

## 2 Material und Methoden

für den Quotienten „260 nm / 280 nm“ sollten der Wert bei etwa 2,0 liegen. Dies spricht für geringe Verunreinigung mit verschiedenen Substanzen, die Licht der Wellenlänge 230 nm absorbieren bzw. phenolischen Substanzen, die Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren.

### - durch Agarose-Gelelektrophorese

Von der isolierten RNA wurden 0,5 µg auf ein 1,2%-iges Agarosegel aufgetragen und eine AGE (Agarose-Gelelektrophorese) durchgeführt. Zwei gut abgrenzbare Banden im Gel, die durch die 28S- und die 18S-rRNA von Eukaryoten entstehen, sprechen für eine Probe mit ungescherter RNA.

### 2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die AGE wurde ein 1 %-iges Agarosegel hergestellt, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde (4 µl / 100 ml). Als elektrisch leitfähiger Puffer für das Gel und das Elektrophoresebad wurde TAE (Tris-Azetat-EDTA-Puffer) verwendet.

### 2.4.8 Überprüfung potentieller DNA-Verunreinigung durch PCR mit *RNA-Polymerase II*-Primern

Möglichen DNA-Verunreinigungen durch Fehler bei der RNA-Isolation oder der Probenhandhabung wurden durch eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion) mit spezifischen Primern für *RNA-Polymerase II* überprüft. Diese Primer erzeugen bei Amplifikation von cDNA des *RNA-Polymerase II*-Gens ein etwa 300bp langes Amplifikat. Bei Amplifikation der genomischen Sequenz des Gens wird ein etwa 800bp langes Amplifikat erzeugt. Diese können in einer AGE unterschieden werden. Der Amplifikationsbereich überspannt nicht-kodierende Intronsequenz, die bei mRNA und entsprechend cDNA nicht vorhanden ist.

### 2.4.9 PCR

Es wurden verschiedene PCR-Methoden für verschiedene Fragestellungen benutzt:

- Standard-PCR
- Gradienten-PCR
- Kolonie-PCR
- RT-PCR
- qRT-PCR

#### - Standard-PCR

Die PCR wurde mit einem Unocycler (VWR International, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Im Allgemeinen wurde mit der korrekturlesefähigen Phusion<sup>®</sup> Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) mit HF-Puffer und folgendem PCR-Programm gearbeitet:

- 3 min 93 °C,
- 35 ×
  - 30 s, 93 °C,
  - 30 s Primer-Anlagerungs-Temperatur (spezifisch für jeden Primer),
  - 1 min/kb 72 °C
- 5 min 72 °C.

Die Anlagerungstemperatur der Primer ist abhängig von deren Nukleotidsequenz und von den benutzten Lösungen. Bestimmt wird diese Temperatur mittels Gradienten-PCR. Die Länge der Synthesephase ist von der Länge des Zielamplifikates und der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase abhängig. Als Negativkontrolle wurde ein Amplifikationsansatz mit destilliertem Wasser anstatt genetischem Material benutzt. Als Positivkontrolle wurde ein Amplifikationsansatz mit DNA der Sorte 'Golden Delicious' benutzt.

### - Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR unterscheidet sich von aufgeführter Standard-PCR dadurch, dass ein Temperaturgradient für einen Zeitintervall eingestellt werden kann. Die Gradienten-PCR wurde benutzt, um den tatsächlichen Schmelzpunkt der Primer zu bestimmen. Es wurden Anlagerungstemperaturen von 0 °C bis +10 °C in Schritten von 1 °C von der berechneten Schmelztemperatur überprüft, da die Puffereigenschaften des verwendeten Polymerase-Kits die Anlagerungstemperatur erhöhen.

### - Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde benutzt, um festzustellen, ob transformierte Plasmide in Zellen einer Bakterienkolonie die Inserts spezifischer Größe enthalten. Hierzu wurde eine PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) und dem zugehörigen PCR-Puffer durchgeführt. Als Primer für die Reaktion wurden die für den pJet1.2-Vector spezifischen Primer benutzt (pJet1.2 Forward Sequencing Primer, pJet1.2 Reverse Sequencing Primer). Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass keine Extraktion des genetischen Materials aus den Bakterien erfolgen muss, da das durch den initialen Erhitzungsschritt auf 93 °C zugänglich gemachte genetische Material als Ausgangsmaterial für die PCR genügt. Es wurde nach Herstellerangaben des CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gearbeitet.

### - RT-PCR

Der Ablauf einer RT-PCR gleicht einer typischen PCR, allerdings wird als Amplifikationsmatrix nicht genomische DNA sondern cDNA eingesetzt. Die Methode wurde mit den gleichen Geräten, Lösungen und den gleichen Amplifikationsprotokollen durchgeführt wie eine Standard-PCR. Da cDNA die Abundanz verschiedener RNA-Moleküle reflektiert, kann dadurch eine Aussage über das grundsätzliche Vorhandensein eines Zielgens im Transkriptom und über die relative Menge im Vergleich zu anderen Proben getroffen werden.

### - qRT-PCR

Durch qRT-PCR (*quantitative real time-PCR*) mit dem Biorad iCycler (Biorad Laboratories, München, Deutschland) wurden Daten ermittelt, um das stabilste Referenzgen für die Expressionsanalyse zu ermitteln. Es wurde der Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) benutzt.

#### 2.4.10 Reinigung von DNA-Material mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution

Die PCR-Fragmente oder isolierten Plasmide wurden durch AGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und durch Gelelution von Puffer und Agarose gereinigt. Zur Gelelution, der Rückgewinnung von DNA aus Agarosegel, wurde das Invisorb<sup>®</sup> Fragment Cleanup Kit (Invitex, Berlin, Deutschland) benutzt. Zumeist wurde mit Gelblöcken der Masse 150-300 ng gearbeitet. Auf diese Weise wurden PCR-Fragmente und isolierte Plasmide von nicht erwünschtem genetischen Material gereinigt. Das nicht erwünschte genetische Material konnte aufgrund seiner unterschiedlichen Laufweite im Agarosegel abgetrennt werden. Beispiele für nicht erwünschtes Material sind vor allem Primer-Dimer-Amplifikate oder gescherte DNA von Plasmiden oder dem makromolekularen Bakterienchromosom. Makromolekulare DNA ist nach einer PCR nur in Spuren vorhanden. Bei einer Plasmidpräparation über Säulen andererseits wird dieses zurückgehalten und verworfen. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden kloniert oder zur Sequenzierung eingeschickt. Die gereinigten Plasmide wurden zur Sequenzierung des Inserts eingeschickt.

#### 2.4.11 Klonierung von PCR-Amplifikaten

Die für eine Klonierung benötigten PCR-Amplifikate wurden durch Phusion<sup>®</sup> Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase erzeugt, einer Polymerase mit Korrekturlesefähigkeit. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion gereinigt. Die Konzentration der Amplifikatlösung wurde mittels AGE bestimmt. Das gereinigte Amplifikationsprodukt wurde in den pJet1.2/blunt Cloning Vector kloniert. Es wurde nach Angaben des Herstellers für das Produkt CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gearbeitet.

#### 2.4.12 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Vergleich mit Referenzmengen der DNA des  $\lambda$ -Phagen ermittelt. Neben festgelegten Volumina von Probelösungen wurden bestimmte Referenzmengen der  $\lambda$ -Phagen-DNA auf das Gel aufgetragen. Anhand der Referenzmengen konnte eine Eichgrade erstellt werden, die es erlaubte, die Fluoreszenzintensität von Banden im Gel einer DNA-Menge zuzuordnen. Da festgelegte Volumina der Proben aufgetragen wurden, konnte so die Konzentration der DNA-Lösungen ermittelt werden.



### 2.4.13 Bakterientransformation

Die Transformation von *Escherichia coli JM109*-Zellen (Promega, Mannheim, Deutschland) wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 50 µl Zellsuspension und 2,5 µl Ligationsmix bei einer durch Hitzeschock vermittelten Transformation benutzt. Die Zellen wurden danach 1 h in SOC-Medium bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf eine Kulturplatte mit festem LB-Medium mit einem DRIGALSKI-Spatel ausgestrichen. Das Medium enthielt Ampicillin als Selektionsmarker. Das pJet1.2-Plasmid enthält ein Gen für Ampicillinresistenz, wodurch transformierte Zellen in der Lage sind, auf ampicillinhaltigem Medium zu wachsen. Nach ein- bis dreitägigem Wachstum bei 37 °C wurden Kolonien für eine Kolonie-PCR ausgewählt.

### 2.4.14 Plasmidpreparation

Um Plasmide aus Transformanden zu isolieren, wurde mit dem Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Invitek, Berlin, Deutschland) gemäß Herstellerangaben gearbeitet. Die Plasmide wurden in 40 µl entionisiertem Wasser gelöst.

### 2.4.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmidinserts und PCR-Produkten wurde durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Zu sequenzierende Plasmide wurden vorher durch AGE und anschließende Gelelektion gereinigt und entsprechend den Richtlinien der Probenvorbereitung der Firma vorbereitet und verschickt. Als Primer wurden die für den pJet1.2-Vector spezifischen Primer benutzt (pJet1.2 Forward Sequencing Primer, pJet1.2 Reverse Sequencing Primer). Um die gesamte Insertsequenz der Plasmide zu bestimmen, wurde eine Sequenzierung mittels *Primer walking* durchgeführt, wozu drei bis vier weitere spezifische Primer erzeugt und benutzt wurden (siehe dazu Tabelle 6.2).

Zu sequenzierende PCR-Amplifikate wurden entsprechend den Richtlinien der Probenvorbereitung der Firma vorbereitet und verschickt, die Reinigung wurde durch Eurofins MWG Operon durchgeführt.

## 2.5 Bioinformatische Arbeiten

### 2.5.1 Alignments und Sequenzvergleiche

Alle MSAs (*multiple sequence alignments*) wurden mit dem Algorithmus MUSCLE erstellt (Edgar, 2004). Für Sequenzvergleiche und die Erstellung von Identitätsmatrizen wurde das Programm BioEdit verwendet (Hall, 1999).

### 2.5.2 Phylogenetische Bäume

Die phylogenetischen Bäume wurden mit MEGA5 berechnet (Tamura et al., 2011). Soweit nicht anders angegeben, wurden bei der Berechnung von Phylogrammen stets die folgenden Parameter verwendet:

- Neighbor joining,
- *bootstrap*-Methode mit 10 000 Replikaten,
- Substitutionstyp: Nukleotid
- Substitutionsmethode: Kimura-2-Parameter-Modell
- einbezogene Substitutionen: Transitionen und Transversionen
- Substitutionsrate: konstant
- Behandlung von Fehlstellen: paarweise Löschung

### 2.5.3 Genidentifikation in einer Datenbank (*gene mining*)

Die Basis für die Suche nach LOX-Genen im Genom des Apfel war die CDS (*coding sequence*, kodierende Sequenz)-Datenbank (Apple Genome V1.0 predicted CDS), welche auf die Genomsequenzierung von 'Golden Delicious' zurückgeht (Velasco et al., 2010). Innerhalb dieser Datenbank wurden mittels BLAST (*basic local alignment search tool*) alle mutmaßlichen LOX-Gene des Apfelgenoms gesucht. Als Vorlage dienten dabei die von Schaffer et al. (2007) veröffentlichten mutmaßlich funktionellen ESTs.

Die Resultate mit einem *e-value* von weniger als  $10^{-4}$  wurden benutzt, um ein MSA inklusive der LOX-ESTs und den publizierten *tentative cluster* zu erzeugen. Die *tentative clusters* stammen aus dem DFCI-Apfel-Gen-Index (Dana-Farber Cancer Institute, 2010). Die mutmaßlichen LOX-Gene wurden manuell geprüft und bearbeitet, um Effekte aus falschen CDS-Berechnungen während der Apfelgenomannotierung zu verringern. Dazu wurde ein weiteres MSA mit 102 publizierten LOX-cDNA-Sequenzen von 32 verschiedenen Pflanzen erzeugt.

### 2.5.4 Primer

Basierend auf den verfügbaren Sequenzdaten der Apfelgenomsequenz wurden genspezifische Primer erstellt. Alle selbst ermittelten Primersequenzen wurden auf Haarnadelstrukturen und Dimerbildung mit dem Programm NetPrimer (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) untersucht. Synthetisiert wurden die Primer-Oligonukleotide durch die Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland). Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mittels Gradienten-PCR experimentell ermittelt.

#### - für die Amplifikation von LOX-Genen in voller Länge (siehe Tabelle 6.1)

Die Primerbindestellen liegen nur wenige Dutzend Nukleotide vom Beginn bzw. Ende der kodierenden Sequenz entfernt. Dennoch flankieren die Primer die kodierende Sequenz nicht direkt, da die PCR-Amplifikate auch bei sorgfältiger Arbeit durch Exonukleasen bereits vor der Klonierung verkürzt werden können.

**- für die RT-PCR von LOX-Genen (siehe Tabelle 6.3)**

Diese wurden ebenfalls auf Basis der Apfelgenomsequenz erstellt. Der Amplifikationsbereich der jeweiligen Primerpaare überspannt dabei mindestens ein Intron (außer bei *MdLOX2a*, *MdLOX2b*). Dadurch kann aufgrund der Länge des PCR-Amplifikats auf mögliche DNA-Verunreinigungen geschlossen werden. Diese Primer wurden auf Genspezifität geprüft, indem Amplifikate von 29 verschiedenen Sorten sequenziert und ausgewertet wurden. Die Primersequenzen für die Referenzgene standen institutsintern zur Verfügung.

**- für die Kartierung von vier LOX-Genen**

Für die Kartierung der Gene *MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX5e* und *MdLOX7a* durch Kopplungsanalyse wurden die RT-PCR-Primer benutzt, um die Sequenzen zu amplifizieren. Anschließend wurden diese sequenziert und Haplotypen zugeordnet (siehe Tabelle 6.3).

**- für die Kontrolle der RT-PCR**

Die Sequenzen der Primer für *MD-ACO1* (eine ACC-Oxidase, beschrieben von Ross et al. (1992), umbenannt durch Binnie und McManus (2009)) und *MdExp2* (Expansin 2, isoliert und charakterisiert durch Wakasa et al. (2003)) wurden aus Wakasa et al. (2003) entnommen.

**- für die Sequenzierung der klonierten LOX-Gene (siehe Tabelle 6.2)**

Für die erste Sequenzierung, beidseitig flankierend zur Insertionsstelle im Plasmid, wurden die für das pJet1.2-Plasmid spezifischen Primer benutzt (pJet1.2 Forward Sequencing Primer, pJet1.2 Reverse Sequencing Primer). Für die Sequenzierung durch *Primer walking* wurden weitere Primer erstellt auf Grundlage der vorliegenden Sequenzierergebnisse.

### 2.5.5 Bestimmung des verlässlichsten Referenzgenes für die RT-PCR

Um das stabilste Referenzgen für die RT-PCR zu finden, wurde sich an den MIQE-Regeln orientiert (Bustin et al., 2009). Dementsprechend wurde die Abundanz von vier verschiedenen Referenzgenen in allen genutzten Proben bestimmt und mit folgenden drei Microsoft® Excel Add-Ins ausgewertet: GeNorm (Vandesompele et al., 2002), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) und Normfinder (Andersen et al., 2004). Dafür wurden die Daten der qRT-PCR von folgenden vier Referenzgenen genutzt:  $\beta$ -Aktin, Elongationsfaktor  $\alpha$ , RNA-Polymerase II und Rubisco. Diese Prozedur wurde sowohl mit Proben der einzelnen Gewebe als auch separat mit Proben des Fruchtreifeverlaufs durchgeführt.

### 2.5.6 *in silico* Charakterisierung von Lipoxygenase-Genen

#### Funktionelle Domänen

Um die Apfel-LOX-Sequenzen auf bekannte Motive aus funktionellen LOX-Genen zu untersuchen, wurde ScanProsite verwendet (De Castro et al., 2006). Scan-Prosite durchsucht die betreffenden Sequenzen nach bekannten Domänen, Motiven und funktionell

## 2 Material und Methoden

wichtigen Positionen. Die Informationen über bekannte Motive sind in der PROSITE-Datenbank (<http://prosite.expasy.org>) hinterlegt. Bei der Abfrage werden die Proteinprimärsequenzen benutzt. Anhand eines MSAs der LOX-Aminosäuresequenzen wurden folgende bekannte Positionen und Domänen untersucht:

- die Substratbindestelle,
- das aktive Zentrum und
- die Position, welche mutmaßlich die Produktspezifität bestimmt.

### Positionsermittlung im Genom

Um die chromosomale Position der LOX-Gene zu bestimmen, wurde auf die Informationsdaten der entsprechenden Contigs aus der GBrowse-Applikation zurückgegriffen ([http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/malus\\_x\\_domestica](http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/malus_x_domestica)), die auf die Daten der Golden Delicious Genomsequenzierung zurückgeht (Velasco et al., 2010). Eine Kartierung von LOX-Genen durch Kopplungsanalyse wurde nur für wenige LOX-Gene im Rahmen der QTL-Analyse durchgeführt.

### Subzelluläre Lokalisierung

Die intrazelluläre Lage aller mutmaßlich vollständigen LOXs wurde berechnet. Dafür wurden folgende drei Programme mit Standardeinstellungen benutzt: WoLF PSort (Horton et al., 2007), ProtComp ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)), und Cell-PLoc (Chou und Shen, 2008).

### 2.5.7 Kartierung (*mapping*)

Die Grundlage für die Kartierung sind die von Dr. Frank Dunemann (JKI) zur Verfügung gestellten Markerdaten der C3-Individuen. Diese wurden mit Markerdaten von vier LOX-Genen ergänzt. Dafür wurden die PCR-Amplifikate von *MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX5e* und *MdLOX7a* sequenziert und die erhaltenen Sequenzen analysiert. Es wurden die jeweils gekoppelten SNP-Zustände ermittelt. Der resultierende Marker beschreibt damit einen Haplotyp. Die Allele zu einem Haplotyp zusammenzufassen ist möglich, da:

- die einzelnen SNPs auf dem gleichen PCR-Amplifikat und damit sehr eng bei einander liegen und
- keine Segregation der SNP-Allele in der untersuchten Nachkommenschaft festgestellt wurde.

Die Allele des Haplotyps der Eltern und der 30 C3-Nachkommen wurden bestimmt. Diese wurden in die Segregationstypen des Populationstyps CP entsprechend dem JoinMap4-typischen Format (z. B. 'ab' × 'cd' für einen Marker mit vier verschiedenen Zuständen) umgewandelt (Van Ooijen, 2006). Diese Markerinformation wurde dem Datensatz hinzugefügt. Die Karte wurde mit JoinMap4 erstellt (Van Ooijen, 2006). Dabei wurden die Standard-Optionen beibehalten. Grundsätzlich wurden die Gruppen so ausgewählt, dass sie zwingend jeweils die Marker der auf diesen Gruppen liegenden LOX-Gene beinhalten. Der LOD (*logarithm of the odds*)-Wert dieser Gruppierung sollte möglichst hoch

sein, um ein statistische Verlässlichkeit zu garantieren. Der LOD-Wert gibt an, um wieviel wahrscheinlicher es ist, dass eine Vererbung zweier Markerzustände durch Kopplung im Gegensatz zu zufälliger gemeinsamer Vererbung stattfindet. Der LOD-Wert ist dabei der dekadische Logarithmus des Quotienten. Ein LOD-Wert von 3 sagt aus, dass die Wahrscheinlichkeit bei 1 000 zu 1 liegt und ein LOD-Wert von 4 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Vererbung durch Kopplung bei 10 000 zu 1 liegt. Vereinzelt wurden einige Marker ausgeschlossen, um Kopplungsgruppen zu generieren, bei denen die Lage der Marker und die Länge der entstehenden Kopplungsgruppe:

- denen der Elternsorten 'Prima' und 'Discovery' ähnlich sind und
- annähernd den Vergleichswerten aus vorrangig Dunemann et al. (2009) und des weiteren N'Diaye et al. (2008) entsprechen.

### 2.5.8 Assoziationsanalyse

Die QTL-Analyse wurde mit dem Programm MapQTL5 durchgeführt (Van Ooijen, 2004). Ermittelt wurden die QTLs durch *intervall mapping*. Die Standardoptionen wurden nicht verändert. Dafür wurden log-transformierte Aromastoff-Datensätze genutzt, um deren Verteilung mit einer QTL-Analyse zu untersuchen. Es wurden nur QTLs mit einem LOD-Wert von mindestens 3 im *intervall mapping* akzeptiert. Ein 2-LOD-Konfidenzintervall um die Position des höchsten LOD-Wertes wurde bestimmt. Dieses wurde grafisch neben den entsprechenden Kopplungsgruppen durch das Grafikprogramm Inkscape dargestellt (Harrington et al., 2012).

### 2.5.9 Proteinmodellerstellung (*structural modeling*)

Die Proteinmodelle von *MdLOX1a* wurden vorlagenbasiert mit SWISS-MODELL erstellt (Arnold et al., 2006). Dabei wurde im „Automatischen Modus“ gearbeitet. Die Akzession mit der ähnlichsten Primärsequenz wird automatisch gesucht und anhand deren Struktur das Proteinmodell erzeugt.

### 2.5.10 Analyse von Proteinmodellen

Für die Analyse und Darstellung von dreidimensionalen Proteinmodellen wurde PyMOL verwendet (Schrödinger, LLC, 2010). Die Bedienung erfolgte vorrangig mittels selbst geschriebenen Skripten mit Python-Syntax. Die durch den PyMOL-Befehl 'png' erstellten Abbildungen wurden zum Teil mithilfe des Grafikprogramms inkscape mit Ziffern und Nummern ergänzt (Harrington et al., 2012).

### 2.5.11 Grafikbearbeitung

Die Schemata und Abbildungen wurden mit dem Programm inkscape erstellt und skaliert (Harrington et al., 2012). Pixelgrafiken wurden gegebenenfalls importiert. Eine Korrektur an aufgenommenen Bildern (z. B. PCR-Bilder, Fotos des Infektionsversuches) erfolgte nicht.

## 2.6 Künstliche Infektion mit Pathogenen

Um die LOX-Expressionsänderung während der Infektion mit einem tierischen, einem pilzlichen und einem bakteriellen Pathogen zu untersuchen, wurden jeweils anfällige und resistente Apfelgenotypen infiziert. Die Infektion mit dem tierischen Pathogen *Eriosoma lanigerum*, der Apfelblutlaus, wurde bei Dr. Edgar Schliephake (Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz des Julius Kühn-Institutes, Quedlinburg) durchgeführt. In weiteren Experimenten wurden Apfelpflanzen einerseits mit dem Erreger des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) und andererseits mit dem Erreger des Feuerbrands (*Erwinia amylovora*) infiziert. Zu verwendetem Pflanzenmaterial, siehe 2.1. Zu verwendeten Mikroorganismenstämmen, siehe 2.2.

### 2.6.1 Infektion mit Apfelschorf

#### Erzeugung des Inokulates



**Abbildung 2.1:** Die Symptome der Apfelschorfrasse 7 auf einem Blatt der Wildapfelakzession *Malus floribunda* 821.

Es wurden nach längerer Trockenheit Blätter mit deutlichen Schorfsymptomen der

Akzession *Malus floribunda* 821 im Spätsommer des Jahres 2011 gesammelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert (siehe Abbildung 2.1). Im Frühjahr 2012 wurden die Sporen von den Blättern gewaschen und eine Suspension von  $10^9$  kbe (koloniebildende Einheiten)/ml in autoklaviertem Leitungswasser hergestellt. Die Vitalität der Sporen wurde nach 2-tägiger Inkubation bei Raumtemperatur überprüft.

### Infektion

Im Frühjahr 2012 wurden die Apfelpflanzen infiziert. Dafür wurde mit einer Sprühflasche ein Sprühnebel mit Sporensuspension auf junge Blätter aufgebracht. Anschließend wurden Plastiktüten über die Blätter gestülpt und verschlossen, um eine hohe Luftfeuchtigkeit über zwei Tage zu gewährleisten. Es wurden jeweils fünf Pflanzen pro Probennahmezeitpunkt infiziert. Die Auswahl der in einem großen Block auf dem Kulturtisch des Gewächshauszelle stehenden beprobten Pflanzen erfolgte willkürlich, um Standortfaktoren zu minimieren. Eine sogenannte Block-Randomisierung erfolgte nicht. Die Pflanzen der resistenten und anfälligen Sorte standen gemischt. Die Kontrollgruppen, welche mit sporenfreiem, autoklaviertem Leitungswasser gesprüht wurden, standen auf einem etwa 50 cm entfernten Kulturtisch. Die Kontrollgruppe hatten den gleichen Umfang, es handelte sich um 5 Pflanzen pro Beprobungszeitpunkt, die gleichen Beprobungszeitpunkte, die gleichen Sorten, es erfolgte eine willkürliche Auswahl der beprobten Pflanzen zum Probennahmezeitpunkt und keine Block-Randomisierung. Die Versuchspflanzen wurden automatisch bewässert, besprüht und beschattet. Die Materialentnahme und die Prüfung auf Schorfssymptome erfolgte zu folgenden Probennahmezeitpunkten:

- $t_0$ : direkt nach der Infektion
- $t_1$ : 12 h nach Infektion
- $t_2$ : 24 h nach Infektion
- $t_3$ : 48 h nach Infektion
- $t_4$ : 28 Tage nach Infektion

### 2.6.2 Infektion mit Feuerbrand

Die Infektion und Herstellung des Inokulates von *Erwinia amylovora* erfolgte, wie in Vogt et al. (2013a) beschrieben.

### Infektion

Die Pflanzen wurden infiziert, indem die Spitzen der obersten zwei Blätter mit einer in Bakteriensuspension getränkten Schere abgeschnitten wurden (siehe Abbildung 2.2). Dabei wurde höchstens ein Drittel der Blattlänge entfernt, die Schnittlinie war etwa 0,5 bis 1 cm lang. Die Baktiensuspension enthielt  $10^9$  kbe/ml. Es wurden von jeder Sorte für jeden Probennahmezeitpunkt fünf Pflanzen infiziert, deren Sprosslänge mindestens 20 cm betrug. Weiterhin wurden von jeder Sorte für jeden Probennahmezeitpunkt fünf Pflanzen auf die gleiche Weise behandelt ohne dabei mit Bakterien in Kontakt zu kommen (Referenzproben ohne Pathogen). Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer inkubiert und

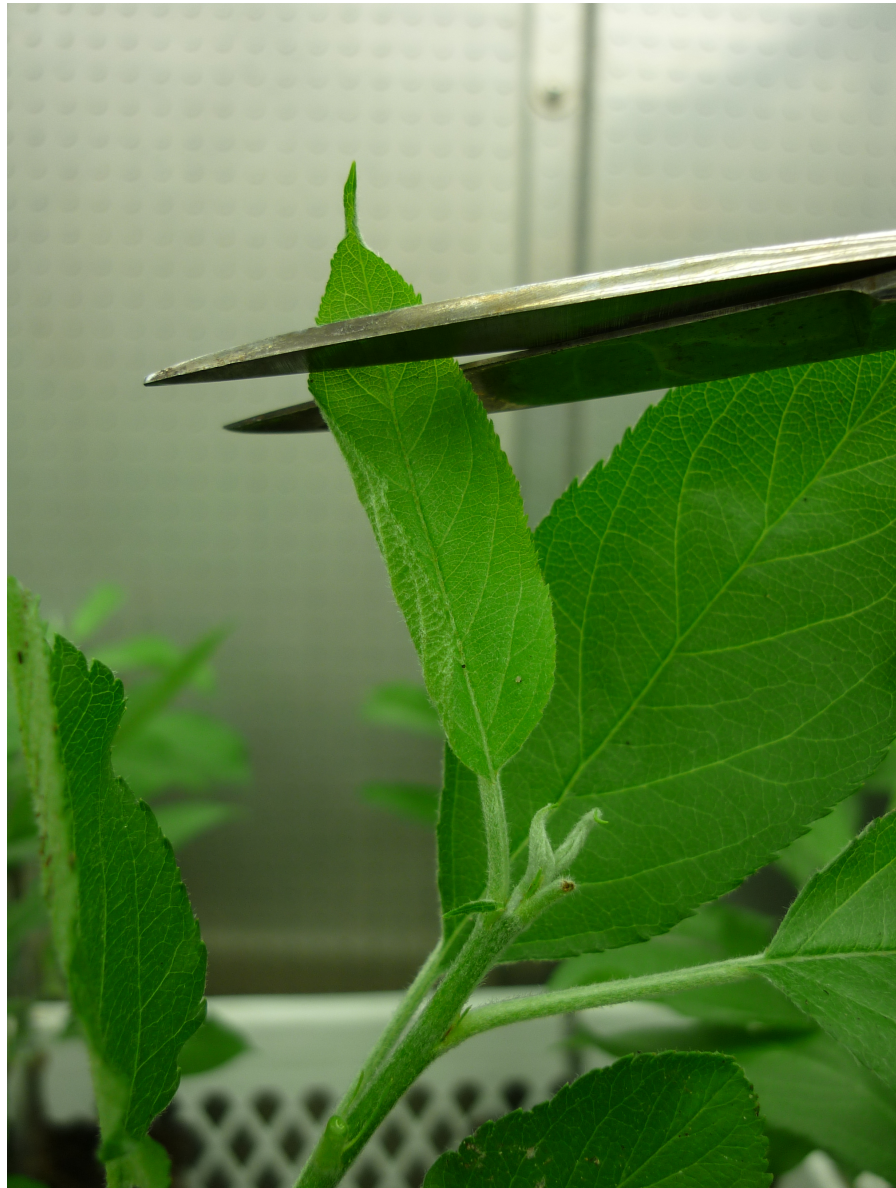


Abbildung 2.2: Die Infektion einer Apfelpflanze mit einer *Erwinia amylovora*-enthaltenden Suspension.



nach Bedarf gegossen. Die Bewertung der Symptome und die Entnahme von Blattmaterial für eine Expressionsanalyse wurden nach folgenden Inkubationszeiten durchgeführt:

- $t_0$ : direkt nach der Infektion
- $t_1$ : 4 h nach Infektion
- $t_2$ : 8 h nach Infektion
- $t_3$ : 24 h nach Infektion
- $t_4$ : 48 h nach Infektion
- $t_5$ : 10 Tage nach Infektion

Dabei wurden stets die obersten noch nicht vertrockneten Blätter gesammelt.

### 2.6.3 Infektion von Apfelpflanzen mit Blattläusen

#### Inkulturnahme der Blattläuse



**Abbildung 2.3: Die Infektion von Apfelpflanzen mit Blattläusen.** Die Blattläuse wurde in ein um den Zweig gelegtes durchsichtiges Plastikröhrchen eingebracht. Dieses wurde oberseits mit Schaumgummi und unterseits mit Parafilm verschlossen.

Die Blattläuse wurden im Herbst 2011 im Versuchsfeld des JKI Dresden-Pillnitz gesammelt und überwinterten an Apfelpflanzen der Sorte 'Gala' bei folgenden Bedingungen:

## 2 Material und Methoden

- 12 °C Minimaltemperatur nachts
- 15 °C Minimaltemperatur am Tag
- ab 20 °C Lüftung
- 13 h Lichtdauer

Im Frühjahr 2012 wurden die Blutläuse in das Institut für Resistenzforschung und Stress-toleranz des Julius Kühn-Institutes, Quedlinburg zu Händen von Herrn Schliephake über-führt. Sie wurden einige Wochen vor Ort kultiviert, um sich an gegebenenfalls abweichen-de Gewächshausbedingungen anzupassen.

### Infektion

Anfang Juni 2012 wurden die Apfelpflanzen mit Blutläusen besetzt. Um den Zweig der Apfelpflanze wurde ein Plastikröhrchen gelegt, welches ca. 3 cm lang war und einen Durchmesser von 1 cm besaß (siehe Abbildung 2.3). Dieses war durchsichtig und der Län-ge nach eingeschnitten, um den Zweig durchzuführen. Verschluss wurde diese Schnitt-stelle, indem das Röhrchen mit Parafilm umwickelt wurde. Die untere Öffnung wurde ebenfalls mit Parafilm verschlossen. Am oberen Ende wurde das Röhrchen mit Schaum-gummi verschlossen, sodass ein Luftaustausch gewährleistet blieb. In dieses Röhrchen wurden 10 vitale Blutläuse (3-5 Imagines und weitere große Blutlaus-Larvenstadien) eingebracht. Die Blutläuse wurden mit einem feinen Pinsel von den Futterpflanzen auf die Versuchspflanzen überführt. Es wurden jeweils 10 Pflanzen pro Probennahmezeit-punkt beprobt. Die Auswahl der in einem großen Block auf dem Kulturtisch des Ge-wächshauszelle stehenden beprobten Pflanzen erfolgte willkürlich, um Standortfaktoren zu minimieren. Eine sogenannte Block-Randomisierung erfolgte nicht. Die mit Blutläu-sen inkubierten resistenten und anfälligen Pflanzen standen gemischt. Die Kontrollgrup-pen, welche nicht infiziert wurden, standen auf einem 1 m entfernten Kulturtisch. Die Kontrollgruppe hatten den gleichen Umfang, es handelte sich um 10 Pflanzen pro Be-probungszeitpunkt, die gleichen Beprobungszeitpunkte, die gleichen Sorten, es erfolgte eine willkürliche Auswahl der beprobten Pflanzen zum Probennahmezeitpunkt und keine Block-Randomisierung.

Die Versuchspflanzen wurden während des Versuches von den Assistenten der Arbeits-gruppe von Herrn Dr. Schliephake per Hand entsprechend der Witterungsbedingungen gegossen. Zu den Probennahmezeitpunkten  $t_1$ - $t_4$  wurde geprüft, ob Blutläuse durch ihren Saugapparat fest mit dem Zweig verbunden waren. Probennahmezeitpunkte:

- $t_0$ : direkt vor Infektion mit Blutläusen
- $t_1$ : Blutlaus-Infektion von 4h
- $t_2$ : Blutlaus-Infektion von 8h
- $t_3$ : Blutlaus-Infektion von 24h
- $t_4$ : Blutlaus-Infektion von 48h

Es wurden jeweils Proben von Blättern unterhalb und oberhalb der Saugstelle gesam-melt. Die Proben wurden bei  $-80\text{ °C}$  gelagert, auf Trockeneis in das JKI Dresden-Pillnitz überführt und dort bis zur RNA-Isolation bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Die Isolation der RNA, die Synthese von cDNA und Expressionanalyse mittels RT-PCR erfolgte ab Herbst 2012 im JKI Dresden-Pillnitz.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bioinformatische Analysen

#### 3.1.1 Sequenzanalyse

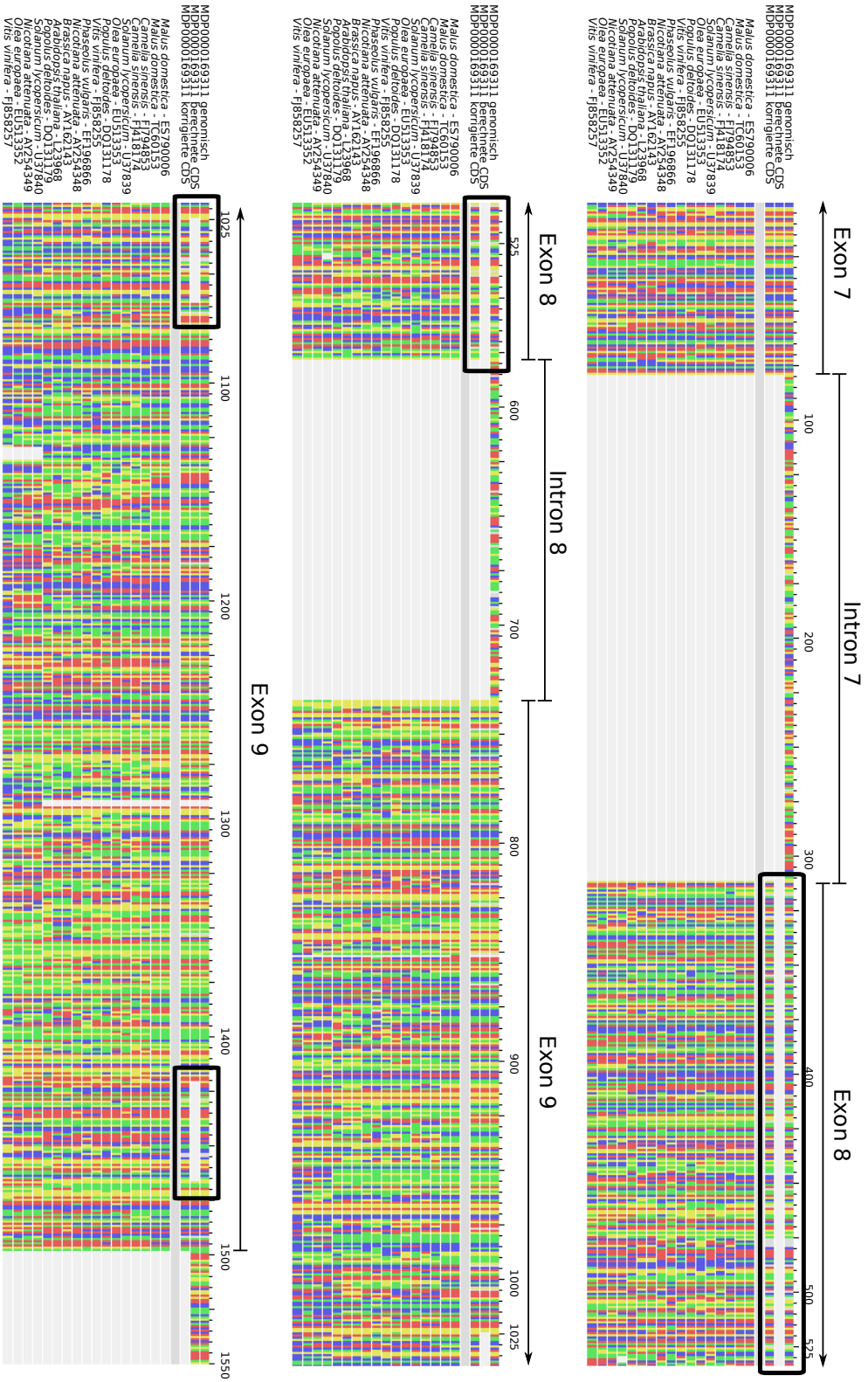
##### Sequenzidentifizierung innerhalb der Apfel-Genomsequenz (*gene mining*)

Um einen Überblick über die LOX-Genfamilie des Apfels zu erhalten, wurde innerhalb der von Velasco et al. (2010) veröffentlichten Golden Delicious Genomsequenz nach LOX-ähnlichen Sequenzen gesucht (*gene mining*). Bei der BLAST-Suche wurden von Schaffer et al. (2007) veröffentlichte LOX-ESTs benutzt und durch diese die vollständig sequenzierten Gene in der MDP (*Malus domestica protein*)-Datenbank der Golden Delicious Genomsequenz identifiziert. ESTs repräsentieren exprimierte Sequenzen, darunter auch die mRNA. MDPs sind aus genomischen Sequenzen *in silico* berechnete mRNA-Sequenzen. Ein MSA der etwa 40 gefundenen Sequenzen mit hoher Sequenzähnlichkeit und weiteren 122 veröffentlichten pflanzlichen LOX-cDNA-Sequenzen wurde benutzt, um konservierte Bereiche zu identifizieren (MSA nicht gezeigt, siehe Anhang Tabelle 6.5 für die Akzessionsnummern der Sequenzen). Es verblieben 25 Sequenzen, die basierend auf ihrer Sequenz vorläufig als funktionell eingestuft werden.

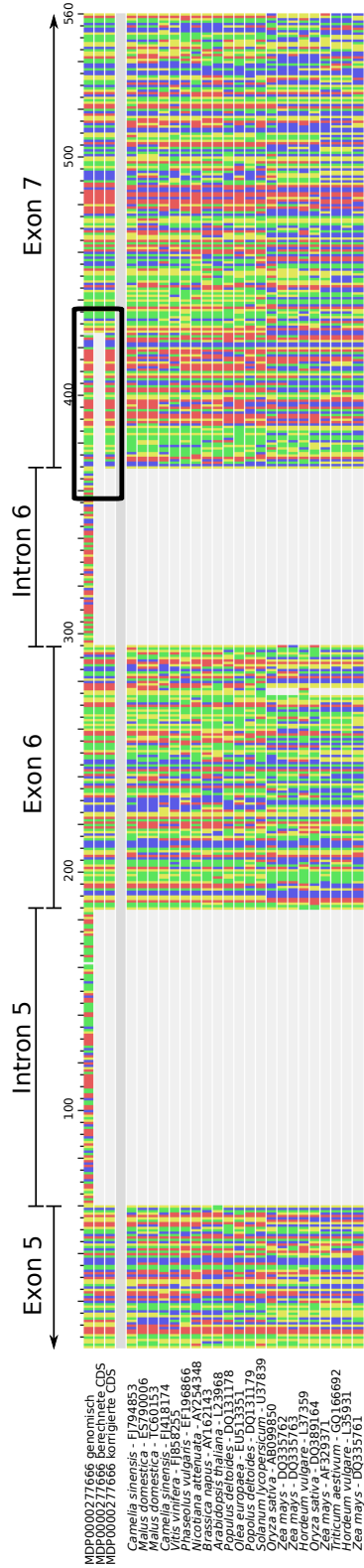
##### Überprüfung und Korrektur der Intron-Exon-Grenzen

Zur Überprüfung der Grenzen von Introns und Exons der berechneten LOX-CDSs wurde ein MSA benutzt. Das MSA beinhaltet 102 LOX-cDNA-Sequenzen aus 32 verschiedenen bedecktsamigen Pflanzen und die 25 identifizierten Apfel-LOX-MDPs sowie deren genomische Sequenzen (MSA nicht gezeigt, siehe Anhang Tabelle 6.6 für die Akzessionsnummern der Sequenzen).

Beispielhaft sind für *MdLOX5a* und *MdLOX6a* Teile aus den Alignments in den Abbildungen 3.1 und 3.2 gezeigt. Bei der computerbasierten Annotation von *MdLOX5a* im Rahmen der Studie von Velasco et al. (2010) wurde das Exon 8 (MSA-Position 312 bis 578) als Intron annotiert und nicht als Teil der CDS angegeben. Ein weiteres Intron wurde im Bereich 1025-1065 im MSA berechnet. Aufgrund des MSA-Profiles ist anzunehmen, dass es sich dabei um eine Exonsequenz handelt. Gleiches gilt für ein 46 bp langes Sequenzstück zwischen Position 1420 und Position 1466 im MSA. Da das Spleißen dieser Sequenz *in vivo* zur Leserasterverschiebung führen würde, wird an der für LOXs typischen Stelle kein Stopp-Codon gelesen (Position 1496). Erst nach weiteren 56 bp einer mutmaßlichen 3'UTR (untranslatierte Region) bei Position 1555 würde ein Stopp-Codon gelesen. Das Ende der CDS ist bei LOX-Genen hochgradig konserviert und die letzte Aminosäure in der Proteinprimärsequenz besitzt wichtige funktionelle Eigenschaften. Diese



**Abbildung 3.1: Ausschnitt eines Sequenzalignments zur Ermittlung der Intron-Exon-Grenzen von *MLOX5a* im Fingerprint-Ansicht.** Neben der genomischen Sequenz, der originalen MDP-Sequenz und der korrigierten MDP-Sequenz sind die 17 ähnlichsten der 102 LOX-cDNA-Sequenzen verschiedener Angiospermen abgebildet. Die Akzessionsnummern und der jeweilige Ursprungsorganismus sind angegeben. Die Introns und Exons sind angegeben. An verschiedenen Stellen sind Sequenzabschnitte nicht entsprechend des vorliegenden MSA-Profiles annotiert (schwarze Kästchen). Die Nummerierung bezieht sich allein auf den MSA-Abschnitt, nicht auf die Gesamtlänge eines der Gene.



**Abbildung 3.2: Ausschnitt eines Sequenzalignments zur Ermittlung der Intron-Exon-Grenzen von *MdLOX6a* in fingerprint-Ansicht.** Neben der genomischen Sequenz, der originalen MDP-Sequenz und der korrigierten MDP-Sequenz sind die 22 ähnlichsten der 102 LOX-cDNA-Sequenzen verschiedener Angiospermen abgebildet. Die Akzessionsnummern und der jeweilige Ursprungsorganismus sind angegeben. Die Introns und Exons sind angegeben. In diesem Abschnitt ist ein Sequenzabschnitt flankierend zu Intron 6 nicht entsprechend des vorliegenden MSA-Profiles annotiert (schwarzes Kästchen). Die Nummerierung bezieht sich allein auf den MSA-Abschnitt, nicht auf die Gesamtlänge eines der Gene.

### 3 Ergebnisse

Überlegungen führten dazu, die berechnete CDS in diesem beispielhaften Abschnitt an genannten Stellen manuell zu korrigieren.

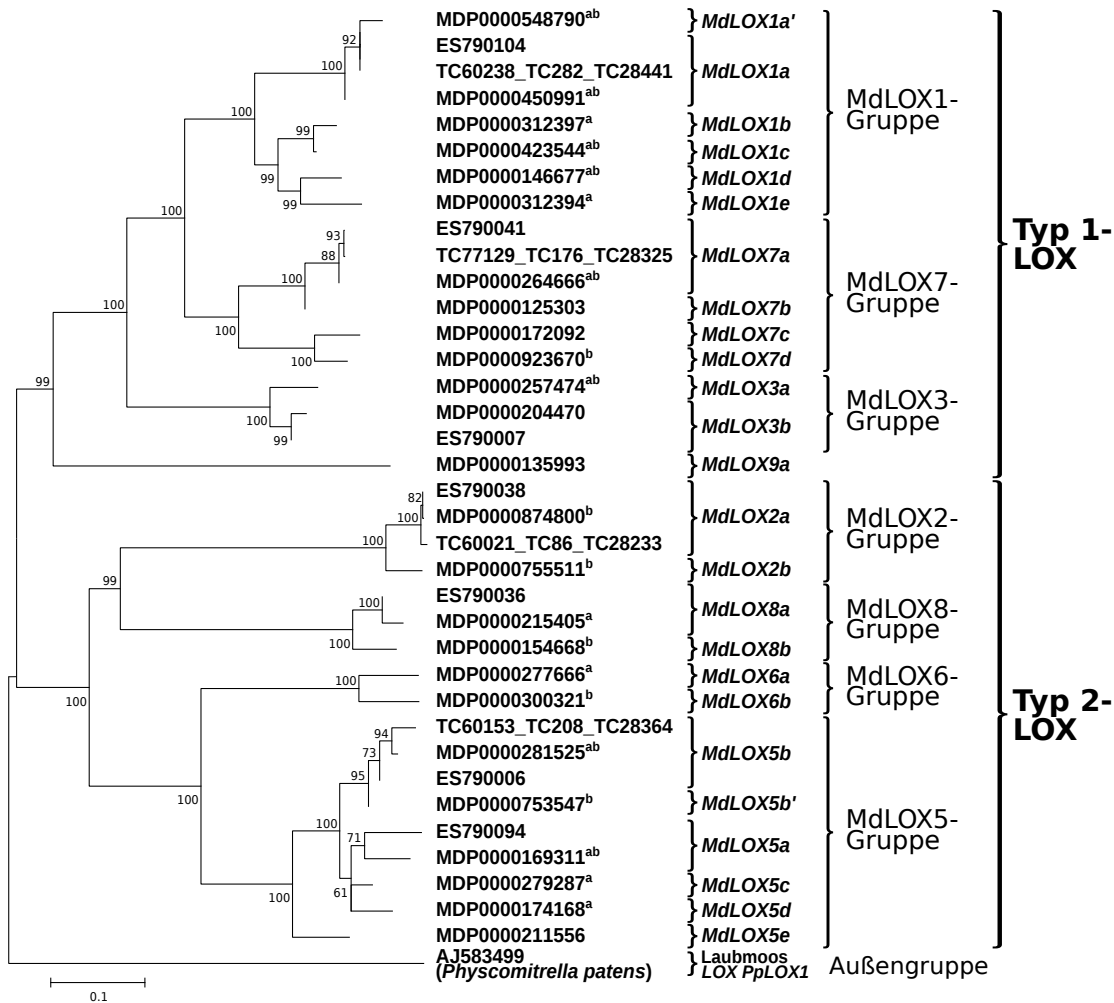
Bei *MdLOX6a* wurde flankierend zu Intron 6 eine 56 bp lange Sequenz dem Intron zugerechnet (Abbildung 3.2). Die Grenze zwischen Intron 6 und Exon 7 ist im MSA-Profil an Stelle 370 im MSA konserviert. In diesem Fall sprechen weitere Sequenzeigenschaften dieses Bereiches gegen die Richtigkeit der computerbasierten Intronberechnung, weshalb der betreffende Bereich dem Exon 7 zugeordnet wurde:

- Die Nukleotidsequenz (ermittelt aus der Contig-Sequenz dieser MDP-Akzession) entspricht der durch das MSA-Profil vorgegebenen Sequenz. Es kommt dabei nicht zu codonbedingten Transkriptionsabbrüchen oder Leserasterverschiebungen.
- An der durch das MSA-Profil vorgegebenen Spleißstelle befindet sich das Dinukleotid AG welches als Akzeptor im Spleißprozess bekannt ist.

Insgesamt wurden 14 der 25 Sequenzen manuell korrigiert (<sup>a</sup> in Abbildung 3.3). Nachfolgend wurden die Intron-Exon-Grenzen bei 12 LOX-Genen (bzw. 14 Sequenzen) überprüft (<sup>b</sup> in Abbildung 3.3). Verglichen wurden die Intron-Exon-Grenzen von zum Teil korrigierten CDSs und von klonierten cDNA-Sequenzen. Die cDNA-Sequenzen entstammen der Arbeit von Schiller et al. (2015). Acht der 14 geprüften Sequenzen wurden vorher manuell korrigiert, bei sechs geprüften Sequenzen wurden die festgelegten Grenzen der Golden Delicious-CDS-Annotation beibehalten. Es konnte keine Abweichungen zwischen den zum Teil korrigierten CDSs der MDP-Sequenzen und den klonierten cDNA-Sequenzen gefunden werden. Die gegenüber der Golden Delicious-MDP-Datenbank teilweise geänderte Festlegung der Intron-Exon-Grenzen einiger LOXs reflektiert den tatsächlichen Zustand *in vivo*. Abgesehen von vier Sequenzen (MDP0000312394, MDP0000548790, MDP0000125303 und ES790007) besitzen alle LOX-Gene neun Exons und acht Introns.

#### Phylogenetische Analyse der identifizierten LOX-Sequenzen

Insgesamt wurden 25 LOX-Gensequenzen in der Apfelgenomsequenz gefunden, welche aufgrund ihrer Primärsequenz als 23 funktionelle Gene kategorisiert wurden. Mit diesen und mit den bekannten LOX-Sequenzen aus dem DFCI Apple Gene Index und den von Schaffer et al. (2007) beschriebenen LOX-ESTs wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 3.3). Die hier eingeführte Nomenklatur der Gene richtet sich nach einem Vorschlag von Meinke und Koornneef (1997) für *Arabidopsis thaliana*. Die Buchstaben 'Md' bezeichnen den Ursprungsorganismus *Malus × domestica*. Die Arabischen Ziffern wurden bereits von Schaffer et al. (2007) benutzt, um verschiedene LOX-Gene zu unterscheiden. Ein LOX4-Gen ist nicht aufgeführt, da das von Schaffer et al. (2007) aufgelistete LOX4-Gen, basierend auf Sequenzanalysen, keine Lipoxygenasefunktion besitzt. Es fehlen die typischen konservierten Motive. In dieser Studie wurden mehr als die acht von Schaffer et al. (2007) identifizierten LOX-Gene gefunden. Um die einzelnen Gene sicher zu unterscheiden, wurde ein Kleinbuchstabe angehängt. Die 23 LOX-Gene können auf Basis ihrer Sequenzähnlichkeit in 7 Gruppen zusammengefasst werden. Allein *MdLOX9a* wird keiner Gruppe zugeordnet, da dessen Primärsequenz abweicht.



**Abbildung 3.3: Phylogenetischer Baum der identifizierten LOX-Nukleotidsequenzen des Apfels.** Neben den identifizierten LOX-Sequenzen, die eine MDP-Akzessionsnummer besitzen, sind auch die bereits durch Schaffer et al. (2007) beschriebenen Apfel-LOX-ESTs (ES-Akzessionsnummern) und die von Park et al. (2006) genutzten 'tentative cluster' (TC-Akzessionsnummern) innerhalb des phylogenetischen Baumes aufgeführt. Eine LOX aus dem Moos *Physcomitrella patens* wurde als Außengruppe benutzt, um dem Baum eine Wurzel zu geben. Vielfach sind mehrere Sequenzen aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit als ein Gen annotiert (siehe z. B. ES790036 und MDP0000215405 als *MdLOX8a*). Mehrfach sind sich Nukleotidsequenzen von unterschiedlichen Genen so ähnlich, dass ein gemeinsamer Ursprung angenommen wird. Sie werden zu einer Gengruppe zusammengefasst (z. B. die MdLOX8-Gruppe). Bei einigen MDP-Sequenzen wurden die Grenzen zwischen den Introns und Exons manuell korrigiert (<sup>a</sup>). Sowohl korrigierte MDPs als auch Sequenzen, bei denen die ursprünglichen Festlegung beibehalten wurde, wurden mit von Schiller et al. (2015) klonierten und sequenzierten cDNA-Sequenzen verglichen (<sup>b</sup>).

**Tabelle 3.1: Identitätswerte der Apfel-LOX-Gene und -Proteine.** Die durchschnittlichen Identitätswerte ( $\emptyset$ ) und die minimale (Min) und maximale Identität (Max) aller Apfel-LOX-Gene und -Proteine sind typgetrennt aufgelistet. Diese Daten für nur jeweils ein Gen oder Protein pro LOX-Gruppe zu erheben, ist für Literaturvergleiche sinnvoll, da Maximal- und  $\emptyset$ -Wert durch die hohe Identität innerhalb der LOX-Gen-Gruppen stark verfälscht werden.

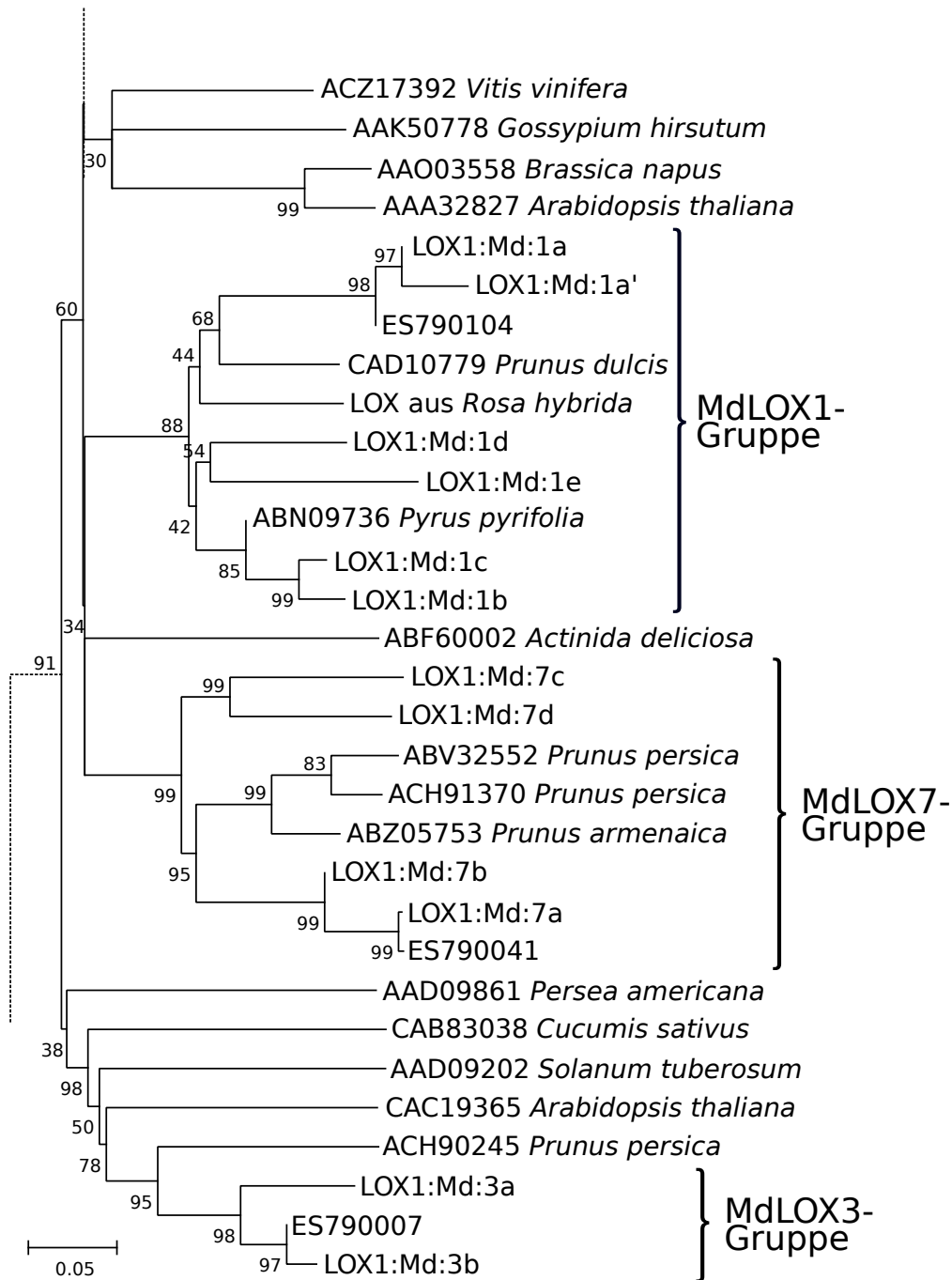
	nur jeweils das Gen „a“ jeder LOX-Gruppe	alle 23 Apfel-LOX- Gene	nur jeweils das Protein von Gen „a“ jeder LOX-Gruppe	alle 23 Apfel-LOX- Proteine
$\emptyset$ in Typ 1	63	73	56	67
Max in Typ 1	73	97	66	95
Min in Typ 1	55	55	47	46
$\emptyset$ in Typ 2	57	66	50	59
Max in Typ 2	66	94	63	93
Min in Typ 2	54	53	45	44

Das LOX-Phylogramm teilt sich an seiner Basis in zwei Teilbäume. Diese Baumarchitektur reflektiert die Unterscheidung von LOXs in Typ 1-LOXs (*type 1-LOXs*) und Typ 2-LOXs (*type 2-LOXs*) anhand ihrer Sequenzähnlichkeit („*LOX1*“ und „*LOX2*“ nach Shibata et al. (1994), später geändert zu „*type 1-LOX*“ und „*type 2-LOX*“ nach Feußner und Wasternack (2002)). Die Typ 1-LOXs haben eine hohe Sequenzähnlichkeit von bis zu 75 %, die Typ 2-LOXs zeigen nur eine geringe Sequenzähnlichkeit von etwa 35 % (Feußner und Wasternack, 2002). Laut Tabelle 3.1 sind die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der Typ 1-LOXs des Apfels zueinander durchschnittlich 63 % bzw. 56 % identisch. Die Nukleotid- und die Proteinprimärsequenz der Typ 2-LOXs sind zueinander durchschnittlich 57 % bzw. 50 % identisch. Die LOX-Proteinsequenzen wurden von den LOX-Gensequenzen *in silico* abgeleitet.

Für alle abgeleiteten LOX-Proteine wird die weitverbreitete Nomenklatur benutzt, die von Shibata et al. (1994) vorgeschlagen und von Feußner und Wasternack (2002) eingeführt wurde. Der Name beinhaltet die Proteinfunktion (LOX), den LOX-Typ, den Ursprungsorganismus und Arabische Zahlen zur Unterscheidung der einzelnen Proteine fortlaufend nach deren Entdeckung. Zum Beispiel war LOX1:St:1 die erste Typ 1-LOX, die in *Solanum tuberosum* entdeckt wurde (Casey, 1995). Um falsche Zuordnungen von Genen zu Proteinen zu vermeiden, wird für die LOX-Proteine des Apfels vorgeschlagen, dass die Identifikationsnummern der Gene (bestehend aus einer Arabischen Ziffer und einem kleinen Buchstaben) unverändert übernommen werden. Folglich heißt das aus dem *MdLOX2a*-Gen resultierende Protein LOX2:Md:2a, da es sich auf Basis der bioinformatischen Analysen um eine Typ 2-LOX handelt (siehe Abbildung 3.3).

Abschließend wurden die Protein-Primärsequenzen der anfangs benutzten 122 LOX-cDNA-Sequenzen erneut mit den 25 Apfel-CDS-Sequenzen in einem MSA verrechnet. Aus diesem MSA wurde ein phylogenetischer Baum und eine Identitätsmatrix erstellt. Weder MSA noch phylogenetischer Baum noch Identitätsmatrix lassen sich aufgrund ihres Informationsgehaltes in ihrer Gesamtheit übersichtlich darstellen. Die Abbildung 3.4





**Abbildung 3.4:** Ausschnitt des Phylogramms von 25 Apfel-LOX- und 122 weiteren Angiospermen-LOX-Proteinsequenzen. Die LOX-Proteine des Apfels sind unter ihrer systematischen Bezeichnung eingetragen. Andere aus cDNA-Sequenzen abgeleitete Angiospermen-LOX-Proteinsequenzen sind mit deren Akzessionsnummer und dem Namen des Ursprungsorganismus bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

zeigt einen Ausschnitt des Phylogramms.

Die Werte in der Identitätsmatrix zeigen, dass die Primärsequenzen von LOXs einer Pflanzenart einander oft weniger ähnlich sind, als jene von LOXs verschiedener Pflanzenarten (Identitätsmatrix nicht gezeigt). Die Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana*-LOXs besitzen z. T. unter 40 % Identität (AAA32827 zu CAG38328 oder AAA32827 zu AAA32749). Dagegen ist die Sequenz AAA32827 zu LOX1:Md:1a 67,4 % identisch. Dies kann auch für *Solanum tuberosum*-LOXs festgestellt werden. Die Identität zwischen CAA65268 und LOX2:Md:6a beträgt 62,2 %. Die Identität zwischen den *Solanum tuberosum*-LOXs CAA65268 und AAD09202 nur 37,1 %. Auch eine LOX aus *Cucumis sativus* (CAB83038) ist mit 66,6 % zu LOX1:Md:3a in höherem Grad identisch, als die *Cucumis sativus*-LOXs CAB83038 und CAA63483 zueinander (56,4 %).

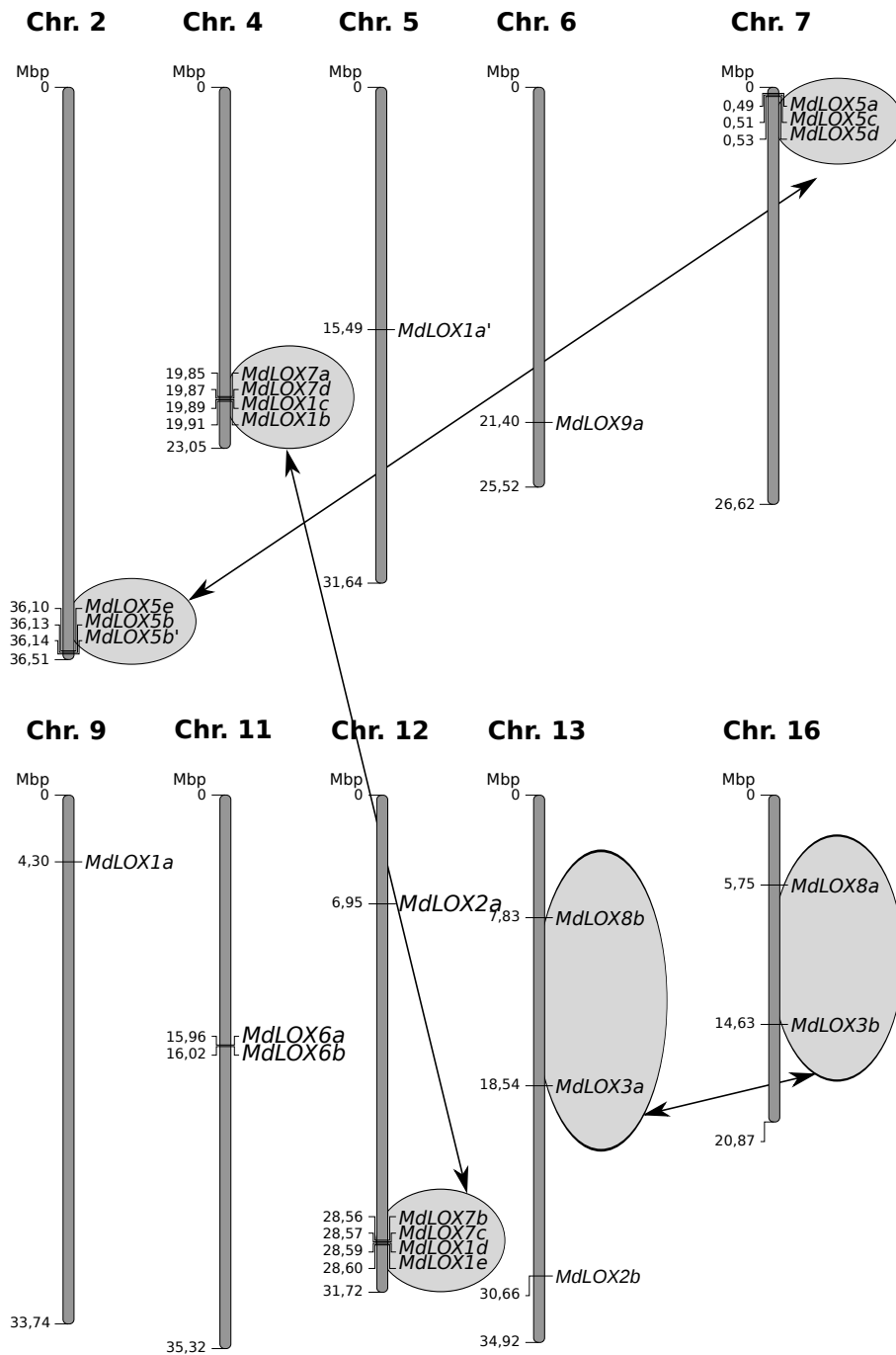
Innerhalb der Teilbäume, in denen alle Apfel-LOXs der jeweiligen Gruppe stehen, sind weitere LOXs aus unterschiedlichen Tribi der Rosengewächse zu finden (Abbildung 3.4). Abgebildet ist ein Ausschnitt eines *Neighbor-Joining*-Baumes, erstellt mit *p-distance*-Substitutionsmodell und geprüft durch die *bootstrap*-Methode mit 1000 Replikaten. Die Baumarchitektur zeigt, dass LOX1:Md:1c zu *Pyrus pyrifolia*-LOX (ABN09736) ähnlicher ist, als zu LOX1:Md:1a, zu LOX1:Md:1d oder zu LOX1:Md:1e. Die LOXs von *Prunus dulcis* (CAD10779) und *Rosa hybrida* sind ähnlicher zu LOX1:Md:1a als LOX1:Md:1a zu LOX1:Md:1b. Die LOXs von *Prunus armenaica* und *Prunus persica* (ABZ05753, ACH91370, ABV32552) sind jeweils ähnlicher zum Protein LOX1:Md:7a, als LOX1:Md:7a zu LOX1:Md:7c oder LOX1:Md:7d. Je nachdem, welches Substitutionsmodell gewählt wird, unterscheiden sich die phylogenetischen Bäume leicht.

#### 3.1.2 Ermittlung der Genposition im Genom (*mapping*)

Die Lage der 23 Gene (25 Sequenzen) innerhalb des Genoms ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

Einzelne LOX-Gene, aber auch Gruppen von bis zu vier LOX-Genen konnten auf den Chromosomen 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 und 16 festgestellt werden. Zur Erstellung der Abbildung 3.5 wurden die Informationen aus der publizierten Genomsequenz benutzt (Velasco et al., 2010). Ein Mapping im Sinne der Positionsermittlung einzelner Gene in einer Kopplungskarte durch Segregationsanalyse von Markerdaten wurde nur für wenige Gene im Zusammenhang mit der QTL-Analyse durchgeführt. Velasco et al. (2010) führen die heutige Genomorganisation auf ein GWD zurück. Paraloge Gene und Regionen besitzen einen gemeinsamen Vorfahren. Die MdLOX5-Gengruppen auf den Chromosomen 2 und 7, die MdLOX1/MdLOX7-Gengruppen auf den Chromosomen 4 und 12 und Gene der Gruppen MdLOX3 und MdLOX8 auf den Chromosomen 13 und 16 liegen in paralogen Regionen.

Die Umgebung der physikalischen Gencluster MdLOX5 und MdLOX1/MdLOX7 wurde genauer betrachtet. Die Annotation der nahe gelegenen Gene jeweils beider Chromosomen wurde verglichen (siehe Anhang, Abbildungen 6.2 und 6.3). In unmittelbarer Nähe der jeweiligen Gencluster sind die gleichen Genfunktionen annotiert. Dies unterstützt die Theorie des gemeinsamen Ursprungs dieser Genomregionen und der darin lokalisierten LOX-Gene (Velasco et al., 2010).



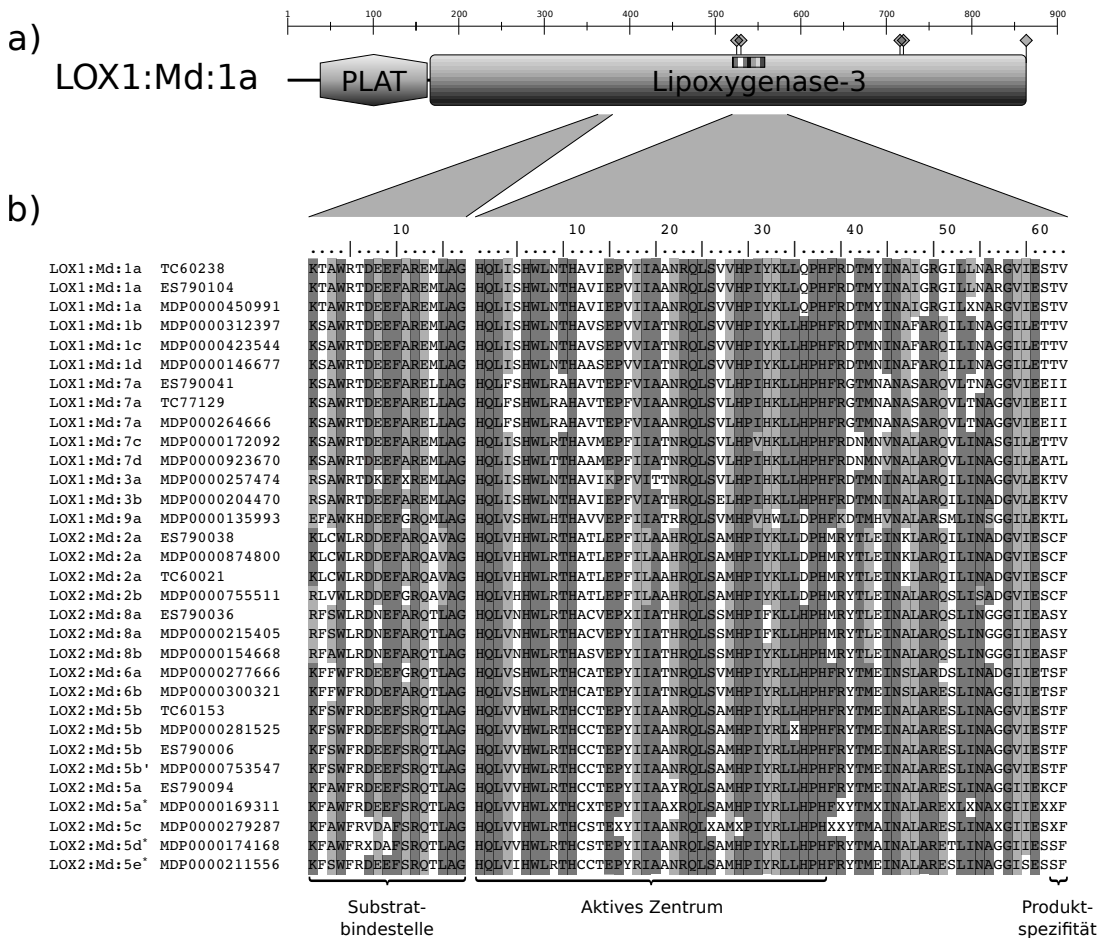
**Abbildung 3.5: Positionen der identifizierten LOX-Gene im Genom des Apfels.** Die jeweilige physikalische Position der identifizierten LOX-Gene ist auf den entsprechenden Chromosomen angegeben. Es sind nur Chromosomen dargestellt, die funktionelle LOX-Gene besitzen. Die Gene und die Gengruppen, die auf laut Velasco et al. (2010) paralogenen Chromosomenregionen liegen, sind durch graue Ellipsen und diese durch Verbindungslinien gekennzeichnet.

#### 3.1.3 Funktionelle Motive und Produktspezifität

Um einen Einblick in die wahrscheinliche Funktion der identifizierten LOX-Gene zu erhalten, wurden die typischen funktionellen Domänen bestimmt. Das ScanProsite Programm wurde benutzt, um die LOX-Protein-Sequenzen zu analysieren, die von den unveränderten, sowie von den manuell korrigierten MDP-Sequenzen abgeleitet wurden.

Die typische Domänenstruktur eines LOX-Proteins ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Hervorgehoben sind die PLAT-Domäne (Polycystin-1, lipoxygenase, alpha toxin, Pfam: PF01477), die Lipoxygenase 3-Domäne (C-terminale Domäne, Pfam: PF00305), das aktive Zentrum und die Aminosäuren, welche durch ihre Seitenketten das katalytisch aktive Eisen-Ion komplexieren. Einigen Sequenzen fehlten wichtige Motive in der nicht manuell korrigierten CDS (LOX2:Md:5a, LOX2:Md:1c), sie hatten einen ungewöhnlich langen N-Terminus (LOX1:Md:1b) oder zeigten eine stark abweichende Domänenstruktur (LOX2:LOX:5c). Die korrigierten Sequenzen besitzen die erwarteten typischen LOX-Protein-Domänen. Neunzehn LOXs besitzen sowohl die PLAT-Domäne als auch die Lipoxygenase-3-Domäne. Einundzwanzig LOXs enthalten alle fünf wichtigen Aminosäuren für die Komplexierung des Eisenions. Diese Ergebnisse wurden parallel durch ein MSA geprüft (Ausschnitt in Abbildung 3.6b). Auch die Substratbindestelle wurde analysiert. Abgesehen von LOX1:Md:1e, LOX1:Md:1a', LOX1:Md:7b und LOX1:Md:3b (ES790007), deren Sequenzdaten am N- oder C-Terminus unvollständig sequenziert sind, besitzen alle LOXs sowohl die hochkonservierte Substratbindestelle, als auch die für die Produktspezifität verantwortliche Position, die in Säugetier-LOXs der sogenannten SLOANE-Position entspricht (Hornung et al., 1999).

Pflanzliche LOXs werden neben der Typ-Klassifizierung weiterhin auf Basis ihrer katalytischen Aktivität in zwei Gruppen eingeteilt. Da die Produktspezifität durch strukturelle Eigenschaften vorgegeben ist, gibt ein MSA der Proteinprimärsequenzen Hinweise auf die Spezifität von biochemisch nicht charakterisierten LOXs. Ein MSA, welches neben den Apfel-LOXs nur biochemisch charakterisierte LOXs enthält, wurde benutzt, um einen phylogenetischen Baum zu berechnen. Die Position der Apfel-LOXs innerhalb dieses Baumes, ermöglicht eine Vorhersage über die wahrscheinliche Spezifität. Besonders das Vorkommen bestimmter Aminosäuren an der SLOANE-Position bestimmt die LOX-Spezifität (Hornung et al., 1999). Alle biochemisch charakterisierten Proteine innerhalb des 9-LOX-Zweiges des phylogenetischen Baumes (Abbildung 3.7) besitzen die Aminosäuren T und V an dieser Position. Alle charakterisierten Proteine innerhalb des 13-LOX-Zweiges zeigen eine der Aminosäuren S, T, C oder A an der stärker variablen ersten und F an der zweiten Position. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der MdLOX1-, MdLOX3- und MdLOX7-Gruppe stehen innerhalb des 9-LOX-Zweiges und besitzen, abgesehen von LOX1:Md:7a, die Aminosäuren T und V an den entsprechenden Positionen (vgl. Abbildung 3.6). Für diese wird vorläufig 9-LOX-Funktion angenommen. Andererseits erscheinen die abgeleiteten Proteinsequenzen der MdLOX2-, MdLOX5-, MdLOX6- und MdLOX8-Gruppe innerhalb des 13-LOX-Zweiges und besitzen S, T oder C an der ersten Position und F an der zweiten Position. Für die LOXs dieser Gruppen wird 13-LOX-Funktion vorausgesagt. Eine Ausnahme stellt LOX2:Md:8a mit den Aminosäuren S und Y dar.



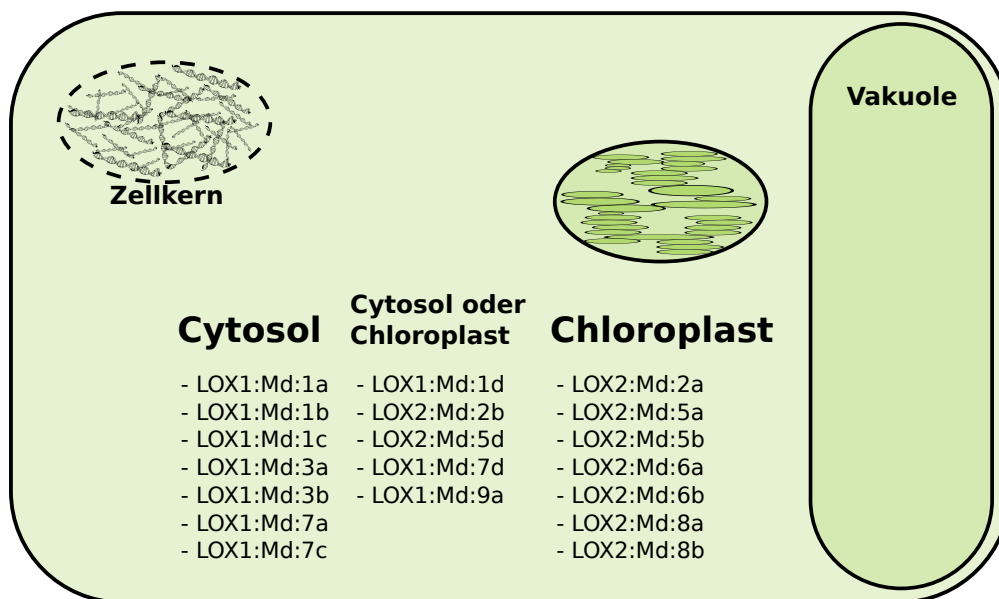
**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der Primärstruktur eines typischen Lipoxygenaseproteins (a) und das Alignment von konservierten Bereichen der abgeleiteten Aminosäuresequenz (b). a) LOXs besitzen N-terminal eine PLAT-Domäne und C-terminal die Lipoxygenase-3-Domäne. Weiterhin sind fünf Aminosäuren bekannt, die mit ihren Seitenketten das Eisen-Ion komplexieren (graue Rauten). Die Aminosäuren im aktiven Zentrum sind hochkonserviert (schraffiertes Rechteck). b) Neben dem aktiven Zentrum ist auch die Aminosäuresequenz der Substratbindestelle konserviert. Ein großer Einfluss auf die Produktspezifität wird zwei Aminosäurepositionen zugeschrieben, die nahe des aktiven Zentrums liegen und der sogenannten SLOANE-Position in Wirbeltier-LOXs entspricht (Hornung et al., 1999). Die Akzessionsnummern der Sequenzen und die LOX-Proteinbezeichnungen sind angegeben.



### 3.1.4 Subzelluläre Lokalisierung

Mit Hilfe von drei verschiedenen Programmen, wurde die subzelluläre Lokalisierung der LOX-Proteine berechnet. Diese Berechnung geht vorrangig auf das Vorhandensein und die Aminosäurezusammensetzung eines N-terminalen Signalpeptids zurück. Das N-terminale Signalpeptid ist eine wichtige Eigenschaft von Typ 2-LOXs (Feußner und Wasternack, 2002). Generell befinden sich Typ 1-LOXs innerhalb des Cytosols, Typ 2-LOXs werden aufgrund der N-terminalen Signalsequenz zu den Chloroplastenmembranen transportiert (Heitz et al., 1997).

Die Proteine, welche innerhalb des Cytosols vorhergesagt wurden, sind Typ 1-LOXs und jene innerhalb der Chloroplastenmembran sind Typ 2-LOXs (Abbildung 3.8). Einige Proteine wurden durch die unterschiedlichen Programme unterschiedlich vorhergesagt. LOX2:Md:2b und LOX2:Md:5d wären aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den Gengruppen als in den Chloroplastenmembranen lokalisiert vermutet worden und LOX1:Md:1d und LOX1:Md:7d innerhalb des Cytosols, aber die Vorhersageergebnisse der Programme waren nicht einheitlich. Die genaue Aufschlüsselung, welche Vorhersage durch das jeweilige Programm getroffen wurde, findet sich in Tabelle 6.7 im Anhang.



**Abbildung 3.8: Subzelluläre Lokalisierung der LOX-Proteine.** Schematisch dargestellt sind die Vorhersageergebnisse der Programme WoLF PSort, ProtComp und Cell-PLoc. Für die fünf LOX-Proteine LOX1:Md:1d, LOX2:Md:2b, LOX2:Md:5d, LOX1:Md:7d, LOX1:Md:9a waren die Vorhersageergebnisse nicht eindeutig (siehe dazu auch Tabelle 6.7 im Anhang).

## 3.2 Klonierung von Lipoxygenase-Genen des Apfels

Es wurden Primer erstellt, um aus verschiedenen Apfelsorten die entsprechenden LOX-Gene zu klonieren und zu sequenzieren. Dafür wurden die Sequenzdaten der von Velasco et al. (2010) ermittelten Genomsequenz benutzt. Neben der Sorte 'Golden Delicious', die als Genotyp für die Sequenzierung des Apfelgenoms genutzt wurde, wurde die DNA weiterer fünf Sorten mit unterschiedlichen Aromaprofilen als Ausgangsmaterial benutzt.

Es konnten 30 Sequenzen durch eine PCR-basierte Strategie kloniert werden (Tabelle 3.2). Diese beinhalten die komplette CDS.

Diese 30 Sequenzen repräsentieren insgesamt acht Gene, die sowohl für Typ 1-LOXs (*MdLOX1a*, *MdLOX3a*, *MdLOX7a*, *MdLOX9a*) als auch für Typ 2-LOXs kodieren (*MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX8a*, *MdLOX8b*). Nach der Übermittlung an die NCBI GenBank erhielten die Sequenzen ihre Akzessionsnummern. Bezüglich der Sorte 'Golden Delicious' konnten alle durch die Genomsequenz vorgegebenen Gene bestätigt werden. Jeweils sieben Sequenzen konnten aus der DNA von 'McIntosh' und 'Discovery' erhalten werden und jeweils eine Sequenz aus 'Alkmene' und 'Royal Gala'. In acht Fällen konnten zwei Allele aus DNA einer Sorte mit den genspezifischen Primern isoliert werden. In diesen Fällen kann bezüglich dieser Gene von Heterozygotie ausgegangen werden (z. B. *MdLOX1a* in 'Golden Delicious'). Die aus genomischer DNA isolierten Sequenzen sind durchschnittlich etwa 4 kb lang. Sie enthalten die Introns, aber nicht die UTRs des Gens. Die von der Gensequenz abgeleiteten Proteine sind zwischen 842 Aminosäuren (Genprodukt von *MdLOX9a*) und 944 Aminosäuren (Genprodukt von *MdLOX8a*) lang. Von *MdLOX1a* und *MdLOX7a* wurden jeweils sechs Allele aus verschiedenen Sorten kloniert. Diese Sequenzen variierten in ihrer Länge und Nukleotidsequenz.

Innerhalb der *MdLOX1a* Sequenz, welche je nach Allel zwischen 3721 und 3802 bp lang ist, wurden bis zu 74 variable Stellen gefunden. Diese wurden als Indels oder SNPs identifiziert. Etwa 50 % der SNPs liegen in Introns. Die zwei unterschiedlichen Allele von 'Golden Delicious' unterscheiden sich durch 28 SNPs. *MdLOX7a* besitzt 41 SNPs in der etwa 3500 bp langen Sequenz. Etwa ein Drittel der SNPs liegen in Introns. Vierzehn SNP-Positionen des Gens sind heterozygot innerhalb 'Golden Delicious'. Drei SNP-Positionen sind einzigartig für ein Allel der untersuchten Sorten.



### 3.2 Klonierung von Lipoxygenase-Genen des Apfels

**Tabelle 3.2: Klonierte Lipoxygenase-Gene verschiedener Apfelsorten.** Die Sequenzen der klonierten LOX-Gene unterscheiden sich in ihrer Länge und Nukleotidsequenzabfolge. Auch die Länge der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist variabel. Die aus der Sequenzierung erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden an NCBI übermittelt und besitzen eine NCBI-Akzessionsnummer. Laut den Daten der Apfel-Genomsequenzdatenbank liegen die Gene auf unterschiedlichen Chromosomen (Velasco et al., 2010).

Gen	Akzessionsnummer	Sorte	Länge in bp	Chromosom	Länge in Aminosäuren
<i>MdLOX1a</i>	KC489090	'Golden Delicious'	3728	9	863
	KC489091	'Golden Delicious'	3799	9	863
	KC489092	'McIntosh'	3721	9	863
	KC489087	'Discovery'	3721	9	863
	KC489088	'Prima'	3799	9	863
	KC489089	'Prima'	3802	9	863
<i>MdLOX2a</i>	KC494388	'Golden Delicious'	4667	12	906
	KC494390	'McIntosh'	4655	12	906
	KC494389	'Discovery'	4667	12	906
	KC494391	'Discovery'	4648	12	906
<i>MdLOX2b</i>	KC494386	'Golden Delicious'	4230	13	905
	KC494385	'Discovery'	4230	13	905
	KC494387	'Prima'	4230	13	905
<i>MdLOX3a</i>	KC747489	'Golden Delicious'	4255	13	900
	KC747490	'Discovery'	4255	13	900
	KC747491	'Discovery'	4255	13	900
<i>MdLOX7a</i>	KC494379	'Golden Delicious'	3490	4	868
	KC494381	'Golden Delicious'	3489	4	868
	KC494380	'McIntosh'	3490	4	868
	KC494383	'McIntosh'	3491	4	868
	KC494384	'Discovery'	3490	4	868
	KC494382	'Alkmene'	3488	4	868
<i>MdLOX8a</i>	KC494378	'Golden Delicious'	3892	16	944
<i>MdLOX8b</i>	KC494375	'Golden Delicious'	4121	13	920
	KC494374	'McIntosh'	4121	13	920
	KC494376	'McIntosh'	4121	13	920
	KC494377	'Royal Gala'	4121	13	920
<i>MdLOX9a</i>	KC494371	'Golden Delicious'	3335	6	842
	KC494372	'Golden Delicious'	3337	6	842
	KC494373	'McIntosh'	3337	6	842

### 3.3 Expressionsanalyse

Um die mögliche Rolle von einzelnen LOX-Genen bei der Fruchtaroma-Produktion zu bestimmen, wurde deren Expression in verschiedenen Geweben und während des Vorgangs der Fruchtreife mithilfe von RT-PCR untersucht.

Für die Untersuchung der gewebespezifischen Expression wurde RNA aus den Blüten, den Blättern und der Fruchtschale von 'Golden Delicious' und 'McIntosh' isoliert. Für die Untersuchung der differentiellen LOX-Gen-Expression während der Fruchtentwicklung wurden Früchte verschiedener Reifestadien benutzt. Es wurden nur Proben verwendet, deren isolierte RNA ungeschert ist, die keine Verunreinigung durch DNA nach DNase-Behandlung aufweist, bei der keine Verunreinigungen durch chemische Stoffe (vor allem Phenole) vorliegen und deren cDNA-Synthese erfolgreich war.

Mit den Sequenzen der zum Teil manuell korrigierten MDP-Akzessionen wurden genspezifische Primer erstellt. Schlussendlich standen genspezifische Primer für 15 LOX-Gene zur Verfügung, nämlich für *MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX3a*, *MdLOX3b*, *MdLOX5b*, *MdLOX5e*, *MdLOX6b*, *MdLOX7a*, *MdLOX7b*, *MdLOX7d*, *MdLOX8a*, *MdLOX8b* und *MdLOX9a*. Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate von 29 verschiedenen Sorten (einschließlich 'Golden Delicious' und 'McIntosh') bestätigte die Spezifität für das gewünschte LOX-Gen.

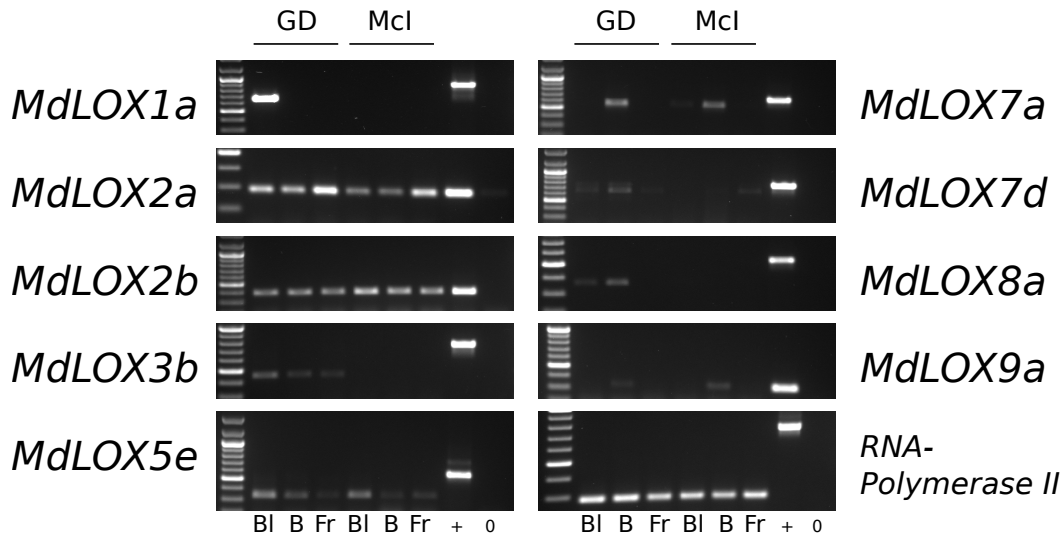
Die drei Microsoft Excel Ad-Ins „BestKeeper“, „GeNorm“ und „NormFinder“ identifizierten RNA-Polymerase II als verlässlichstes Referenzgen zur Analyse von verschiedenen Gewebeproben und Elongationsfaktor  $\alpha$  als verlässlichstes Referenzgen zur Analyse von Proben des Fruchtreifeverlaufs (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.1 Lipoxygenase-Expression in verschiedenen Geweben

Innerhalb von verschiedenen Gewebeproben (Blatt, Blüte, Frucht) wurde die Expression von 15 LOX-Genen in den Sorten 'Golden Delicious' und 'McIntosh' untersucht. Neun Gene zeigten Expression in zumindest einem der untersuchten Gewebe (Abbildung 3.9). *MdLOX2a* und *MdLOX2b* sind in allen Proben exprimiert. Andere Gene zeigen nur innerhalb einer Sorte Transkriptionsaktivität (*MdLOX1a* und *MdLOX3b* in 'Golden Delicious') oder die gleichen Expressionsmuster in beiden Sorten (z. B. *MdLOX5e* in allen Geweben und *MdLOX7a* in Blüten). Es konnten keine LOX-Gene identifiziert werden, die ausschließlich in Früchten exprimiert sind. Allerdings sind die Gene *MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX3b* und *MdLOX5e* unter anderem auch in Früchten aktiv (Abbildung 3.9). Die Gene *MdLOX7d*, *MdLOX8a* und *MdLOX9a* zeigen in Blättern eine schwache Transkriptionsaktivität. Die Transkripte der Gene *MdLOX1d*, *MdLOX3a*, *MdLOX5b*, *MdLOX6b*, *MdLOX7b* und *MdLOX8b* konnten nicht detektiert werden (nicht gezeigt).

#### 3.3.2 Lipoxygenase-Expression während der Fruchtentwicklung

Der Anstieg der LOX-Aktivität zum Reifezeitpunkt wurde in verschiedenen Früchten beschrieben (Pérez et al., 1999; Lara et al., 2003; Chen et al., 2004; Zhang et al., 2006; Padilla et al., 2012). Wahrscheinlich zeigen Kandidatengene für Fruchtaroma plötzlich

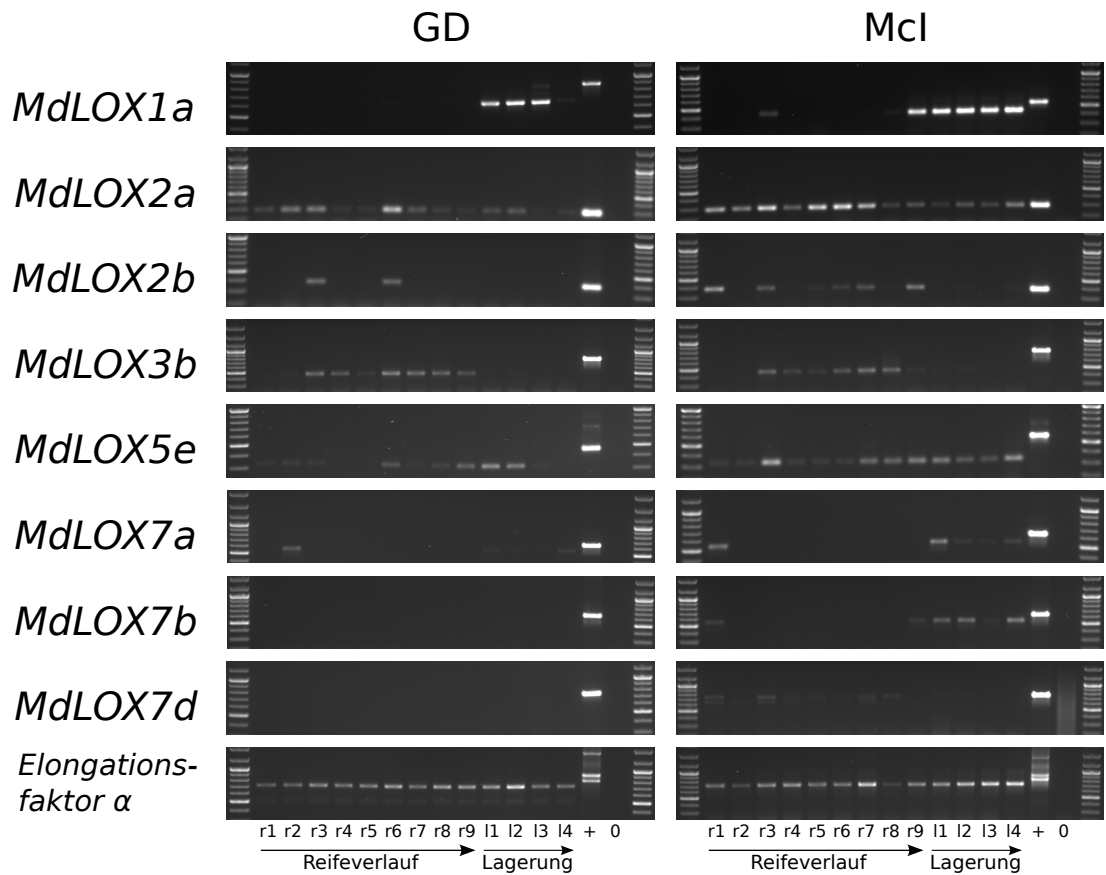


**Abbildung 3.9: Differenziell exprimierte LOX-Gene innerhalb verschiedener Gewebe.** Die RT-PCR zeigt die differentielle Expression von neun Apfel-LOX-Genen. In die Analyse der differentiellen Expression wurden die Gewebe Blüte (Bl), Blatt (B) und Frucht (Fr) der Sorten 'Golden Delicious' (GD) und 'McIntosh' (McI) einbezogen. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA von 'Golden Delicious' benutzt, bei der Nullkontrolle (0) wurde Wasser anstatt einer DNA-Lösung genutzt.

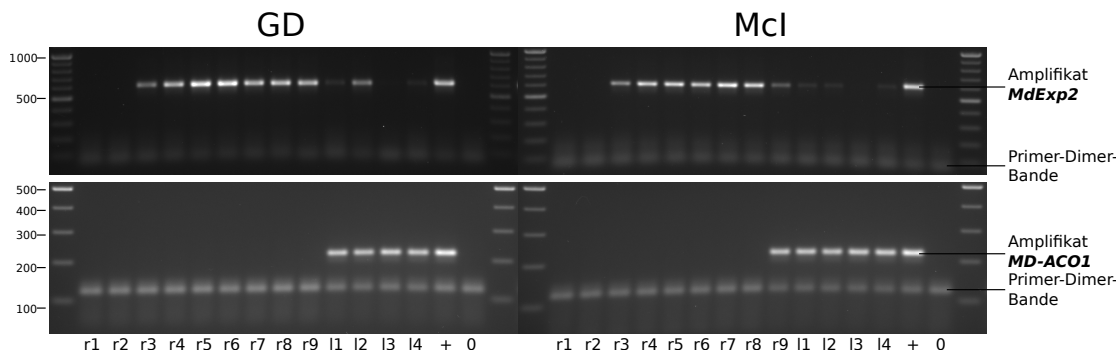
oder stetig beim Eintritt in das Fruchtreifestadium eine erhöhte Expression. Es wurden Fruchtproben von neun verschiedenen Reifestadien benutzt, weiterhin jeweils zwei Proben, die 10 bzw. 20 Tage gelagert wurden. Die Lagerung erfolgte jeweils bei 8 °C bzw. bei Raumtemperatur (je Lagerzeitlänge eine Probe). Acht LOX-Gene waren transkriptionell aktiv in zumindest einigen Proben (Abbildung 3.10). Wie auch in den Proben unterschiedlicher Gewebe, ist die Expression von *MdLOX2a* in allen Fruchtproben feststellbar. Die Amplifikate von *MdLOX2b* hingegen sind nur 40 Tage bzw. 100 Tage nach dem Zeitpunkt der Vollblüte (r3, r6 in Abbildung 3.10) detektierbar. *MdLOX3b* ist zu den gleichen Zeitpunkten stark exprimiert. Die Amplifikatmenge wird bis zur Probe des Reifezeitpunktes stetig schwächer.

Die *MdLOX1a*-Transkripte werden besonders während der Lagerung nachgewiesen. Der sehr plötzliche Anstieg der Transkriptionsaktivität findet beim Eintritt in die Frucht-reife statt. Zum Erntezeitpunkt (r9) ist nur in 'McIntosh' eine Expression detektierbar.

Der Anstieg der *MdLOX5e*-Expression beginnt weniger plötzlich und ist weniger stark. Auch in Proben zum Blütezeitpunkt (r1, r2) sind Transkripte detektierbar. Sowohl in 'Golden Delicious', als auch in 'McIntosh' nimmt die Expression ab r6 bis zum Reifezeitpunkt (r9) stetig zu. Nach 20-tägiger Lagerung ist bei Proben von 'Golden Delicious' nur noch eine sehr geringe (13) bzw. keine Transkription (14) nachweisbar. Bei Proben von 'McIntosh' bleibt die *MdLOX5e*-Expression auch während der Lagerung bei Raumtemperatur (11, 13) und bei 8 °C (12, 14) nahezu konstant.



**Abbildung 3.10: Differentiell exprimierte LOX-Gene während verschiedener Frucht-reifestadien.** Die RT-PCR von Proben verschiedener Frucht-reifestadien zeigt die differentielle Expression von acht Apfel-LOX-Genen. Das Ausgangsmaterial wurde aller 20 Tage ab dem Zeitpunkt der Vollblüte (r1) bis zum Zeitpunkt der Pflückreife (r9) im Versuchsfeld entnommen. Weiterhin wurde Probenmaterial nach 10 (l1, l2) bzw. 20 Tagen Lagerung (l3, l4) bei entweder Raumtemperatur (l1, l3) oder 8 °C (l2, l4) genutzt. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA von 'Golden Delicious' benutzt. Bei der Nullkontrolle (0) wurde Wasser anstatt einer DNA-Lösung genutzt.



**Abbildung 3.11: Expression der Apfelgene *MdExp2* (oben) und *MD-ACO1* (unten).** Ermittelt wurde die Abundanz von *MdExp2* und *MD-ACO1*-Transkripten in Fruchtproben der Sorten 'Golden Delicious' (GD) und 'McIntosh' (McI). Die Probenahmezeitpunkte reichen vom Zeitpunkt der Vollblüte (r1) bis zur Pflückreife (r9). Die Sorte 'McIntosh' erreicht zur Pflückreife bereits die Genussreife. Weiterhin wurden Proben nach 10-tägiger (l1, l2) oder 20-tägiger (l3, l4) Lagerung bei Raumtemperatur (l1, l3) oder 8 °C (l2, l4) untersucht. In Anlehnung an die Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben und über den Fruchtreifeverlauf wurde als Positivkontrolle (+) DNA von 'Golden Delicious' benutzt, bei der Nullkontrolle (0) wurde Wasser anstatt einer DNA-Lösung genutzt.

### 3.3.3 Qualität der Proben-Normalisierung

Die Normalisierung der cDNA-Proben des Fruchtreifeverlaufes der Apfelfrucht zu überprüfen, ist eine besondere Herausforderung. Microarray-Daten können für den Vergleich der Expression verschiedener Referenzgene genutzt werden. Es sind allerdings keine Referenzdatensätze für den Fruchtreifeverlauf der hier benutzten Sorten bekannt. Um dennoch eine verlässliche Aussage über die Qualität der Normalisierung der Ausgangslösungen zu erhalten, wurde RT-PCR mit Referenzgenen durchgeführt.

Die jeweilige Transkriptabundanz der für die Normalisierung verwendeten stetig exprimierten Referenzgene RNA-Polymerase II und Elongationsfaktor  $\alpha$  ist in den Abbildungen 3.9 und 3.10 ablesbar. Als weitere Kontrolle wurde die Expression von Genen ermittelt, deren relative Transkriptabundanz während des Reifeverlaufs bekannt ist:

- das Expansin-Gen *MdExp2* und
- die ACC-Oxidase *MD-ACO1* (Aminocyclopropanecarboxylat-Oxidase) (beschrieben von Ross et al. (1992), umbenannt durch Binnie und McManus (2009))

Die Expression von *MdExp2* kann in 'Golden Delicious' in den Proben r3 bis r9 (40 Tage nach Vollblüte bis Reife) und bei 10-tägiger Lagerung (l1, l2) nachgewiesen werden. Die Expression nimmt dabei bis r5/r6 stetig zu, danach stetig ab. Die Probe der ungekühlt gelagerten Früchte (l1) zeigt eine niedrigere Transkriptabundanz, als die der gekühlten Lagerung (l2). Nahezu die gleichen Ergebnisse erhält man bei der Expressionsanalyse von 'McIntosh'. Die Expression zwischen den Proben r4 bis r8 steigt jedoch nicht stetig an, sondern stagniert. Weiterhin ist die Abundanz von *MdExp2*-Amplifikaten bereits

### 3 Ergebnisse

zum Reifezeitpunkt (r9) sehr niedrig. Auch in Proben der gelagerten Früchte liegt die Transkriptmenge an der Nachweisgrenze.

In Proben der reifen Frucht (r9) von 'Golden Delicious' sind Transkripte des *MD-ACO1*-Gens nicht nachweisbar. In der AGE der RT-PCR-Produkte von gelagerten Früchten erscheinen für alle Proben (11, 12, 13, 14) gleich starke Banden. Aufgrund des Fehlens von stärkeren oder schwächeren Banden kann nicht eingeschätzt werden, ob sich die PCR bei Beendigung noch in der logarithmischen Phase befand. Eine zuverlässige Aussage über relative Transkriptmengen ist nicht möglich. Bei 'McIntosh' zeigt sich ein ähnliches Expressionsprofil: *MD-ACO1* ist in gelagerten Früchten stark exprimiert. Bei dieser Sorte kann allerdings bereits zur Pflückreife (r9) die Expression nachgewiesen werden.

#### 3.3.4 Randnotiz: Lipoxygenase-Expression bei Pathogenbefall

Um die LOX-Expressionsänderung bei Infektion mit einem tierischen, einem pilzlichen und einem bakteriellen Pathogen zu untersuchen, wurden jeweils anfällige und resistente Apfelgenotypen infiziert.

#### Ergebnisse der Infektionen

Die Befallsstudie der Apfelblutlaus wurde zusammen mit Dr. Edgar Schliephake (Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz des Julius Kühn-Institutes, Quedlinburg) durchgeführt. Von 10 angesetzten Imagines waren 3-5 Tiere nach Ablauf des Inkubationszeitintervalls durch den eindringenden Saugapparat fest mit dem Zweig verbunden. Ob die Tiere tatsächlich saugten, wurde nicht geprüft. Nach der Infektion mit *Erwinia amylovora* zeigten sich die krankheitstypischen Symptome, zuerst nekrotisierte Blattadern und im weiteren Verlauf Exsudattropfen, Blattnekrosen und der sogenannte Hirtenstab (siehe Abbildungen 3.12, 3.13, 3.14 und 3.15). Die Infektion mit *Venturia inaequalis* war nicht erfolgreich. Die Positivkontrollen blieben befallsfrei, obwohl die Sporen in der Suspension nachweislich auskeimten (siehe Abbildung 3.16).



Abbildung 3.12: Der Habitus einer mit *Erwinia amylovora* infizierten Apfelpflanze der sehr anfälligen Sorte 'Gala' exakt 10 Tage nach der Infektion. Deutlich erkennbar ist der sogenannte Hirtenstab.



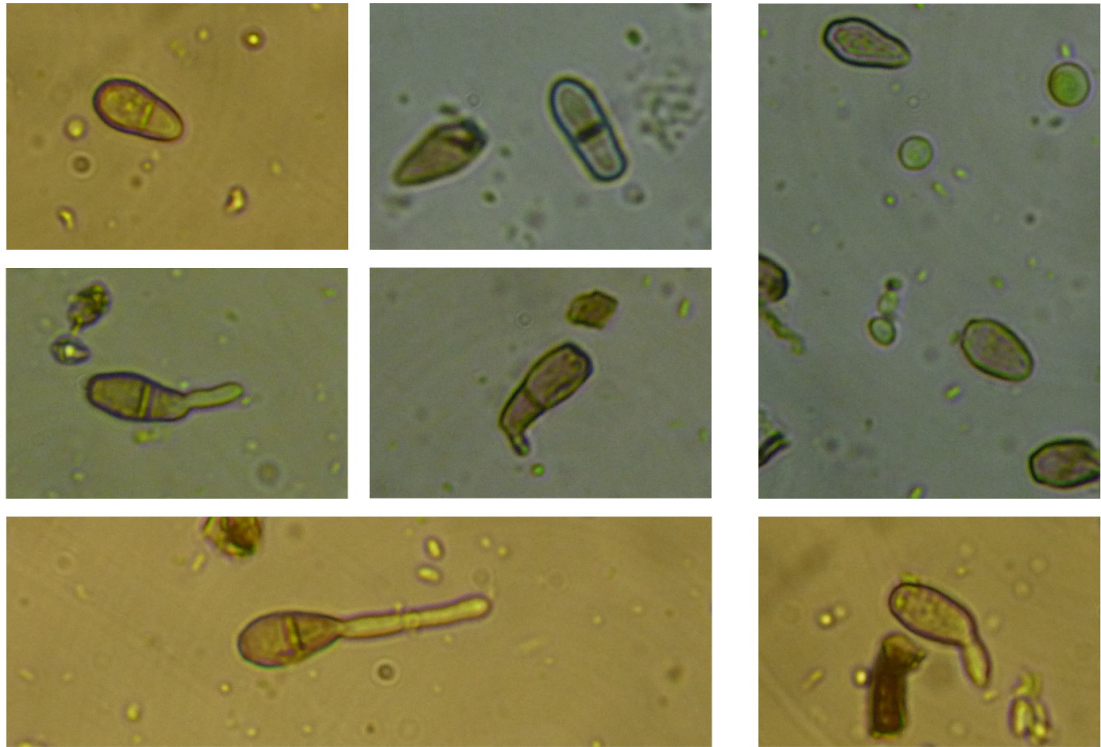
Abbildung 3.13: Der Habitus einer mit *Erwinia amylovora* infizierten Apfelpflanze der wenig anfälligen Akzession *Malus* × *robusta* 'Mr5' exakt 10 Tage nach der Infektion.



Abbildung 3.14: An Blattadern beginnende Nekrose eines mit *Erwinia amylovora* infizierten Blattes 72 h nach der Infektion der Sorte 'Gala'.



Abbildung 3.15: Mehrere Exsudattropfen am Blattstiel 10 Tage nach einer erfolgreichen *Erwinia amylovora*-Infektion der Sorte 'Gala'.



**Abbildung 3.16: Keimende Asco- und Konidiosporen von *Venturia inaequalis*.** Links: Ascosporen, rechts: Konidiosporen, unten: jeweils mit Keimhyphe.

### Expressionsanalyse

Die für *Venturia inaequalis* anfälligen Pflanzen zeigten nach einer Inkubationszeit von 28 Tagen keine Krankheitssymptome. Das Probenmaterial wurde verworfen. Es wurde keine Expressionsanalyse durchgeführt. Die Expressionsanalyse der LOX-Gene bei *Erwinia amylovora*-Infektion konnte während des Projektzeitraumes nicht durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse beim Befall von Apfelpflanzen mit Blutläusen sind nur teilweise aussagekräftig. Von den 15 geprüften Genen sind die Ergebnisse von 6 Genen nicht auswertbar, weil Positiv- oder Negativkontrollen keine erwartungsgemäßen Ergebnisse zeigen (*MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX2b*, *MdLOX5b*, *MdLOX7d*, *MdLOX9a*). Daneben zeigen 6 Gene keine Expression in den Blättern der befallenen Pflanzen (*MdLOX3a*, *MdLOX6b*, *MdLOX7a*, *MdLOX7b*, *MdLOX8a*, *MdLOX8b*). Diese nicht exprimierten Gene sind auch bei der Ermittlung der gewebespezifischen Expression in keinem Gewebe (*MdLOX3a*, *MdLOX6b*, *MdLOX7b* und *MdLOX8b*) oder zumindest nicht in Blättern (*MdLOX7a* und *MdLOX8a*) exprimiert. *MdLOX2a* ist in allen Proben exprimiert. *MdLOX3b* und *MdLOX5e* sind in beiden Sorten schwach exprimiert. Die unterschiedliche Transkriptabundanz ist unabhängig von den benutzten resistenten oder anfälligen Sorten. Sie lässt sich nicht auf eine stattgefundenen oder nicht stattgefundenen (Kontrollgruppe) Pathogeninkubation zurückführen (Ergebnisse nicht gezeigt).



### 3.4 Genetische Assoziation zwischen Aromastoffen und Kandidatengen

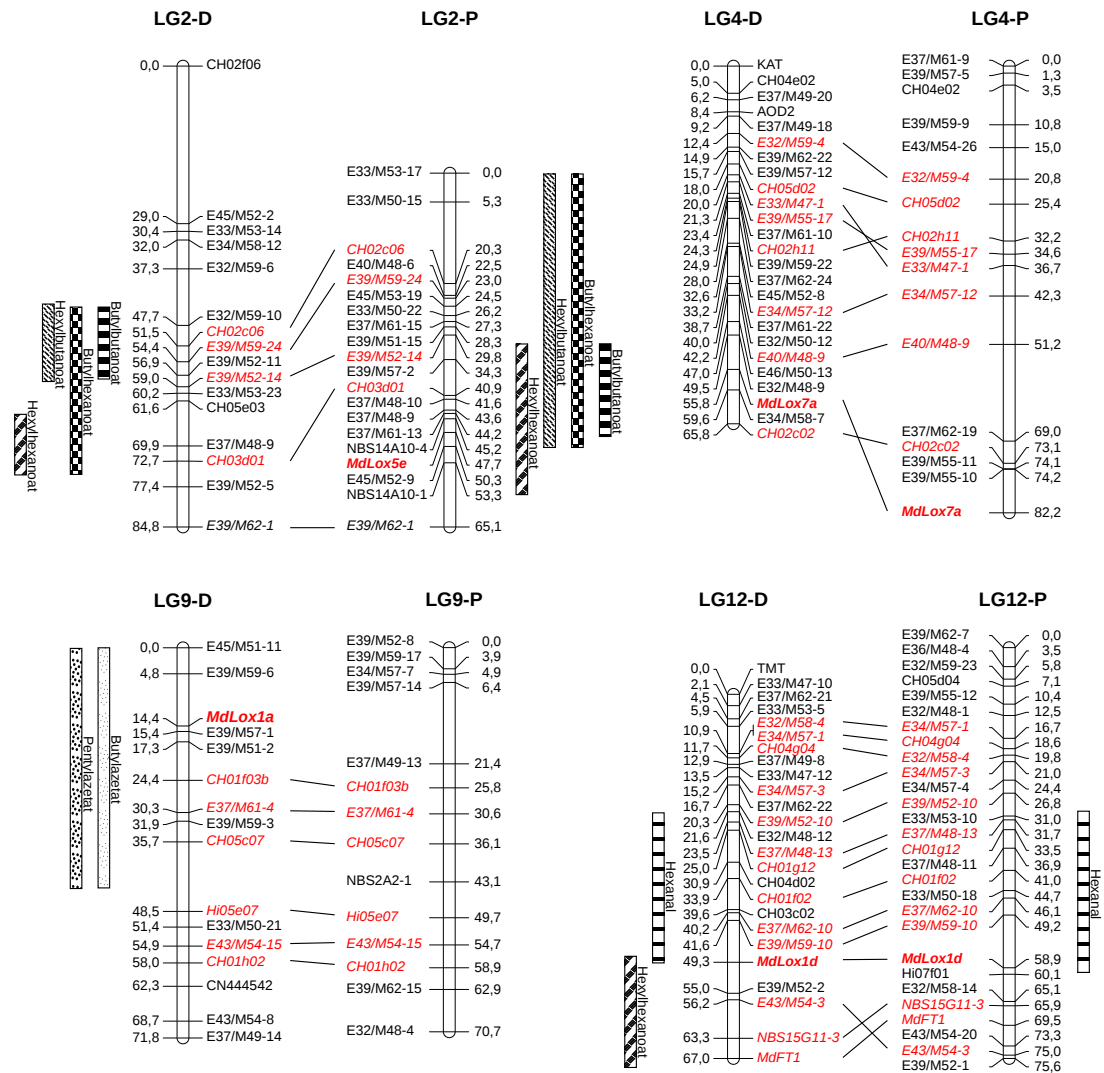
Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass das Programm TASSEL 3.0 eine oder mehrere Assoziationen zwischen den SNP-Zuständen der verschiedenen LOX-Gene und verschiedenen Schlüsselaromastoffen nachweist. Die Datensätze für die Schlüsselaromastoffe standen zur Verfügung (Ulrich, unveröffentlicht). Für 15 LOX-Gene wurden während der Arbeit genspezifische Amplifikate von 78 verschiedenen Apfelsorten sequenziert. Es konnten keine signifikanten Assoziationen für einzelne SNPs gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis einer Assoziation zwischen den Konzentrationen der Aromastoffe und Haplotypen scheiterte daran, die 78 sortenspezifischen SNP-Muster einer überschaubaren Anzahl an Haplotypen zuzuordnen, bei der jedes Allel mehrfach in unterschiedlichen Sorten vorkommt.

Alternativ zur Assoziationanalyse mithilfe des Programms TASSEL 3.0 wurde QTL-Analyse als Methode benutzt, um die Assoziation zwischen Aromastoffen und Kandidatengen zu prüfen. Diese Strategie unterscheidet sich grundlegend. Es wird nicht die Korrelation von genotypischen und phänotypischen Eigenschaften unterschiedlicher Sorten des Apfelpools auf Korrelation geprüft, sondern jene von unterschiedlichen Genotypen einer Nachkommenschaft aus lediglich zwei Sorten.

Für die C3-Population, einer Kreuzungspopulation der Elternsorten 'Discovery' und 'Prima', wurden Markerdaten von Dr. Dunemann freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden Amplifikate der Gene *MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX5e* und *MdLOX7a* aus 30 ausgewählten Genotypen der C3-Population und den Elternsorten sequenziert. Die Position des *MdLOX1a*-Amplifikates ist in Abbildung 3.19 eingezeichnet. Der Amplifikationsbereich in *MdLOX1a* überspannt zwei Introns. Da Nukleotide in Introns sich meist ohne Effekte auf das entstehende Protein verändern, findet man in Introns relativ betrachtet mehr SNPs. Die identifizierten Haplotypen wurden Segregationstypen zugeordnet und dem Markerdatensatz hinzugefügt. Die aus der Kartierung mit JoinMap hervorgehende Kopplungskarte wurde für das QTL-Mapping benutzt, bei dem die gefundenen QTLs auf diese Karte projiziert werden.

Die Datensätze, welche Informationen zu den Aromastoffen und deren Konzentration beinhalten, wurden von Herrn Dr. Ulrich (JKI) zur Verfügung gestellt. Dafür wurden aufgearbeitete Fruchtproben mittels *Headspace*-Festphasenmikroextraktion und anschließender Gaschromatographie analysiert, um die Datensätze mit Aromastoffkonzentrationen zu erzeugen. Etwa 100 unterschiedliche Diagramm-Spitzen, die unterschiedlichen Aromastoffen entsprechen, wurden detektiert. 15 wichtige Aromastoffe wurden ausgewählt, um mit diesen phänotypischen Daten zu arbeiten. Fünf dieser Stoffe sind Fruchtalkohole und neun gehören zur Gruppe der Ester, wie zum Beispiel Azetat-, Butanoat- und Hexanoat-Ester. Zusätzlich konnte das Aldehyd Hexanal, welches das erste flüchtige Produkt des LOX-Stoffwechselweges ist, identifiziert und in die Analysen einbezogen werden.

In den Regionen, in welchen LOX-Gene durch Kopplungsanalyse kartiert wurden, liegen 13 QTLs von 7 Aromastoffen, nämlich von 6 Estern und dem Aldehyd Hexanal. Dabei handelt es sich um QTLs, mit einem LOD-Maximalwert von mindestens 3. In



**Abbildung 3.17: Kopplungskarten der vier Kopplungsgruppen mit kartierten LOX-Genen und darauf kartierten QTLs.** Durch Kopplungsanalyse einer Nachkommenschaft der Sorten 'Prima' (P) und 'Discovery' (D) konnten die Kopplungsgruppen beider Sorten erstellt werden. Durch QTL-Analyse wurden Bereiche identifiziert, die einen signifikanten Einfluss auf die Art und Menge bestimmter Aromastoffe haben (unterschiedlich gemusterte Balken mit entsprechendem Aromastoffnamen). Die zur Erstellung der Kopplungsgruppenkarte benutzten Marker und deren Position in cM (Centimorgan) sind angegeben. Die Marker, die auf den Karten beider Elternsorten eingetragen sind, sind rot hervorgehoben und durch eine Linie verbunden. Die kartierten LOX-Gene sind rot und fett hervorgehoben.

### 3.4 Genetische Assoziation zwischen Aromastoffen und Kandidatengen

Abbildung 3.17 sind die QTLs als 2-LOD-Konfidenzintervall eingetragen. Die maximalen LOD-Werte, deren Position auf der LG und die Grenzen der 2-LOD-Konfidenzintervalle sind in Tabelle 6.8 im Anhang aufgelistet.

Für die Stoffe Butylbutanoat, Butylhexanoat, Hexylbutanoat und Hexylhexanoat existieren QTLs auf der LG (*linkage group*, Kopplungsgruppe) 2 von 'Discovery' und von 'Prima'. In 'Prima' liegt die durch Kartierung ermittelte Position von *MdLOX5e* innerhalb der Konfidenzintervalle. In 'Discovery' war eine Kartierung nicht möglich, da 'Discovery' homozygot für diesen Marker ist. Flankierend zu *MdLOX5e* liegt das Gen *MdLOX5b* und eventuell Gen *MdLOX5b'* (siehe Abbildung 3.5). Auch diese nicht kartierten Gene könnten für einen oder mehrere der QTLs verantwortlich sein. Auf der LG4 von 'Discovery' und 'Prima' wurde *MdLOX7a* kartiert. Für die 15 betrachteten Aromastoffe existiert kein QTL auf dieser LG. In dieser Region liegen laut Abbildung 3.5 weiterhin *MdLOX1b*, *MdLOX1c* und *MdLOX7d*. Entsprechend der vorläufigen Charakterisierung dieser Gene als 9-LOX ist ein Anteil an der Produktion von Fruchtaromastoffen unwahrscheinlich. Auf LG9, an dessen oberem Ende das Kandidatengen *MdLOX1a* kartiert wurde, existieren QTLs für Butylazetat und Pentylazetat. Diese QTLs besitzen einen LOD-Wert von wenig über 3 und Konfidenzintervalle, die die halbe LG überspannen. Auf LG12 liegt das kartierte Gen *MdLOX1d* am Rand der Konfidenzintervalle von Hexanal und von Hexylhexanoat. Benachbart zu *MdLOX1d* liegen *MdLOX1e*, *MdLOX7b* und *MdLOX7c* (siehe Abbildung 3.5). Ob eine dieser LOXs mit vorläufiger 9-LOX-Funktion einen direkten oder indirekten Einfluss auf eines der QTLs hat, ist nicht bekannt. Neben den kartierten LOX, sind die Positionen von weiteren LOXs auf unterschiedlichen Chromosomen bekannt (siehe Abbildung 3.5).

Verzweigt-kettige Aromastoffe werden nicht durch den LOX-Stoffwechselweg gebildet. Die QTLs der Aromastoffe 2-Methylbutanol, Butyl-2-methylbutanoat und 2-Methylbutylazetat, Ethyl-2-methylbutanoat und Hexyl-2-methylbutanoat liegen erwartungsgemäß nicht in den Regionen der 23 bekannten LOX-Gene.

Ein starker QTL für Hexanal befindet sich am oberen Ende der LG7, sowohl in 'Discovery' als auch in 'Prima'. In diesem Bereich befinden sich die Gene *MdLOX5a*, *MdLOX5c* und *MdLOX5d* (siehe Abbildung 6.1 und Tabelle 6.9 im Anhang). Diese konnten nicht kartiert werden. Für die entsprechenden Proteine wurde vorläufig 13-LOX-Funktion festgestellt. Hexanal ist das erste flüchtige Zwischenprodukt von 13-LOXs. Es ist nicht möglich *MdLOX5a* durch Kopplungsanalyse in der C3-Population zu lokalisieren, da die Eltern jeweils homozygot sind und dementsprechend in der Nachkommenschaft informative Allelzustände für die Kopplungsanalyse nicht vorhanden sind. Für *MdLOX5c* und *MdLOX5d* wurden die Allelzustände nicht bestimmt, da genspezifische Primer nicht zur Verfügung standen. Möglicherweise hat eines dieser *MdLOX5*-Gene einen starken Einfluss auf das Schlüsselaldehyd Hexanal.

### 3.5 Analyse sortenspezifischer *LOX1:Md:1a*- Sequenzunterschiede und Strukturmodellierung

Die Menge eines entstehenden Enzyms wird durch verschiedene Mechanismen der prä- und posttranskriptionellen Expressionsregulation bestimmt. Andererseits wird die Funktionalität eines Enzyms neben äußeren Faktoren (z. B. pH-Wert) hauptsächlich durch strukturelle Eigenschaften vorgegeben. Durch Nukleotidmutationen im Gen verändert sich gegebenenfalls die Proteinprimärstruktur, die Aminosäuresequenz des Polypeptides. Sich daraus ergebende Veränderungen in Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur können den Zugang von Stoffen zum aktiven Zentrum oder die Struktur des aktiven Zentrums selbst beeinflussen. Dies hat Auswirkungen auf die Art und Effizienz der Katalyse.

In diesem Abschnitt werden die Allele des Kandidatengens *MdLOX1a* auf Sequenzebene untersucht. Es konnten sechs vollständige Sequenzen aus vier unterschiedlichen Sorten kloniert und sequenziert werden (siehe Tabelle 3.3). Die Nukleotidpolymorphismen, die Veränderungen in der Aminosäuresequenz verursachen, beeinflussen die Proteinstruktur. Die Erkenntnisse der Sequenz- und Strukturvergleiche liefern Anhaltspunkte dafür, ob das sortenspezifische Aromaprofil schlussendlich auf spezifische Nukleotidpolymorphismen zurückzuführen ist.

**Tabelle 3.3: Kennwerte der klonierten *MdLOX1a*-Allele.** Die Kennwerte Gen-, Intron-, Exon- und Proteidlänge sind für die aus verschiedenen Apfelsorten klonierten und sequenzierten *MdLOX1a*-Allele aufgeführt. Das Allel 2 von 'Golden Delicious' (GD) und das Allel 1 von 'Prima' haben eine identische Nukleotidsequenz. Die aus 'McIntosh' und aus 'Discovery' klonierten Allele unterscheiden sich bezüglich ihrer Nukleotidsequenz.

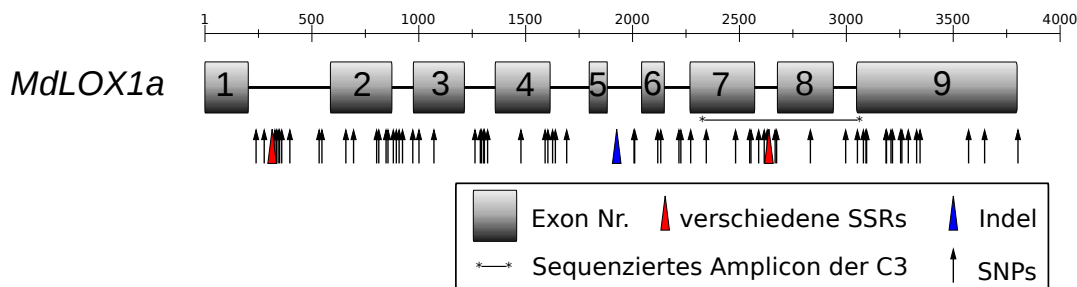
Allel	Genlänge* in bp	davon Introns in bp	davon Exons* in bp	Proteidlänge in Aminosäuren
- GD (Allel 1)	3728	1136 (30,5 %)	2592 (69,5 %)	863
- GD (Allel 2)	3799	1207 (31,8 %)	2592 (68,2 %)	863
- McIntosh	3721	1129 (30,3 %)	2592 (69,7 %)	863
- Discovery	3721	1129 (30,3 %)	2592 (69,7 %)	863
- Prima (Allel 1)	3799	1207 (31,8 %)	2592 (68,2 %)	863
- Prima (Allel 2)	3802	1210 (31,8 %)	2592 (68,2 %)	863
<b>Ø</b>	<b>3762,7</b>	<b>1170,7 (31,1 %)</b>	<b>2592 (68,9 %)</b>	<b>863</b>

\* inklusive Stopp-Codon

Die Tabelle 3.3 listet die Genlänge, sowie die summierte Intron- und Exonlänge der klonierten *MdLOX1a*-Allele und die Länge des resultierenden Proteins auf. Die durchschnittliche Länge des Gens vom Start bis zum Stopp-Codon beträgt 3762 bp. In der Summe sind die Exons aller Allele jeweils 2592 bp lang, sodass ein Protein aus 863 Aminosäuren entsteht. Die 5'- und 3'-UTR wurde nicht untersucht. Etwa ein Drittel der Sequenz sind Introns. Das Allel 2 von 'Golden Delicious' und das Allel 1 von 'Prima' sind identisch. Die klonierten Allele von 'McIntosh' und 'Discovery' sind gleich lang, unterscheiden sich jedoch durch ihre Nukleotidsequenz.

**Tabelle 3.4: Variable Sequenzpositionen innerhalb der klonierten *MdLOX1a*-Allele.**  
 In der Übersicht über die variablen Sequenzpositionen der 6 klonierten *MdLOX1a*-Allele ist die Anzahl der Indels und der SSRs sowie die Anzahl der sortenspezifischen SNPs aufgelistet.

Variable Sequenzpositionen	74
Anzahl von Indels und SSRs	4
- innerhalb von Introns	4
Anzahl von SNPs im Gen	70 ( 1,84 %)
- innerhalb von Introns	33 (47,14 %)
Anzahl der sortenspezifischen SNPs	32
- davon sortenspezifisch für GD	7
- davon sortenspezifisch für 'McIntosh'	11
- davon sortenspezifisch für 'Discovery'	5
- davon sortenspezifisch für 'Prima'	9



**Abbildung 3.18: Schematische Darstellung des Gens *MdLOX1a*.** Abgebildet ist die Lage und Länge der Exons (graue Boxen). Die variablen Sequenzpositionen sind eingetragen (SNPs: Pfeile, SSRs: rote Dreiecke, Indel: blaues Dreieck). Das dritte SSR liegt innerhalb des Indels. Auch die Position des sequenzierten Amplicons, durch dessen Sequenzinformation *MdLOX1a* in der C3-Population kartiert wurde, ist angegeben.

### 3 Ergebnisse

Die Tabelle 3.4 zeigt die variablen Sequenzpositionen in den *MdLOX1a*-Allelen. Sowohl 33 der insgesamt 70 SNPs, als auch alle 4 Indels liegen innerhalb von Introns. Insgesamt 32 der 70 SNPs sind für ein Allel einer der hier betrachteten Sorten spezifisch. Die SNP-Frequenz liegt bei etwa 1,8%.

In Abbildung 3.18 erkennt man die Intron-Exon-Struktur des ORFs (*open reading frames*) von *MdLOX1a*. Änderungen der Nukleotidsequenz innerhalb von untranslatierten Bereichen (5'UTR, 3'UTR, Introns) und innerhalb von nicht-transkribierten Bereichen (Promotor, Enhancer, Silencer) haben Einfluss auf die Art und Menge des entstehenden Proteins. Dies ist jedoch nicht Themenschwerpunkt des Abschnitts. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit DNA-Sequenz-Information gearbeitet. Anfangs war nicht bekannt, wo die Grenzen zwischen Introns und Exons liegen bzw. ob diese in vorangegangenen Arbeiten korrekt erfasst wurden. Aus diesem Grund wurden auch die Sequenzunterschiede in Introns erfasst. Etwa die Hälfte der SNPs tritt innerhalb von etwa ein Drittel der Sequenzlänge auf, nämlich innerhalb der Introns. Die Lage von verschiedenartigen Typen von Polymorphismen (SNPs, Indels (*insertion deletion polymorphisms*), SSRs (*simple sequence repeats*)) wurden in das Schema integriert (Abbildung 3.18). Die Indels und die SSRs sind von großem Interesse, da diese innerhalb der kodierenden Sequenz eines Gens oft zu Leserasterverschiebungen führen. Die entstehenden Proteine weichen in ihrer Primärsequenz meist stark ab und besitzen nicht die ursprünglich Funktionalität. In den hier analysierten Fällen liegen die vorhandenen Indels und SSRs innerhalb von Introns und führen nicht zu Leserasterverschiebungen. Der Einfluss der erfassten Sequenzveränderungen auf das Splicing wurde nicht untersucht. Es wird nicht über regulatorische Bereiche in erwähnten untranslatierten und nicht-transkribierten Bereichen eingegangen. *De facto* ist dem Autor keine umfassende Arbeit über diese Bereiche bei LOX-Genen bekannt.

#### 3.5.1 Kodierende Sequenz

Die Intron-Exon-Struktur von *MdLOX1a* wurde bereits überprüft und ggf. korrigiert (siehe Kapitel 3.1.1). Dadurch können jene Polymorphismen zuverlässig bestimmt werden, die innerhalb der kodierenden Sequenz liegen. Die daraus resultierenden Aminosäureaustauschereignisse sind in der Tabelle 3.5 aufgeführt. Die stillen Mutationen (*silent mutations*) an den Positionen 282, 335, 445, 572, 623, 677, 702 und 860 sind nicht angegeben, weil sie für weitere Analysen keine Bedeutung besitzen. Mutationen bei denen Stopp-Codons involviert sind (*nonsense mutations, readthrough mutations*) wurden nicht gefunden.

In keiner der aktiven LOX1:Md:1a-Isoformen (Genprodukte der *MdLOX1a*-Allele) sind Aminosäureveränderung innerhalb des aktiven Zentrums oder eines anderen in der Abbildung 3.6 gezeigten, hochkonservierten Bereiches vorhanden. Da diese Ergebnisse keine Aussage über Funktionsänderungen aufgrund einer veränderten Tertiärstruktur zulassen, ist die Strukturmodellerstellung (*structural modeling*) eine sinnvolle Ergänzung, um die Analyse zu komplettieren.

**Tabelle 3.5: Variable Aminosäure-Positionen der LOX1:Md:1a-Proteine.** Die Primärsequenz der abgeleiteten LOX1:Md:1a-Proteine von den *MdLOX1a*-Allelen der Sorten 'Golden Delicious' (GD), 'McIntosh' (McI), 'Discovery' (Disc) und 'Prima' (Pri) besitzen 15 variable Aminosäure-Positionen. Die stillen Mutationen (*silent mutations*) an den Positionen 282, 335, 445, 572, 623, 677, 702 und 860 sind nicht aufgeführt, da diese keine Änderung der Aminosäuresequenz verursachen. Die Aminosäuren, welche der konservierten *consensus*-Sequenz (kons. AS) entsprechen, sind ausgelassen (Punkt). Als Referenz (Ref.) gilt die in der Golden Delicious Genomsequenz angegebene Sequenzabfolge (MDP0000450991).

AS-Pos.	89	101	137	140	154	163	193	331	353	413	655	662	665	708	808
kons. AS	I	V	D	R	K	A	R	S	M	K	A	D	Q	I	E
Ref.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	R	.	E	.	V/I	E/D
GD 1	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	E	.	V	.
GD 2	.	.	.	.	.	.	G	.	.	R	.	E	.	.	D
McI 1	.	.	N	.	.	.	.	N	T	.	.	.	K	.	.
Disc 1	.	I	.	H	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Pri 1	.	.	.	.	.	.	G	.	.	R	.	E	.	.	D
Pri 2	F	.	.	.	N	.	G	.	.	.	T	.	.	V	.

### 3.5.2 Bewertung der Strukturmodellierung

Durch SWISS-MODELL wurden mittels Homologie-Modellierung (*homology modeling*) vorlagenbasierte Proteinmodelle errechnet. Die Proteinmodelle sind nicht *ab initio* auf Basis von physikalischen Prinzipien modelliert, sondern an eine bereits experimentell ermittelte Proteinstruktur angelehnt. Die Modellierungsvorlage für LOX1:Md:1a (namentlich der *Protein Data Bank*-Eintrag "1ik3") ist eine Soja-LOX. Ein Maß für die Ähnlichkeit von Proteinstrukturen liefert der Wert RMSD (*root mean square deviation*, mittlere quadratische Standardabweichung). Je kleiner diese mittlere quadratische Standardabweichung aller Aminosäuren innerhalb der Proteinkette im dreidimensionalen Raum ist, desto ähnlicher sind sich diese. Vor der Bestimmung des RMSD-Wertes

**Tabelle 3.6: Mittlere quadratische Standardabweichung der LOX1:Md:1a-Modelle.** Eingetragen sind die mittleren quadratischen Standardabweichungen der Modelle von Md:LOX:1a von den 'Golden Delicious'-Allelen (GD1, GD2) und den davon abweichenden Allelen von 'McIntosh' (McI1), 'Discovery' (Disc1) und 'Prima' (Prim2). In der symmetrischen Matrix ist die untere Hälfte ausgeblendet. Der ausgeblendete Wert für ein Modell im Vergleich mit sich selbst ist 0.

	1ik3	GD1	GD2	McI1	Disc1	Prim2
1ik3	-	0,071	0,070	0,070	0,071	0,070
GD1	-	-	0,001	0,001	0,001	0,001
GD2	-	-	-	0,000	0,001	0,001
McI1	-	-	-	-	0,000	0,001
Disc1	-	-	-	-	-	0,001

### 3 Ergebnisse

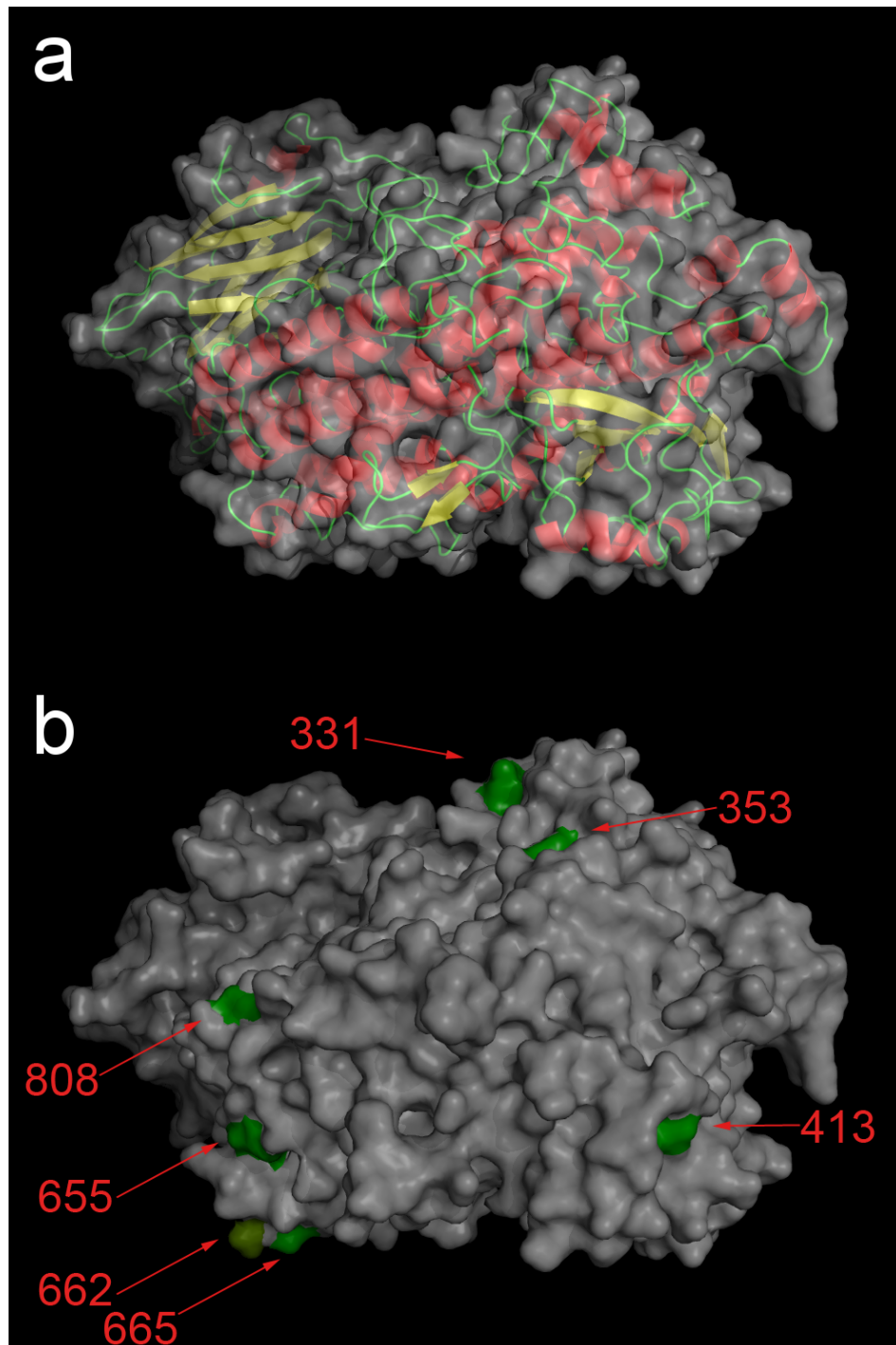
werden die einzelnen Strukturen durch den PyMOL-Befehl 'align' bestmöglich zueinander ausgerichtet (*structural alignment*). Die RMSD-Werte der Strukturpaare nach dem erfolgreichem Alignment sind in der Tabelle 3.6 eingetragen. Die RMSD-Werte zur Vorlage sind größer als jene zwischen den Apfel-LOX-Isoformen. Diese liegen sehr nahe bei 0. Auch die Abweichungen zur Vorlage sind sehr gering (0.070 bzw. 0.071) und sprechen für die sehr große strukturelle Ähnlichkeit der Modelle. Große Unterschiede der Modelle zueinander bezüglich ihrer Tertiärstruktur sind durch diesen Kennwert nicht feststellbar.

#### 3.5.3 Analyse der Strukturmodelle des *LOX1:Md:1a*-Proteins

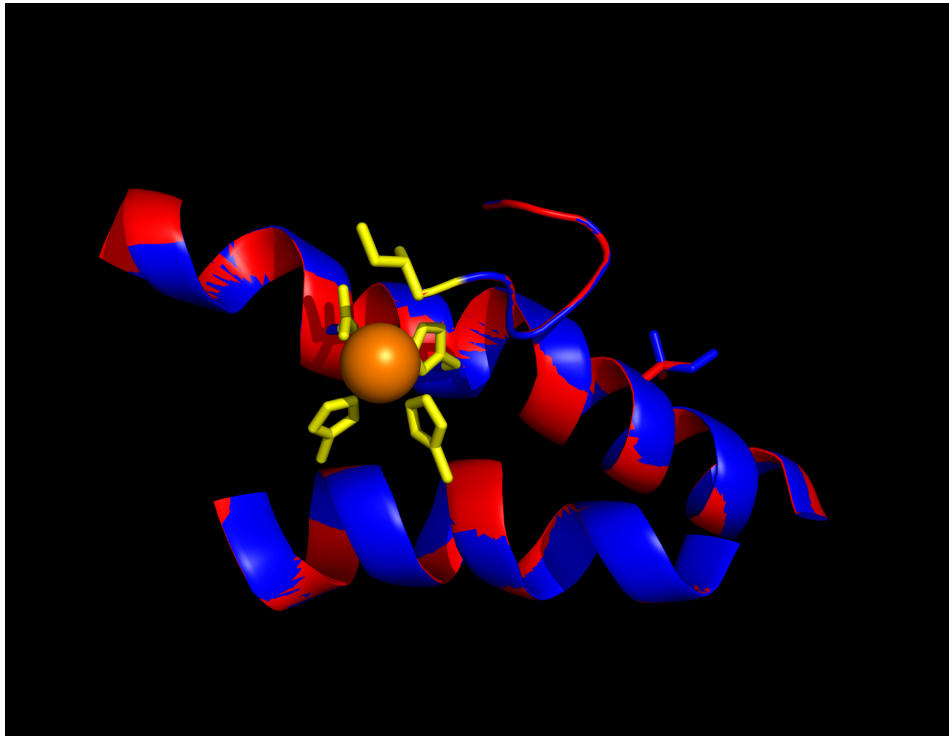
Die Mehrzahl der in Tabelle 3.5 aufgeführten variablen Aminosäurepositionen liegen an der Oberfläche des Proteinmodells. Sie liegen entfernt vom aktiven Zentrum (siehe Abbildung 3.19). Am N-Terminus der LOX-Proteine befindet sich eine  $\beta$ -barrel-Struktur (Abbildung 3.19a, links oben, gelb). Diese Struktur ist aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften häufig in Membranen eingelagert. Dem Autor sind keine Arbeiten bekannt, die über eine nachgewiesene Beteiligung dieser Proteindomäne an der LOX-Reaktion berichten. Die in diesem Bereich lokalisierten Aminosäureaustauschereignisse wurden in Abbildung 3.19 nicht eingetragen und fortfolgend nicht analysiert. Nur ein Aminosäureaustauschereignis liegt in der Nähe des aktiven Zentrums. An Position 708 ist Isoleucin durch Valin ersetzt. Dieser Austausch liegt in der Primärstruktur nahe der Region, in der zwei der fünf Aminosäuren liegen, deren Seitenketten das katalytisch aktive Eisen-Ion komplexieren. Die Abbildung 3.20 zeigt die umgebende Sekundärstruktur der Modelle, um dreidimensionale Änderungen im aktiven Zentrum zu untersuchen. In Überlagerung der Struktur der abweichenden (rot) mit der Struktur der konservierten Aminosäuresequenz (blau) erkennt man keine Änderungen der Sekundärstruktur oder der Bindungsverhältnisse am aktiven Zentrum.

Zusammenfassend bleibt festzustellen: Es wurde die Nukleotid- und der Proteinprimärsequenz, sowie die Proteinsekundär-, -tertiär- und -quartärstruktur von fünf unterschiedlichen *MdLOX1a*-Allelen bzw. der LOX1:Md:1a-Proteinisoformen untersucht. Es wurden keine Hinweise gefunden, dass Nukleotid- und folglich Aminosäurepolymorphismen zu funktionellen Einschränkungen dieser Isoformen führen.





**Abbildung 3.19: Strukturmodell von LOX1:Md:1a.** a) Oberfläche des Modells (grau) mit farblich hervorgehobener Tertiärstruktur des Proteinrückgrades (rot:  $\alpha$ -Helices, gelb:  $\beta$ -Faltblattstrukturen, grün: Schleifen). b) Oberfläche des Modells, exponierte variable Aminosäurepositionen sind grün eingefärbt. Die Nummerierung entspricht der Nummer der Aminosäure innerhalb der Primärsequenz. Die Mutationen an den Stellen 89 bis 193 liegen am N-Terminus des Proteins und sind nicht abgebildet.



**Abbildung 3.20: Aktives Zentrum des LOX1:Md:1a-Modells.** Das Eisen-Ion (orange) wird durch die Aminosäureseitenketten von His524, His529, His715, Asn719 und Ile863 (gelb) komplexiert. Die Peptidrückgrade des 'Golden Delicicious'-Allels 2 (blau) und des 'Prima'-Allels 2 (rot) wurden durch *structural alignment* bestmöglich überlagert. An Position 708 besitzt das dargestellte 'Prima'-Allel die Aminosäure Valin, das dargestellte 'Golden Delicicious'-Allel die Aminosäure Isoleucin.

## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das hauptverantwortliche LOX-Gen für Aroma ermittelt werden. Dafür wurde sich ein Überblick über die LOX-Genfamilie des Apfels verschafft. Die Gene wurden mit bioinformatischen Hilfsmitteln analysiert und es wurden Expressions- und Assoziationsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stützen die Hypothese, das *MdLOX1a* das hauptverantwortliche LOX-Gen für die Produktion von Schlüsselaromastoffen der Apfelfrucht ist.

### 4.1 Überblick über die Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels

#### 4.1.1 Anzahl der Apfel-Lipoxygenase-Gene

Innerhalb der von Velasco et al. (2010) veröffentlichten Apfelgenomsequenz wurden 23 als funktionell eingestufte LOX-Gene durch *gene mining* gefunden. In anderen Pflanzen reicht die Größe dieser Genfamilie von sechs Genen (*Arabidopsis thaliana*) bis zu 23 Genen (*Pyrus bretschneideri* und Gurke) (Bannenberget al., 2009; Li et al., 2014; Liu et al., 2011). Schaffer et al. (2007) konnten in einer EST-Datenbank nur acht Apfel-LOX-Gene identifizieren. Der größere Umfang der in vorliegender Arbeit benutzten Genomsequenz (57000 geschätzte Gene, Velasco et al. (2010)) im Vergleich zur EST-Datenbank (15000 nicht-redundante Sequenzen, Schaffer et al. (2007)) und die durch Expressionsanalyse gewonnene Erkenntnis, dass die Gene nicht ständig exprimiert sind, erklären diese Diskrepanz. Um eine Theorie über den Ablauf der Expansion der Genfamilie zu erarbeiten, konnte auf Ergebnisse aus der Kartierung und aus den Sequenzanalysen zurückgegriffen werden.

#### 4.1.2 Verteilung der Lipoxygenase-Gene im Genom des Apfels und die wahrscheinliche Expansion der Genfamilie

Die physikalische Kartierung geht auf Daten der Apfelgenomsequenz zurück (Velasco et al., 2010). Die 23 LOX-Gene liegen auf 10 Chromosomen teilweise in Gruppen von bis zu 4 Genen. Ein GWD wurde als Erklärung für die heutige Genomorganisation des Apfels diskutiert (Velasco et al., 2010). Um die Anzahl und chromosomale Verteilung von einigen LOX-Genen bei Gurke zu erklären, wird Tandem-Duplikation als hauptsächliche Ursache angenommen (Liu et al., 2011; Huang et al., 2009). Auch replikative Transposition ist grundsätzlich möglich (Kong et al., 2007). Die Gruppierung einzelner Apfel-LOX-Gene erklärt sich am schlüssigsten durch Tandem-Duplikation oder Segment-Duplikation. Andererseits sind Genpaare und Paare von LOX-Clustern auf zueinander

paralogen Chromosomen lokalisiert. Die Cluster werden laut Annotation in der Apfelgenomsequenz durch jeweils funktionsgleiche Gene flankiert, was die von Velasco et al. (2010) vorgebrachte Theorie eines GWD stützt. Eine replikative Transposition ist für die Vervielfachung von Bereichen mit einer Länge von bis zu 300 kb (Gencluster mit 4 Genen) nicht denkbar. Wahrscheinlich sind sowohl ein GWD als auch ein oder mehrere Tandem- oder Segment-Duplikationen verantwortlich für die Anzahl der LOX-Gene im Apfel. Das Zusammenspiel von mehreren Duplikationsmechanismen wurde bereits für *Glycine max* postuliert: in *Glycine max* und *Medicago truncatula* fand ein GWD vor der Arttrennung statt, gefolgt von für *Glycine max* spezifischen Tandem-Duplikationen (Shin et al., 2008). Auch für die dem Apfel nahe verwandte Birne wurde geschlussfolgert, dass sowohl Segment-Duplikationen als auch ein GWD für die Anzahl und Verteilung der Birnen-LOX-Gene verantwortlich sind (Li et al., 2014). Diese Theorie wird gestützt durch die Homologie der einzelnen LOX-Gensequenzen. Die Sequenzanalyse ermöglicht, die LOX-Genervielfältigung zeitlich zu ordnen. Ohne Zunahme von Sequenzen anderer Bedecktsamer kann geschlussfolgert werden, dass einige Gene aus einer Tandemduplikation eines Vorläufers hervorgegangen sind (*MdLOX7a* und *MdLOX7d* oder *MdLOX1c* und *MdLOX1d*) und diese Tandems danach durch ein GWD dupliziert wurden. Für weitere Studien wurden LOX-cDNA-Sequenzen von entfernt verwandten aber auch nahe verwandten Bedecktsamern benutzt (z. B. Erdnuss, Mays, Rose oder Mandel) (Burow et al., 2000; Wilson et al., 2001; Fukuchi-Mizutani et al., 2000; Mita et al., 2001). Deren Homologie zueinander lässt Vermutungen zu über den Zeitpunkt früher Genervielfachung, der vermuteten Tandem-Duplikation und des GWDs im Kontext der Artentwicklung innerhalb der Pflanzenfamilie Rosengewächse. Die 23 LOX-Gene werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie in 7 Gruppen eingeteilt. Die hohen Sequenzhomologien innerhalb der jeweiligen Gruppen sprechen jeweils für ein gemeinsames Vorläufergen. Die Ergebnisse aus einem MSA und der damit berechneten Identitätsmatrix zeigen: Die LOX-Proteine verschiedener Angiospermen-Arten sind zu denen des Apfels ähnlicher als die Apfel-LOXs zueinander.

Durch die Verfügbarkeit von Genomsequenzen und die fortschreitende Identifizierung weiterer Mitglieder von LOX-Genfamilien verschiedener Pflanzen, kann nun eine Hypothese für die Entstehung der Genfamilien formuliert werden. Die Vorläufergene der einzelnen Gruppen existierten bereits sehr früh in der Geschichte der bedecktsamigen Pflanzen oder noch früher. Bei Kartoffel oder in der Abstammungslinie der Gräser expandierten einige dieser Gruppen (Ergebnisse nicht gezeigt). In anderen Pflanzen wurde die gesamte Genfamilie während einem oder mehreren GWDs oder Polyploidierungseignissen kopiert (Velasco et al., 2010; Liu et al., 2011; Shin et al., 2008; Podolyan et al., 2010). Die Stellung einzelner LOX-Gene anderer Rosengewächse innerhalb der Gruppen MdLOX7 und MdLOX1 im phylogenetischen Baum legt folgenden Schluss nahe: die Tandemduplikation von MdLOX1- und MdLOX7-Genen erfolgte vor der Arttrennung von Vorfahren des Apfels, der Birne, des Pfirsichs, der Aprikose und der Rose. Dies sind Arten der klassischen Unterfamilien Maloideae, Prunoideae und Rosoideae. Die Tandem-Duplikation fand in einem sehr ursprünglichen Rosengewächs statt. Basierend auf einem Phylogramm erfolgte der GWD nach der Trennung dieser Abstammungslinien. Auch Li et al. (2014) stellen fest, dass die LOX-Genverteilung, abgesehen von der Verdopplung

## 4.1 Überblick über die Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels

durch einen GWD in der Abstammungslinie von Apfel und Birne, auch in *Prunus persica*, *Prunus mume* und *Fragaria vesca* vorhanden ist und eine Vervielfachung vor deren Arttrennung stattgefunden haben muss.

### 4.1.3 Biochemische Funktion der Lipoxygenasen

Die Sequenzanalyse liefert neben Anhaltspunkten zur Entstehung der Genfamilie weitere Erkenntnisse. Auch bei anderen Pflanzen wurden viele Isoformen von LOXs gefunden (Liavonchanka und Feussner, 2006). Entsprechend der von Feußner und Wasternack (2002) eingeführten Klassifizierung in Typ 1- und Typ 2-LOXs, teilt sich der phylogenetische Baum aller identifizierten Apfel-LOX-Sequenzen an seiner Basis in zwei Teilbäume. Dies ist auch für die LOX-Genfamilien von Wein und Olive beschrieben (Podolyan et al., 2010; Padilla et al., 2009). Der N-Terminus von Typ 2-LOXs besitzt häufig eine für Chloroplasten spezifische Signalsequenz (Feußner und Wasternack, 2002). Diese wurde für viele Typ 2-LOXs des Apfels nachgewiesen.

Basierend auf der Protein-Primärsequenz kann die Positionsspezifität von LOXs mit hoher Sicherheit vorhergesagt werden (Bannenberget al., 2009). Die SLOANE-Position liegt in der Nähe des aktiven Zentrums und bestimmt die Produktspezifität (Hornung et al., 1999). Sie wird für die Vorhersage der Positionsspezifität der Oxygenierung verwendet (Marmey et al., 2007; Acosta et al., 2009; Park et al., 2010; Podolyan et al., 2010). Die LOXs der Gruppen MdLOX1, MdLOX3 und MdLOX7 besitzen vorrangig 9-LOX-Funktion. Die LOXs der Gruppen MdLOX2, MdLOX5, MdLOX6 und MdLOX8 besitzen vorrangig 13-LOX-Funktion. Die Stellung der LOX-Proteinsequenzen in einem phylogenetischen Baum biochemisch charakterisierter LOXs unterstützt diese Annahme. Diese Klassifizierung ist nur vorläufig, da Art und Menge von Produkten generell von weiteren Faktoren anhängt, wie z.B. dem pH-Wert (Schiller et al., 2015). Die Überprüfung dieser Vorhersagen durch biochemische Proteincharakterisierung ist notwendig. Für *MdLOX1a* wurde von Schiller et al. (2015) eine Mischaktivität mit vorrangiger 13-LOX-Funktion ermittelt. Als Produzent von Vorstufen für Fruchtester kommen aufgrund deren katalytischer Aktivität nur 13-LOX in Frage (Schwab et al., 2008). LOX1:Md:1a, das Protein des Gens *MdLOX1a*, kann die Vorstufen für wichtige C6-Apfelaromastoffe bilden. Tatsächlich ist es noch immer strittig, wie der katalytische Prozess funktioniert und welche Aminosäureseitenketten Einfluss auf die Umwandlung des Substrates haben. Auch die zielgerichtete Mutagenese einer dieser Aminosäuren an der SLOANE-Position veränderte das prozentuale Verhältnis zwischen 9-LOX- und 13-LOX-Produkten nicht wesentlich (Schiller et al., 2015). Weitere LOXs mit dualer Positionsspezifität sind bekannt aus der Olive, der Teepflanze, der Erdnuss, der Kartoffel oder dem Reis (Palmieri-Thiers et al., 2009; Liu und Han, 2010; Burow et al., 2000; Hughes et al., 2001; Cho et al., 2012). Dies relativiert die anhand von bioinformatischen Analysen getroffene Vorhersage.

### 4.1.4 Verlässlichkeit von *in silico*-Ergebnissen

Grundsätzlich sind Vorhersagen mithilfe von bioinformatischen Werkzeugen bislang nicht vollständig verlässlich. Eine exakte computer-gestützte Genannotierung bedarf oft zu-

sätzlicher Verbesserungen (Salamov und Solovyev, 2000). Die Erweiterung von Genberechnungs- (und Annotierungs-) Software mit durch MSAs bereitgestellten Profilen erhöht die Genauigkeit der Vorhersage (Keller et al., 2011). Die in der Genomsequenz annotierten Intronengen wurden durch ein MSA-Profil aus 102 sequenzierten pflanzlichen LOX-cDNAs überprüft. Für die Hälfte der 25 LOX-Gensequenzen (23 LOX-Gene) wurden die Intronengen anhand des Profils neu festgelegt. Der Vergleich von 14 Sequenzen, von denen acht Sequenzen korrigiert wurden, mit von Schiller et al. (2015) klonierten cDNAs der Apfel-LOXs zeigt: die Festlegung der Intronengen mithilfe des MSA-Profiles entspricht dem tatsächlichen Zustand *in vivo*. Die MSA-gestützte Korrektur der *in silico* berechneten CDSs und der anschließende Vergleich mit deren klonierten cDNA-Sequenzen wurde nie zuvor für eine pflanzliche LOX-Genfamilie vorgenommen. Die Sequenzdaten der Apfel-Genomsequenz selbst sind, abgesehen von sortenspezifischen SNPs, identisch mit den durch SANGER-Sequenzierung erhaltenen Sequenzdaten der in dieser Arbeit klonierten LOX-Gene. Dies spricht für die hohe Qualität der Sequenzierung von Velasco et al. (2010). Die Verlässlichkeit von *ab initio* und referenzdatenbasierten Algorithmen für verschiedene Fragestellungen erhöht sich stetig. Die strukturellen und funktionellen Vorhersagen müssen bisher durch geeignete molekularbiologische oder biochemische Methoden überprüft werden.

### 4.2 *MdLOX1a* - das wichtigste Lipoxygenase-Frucharomagen des Apfels

Die Genexpression wird mittels molekularbiologischer Techniken ermittelt. Um bei der Entstehung des Frucharomas eine Rolle zu spielen, muss ein Gen zum Zeitpunkt der Aromastoffsynthese in der Frucht exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde die Expression von 15 der 23 LOX-Gene mittels RT-PCR untersucht. Zwei der untersuchten Gene zeigten eine Expressionssteigerung während der Fruchtentwicklung: *MdLOX1a* und *MdLOX5e*. Der Expressionsverlauf unterscheidet sich: die Expression von *MdLOX1a* steigt beim Eintritt in das Stadium der Genussreife sprunghaft an, die Transkriptmenge von *MdLOX5e* erhöht sich deutlich früher in der Fruchtentwicklung mit moderatem Anstieg.

#### 4.2.1 Kandidatengenexpression im Klimakterium

Der Stoffwechsel in der Apfelfrucht verändert sich beim Eintritt in das Klimakterium. Das Gas Ethylen (Ethen) wirkt bei klimakterischen Früchten als Reifehormon (Kieber und Ecker, 1993). Beispielweise sind Äpfel, Tomaten, Bananen und viele Steinfrüchte klimakterisch, wohingegen Wein, Orangen und Erdbeeren ohne die Erhöhung der Ethylensynthese ausreifen (Giovannoni, 2004). Beschrieben ist der Zusammenhang von LOX-Genexpression und dem Reifezeitpunkt beziehungsweise dem Beginn der Aromastoffbildung in der Birne, der Kiwifrucht und der Tomate (Lara et al., 2003; Zhang et al., 2006; Chen et al., 2004). Die Expression von *MdLOX1a* steigt im Gegensatz zu jener von *MdLOX5e* zum Zeitpunkt des Eintritts der Frucht in die Genussreife an. Diese zeitliche Übereinstimmung spricht für eine Rolle von *MdLOX1a* in der Aromastoffproduk-

## 4.2 *MdLOX1a* - das wichtigste Lipoxygenase-Frucharomagen des Apfels

tion. Darüber hinaus wird *MdLOX5e* in allen Geweben moderat exprimiert, was eine von der Fruchtreife unabhängige Funktion vermuten lässt. Die LOX-Genexpression und die Ethylenproduktion, stehen bei reifenden Pfirsichen in [funktionell oder regulatorisch nicht näher geklärtem] Zusammenhang (Zhu et al., 2006). Zhang et al. (2010) konkretisieren: während der Fruchtreife steigt die Expression von *PpLOX1* und *PpLOX4* an. Han et al. (2011) gehen davon aus, dass hauptsächlich *PpLOX1* aufgrund dessen Expression eine Rolle bei der Reife der Pfirsichfrucht spielt. Die Aromaproduktion des Apfels ist hauptsächlich von Ethylen abhängig und LOX1, LOX7 und LOX3 (entspricht *MdLOX1a*, *MdLOX7a* und *MdLOX3b*) werden in der Sorte ‘Royal Gala’ durch Ethylen induziert (Schaffer et al., 2007). Die Hexylesterproduktion und die autokatalytische Ethylenproduktion steigen zeitgleich an und der Verlauf der Abundanz der *MdLOX1a*-Transkripte entspricht dem Verlauf der Menge an detektierbaren Hexylestern (Schiller et al., 2015). Ethylen-induzierte Transkriptionsfaktoren und ihre Bindesequenzen (GCC-Boxen) in der Promotorregion von durch Ethylen induzierten Genen sind bekannt (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Es wurden keine GCC-Boxen bis zu 500 Nukleotide vor Translationsstart der Apfel-LOX-Gene gefunden (Ergebnisse nicht gezeigt). Defilippi et al. (2005) stellten zudem fest, dass exogene Ethylenanwendung nur einen geringen Effekt auf die LOX-Aktivität hat. Es sind keine funktionellen Nachweise für die Abhängigkeit des LOX-Stoffwechselweges von der Ethylenkonzentration aus eigenen Arbeiten oder der Literatur bekannt. Dennoch ist ein zeitlicher oder empirischer Zusammenhang vorhanden (Schiller et al., 2015; Schaffer et al., 2007). Ein Zusammenhang von LOX-Expression und Reifezeitpunkt bzw. der einsetzenden Produktion von Aromastoffen ist auch für andere Früchte beschrieben. Bis zur Pflückreife ist bei reifenden Kiwis keine deutliche Erhöhung der LOX-Transkript-Abundanz feststellbar, aber während der Lagerung bis zur Genussreife steigt die Expression der Gene *AdLOX1* und *AdLOX5* deutlich an (Zhang et al., 2006). Einzig für Tomate wurde eine funktionelle Studie durchgeführt, bei der mittels *antisense*-vermitteltem *knockout* gezeigt wurde, dass nur 13-LOX kurzkettige C6-Aldehyde und -Alkohole produzieren (Chen et al., 2004). Wenn die 13-LOX TomloxC ausgeschaltet wird, werden 9-LOX-Gene exprimiert, aber es werden keine C6-Aromastoffe gebildet (Chen et al., 2004). Neben der Expression während des Klimakteriums ist *MdLOX1a* in zumindest einem weiteren Gewebe exprimiert.

### 4.2.2 Hinweise auf Funktionen in mehreren Stoffwechselwegen

Schiller et al. (2015) isolierten *MdLOX1a*-cDNA aus Blättern. Eigene Studien bestätigen die Expression in jungen Blättern. Möglicherweise besitzen einige LOXs Funktionen in mehreren Entwicklungsstadien oder mehreren verschiedenen Geweben und Organen. Das *MdLOX1a*-Gen hat hohe Sequenzähnlichkeit zum Gen *Rlox1* der Rose (*Rosa hybrida*). Fukuchi-Mizutani et al. (2000) detektierte *Rlox1*-Transkripte sowohl in jungen Blättern als auch in Blütenorganen. In weiteren Pflanzen sind spezielle LOX-Gene in mehreren Geweben aktiv: in *Arabidopsis thaliana* (Melan et al., 1993; Bell und Mullet, 1993), in der Erdnuss (Burow et al., 2000), in der Teepflanze (Liu und Han, 2010), in der Tomate (Ferrie et al., 1994), im Raps (Terp et al., 2006) und im Wein (Podolyan et al., 2010). In Melone werden sechs von 18 LOX-Genen in allen untersuchten Geweben exprimiert

(Zhang et al., 2014). In Birne sind 10 von 23 Genen in allen Stadien der Fruchtentwicklung exprimiert (Li et al., 2014). *MdLOX1a* könnte in verschiedenen Geweben an unterschiedlichen Funktionen beteiligt sein.

Der Effekt durch die selektive Stilllegung eines LOX-Gens in einem Organ oder einem speziellen Entwicklungsstadium könnte mittels RNA-Interferenz untersucht werden. Gene können durch RNA-Interferenz, einer posttranskriptionalen Regulierung, stillgelegt werden (für eine Übersicht, siehe Hannon, 2002). Die Transformation von Apfelpflanzen und die Nutzung eines induzierbaren Promotors werden bereits erforscht (Herzog et al., 2012; Würdig et al., 2013). Mittels dieser molekularbiologischen Werkzeuge könnte diese Fragestellung einer eventuellen Multifunktionalität von LOX-Genen untersucht werden. Neben organspezifischen Expressionsunterschieden wurden auch sortenspezifische Unterschiede in vorliegender Studie festgestellt.

### 4.2.3 Sortenspezifische Expressionsunterschiede

Während der Fruchtlagerung sind *MdLOX7a* und *MdLOX7b* in 'McIntosh' exprimiert, in 'Golden Delicious' wurde keine Expression nachgewiesen. Der Expressionsverlauf der Gene *MD-ACO1* und *MdExp2* wurde untersucht, um die Vergleichbarkeit mit anderen Expressionsstudien zu beurteilen. Die relative Expression der Gene in 'Golden Delicious' und 'McIntosh' dieser Studie und 'Golden Delicious' aus Wakasa et al. (2003) ist nahezu identisch.

Der direkte Vergleich der Transkriptabundanz der zwei untersuchten Sorten zeigte, dass neben *MdLOX1a* auch *MD-ACO1* in 'McIntosh' früher exprimiert wird. Tatsächlich liegt die Genussreife von 'McIntosh' 10-14 Tage vor der von 'Golden Delicious'. Aufgrund der Ergebnisse der Expressionsstudien wird von genotyp-abhängigen Unterschieden bei der Regulation einzelner LOX-Gene ausgegangen. Die differentielle LOX-Genexpression in unterschiedlichen Sorten einer Art wurde bisher selten dokumentiert. In Olive ist *Oep2LOX1* in unterschiedlichen Sorten genotyp-spezifisch reguliert (Padilla et al., 2012).

Es wurden sechs *MdLOX1a*-Amplifikate kloniert und sequenziert. Diese entsprechen fünf Allelen. Die Nukleotidsequenz unterscheidet sich in verschiedenen Sorten. Für ein anderes Apfelaromagen wurde ein funktionaler Zusammenhang zwischen Sequenzpolymorphismen und der Aromastoffbildung festgestellt (Dunemann et al., 2012). Die Sequenzpolymorphismen haben keinen Einfluss auf die Struktur der LOX-Proteine. Die Proteine sind den Ergebnissen der *in silico*-Studien nach funktionstüchtig. Noch nie zuvor wurden fünf verschiedene LOX-Allele beziehungsweise fünf Isoformen eines auf ein LOX-Gen zurückgehenden Proteins miteinander verglichen. Die Interpretation dieser *in silico*-Analysen ist jedoch schwierig. Die *ab initio*-Berechnung von Proteinmodellen ist für große Proteine (von medizinischem und wissenschaftlichem Interesse) heutzutage unmöglich (Adams et al., 2013; Dorn et al., 2014). Die Alternative der vorlagenbasierten Modellierung nimmt bereits experimentell ermittelte Strukturen zu Hilfe (für eine Übersicht, siehe Baker und Sali, 2001). Damit werden Voraussetzungen zugrunde gelegt, die den Ausgang der Studie hin zu bestimmten Ergebnissen beeinflusst. Die experimentelle Überprüfung der Ergebnisse kann nicht Teil dieser Arbeit sein.



#### 4.2.4 Assoziationsanalyse

##### Kartierung

Die sortenspezifischen Sequenzpolymorphismen konnten als Marker für die Kartierung benutzt werden. Insgesamt wurden vier Gene kartiert. Darunter sind die zwei Kandidatengene *MdLOX1a* und *MdLOX5e*. Weiterhin wurde jeweils ein Gen der vier Gene enthaltenden Cluster, das Gen *MdLOX1d* auf LG 12 und *MdLOX7a* auf LG 4. Die LOX-Gene liegen in der physikalischen Karte und in den durch Kopplungsanalyse erstellten genetischen Karten in den gleichen Regionen. *MdLOX5e* konnte nur in der zu 'Prima' gehörenden LG 2 kartiert werden, weil der mit *MdLOX5e* gekoppelte Marker in 'Discovery' homozygot ist. *MdLOX1a* konnte nur auf der zu 'Discovery' gehörenden LG 9 kartiert werden. In diesem Bereich kartierten auch Dunemann et al. (2009) ein LOX-Gen des Clusters MD187410 mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP-Marker). Ein Sequenzvergleich mit *MdLOX1a* bestätigte, dass diese Sequenzen das gleiche Gen repräsentieren. Die hier verwendeten Markerdaten für die Berechnung der Kopplungskarte lagen auch der Kartierung von Dunemann et al. (2009) zugrunde. Die Markerdaten für die Haplotypen von *MdLOX1a*, *MdLOX1d*, *MdLOX5e* und *MdLOX7a* wurden hinzugefügt. Die Längen der Kopplungsgruppen weichen zu veröffentlichten Karten nur geringfügig ab (Dunemann et al., 2009; N'Diaye et al., 2008). In vorliegender Arbeit wurden einige Marker zusätzlich einbezogen oder ausgeschlossen, um eine möglichst hohe Ähnlichkeit der elterlichen Kopplungsgruppen zueinander zu gewährleisten. Dadurch kann die Position von *MdLOX1a* und *MdLOX5e* auch auf der Kopplungsgruppe abgeschätzt werden, in der sie nicht bestimmt werden konnte. Die Kartierung ermöglichte die Durchführung einer QTL-Analyse.

##### Aromastoffassoziation

Die QTL-Analyse ergab, dass der genomische Bereich, in dem auch *MdLOX1a* liegt, einen wichtigen Beitrag zur Synthese von Azetateestern leistet. *MdLOX5e* andererseits liegt in einem genomischen Bereich, der großen Einfluß auf die Menge von Butyl- und Hexylestern hat. Insgesamt wurden QTLs für die durch 13-LOX gebildeten C6-Verbindungen Hexanal, Hexylhexanoat, Hexylbutanoat, Butylhexanoat und Hexylazetat gefunden, deren 2-LOD-Intervall die Position von LOX-Genen einschließt. Die QTL-Analyse wurde für alle Kopplungsgruppen durchgeführt, allerdings wurden nur jene QTLs ausgewertet, die auf Kopplungsgruppen mit kartierten LOX-Genen liegen. Das Vorhandensein von QTLs bestätigt die Hypothese der Beteiligung von *MdLOX1a* oder *MdLOX5e* an der Aromastoffbildung. Die Beteiligung anderer LOX-Gene ist dadurch nicht ausgeschlossen. Es wurden weitere QTLs gefunden. Diese liegen auf LGs, die Chromosomen entsprechen, auf denen LOX-Gene physikalisch lokalisiert wurden. Die QTL-Analyse arbeitet nicht mit physikalischen sondern mit genetischen Karten. Eine Interpretation hinsichtlich der Rolle dieser LOXs ist ausgeschlossen, da es nicht möglich ist, aus der bekannten Position auf einem Chromosom die genaue Lage in einer Kopplungsgruppe abzuleiten. Weitere QTLs werden gefunden, wenn der LOD-Wert von 3,0 auf 2,5 abgesenkt wird (Vogt et al., 2013b). *MdLOX1a* liegt demnach im 2-LOD-Intervall von Hexylazetat. Weiterhin

liegt auf der LG 12 in 'Prima' ein QTL für Hexylhexanoat. In 'Discovery' besitzt der Hexylhexanoat-QTL auf LG 12 einen LOD-Wert von mehr als 3 und wurde in vorliegender Arbeit einbezogen.

Bei der QTL-Analyse des Apfels mit Aromastoffdatensätzen erschweren folgende Rahmenbedingungen die Interpretation der Ergebnisse:

- **die Überlagerung von Effekten der bei der Bildung von gradzahligen, unverzweigt-kettigen Aromastoffen beteiligten Gene von LOX über HPL und ADH bis hin zu AAT** - Kumar et al. (2015) bezeichnen das Apfel-Fruchtroma ausdrücklich als polygenes Merkmal aufgrund von SNP-Assoziationsanalysen.
- **die Größe der Genfamilien, die an diesen einzelnen Schritten beteiligt sind** - Es sind 23 LOX-Gene und 17 AAT-Gene (Dunemann et al., 2012) des Apfels bekannt. Die Anzahl der HPL und ADH-Gene des Apfels wurde bisher nicht ermittelt. Diese hohe Anzahl erschwert die sichere Identifikation des für die Aromastoffbildung hauptverantwortlichen Gens der jeweiligen Familie.
- **der räumlichen Nähe der Position dieser Gene auf den Chromosomen**

Der letzte Punkt wird in vorliegender Arbeit als Problem erkannt. Die Position von *MdLOX5e* auf LG 2 birgt für die QTL-Analyse eine spezielle Schwierigkeit. Am oberen Ende dieser LG wurde auch das Gen *MdAAT1* kartiert (Dunemann et al., 2012). Es befinden sich weitere Aroma-QTLs am oberen Ende der LG (Rowan et al., 2009b; Dunemann et al., 2009). Der breite 2-LOD-Konfidenzintervall von zwei hier beschriebenen Aromastoff-QTLs überspannt zudem das obere Ende der LG. Die verlässliche Beurteilung des Einflusses dieser Loci auf die Aromastoffe ist für Assoziationsstudien deshalb eine nicht zu unterschätzende Herausforderung. Durch weitere Arbeiten könnten diese Probleme gelöst werden. Die Markersättigung der Kopplungskarte könnte erhöht und damit eine Feinkartierung durchgeführt werden. Die Identifizierung von SNPs innerhalb des Genoms des Apfels führte zu der Entwicklung eines 8K-SNP-Chips (Chagné et al., 2012a). Durch diese Technik lassen sich Nachkommenschaften schnell genotypisieren (Kumar et al., 2012). Indem 8000 SNPs identifiziert werden können, ist eine hohe Genomabdeckung gewährleistet, die eine Feinkartierung ermöglicht.

Weiterhin ist die gründliche Erforschung aller im LOX-Stoffwechsel beteiligten Genfamilien notwendig, um den quantitativen Einfluss der einzelnen Kandidatengene zu ermitteln. Die LOX-Genfamilie wurde in vorliegender Arbeit gründlich untersucht. Durch *gene mining* wurden 20 AAT-Gene identifiziert, das hauptverantwortliche Gen für Fruchtroma identifiziert und ein funktioneller Marker entwickelt (Souleyre et al., 2005; Dunemann et al., 2012). Die gründliche Charakterisierung der Genfamilien HPL und ADH steht bisher aus. Auch diese sind beteiligt an der Produktion von unverzweigt-kettigen Schlüsselaromastoffen (Schwab et al., 2008). Dabei kommt den der AAT vorgelagerten Enzymen LOX, HPL und ADH ein großer Stellenwert zu, denn die Verfügbarkeit von Substraten spielt für die Ausprägung unterschiedlicher Aromen verschiedener Sorten eine größere Rolle als die AAT-Spezifität (Souleyre et al., 2005).

Schlussendlich sind funktionelle Studien notwendig. Für diese stehen seit kurzem sehr vielversprechende Werkzeuge der sequenzspezifischen Mutagenese zur Verfügung (TALENs oder CRISPR/Cas, (siehe Wang et al., 2014)). Damit können funktionelle Frage-

stellungen durch die Veränderung oder komplette Stilllegung eines Gens mittels Gentargeting effizient untersucht werden. Die lange juvenile Phase des Apfels ist bei funktionellen Studien für die Bestimmung eines Effektes im Zusammenhang mit der Frucht problematisch. Der Apfel bildet erst nach 5 bis 10 Jahren Blüten und Früchte (Flachowsky et al., 2009). Allerdings existiert für dieses Problem bereits ein Lösungsansatz. In transgenen Apfelpflanzen mit einem Frühblühergen kann die juvenile Phase stark verkürzt werden (Flachowsky et al., 2011).

## 4.3 Schlussfolgerung

Das Ziel der Arbeit, eine LOX der Produktion von Schlüsselaromastoffen in reifen Früchten zuzuordnen, wurde erreicht. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse, der Assoziationsanalyse und der durch Schiller et al. (2015) durchgeführten Proteincharakterisierung bestätigen die Hypothese, dass *MdLOX1a* das für die Synthese von Schlüsselaromastoffen der reifen Apfelfrucht hauptverantwortliche LOX-Gen ist. Die Schlussfolgerung unterstützt und konkretisiert die durch andere Studien beschriebenen Vermutungen für ein LOX-Aromagen des Apfels (Schaffer et al., 2007; Dunemann et al., 2009). Möglicherweise haben auch andere Gene der Genfamilie einen quantitativen Einfluss auf das Aromaprofil der reifen Apfelfrucht. Anhand der Ergebnisse wird vermutet, dass die Art und Menge der in der Apfelfrucht produzierten Aromastoffe weniger von der LOX1:Md:1a-Isoform als von der grundsätzlichen Verfügbarkeit und Menge des Enzyms im Stoffwechsel abhängt. Bereits geringe Enzymaktivität ist in 'Fuji'-Äpfeln für die Synthese von Aromastoffen ausreichend (Echeverría et al., 2004). Weitere Studien bestätigen diese Schlussfolgerung, denn es konnte kein SNP in der Nähe von *MdLOX1a* mit signifikanter Aromastoffassoziation gefunden werden und auf eine Rolle von Elementen der Expressionsregulation aromarelevanter Enzyme wird hingewiesen (Kumar et al., 2015). Die gezielte Mutagenese des LOX:Md:1a-Proteins beeinflusst die relative Menge der gebildeten Stoffe (Schiller et al., 2015). *In silico*-Analyseergebnisse lassen jedoch vermuten, dass kein nennenswerter Einfluss von natürlich vorkommenden Sequenzpolymorphismen auf die Struktur der entstehenden LOX1:Md:1a-Isoformen und deren Funktionalität existiert. Die Arbeiten haben weiterhin gezeigt, dass eine zuverlässige Aussage über die Funktionalität eines Enzyms nur durch funktionelle Studien oder durch biochemische Charakterisierung von Isoformen möglich ist.

## 4.4 Weiterführende Arbeiten

Durch die Identifizierung aller LOX-Gene des Apfels und die *in silico*-Charakterisierung wurde ein wesentlicher Beitrag geleistet, einen Überblick über die gesamte LOX-Genfamilie im Apfel zu schaffen. Bereits angesprochen wurden die Lösungsansätze für Probleme bei der sicheren Identifizierung der Kandidatengene aller Genfamilien, die bei der Bildung von unverzweigt-kettingen Aromastoffen beteiligt sind. Zusätzlich besitzen LOXs viele weitere physiologische Funktionen in höheren Pflanzen (Porta und Rocha-Sosa, 2002; Feußner und Wasternack, 2002; Matsui, 2006). In diesem Zusammenhang ergeben sich

aus den Ergebnissen weitere interessante Fragestellungen.

### 4.4.1 LOX-abhängige Hexanalproduktion und Pathogene

Aussichtsreich ist die erneute, umfassende Überprüfung unter dem Aspekt der Hexanal- und Hexenalproduktion mit unterschiedlichen Pathogenen. Hexanal und 3-Hexenal besitzen antimikrobielle Eigenschaften und verringern die Blattlausfruchtbarkeit im Laborexperiment (Deng et al., 1993; Hildebrand et al., 1993). Mehrere C6-Aldehyde, darunter Hexanal, sind beteiligt in der direkten Abwehrreaktion von Blattläusen (Vancanneyt et al., 2001). Die Expressionsänderung des 13-LOX-Gens *MdLOX6a* während der Reife ist identisch zum Kurvenverlauf der cis-3-Hexenal-Bildung in diesem Zeitintervall (Schiller et al., 2015). Drei 13-LOX-Gene befinden sich am oberen Ende der LG 7, wo Roche et al. (1997) auch den *Sd1*-Resistenzlocus gegen die Apfelfaltenlaus (*Dysaphis devecta*) in 'Fiesta' kartierten. An dieser Position existiert auch ein starker Blattlausresistenz-QTL und ein Hexanal-QTL (Stoeckli et al., 2008; Vogt et al., 2013b). 13-LOXs produzieren Vorstufen für den Jasmonat-Stoffwechsel und *green leaf volatiles*, welche bei der Pathogenabwehr relevant sind (Matsui, 2006; Howe und Jander, 2008; Jardine et al., 2012). Möglicherweise ist eines der drei Gene verantwortlich für Blattlausresistenz. Verschiedene funktionelle Studien weisen nach, dass LOXs die Pathogen-Pflanzen-Interaktion beeinflussen (Kolomiets et al., 2000; Hwang und Hwang, 2010; Burow et al., 2000; Liu und Han, 2010). Eine initiale Expressionsanalyse mit verschiedenen Pathogenen (*Erwinia amylovora*, *Venturia inaequalis* und *Eriosoma lanigerum*) lieferte in vorliegender Studie nur wenige auswertbare Ergebnisse und sollte erneut in Betracht gezogen werden.

### 4.4.2 Entwicklungsphysiologische Funktionen

Der Beitrag von LOXs bei entwicklungsphysiologischen Vorgängen, wie Keimung oder Blühregulation ist für andere Pflanzen beschrieben (Feußner et al., 2001; Caldelari et al., 2011). Bekannt ist, dass die Blütenentwicklung auch über Jasmonatderivate beeinflusst wird und 13-LOXs die Ausgangsstoffe für die Jasmonatsynthese liefern (für eine Übersicht, siehe Siedow, 1991; Feußner und Wasternack, 2002). Das Verständnis der Zusammenhänge von durch 9-LOX-gebildeten Stoffen mit entwicklungsphysiologischen Funktionen sind noch immer lückenhaft. KODA ist ein Derivat von 9-LOX-Produkten und unterdrückt *MdTFL1*, welches die Blütenknospenentwicklung des Apfels steuert (Kittikorn et al., 2011; Hättasch et al., 2008). Die Transkription von *MdTFL1-1* wird im gleichen Zeitraum unterdrückt, in dem die Transkriptanzahl von *MdLOX7a* am höchsten ist. Basierend auf der zeitlichen Übereinstimmung und der vorausgesagten 9-LOX-Funktion ist es untersuchenswert, ob *MdLOX7a*-Vorstufen für die Synthese von KODA zur Verfügung stellt und damit einen indirekten Effekt auf die Blütenknospenentwicklung des Apfels hat.

LOXs produzieren Fruchtaromastoffe, besitzen entwicklungsphysiologische Funktionen und spielen eine Rolle bei der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Schwab et al., 2008; Caldelari et al., 2011; Kittikorn et al., 2011; Feußner und Wasternack, 2002; Huang et al., 2009; Liavonchanka und Feussner, 2006; Podolyan et al., 2010). Das detail-

#### *4.4 Weiterführende Arbeiten*

lierte Verständnis dieser Wechselwirkungen bietet ein kaum abschätzbares Potential für die Ertragsoptimierung und den Pflanzenschutz.



## 5 Zusammenfassung

### Einführung:

Der Apfel ist das bedeutendste Obst in Deutschland. Der Geschmack eines Apfels ist abhängig von der Ausstattung an Schlüsselaromastoffen, deren Konzentration sich sortenspezifisch unterscheidet. Einige wichtige Aromastoffe werden durch den Lipoxygenase-Stoffwechselweg gebildet. Als erstem Enzym in diesem Stoffwechselweg kommt der Lipoxygenase eine Schlüsselrolle zu. Durch die Oxigenierung von ungesättigten Fettsäuren werden Vorstufen für Stoffe gebildet, die dem Apfel seinen typischen Geruch und fruchtigen Geschmack verleihen und in weiteren Stoffwechselwegen wirken.

### Methodik:

Es wurden die Lipoxygenasegene des Apfels mittels *gene mining* identifiziert. Durch Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse der Gensequenzen wurde die Funktion der Enzyme als 9- bzw. 13-LOX vorhergesagt. Die Sequenzanalyse von klonierten Amplifikaten und die Strukturmodellierung erweiterten die *in silico*-Analysen. Die Notwendigkeit der Überprüfung von *in silico*-Ergebnissen wird diskutiert. Die Expression von 15 Lipoxygenase-Genen wurden mittels *reverse transcriptase*-PCR untersucht. Die Integration von Markern für vier Lipoxygenasegene in eine existierende Kopplungskarte ermöglichte es, eine QTL-Analyse durchzuführen.

### Ergebnisse:

Der Apfel besitzt 23 LOX-Gene, die unregelmäßig und zum Teil gruppiert auf 10 der insgesamt 17 Chromosomen des Apfels verteilt sind. Mithilfe der verfügbaren Sequenzen für Lipoxygenasegene anderer Bedecktsamer wurde eine Hypothese über die Expansion der Lipoxygenasegenfamilie aufgestellt: sieben Vorläufergene existierten in einer basalen Angiosperme. Innerhalb der Abstammungslinie der Rosengewächse kam es zunächst zu Tandem-Duplikation und später zur Verdopplung aufgrund einer Duplikation des gesamten Kerngenoms. Durch Expressionsanalysen wurden *MdLOX1a* und *MdLOX5e* als mögliche Fruchtaromakandidatengene ermittelt. Dabei ist die Expressionssteigerung von *MdLOX1a* eng an die Genussreife der Apfelfrucht gebunden. Von der Fruchtaromabildung unabhängige Funktionen werden aufgrund der Expression in anderen Geweben nicht ausgeschlossen. Sortenspezifische Expressionsunterschiede verschiedener Lipoxygenasegene wurden festgestellt. Eine QTL-Analyse zeigte, dass sowohl *MdLOX1a* als auch *MdLOX5e* in Bereichen kartiert sind, die jeweils einen Einfluss auf wichtige Schlüsselaromastoffe des Apfels besitzen. Die biochemische Charakterisierung im Rahmen des Kooperationsprojektes zeigte: *MdLOX1a* produziert Vorstufen für Fruchtester.

## 5 Zusammenfassung

### Schlussfolgerung:

*MdLOX1a* leistet unter den Apfelloxygenasen den hauptsächlichlichen Beitrag für die Produktion von wichtigen Aromaschlüsselkomponenten, nämlich den unverzweigten Fruchtestern, Alkoholen und Aldehyden. Es konnten keine Hinweise gefunden werden, die die sortenspezifischen Aromaunterschiede auf Sequenzpolymorphismen des *MdLOX1a*-Gens zurückführen.

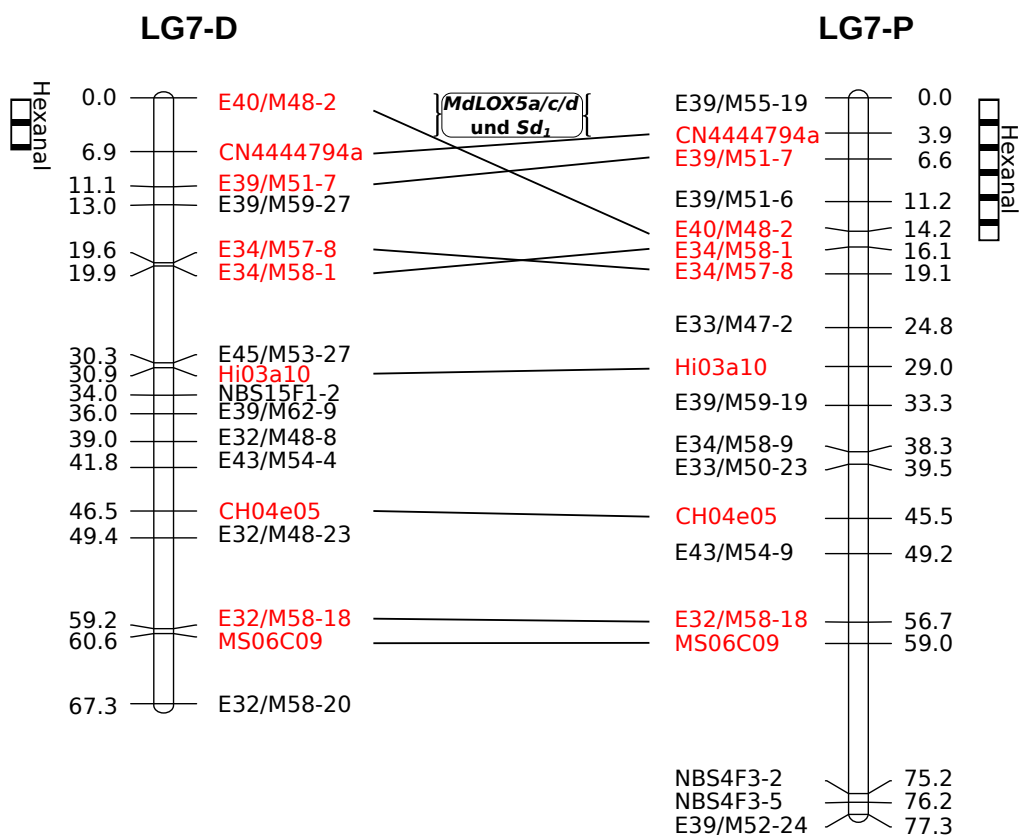
### Ausblick:

Die Funktionen von Lipoxygenasen im Stoffwechsel von Pflanzen sind vielfältig. Die Bestimmung von *MdLOX1a* als das hauptverantwortliche Lipoxygenase-Kandidatengen für Aroma einerseits und die Verfügbarkeit von klonierten und sequenzierten Sequenzen andererseits ermöglichen, Marker mit enger Kopplung zu diesem Gen zu entwickeln. Die Nutzung dieser Marker durch moderne markerbasierte Züchtungsstrategien könnte die auf Fruchtqualität ausgerichtete Sortenzüchtung wesentlich beschleunigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten weiterhin eine Übersicht über die gesamte Lipoxygenasefamilie des Apfels. Dadurch sind gute Voraussetzungen geschaffen, um die Rolle von Lipoxygenasen während der Pathogeninteraktion und bei Entwicklungsprozessen des Apfels zu erforschen.



# 6 Anhang

## 6.1 Zusätzliche Abbildungen



**Abbildung 6.1:** Karten der Kopplungsgruppe 7 von 'Prima' (P) und 'Discovery' (D). Am oberen Ende der Kopplungsgruppen ist die Region vermerkt, in der die Gene *MdLOX5a*, *MdLOX5c* und *MdLOX5d* physikalisch kartiert wurden. Auch der Resistenzlocus *Sd1* wurde von Roche et al. (1997) in diesem Bereich beschrieben. Durch QTL-Analyse wurde am oberen Ende der Kopplungskarten beider Eltern ein Bereich identifiziert, der einen signifikanten Einfluss auf die Menge des Aldehyds Hexanal hat. Die zur Erstellung der Kopplungsgruppenkarte benutzten Marker und deren Position in cM (Centimorgan) sind angegeben. Die Marker, die auf den Karten beider Elternsorten eingetragen sind, sind rot hervorgehoben und durch eine Linie verbunden.

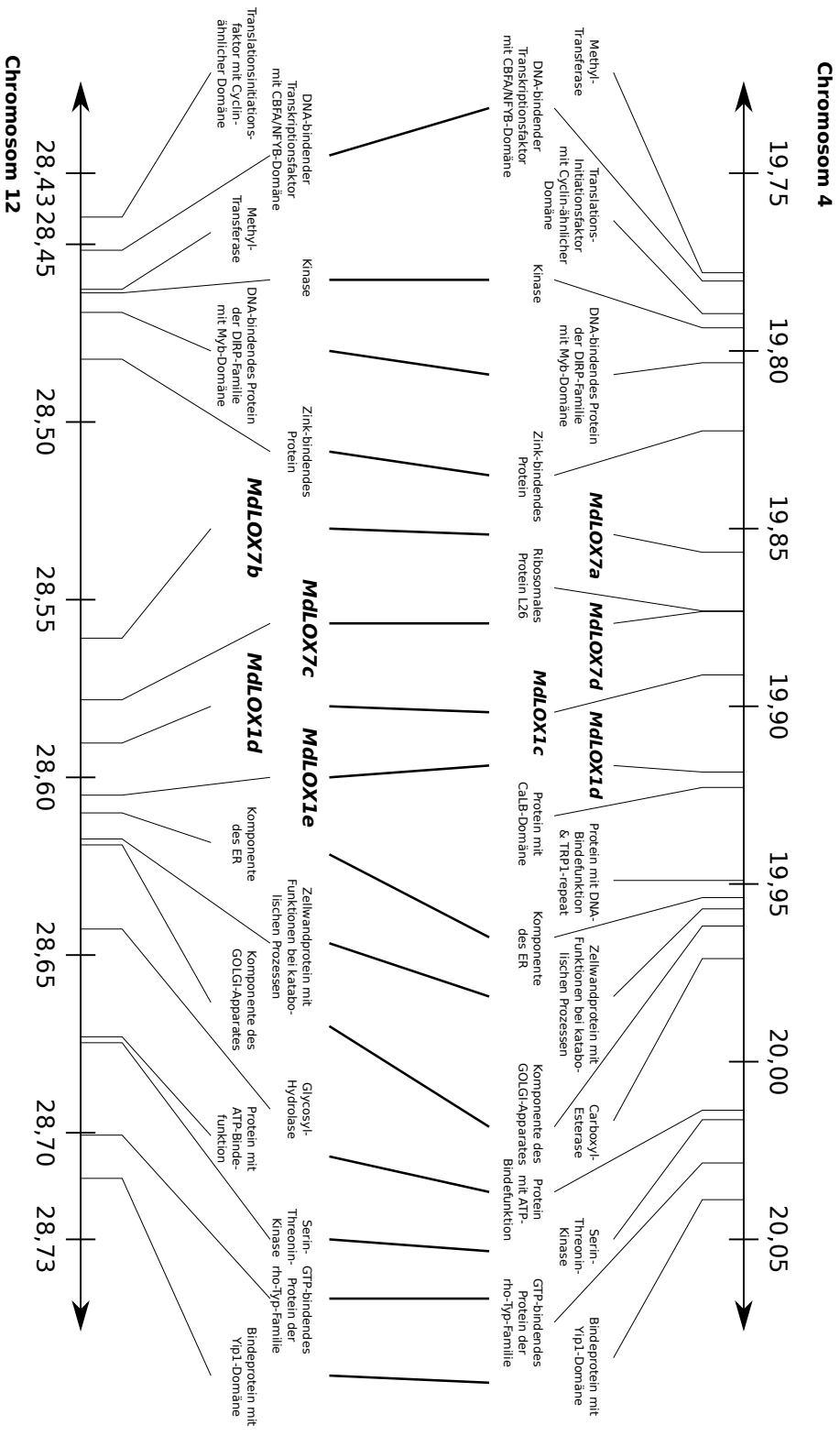
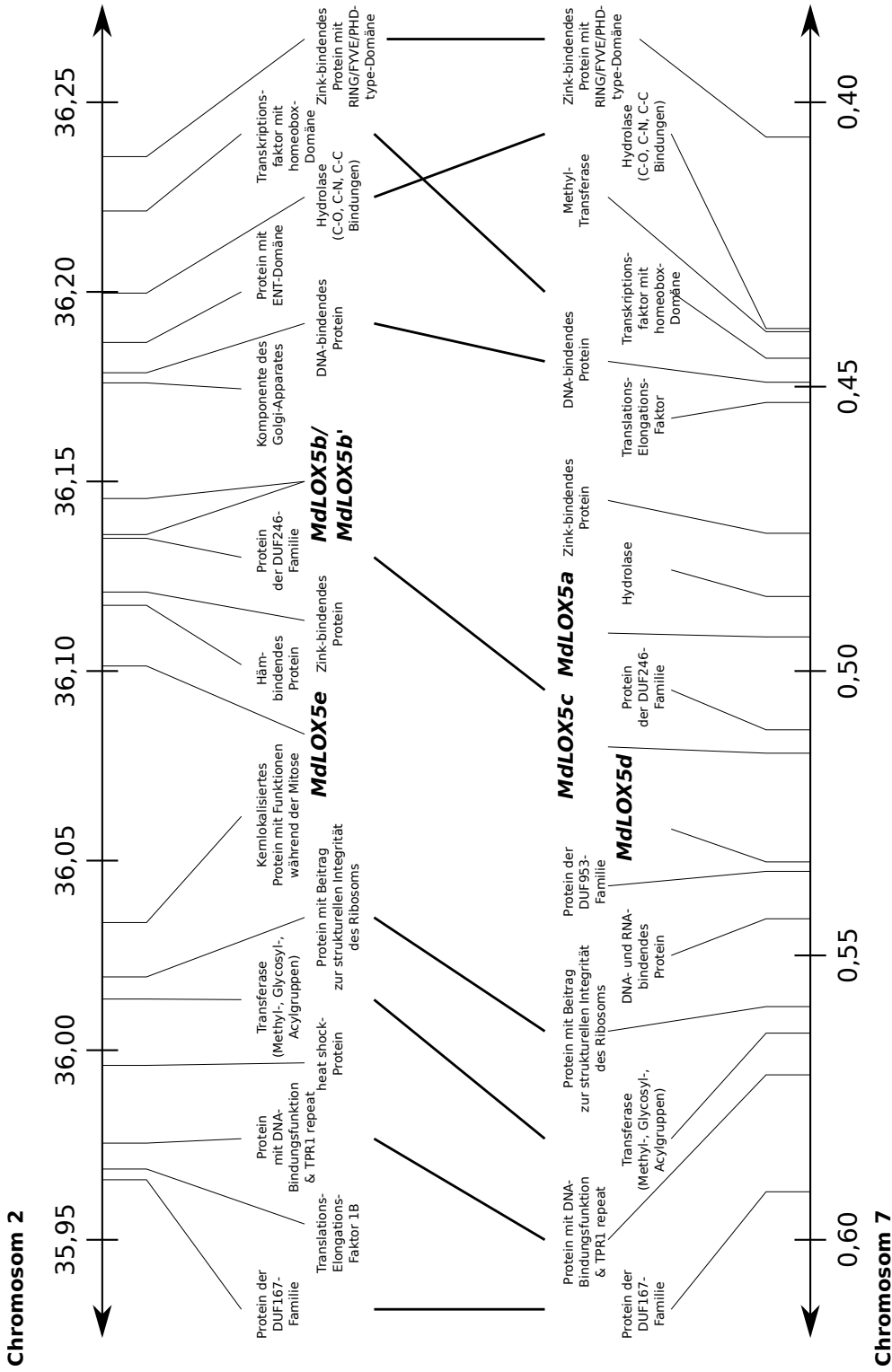


Abbildung 6.2: Einige ausgewählte Genannotationen nahe der MdlOX1/MdlOX7-Cluster. Die Gene mit gleichen Funktionsannotationen sind durch Verbindungslinien gekennzeichnet. Auf den Chromosomen sind Orientierungspunkte in Mbp angegeben. Die Länge der beiden Chromosomenabschnitte ist identisch. Die Genannotationen und die Lage der Gene auf den Chromosomen wurden der Golden Delicious-Genomsequenz entnommen (Velasco et al., 2010).



**Abbildung 6-3: Einige ausgewählte Genannotationen nahe der MdLOX5-Cluster.** Die Gene mit gleichen Funktionsannotationen sind durch Verbindungslinien gekennzeichnet. Auf den Chromosomen sind Orientierungspunkte in Mbp angegeben. Die Länge der beiden Chromosomenabschnitte ist identisch. Die Genannotationen und die Lage der Gene auf den Chromosomen wurden der Golden Delicious-Genomsequenz entnommen (Velasco et al., 2010).

## 6.2 Zusätzliche Tabellen

**Tabelle 6.1: Primer für die LOX-Genklonierung.** Die Primer sind angegeben mit ihrer Nukleotidsequenz in 5'→3'-Richtung und ihrer durch Gradienten-PCR ermittelten Schmelztemperatur.

Primername	Nukleotidsequenz	Schmelztemperatur
lox1a_for	TGAACTCTTCCATGCAAGGTTTC	60 °C
lox1a_rev	AAATTGTGTCAAATCCACGCTT	60 °C
lox2a_for	ATGCGGGAATTTCGGATTCAAACTTTCTCGAAC	62 °C
lox2a_rev	ATCATCGGTACCCCACCACCACCTCAAATAA	62 °C
lox2b_for	GAAGAAGAAGATGGCACTGACTAAAC	60 °C
lox2b_rev	CTAAATGTTGTTGAGAGTCATATCG	60 °C
lox3a_for	CCACATTCTCATCCATCTTCCT	60 °C
lox3a_rev	CTTTCACCTCCTGTTGTCCGTTG	60 °C
lox7a_for	ATCTCCGGTACCACCTTCTCCTTCTGTAAAC	62 °C
lox7a_rev	ACCACCTCTAGACACGAGTGAAATACAATGTAGAC	62 °C
lox8a_for	GTCCTTACTGTAAAGCATTAAACT	50 °C
lox8b_for	CTTCCTGTTACTGTAAAGCATTAAACC	55 °C
lox8_rev	TCCGAGCACAGCTATCATATAGA	55 °C
lox9a_for	GTTGATTTGCCGAGTCACTTTTC	60 °C
lox9a_rev	ATGGTGCGTCTCCTGGG	60 °C

**Tabelle 6.2: Primer für die durch MWG durchgeführte Sequenzierung der klonierten LOX-Gene.** Die Primer sind angegeben mit ihrer Nukleotidsequenz in 5'→ 3'-Richtung. Die Schmelztemperatur wurde nicht ermittelt. Die Primer 'pJET1.2 forward sequencing primer' und 'pJET1.2 forward sequencing primer' und die zugehörigen Informationen stammen aus dem CloneJET™ PCR Cloning Kit.

Primername	Nukleotidsequenz	Schmelztemperatur
pJET1.2 forward sequencing primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	60 °C
pJET1.2 reverse sequencing primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	60 °C
lox1a_PW1_for	GCCTTGCTCCACTTTGTTTGCC	-
lox1a_PW1_rev	TCCTTGACTGCCACGCCTC	-
lox1a_PW2_for	ATTCGGTTGCCTGAAGGTTTAT	-
lox1a_PW1_McI_for	AACAATCATCATAGTGAGTTCTTCCT	-
lox1a_PW1_McI_rev	TATTACCTCATCCACTGTTAGTCCAT	-
lox2a_PW1_for	TTACAAACAAGCACCAGAACGAG	-
lox2a_PW1_rev	GGTAACGAGTGCTAACAAGACATATT	-
lox2a_PW2_for	AACCCACTTTACCCCTTACTTGAATA	-
lox2a_PW2_rev	GAAGAAAAGATGAATAGTCCCATAAAAAGG	-
lox2b_PW1_for	TCTTTCTGGAGACCATAACCCTTGA	-
lox2b_PW1_rev	GAAATAGTAAACCTAATGGAAACGCA	-
lox2b_PW2_for	CATTATGTTGCCAAACTGCTATCTT	-
lox2b_PW3_for	TCGTCATCTGTAGTGTTGTTAGTTTAG	-
lox3a_PW1_for	GGGCTACAACCATTACATCGT	-
lox3a_PW1_rev	GAAATCCAACAGAAGCAAATGAC	-
lox3a_PW2_for	CAAGAAGAGGAAGAAGACTGGTC	-
lox7a_PW1_for	TCGTAGTTAGAAATGAGCATCACAGT	-
lox7a_PW1_rev	AATTCTTCAACCGCCACTCCTC	-
lox7a_PW2_for	CTATGAAGGAGGATTAGAGTTGCC	-
lox8a_PW1_for	CCGTGAGAGGGTGGCTGC	-
lox8a_PW2_for	TACCGAAAGTAGAATGGAAAAGC	-
lox8a_PW1_rev	CCTCCATCTCAAACCTCCACA	-
lox8b_PW1_for	TCCTACCATGAATCAATATCTTGTTATC	-
lox8b_PW1_rev	CCTCCATCTCAAACCTCCACA	-
lox8b_PW2_rev	CGGAGAGCAGAAATGAAAAGC	-
lox9a_PW1_for	AACAATCATCATAGTGAGTTCTTCCT	-
lox9a_PW1_rev	TATTACCTCATCCACTGTTAGTCCAT	-

**Tabelle 6.3: Primer für die Expressionsanalyse ausgewählter LOX-Gene durch Reverse Transkriptase-PCR.** Die Primer sind angegeben mit ihrer Nukleotidsequenz in 5'→3'-Richtung und ihrer durch Gradienten-PCR ermittelten Schmelztemperatur. Die Primer 'MdACO1F', 'MdACO1R', 'MdExp2F' und 'MdExp2R' stammen aus der Veröffentlichung von Wakasa et al. (2003).

Primername	Nukleotidsequenz	Schmelztemperatur
lx1a_genspez_for	AGGCACTCAAGAACAAAAAGC	60 °C
lx1a_genspez_rev	TTCAATCCCATCAACAGCATAT	60 °C
lx1d_genspez_for	TCCTCATCAATGCGGGCGGTATC	62 °C
lx1d_genspez_rev	ACACTTCATCAGTTCAATGCCTAGACAG	62 °C
lx2a_genspez2_for	ACCATTACTACCAGACTCAAGCC	62 °C
lx2a_genspez2_rev	GCGTATTTCGGGGTTCATTCTCC	62 °C
lx2b_genspez2_for	ATCAACTCAACTGCGGCACCTTA	62 °C
lx2b_genspez2_rev	AAAACTCCTGCTCCACACCTG	62 °C
lx3a_genspez_for	TCTCTACGAGGGAGGTATCAAGTT	62 °C
lx3a_genspez_rev	CGTCTTTGTGTCCGTGGAGTTTA	62 °C
lx3b_genspez_for	CAACGAGTTTGACACTTTTGAGGATG	60 °C
lx3b_genspez_rev	CGTCTTTGCGTGCGTAGAGTTTATTC	60 °C
lx5b_genspez_for	TACCTACCATCAGTGACACCGAGT	62 °C
lx5b_genspez_rev	GGGATTATTGTCTGAAAAAACC	62 °C
lx5e_genspez_for	CATCTATCGTCTTCTACATCCTCATTTC	60 °C
lx5e_genspez_rev	GGTTCACACAGTCACTCACCCATC	60 °C
lx6b_genspez_for	AAACCTCATTTTCGCCAA	60 °C
lx6b_genspez_rev	TAATAGCATCCCATAAGAGCAGT	60 °C
lx7a_genspez_for	ATGGAATGGTCATCAGCAGTGTA	62 °C
lx7a_genspez_rev	GCATCCGTTGTCCACTCCG	62 °C
lx7b_genspez_for	TTTTCTGTTCAAGCACTCCCCAT	62 °C
lx7b_genspez_rev	GCGAGGTGCCTAGACAAGATTTCC	62 °C
lx7d_genspez_for	TAACGCTGGTGGAAATACGAGAGGCA	60 °C
lx7d_genspez_rev	CCGAGTGTCTTTACAGGATTTCA	60 °C
lx8a_genspez_for	GGGTAATGTGATAAGGCACGC	55 °C
lx8a_genspez_rev	TTCTTTCTTCTCCTCCTCTTTCCA	55 °C
lx8b_genspez_for	GGGGTGATGGGATAGGTAGGA	55 °C
lx8b_genspez_rev	CTTCTTTCTTCTCTTCGTCTTTCTC	55 °C
lx9a_genspez_for	TGCTGGTTATCCTCTAAATCGTCC	62 °C
lx9a_genspez_rev	GGTAAGCCTGGCATCGGTGTTTC	62 °C
MdACO1F	TGAAATTCCAAGCCAAGGAG	61 °C
MdACO1R	TTCAACTACACAAACAGTGG	61 °C
MdExp2F	GGCAAGCAATGTCAAGAAACTG	61 °C
MdExp2R	TTAAAGGCGCAGAATAAGCAGC	61 °C

**Tabelle 6.4: Liste der biochemisch charakterisierten LOX-Proteine.** Diese Liste enthält neben dem Namen des Ursprungsorganismus auch die systematische Bezeichnung des Proteins, die NCBI-Akzessionsnummer, die biochemisch ermittelte Produktspezifität aus der Originalpublikation und gibt die Aminosäuren an der SLOANE-Position an. Die Primärsequenzen dieser LOX-Proteine wurden zur Erstellung des phylogenetischen Baumes in Abbildung 3.7 benutzt. Die systematische Bezeichnung der pflanzlichen LOXs folgt den Vorschlägen von Feußner und Wasternack (2002), Bannenberget al. (2009) und Podolyan et al. (2010).

Ursprungsorganismus	Bezeichnung	NCBI-akzession	Positions-spezifität	Sloane-Position	
<i>Adelostemma gracillimum</i>	LOX1:Agr:1	AAZ04411	9	TV	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LOX1:At:1	AAA32827	9	TV	
	LOX1:At:2	CAC19365	9	TV	
	LOX2:At:1	AAA32749	13	CF	
	LOX2:At:2	CAB56692	13	GF	
	LOX2:At:3	CAC19364	13	CF	
	LOX2:At:4	CAG38328	13	CF	
	<i>Arachis hypogaea</i>	LOX1:Ah:1	AAF60270	13/9	TF
<i>Brassica napus</i>	LOX2:Bn:2	AAO03559	13	RF	
<i>Camelia sinensis</i>	LOX1:Csi:1	ABW75772	9/13	TV	
<i>Capsicum annuum</i>	LOX1:Can:1	ACO57136	9	TV	
<i>Corylus avellana</i>	LOX1:Ca:1	CAD10740	9	TV	
<i>Cucumis sativus</i>	LOX1:Cs:3	CAA63483	13/9	TH	
	LOX1:Cs:4	CAB83038	9	TV	
	<i>Hordeum vulgare</i>	LOX1:Hv:1	AAA64893	9	TV
		LOX1:Hv:3	AAB70865	13	TV
LOX2:Hv:1		AAC12951	9/13	SF	
	LOX2:Hv:2	CAD45186	13	TF	
	LOX2:Hv:3	CAD45187	13	AF	
<i>Lens culinaris</i>	LOX1:Lc:1	CAA50483	13/9	TF	
<i>Marchantia polymorpha</i>	MpLOX1 <sup>a</sup>	BAJ46514	13	SF	
	MpLOX2 <sup>a</sup>	BAJ46515	13	YF	
	MpLOX3 <sup>a</sup>	BAJ46516	13	FF	
<i>Nicotiana tabacum</i>	LOX1:Nt:1	CAA58859	9	TV	
<i>Olea europaea</i>	LOX1:Oep:1	ACG56281	9/13	TV	
	LOX1:Oep:2	ACD43483	9/13	TV	
	LOX2:Oep:1	ACD43484	13	CF	
	LOX2:Oep:2	ACD43485	13	GF	
<i>Oryza sativa</i>	LOX1:Os:1	CAA45738	13/9	TV	
	LOX1:Os:2	BAD02945	9	TV	
	LOX1:Os:3	ABD47523	13/9	TV	
	LOX2:Os:1	BAA03102	13	SF	
	LOX2:Os:2	CAC01439	13	AF	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 6.4** – Fortsetzung von vorheriger Seite

Ursprungsorganismus	Bezeichnung	NCBI-akzession	Positionsspezifität	Sloane-position
<i>Physcomitrella patens</i>	LOX2:Ps:1	CAE47464	13/9	HF
<i>Pisum sativum</i>	LOX1:Ps:2	CAA55318	13/9	SF
	LOX1:Ps:3	CAA55319	9/13	TF
	LOX1:Ps:7	CAG44502	9/13	TY
	LOX2:Pod:1	AAZ57444	13/9	SF
<i>Populus deltoides</i>	LOX2:Pod:2	AAZ57445	13/9	SF
	LOX1:Prd:1	CAB94852	9	TV
<i>Prunus dulcis</i>	LOX1:Prd:2	CAD10779	9	TV
	LOX1:St:4	CAA64766	9	TV
<i>Solanum tuberosum</i>	LOX1:St:9	AAD04258	9	TV
	LOX1:St:12	CAB65460	9/13	TV
	LOX2:St:1	CAA65268	13	SF
	LOX2:St:2	CAA65269	13	CF
	LOX2:Vv:A	ACZ17391	13	AF
	LOX2:Vv:O	ACZ17393	13	CF
<i>Zea mays</i>	LOX1:Zm:1	ABC59685	13/9	TV
	LOX1:Zm:3	AAG61118	9	TV
	LOX2:Zm:1	ABC59693	13	SF
	ZmLOX5 <sup>b</sup>	ABC59688	9	TV

<sup>a</sup> ursprüngliche Bezeichnung der LOX-Proteine von *Marchantia polymorpha* beibehalten

<sup>b</sup> ursprüngliche Bezeichnung beibehalten, da LOX-Typ in der Literatur nicht genannt

**Tabelle 6.5: Akzessionsnummern der für die Identifizierung von mutmaßlich funktionellen LOX-Genen verwendeten LOX-Sequenzen.** Für die Identifizierung der mutmaßlich funktionellen LOX-Gene wurden 122 LOX-Sequenzen aus 35 verschiedenen bedecktsamigen Pflanzen verwendet. Durch Sequenzvergleich der 40 per BLAST identifizierten LOX-Kandidaten mit diesen 122 Sequenzen wurden 15 der 40 durch BLAST gefundenen Apfel-LOX-Sequenzen als nicht funktionell identifiziert und ausgeschlossen.

Ursprungsorganismus	Akzessionsnummer
<i>Actinida deliciosa</i>	ABF59998, ABF59999, ABF60000, ABF60002, ABF60001
<i>Adelostemma gracillimum</i>	AAZ04411
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAA32749, AAA32827, CAB56692, CAC19364, CAC19365, CAG38328
<i>Arachis hypogaea</i>	AAF60270
<i>Brassica napus</i>	AAO03558, AAO03559
<i>Camelia sinensis</i>	ABW75772, ACJ54281, ACQ76787

Fortsetzung auf nächster Seite



Tabelle 6.5 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Ursprungsorganismus	Akzessionsnummer
<i>Capsicum annuum</i>	ACO57136
<i>Caragana jubata</i>	ABQ10187
<i>Cucumis melo</i>	ABB82552
<i>Cucumis sativus</i>	AAC61785, CAB83038, CAA63483
<i>Gladiolus hybridus</i>	AEO13837
<i>Glycine max</i>	AAA33986, AAA33987, AAA03728, AAA96817, AAB67732, AAC49159, ABS32275, ABS32276, CAA31664
<i>Gossypium hirsutum</i>	AAK50778
<i>Hordeum vulgare</i>	AAA64893, AAB41791, AAB60715, AAB70865, AAC12951, CAD45186, CAD45187, CAI84707
<i>Lens culinaris</i>	CAA50483
<i>Malus domestica</i>	ES790006, ES790007, ES790036, ES790038, ES790041, ES790094, ES790104
<i>Marchantia polymorpha</i>	BAJ46514, BAJ46515, BAJ46516
<i>Nicotiana attenuata</i>	AAP83134, AAP83137, AAP83138
<i>Nicotiana tabacum</i>	AAV92893, CAA58859
<i>Olea europaea</i>	ACD43484, ACD43485, ACG56281
<i>Oryza sativa</i>	AAD39093, AAD42043, ABD47523, ACU42568, BAA03102, BAD02945, CAA45738, CAC01439
<i>Persea americana</i>	AAD09861
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AAB18970, AAF15296, ABM88259, CAA45086
<i>Physcomitrella patens</i>	CAE47464
<i>Pisum sativum</i>	CAA53730
<i>Populus deltoides</i>	AAZ57444, AAZ57445
<i>Prunus armeniaca</i>	ABZ05753
<i>Prunus dulcis</i>	CAD10779
<i>Prunus persica</i>	ABV3255, ACH90245, ACH91370, ACG59769
<i>Pyrus pyrifolia</i>	ABN09736
<i>Solanum lycopersicum</i>	AAA53183, AAA53184, AAB65766, AAB65767, AAG21691
<i>Solanum tuberosum</i>	AAB67858, AAB67860, AAB67865, AAB81594, AAB81595, AAD04258, AAD09202, CAA55724, CAA64766, CAA65268, CAA65269, CAB65460
<i>Triticum aestivum</i>	AAC49285, ACS34908, ACS34909
<i>Vitis vinifera</i>	ACZ17391, ACZ17392, ACZ17393
<i>Zea mays</i>	AAG61118, ABC59685, ABC59686, ABC59687, ABC59688, ABC59689, ABC59690, ABC59691, ABC59692, ABC59693, ABC59694, ABC59695, ACG43480

**Tabelle 6.6: Akzessionsnummern der für die Exon-Intron-Grenzenbestimmung verwendeten LOX-cDNA-Sequenzen.** Für die Überprüfung der Intron-Exon-Struktur der 25 Apfel-LOX-Sequenzen wurden 102 LOX-cDNA-Sequenzen aus 32 verschiedenen bedecktsamigen Pflanzen verwendet um ein Profil der konservierten Intron-Exon-Grenzen zu ermitteln.

Ursprungsorganismus	Akzessionsnummer
<i>Actinida deliciosa</i>	DQ497793, DQ497795, DQ497796, DQ497797
<i>Adelostemma gracillimum</i>	DQ094169
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ302043, AY056166, AY081253, BX818403, L04637, L23968
<i>Arachis hypogaea</i>	AF231454
<i>Brassica napus</i>	AY162142, AY162143
<i>Camelia sinensis</i>	EU195885, FJ418174, FJ794853
<i>Capsicum annuum</i>	FJ377708
<i>Caragana jubata</i>	EF530043
<i>Cucumis melo</i>	DQ267934
<i>Cucumis sativus</i>	AJ271161, U25058, X92890
<i>Gladiolus hybridus</i>	JF831194
<i>Gossypium hirsutum</i>	AF361893
<i>Hordeum vulgare</i>	AJ507212, AJ507213, AJ966349, L37359, L37358, L35931, U56406
<i>Lens culinaris</i>	X71344
<i>Malus domestica</i>	ES790007, ES790036, ES790038, ES790041, ES790104, TC60021_TC86_TC28233, TC60153_TC208_TC28364, TC60238_TC282_TC28441, TC77129_TC176_TC28325
<i>Nicotiana attenuata</i>	AY254345, AY254348, AY254349
<i>Nicotiana tabacum</i>	AY775034, X84040
<i>Olea europaea</i>	EU513352, EU513353, EU678670
<i>Oryza sativa</i>	AB099850, AF095895, AF095896, AJ270938, D14000, DQ389164, FJ607153, X64396
<i>Persea americana</i>	AD001673
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AF204210, EF196866, U76687, X63521
<i>Pisum sativum</i>	AJ293015 X76124, X78580 , X78581, Y15410
<i>Populus deltoides</i>	DQ131178, DQ131179
<i>Prunus armeniaca</i>	EU439430
<i>Prunus dulcis</i>	AJ418043
<i>Prunus persica</i>	EF568783, EU883638, FJ029110, FJ032015
<i>Pyrus pyrifolia</i>	EF215449
<i>Rosa hybrida</i>	Fukuchi-Mizutani et al. (2000)
<i>Solanum lycopersicum</i>	AY008278, U09025, U09026, U37839, U37840
<i>Triticum aestivum</i>	GQ166691, GQ166692, U32428
<i>Vitis vinifera</i>	FJ858255, FJ858256, FJ858257
<i>Zea mays</i>	AF329371, DQ335760, DQ335761, DQ335762, DQ335763, DQ335764, DQ335765, DQ335766, DQ335767, DQ335768, DQ335769, DQ335770, EU971362

**Tabelle 6.7: Vorhersageergebnisse der Programme PLOC, ProtComp und Psort über die subzelluläre Lokalisierung der 23 LOX-Proteine.** Die Programme PLOC, ProtComp und Psort analysieren ein eventuell vorhandenes N-terminales Signalpeptid und berechnen die Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung der Proteine in den entsprechenden Zellkompartimenten. Diese Vorhersage beschreibt das Protein in der Chloroplastenmembran (Chlo), im Cytoplasma (Cyt) oder ist nicht eindeutig (n.e.). N-terminale Signalpeptide sind ein wichtiges Merkmal von Typ 2-LOXs (Feußner und Wasternack, 2002).

<b>LOX-Protein</b>	<b>Erwartung (entsprechend LOX-Typ)</b>	<b>PLOC</b>	<b>ProtComp für pflanzliche Proteine</b>	<b>Psort</b>
LOX1:Md:1a	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX1:Md:1b	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX1:Md:1c	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX1:Md:1d	Cyt	Cyt	Chlo	Chlo
LOX1:Md:1e	aufgrund der Unvollständigkeit des N-Terminus nicht geprüft			
LOX2:Md:2a	Chlo	Chlo	Chlo	Chlo
LOX2:Md:2b	Chlo	Cyt	Chlo	Cyt
LOX1:Md:3a	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX1:Md:3b	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX2:Md:5a	Chlo	Cyt	Chlo	Chlo
LOX2:Md:5b	Chlo	Cyt	Chlo	Chlo
LOX2:Md:5c	aufgrund der Unvollständigkeit des N-Terminus nicht geprüft			
LOX2:Md:5d	Chlo	Cyt	Chlo	Chlo
LOX2:Md:5e	aufgrund der Unvollständigkeit des N-Terminus nicht geprüft			
LOX2:Md:6a	Chlo	Cyt	Chlo	n.e.
LOX2:Md:6b	Chlo	Chlo	Chlo	Chlo
LOX1:Md:7a	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
LOX1:Md:7b	aufgrund der Unvollständigkeit der N-Terminus nicht geprüft			
LOX1:Md:7c	Cyt	Cyt	Chlo	Chlo
LOX1:Md:7d	Cyt	Cyt	Chlo	Chlo
LOX2:Md:8a	Chlo	Cyt	Chlo	Chlo
LOX2:Md:8b	Chlo	Cyt	Chlo	Chlo
LOX1:Md:9a	Cyt	Cyt	Chlo	Chlo

**Tabelle 6.8: Übersicht über die Kennwerte der QTLs in Regionen mit kartierten LOX-Genen.** Die gefundenen QTLs in den Bereichen von kartierten LOX-Genen sind vorrangig Ester. Auch das Aldehyd Hexanal besitzt einen QTL in 'Prima' und 'Discovery'. Weitere QTLs, auch in Regionen von physikalisch kartierten LOXs, sind nicht aufgeführt. Die Position des maximalen LOD-Wertes und der Start bzw. das Ende des 2-LOD-Intervalls sind in cM angegeben.

Kopplungsgruppe	Aromastoff	maximaler LOD-Wert	Position des maximalen LOD-Wertes	Start des 2-LOD-Intervalls	Ende des 2-LOD-Intervalls
<u>Discovery</u>					
LG2	BuOBu	7,41	56,9	40,3	61,6
	BuOHex	6,57	56,9	43,3	73,7
	HexOBu	8,45	47,7	43,3	56,9
	HexOHex	3,14	69,9	62,6	73,7
LG9	BuOAc	3,08	4,7	0	45,6
	PentOAc	3,21	4,7	0	43,6
LG12	HexOHex	3,14	57,2	47,6	67,0
	Hexanal	5,19	39,6	21,3	48,6
<u>Prima</u>					
LG2	BuOBu	7,24	43,6	30,7	47,2
	BuOHex	5,74	39,2	0	47,7
	HexOBu	5,61	5,5	0	47,2
	HexOHex	3,22	43,6	24,5	51,3
Lg12	Hexanal	4,94	38,9	28,7	56,2

**Tabelle 6.9: Kennwerte der Hexanal-QTLs auf Kopplungsgruppe 7 in 'Prima' und 'Discovery'.** In der QTL-Region wurde der MdLOX5-Cluster physikalisch kartiert. Der Cluster besteht aus den 13-LOX-Genen *MdLOX5a*, *MdLOX5c*, *MdLOX5d*. Die Tatsache, dass 13-LOXs Hexanal produzieren, im Zusammenhang mit der Eigenschaft von Hexanal, die Blattlausfruchtbarkeit zu verringern und die Existenz eines Blattlausresistenzlokus ist bemerkenswert. Die Position des maximalen LOD-Wertes und der Start bzw. das Ende des 2-LOD-Intervalls sind in cM angegeben.

Kopplungsgruppe	Aromastoff	maximaler LOD-Wert	Position des maximalen LOD-Wertes	Start des 2-LOD-Intervalls	Ende des 2-LOD-Intervalls
<u>Discovery</u>					
LG7	Hexanal	5,20	0	0	5,6
<u>Prima</u>					
LG7	Hexanal	4,34	3,9	0	15,4

## 6.3 Lösungen und Medien

### 6.3.1 Medien

#### LB-Medium (flüssig)

1 % Bactotrypton

1 % NaCl

0,5 % Hefeextrakt

#### LB-Medium fest

Zugabe von 1 % Agar-Agar zu flüssigem LB-Medium

#### SOC-Medium

Zugabe von:

- sterilfiltrierter Glucoselösung, Endkonzentration: 20 mM
- sterilfiltrierter Magnesiumchloridlösung, Endkonzentration: 20 mM
- Magnesiumsulfat, Endkonzentration: 10 mM

zu 96 ml SOB-Medium

#### SOB-Medium

20 g Trypton/Pepton

5 g Hefeextrakt

Natriumchlorid, Endkonzentration: 10 mM

Kaliumchlorid, Endkonzentration: 2,5 mM

auf 1 l mit Wasser auffüllen

pH-Wert einstellen auf 7,0

*Medium vor Gebrauch autoklavieren.*

### 6.3.2 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, sind Lösungen von flüssigen Stoffen im jeweiligen prozentualen Volumenmischverhältnis mit Wasser gemischt, wie z. B. 0,05 %-ige Natriumlaurylsulfat-Lösung (SDS-Lösung), 70 %-ige Ethanollösung.

weitere grundsätzliche Bemerkungen:

- Ethanol: Es wurde ausschließlich unvergällter Alkohol benutzt.
- Wasser: Solange nicht anders angegeben, wurde entionisiertes Wasser benutzt. Für Arbeiten mit RNA wurde DEPC-behandeltes Wasser benutzt.

#### DEPC-behandeltes Wasser

1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) in entionisiertem Wasser über Nacht durch Magnetrührer mischen, danach zweimal autoklavieren.

## 6 Anhang

*Achtung: Kontaminationen beim Entfernen des Magnetrührers vermeiden!*

TAE-Puffer (40-fach)

40 mM TRIS-Acetat

1 mM EDTA

pH-Wert einstellen auf 8,0

AGE-Ladepuffer 10-fach

**Tabelle 6.10: Zusammensetzung des 10-fach AGE-Ladepuffers.**

<u>Stoff</u>	<u>absolut</u>	<u>für 50 ml</u>
Glyzerin	50 %	25 ml
Bromphenolblau	0,25 %	125 mg
Xylencyanol	0,25 %	125 mg

3-fach CTAB-Extraktionspuffer

**Tabelle 6.11: Zusammensetzung des 3-fach CTAB-Extraktionspuffers.**

<u>Stoff</u>	<u>absolut</u>	<u>für für 400 ml</u>	<u>für für 50 ml</u>
CTAB	3 %	12 g	1,5 g
PVP (40)	3 %	12 g	1,5 g
EDTA	25 mM	20 ml einer 0,5 M Lösung	2,5 ml einer 0,5 M Lösung
NaCl	2 M	200 ml einer 4 M Lösung	5,884 g NaCl
TRIS-HCl	100 mM	40 ml einer 2 M TRIS-Lösung	5 ml einer 1 M TRIS-Lösung

*Achtung: beta-Mercaptoethanol wird erst kurz vor Gebrauch zugesetzt!*

# Literaturverzeichnis

- Acosta I, Laparra H, Romero S, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger J, Moreno M und Dellaporta S. 2009. *tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science Signalling*, 323(5911):262.
- Adams P, Baker D, Brunger A, Das R, DiMaio F, Read R, Richardson D, Richardson J und Terwilliger T. 2013. Advances, interactions, and future developments in the cns, phenix, and rosetta structural biology software systems. *Annual Review of Biophysics*, 42:265–287.
- Altisent R, Echeverría G, Graell J, López L und Lara I. 2009. Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of ‘fuji’ apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10):4305–4312.
- Andersen C, Jensen J und Ørntoft T. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15):5245–5250.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J und Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2):195.
- Baker D und Sali A. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294(5540):93–96.
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M und Castresana C. 2009. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2):85–95.
- Bell E und Mullet J. 1993. Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology*, 103(4):1133.
- Binnie J und McManus M. 2009. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) oxidase multigene family of *Malus domestica* BORKH. *Phytochemistry*, 70(3):348–360.
- BMELV-Statistisches Bundesamt. 2013. Zahl der Woche, Pressemitteilung Nr. 232 vom 15.08.2013, 2013. Verfügbar auf <http://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2013/232-Zahl-der-Woche-Obstverbrauch.html?nn=312878>. Zuletzt abgerufen am 30.07.2015.

- Burow G, Gardner H und Keller N. 2000. A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Molecular Biology*, 42(5):689–701.
- Bus V, Rikkerink E, Aldwinckle H, Caffier V, Durel C, Gardiner S, Gessler C, Groenwold R, Laurens F, Cam B et al. 2009. A proposal for the nomenclature of venturia inaequalis races. *Proceedings of the 12th Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Zaragoza, Spain, 16-20 September 2007.*, 2(814):739–746.
- Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley G et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611–622.
- Caldelari D, Wang G, Farmer E und Dong X. 2011. Arabidopsis *lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Molecular Biology*, 75(1):25–33.
- Casey R. 1995. Sequence of a cDNA clone encoding a potato (*Solanum tuberosum*) tuber lipoxygenase. *Plant Physiology*, 107(1):265.
- Chagné D, Crowhurst R. N, Troglio M, Davey M. W, Gilmore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens R. P, Kumar S, Cestaro A et al. 2012a. Genome-wide snp detection, validation, and development of an 8k snp array for apple. *PLoS One*, 7(2):e31745.
- Chagné D, Krieger C, Rassam M, Sullivan M, Fraser J, André C, Pindo M, Troglio M, Gardiner S. E, Henry R. A et al. 2012b. QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. *BMC Plant Biology*, 12(1):12.
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z und Grierson D. 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, 136(1):2641.
- Chevreau E und Laurens F. 1987. The pattern of inheritance in apple (*malus x domestica* borkh.): further results from leaf isozyme analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(1):90–95.
- Cho K, Kim Y, Woo J, Rakwal R, Agrawal G, Yoeun S und Han O. 2012. Transgenic expression of dual positional maize lipoxygenase-1 leads to the regulation of defense-related signaling molecules and activation of the antioxidative enzyme system in rice. *Plant science*, 185:238–245.
- Chou K und Shen H. 2008. Cell-PLoc: a package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nature Protocols*, 3(2):153–162.
- Cornille A, Giraud T, Smulders M, Roldán-Ruiz I und Gladieux P. 2014. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics*, 30(2):57–65.



- Costa F, Cappellin L, Zini E, Patocchi A, Kellerhals M, Komjanc M, Gessler C und Biasioli F. 2013. QTL validation and stability for volatile organic compounds (VOCs) in apple. *Plant Science*, 211:1–7.
- Cunningham D, Acree T, Barnard J, Butts R und Braell P. 1986. Charm analysis of apple volatiles. *Food Chemistry*, 19(2):137–147.
- Dana-Farber Cancer Institute. 2010. DFCI Apple Gene Index, 2010. Verfügbar auf <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=apple>. Zuletzt abgerufen am 15.10.2010.
- De Castro E, Sigrist C, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux P, Gasteiger E, Bairoch A und Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and prerule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl 2):W362–W365.
- Defilippi B, Dandekar A und Kader A. 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8):3133–3141.
- Deng W, Hamilton-Kemp T, Nielsen M, Andersen R, Collins G und Hildebrand D. 1993. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3):506–510.
- Dorn M, e Silva M, Buriol L und Lamb L. 2014. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, 53:251–276.
- Dunemann F, Ulrich D, Boudichevskaia A, Grafe C und Weber W. 2009. QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny ‘Discovery’ × ‘Prima’. *Molecular Breeding*, 23(3):501–521.
- Dunemann F, Ulrich D, Malysheva-Otto L, Weber W, Longhi S, Velasco R und Costa F. 2012. Functional allelic diversity of the apple alcohol acyl-transferase gene *MdAAT1* associated with fruit ester volatile contents in apple cultivars. *Molecular breeding*, 29(3):609–625.
- Echeverría G, Graell J, López M und Lara I. 2004. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3):217–227.
- Edgar R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5):1792–1797.
- Evans R. C und Campbell C. S. 2002. The origin of the apple subfamily (maloideae; rosaceae) is clarified by dna sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany*, 89(9):1478–1484.

- FAO. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division, 2015. Verfügbar auf <http://faostat3.fao.org>. Zuletzt abgerufen am 30.07.2015.
- Ferrie B, Beaudoin N, Burkhart W, Bowsher C und Rothstein S. 1994. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 106(1):109.
- Feuillet C, Leach J, Rogers J, Schnable P und Eversole K. 2011. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends in Plant Science*, 16(2):77–88.
- Feußner I und Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53:275–297.
- Feußner I, Kühn H und Wasternack C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science*, 6(6):268–273.
- Feussner I, Hause B, Nellen A, Wasternack C und Kindl H. 1996. Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta*, 198(2):288–293.
- Flachowsky H, Hanke M.-V, Peil A, Strauss S und Fladung M. 2009. A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding*, 128(3): 217–226.
- Flachowsky H, Le Roux P.-M, Peil A, Patocchi A, Richter K und Hanke M.-V. 2011. Application of a high-speed breeding technology to apple (*malus* × *domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist*, 192(2):364–377.
- Fukuchi-Mizutani M, Ishiguro K, Nakayama T, Utsunomiya Y, Tanaka Y, Kusumi T und Ueda T. 2000. Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. *Plant Science*, 160(1 ,0):129–137.
- Giovannoni J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16(suppl 1):S170–S180.
- Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, volume 41, pages 95–98, 1999.
- Han M, Zhang T, Zhao C und Zhi J. 2011. Regulation of the expression of lipoxygenase genes in *Prunus persica* fruit ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4):1345–1352.
- Han Y und Korban S. 2008. An overview of the apple genome through BAC end sequence analysis. *Plant Molecular Biology*, 67(6):581–588.
- Hannon G. J. 2002. Rna interference. *Nature*, 418(6894):244–251.

- Harker R, Gunson A und Jaeger S. 2003. The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3):333–347.
- Harrington B et al. Inkscape, version 0.48.4 r9939. 2012.
- Hättasch C, Flachowsky H, Kapturska D und Hanke M.-V. 2008. Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple *Malus domestica*. *Tree Physiology*, 28(10):1459–1466.
- Heitz T, Bergey D und Ryan C. 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 114(3):1085.
- Herzog K, Flachowsky H, Deising H. B und Hanke M.-V. 2012. Heat-shock-mediated elimination of the nptII marker gene in transgenic apple (*Malus × domestica* borkh.). *Gene*, 498(1):41–49.
- HIDRAS Framework. 2010. HIDRAS - High quality disease resistant apples for a sustainable agriculture, 2010. Verfügbar auf <http://www.hidras.unimi.it/index.php>. Zuletzt abgerufen am 19.10.2015.
- Hildebrand D, Brown G, Jackson D und Hamilton-Kemp T. 1993. Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology*, 19(9):1875–1887.
- Höfer M und Meister A. 2010. Genome size variation in *Malus* species. *Journal of Botany*, 2010.
- Hornung E, Walther M, Kühn H und Feussner I. 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7):4192–4197.
- Horton P, Park K.-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C und Nakai K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35:W585–W587.
- Howe G und Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59:41–66.
- Huang F und Schwab W. 2011. Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnology*, 11(1):30.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas W. J, Wang X, Xie B, Ni P et al. 2009. The genome of the cucumber, *cucumis sativus* l. *Nature Genetics*, 41(12):1275–1281.

- Hughes R, West S, Hornostaj A, Lawson D, Fairhurst S, Sanchez R, Hough P, Robinson B und Casey R. 2001. Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *Biochemical Journal*, 353:345–355.
- Hwang I und Hwang B. 2010. The pepper 9-lipoxygenase gene *CaLOX1* functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiology*, 152(2):948.
- Jardine K, Barron-Gafford G, Norman J, Abrell L, Monson R, Meyers K, Pavao-Zuckerman M, Dontsova K, Kleist E, Werner C et al. 2012. Green leaf volatiles and oxygenated metabolite emission bursts from mesquite branches following light–dark transitions. *Photosynthesis Research*, 113(1-3):321–333.
- Keller O, Kollmar M, Stanke M und Waack S. 2011. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 27(6):757–763.
- Kieber J und Ecker J. 1993. Ethylene gas: it’s not just for ripening any more! *Trends in Genetics*, 9(10):356–362.
- Kittikorn M, Okawa K, Ohara H, Kotoda N, Wada M, Yokoyama M, Ifuku O, Yoshida S und Kondo S. 2011. Effects of fruit load, shading, and 9, 10-ketol-octadecadienoic acid (KODA) application on *MdTFL1* and *MdFT1* genes in apple buds. *Plant Growth Regulation*, 64(1):75–81.
- Kolomiets M, Chen H, Gladon R, Braun E und Hannapel D. 2000. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiology*, 124(3):1121.
- Kong H, Landherr L, Frohlich M, Leebens-Mack J, Ma H und DePamphilis C. 2007. Patterns of gene duplication in the plant *SKP1* gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. *The Plant Journal*, 50(5):873–885.
- Kumar S, Chagné D, Bink M, Volz R. K, Whitworth C und Carlisle C. 2012. Genomic selection for fruit quality traits in apple (*malus × domestica* borkh.). *PloS One*, 7(5): e36674.
- Kumar S, Rowan D, Hunt M, Chagné D, Whitworth C und Souleyre E. 2015. Genome-wide scans reveal genetic architecture of apple flavour volatiles. *Molecular Breeding*, 35(5):1–16.
- Lara I, Miró R, Fuentes T, Sayez G, Graell J und López M. 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29(1):29–39.
- Li D, Xu Y, Xu G, Gu L, Li D und Shu H. 2006. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (*MdAAT2*) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, 67(7):658–667.

- Li M, Li L, Dunwell J. M, Qiao X, Liu X und Zhang S. 2014. Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the rosaceae. *BMC Genomics*, 15(1):444.
- Liao Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X und Tang K. 2004. Rapid isolation of high-quality total RNA from taxus and ginkgo. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 34(3):209–214.
- Liavonchanka A und Feussner I. 2006. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, 163(3):348–357.
- Liebhard R, Koller B, Patocchi A, Kellerhals M, Pfammatter W, Jermini M und Gessler C. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a 'Fiesta' × 'Discovery' progeny. *Phytopathology*, 93(4):493–501.
- Liu S und Han B. 2010. Differential expression pattern of an acidic 9/13-lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant. *BMC Plant Biology*, 10(1):228.
- Liu S, Liu X und Jiang L. 2011. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 10(4):2613.
- Marmey P, Jalloul A, Alhamdia M, Assigbetse K, Cacas J, Voloudakis A, Champion A, Clerivet A, Montillet J und Nicole M. 2007. The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8):596–606.
- Matsui K. 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3):274–280.
- Matsui K, Minami A, Hornung E, Shibata H, Kishimoto K, Ahnert V, Kindl H, Kajiwara T und Feussner I. 2006. Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7):649–657.
- Meinke D und Koornneef M. 1997. Community standards for *Arabidopsis* genetics. *The Plant Journal*, 12(2):247–253.
- Melan M, Dong X, Endara M, Davis K, Ausubel F und Peterman T. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 101(2):441–450.
- Mellidou I, Chagné D, Laing W, Keulemans J und Davey M. 2012. Allelic variation in paralogs of *GDP-L-galactose* phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiology*, 160(3):1613–1629.

- Mita G, Gallo A, Greco V, Zasiura C, Casey R, Zacheo G und Santino A. 2001. Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus dulcis*) seed. *European Journal of Biochemistry*, 268(5):1500–1507.
- Noordermeer M, van Dijken A, Smeekens S, Veldink G und Vliegenthart J. 2000. Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *European Journal of Biochemistry*, 267(9):2473–2482.
- N'Diaye A, Van de Weg W, Kodde L, Koller B, Dunemann F, Thiermann M, Tartarini S, Gennari F und Durel C. 2008. Construction of an integrated consensus map of the apple genome based on four mapping populations. *Tree Genetics & Genomes*, 4(4):727–743.
- Ohme-Takagi M und Shinshi H. 1995. Ethylene-inducible dna binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 7(2):173–182.
- Padilla M, Hernández L, Sanz C und Martínez-Rivas J. 2009. Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19):9097–9107.
- Padilla M, Hernández L, Sanz C und Martínez-Rivas J. 2012. Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry*, 74:58–68.
- Palmieri-Thiers C, Canaan S, Brunini V, Lorenzi V, Tomi F, Desseyn J, Garscha U, Oliw E, Berti L und Maury J. 2009. A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(5):339–346.
- Park S, Sugimoto N, Larson M, Beaudry R und Van Nocker S. 2006. Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiology*, 141(3):811–824.
- Park Y, Kunze S, Ni X, Feussner I und Kolomiets M. 2010. Comparative molecular and biochemical characterization of segmentally duplicated 9-lipoxygenase genes *ZmLOX4* and *ZmLOX5* of maize. *Planta*, 231(6):1425–1437.
- Péneau S, Hoehn E, Roth H.-R, Escher F und Nuessli J. 2006. Importance and consumer perception of freshness of apples. *Food Quality and Preference*, 17(1):9–19.
- Pérez A, Sanz C, Olías R und Olías J. 1999. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1):249–253.
- Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C und Neuvians T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6):509–515.

- Podolyan A, White J, Jordan B und Winefield C. 2010. Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of sauvignon blanc. *Functional Plant Biology*, 37(8):767–784.
- Porta H und Rocha-Sosa M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1):15–21.
- Rancé I, Fournier J und Esquerré-Tugayé M.-T. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11):6554–6559.
- Roche P, Alston F, Maliepaard C, Evans K, Vrielink R, Dunemann F, Markussen T, Tartarini S, Brown L, Ryder C et al. 1997. RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sd*<sub>1</sub>) in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(3-4):528–533.
- Ross G, Knighton M und Lay-Yee M. 1992. An ethylene-related cDNA from ripening apples. *Plant Molecular Biology*, 19(2):231–238.
- Rowan D, Hunt M, Alspach P, Whitworth C und Oraguzie N. 2009a. Heritability and genetic and phenotypic correlations of apple (*Malus × domestica*) fruit volatiles in a genetically diverse breeding population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17):7944–7952.
- Rowan D, Hunt M, Dimouro A, Alspach P, Weskett R, Volz R, Gardiner S und David C. 2009b. Profiling fruit volatiles in the progeny of a ‘Royal Gala’ × ‘Granny Smith’ apple (*Malus × domestica*) cross. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17):7953–7961.
- Salamov A und Solovyev V. 2000. *Ab initio* gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Research*, 10(4):516–522.
- Santino A, De Paolis A, Gallo A, Quarta A, Casey R und Mita G. 2003. Biochemical and molecular characterization of hazelnut (*Corylus avellana*) seed lipoxygenases. *European Journal of Biochemistry*, 270(21):4365–4375.
- Santino A, Iannaccone R, Hughes R, Casey R und Mita G. 2005. Cloning and characterisation of an almond 9-lipoxygenase expressed early during seed development. *Plant Science*, 168(3):699–706.
- Schaffer R, Friel E, Souleyre E, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen J, Ma J, Nain B, Cohen D 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 Physiology*, 144(4):1899–1912.

- Schiller D, Contreras C, Vogt J, Dunemann F, Defilippi B. G, Beaudry R und Schwab W. 2015. A dual positional specific lipoxygenase functions in the generation of flavor compounds during climacteric ripening of apple. *Horticulture Research*, 2.
- Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. 2010.
- Schulz I, Ulrich D und Fischer C. 2003. Rapid differentiation of new apple cultivars by headspace solid-phase microextraction in combination with chemometrical data processing. *Food/Nahrung*, 47(2):136–139.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R und Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4):712–732.
- Shen J, Tieman D, Jones J, Taylor M, Schmelz E, Huffaker A, Bies D, Chen K und Klee H. 2014. A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(2):419–428.
- Shepherd G. 2006. Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature*, 444(7117):316–321.
- Shibata D, Slusarenko A, Casey R, Hildebrand D und Bell E. 1994. Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(2):41–42.
- Shin J, Van K, Kim D, Do Kim K, Jang Y, Choi B.-S, Kim M und Lee S.-H. 2008. The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 8(1):133.
- Siedow J. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1):145–188.
- Song J und Forney C. F. 2008. Flavour volatile production and regulation in fruit. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(3):537–550.
- Souleyre E, Greenwood D, Friel E, Karunairetnam S und Newcomb R. 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *Febs Journal*, 272(12):3132–3144.
- Stoeckli S, Mody K, Gessler C, Patocchi A, Jermini M und Dorn S. 2008. QTL analysis for aphid resistance and growth traits in apple. *Tree Genetics & Genomes*, 4(4):833–847.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M und Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731–2739.
- Terp N, Göbel C, Brandt A und Feussner I. 2006. Lipoxygenases during *Brassica napus* seed germination. *Phytochemistry*, 67(18):2030–2040.



- Ties P und Barringer S. 2012. Influence of lipid content and lipoxygenase on flavor volatiles in the tomato peel and flesh. *Journal of Food Science*, 77(7):C830–C837.
- Ulrich D, Bruchmüller T, Krüger H und Marthe F. 2011. Sensory characteristics and volatile profiles of parsley (*Petroselinum crispum* [MILL.] NYM.) in correlation to resistance properties against septoria blight (*Septoria petroselini*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19):10651–10656.
- Van Ooijen J. 2004. Mapqtl® 5. *Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen.
- Van Ooijen J. 2006. Joinmap 4. *Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.
- Vancanneyt G, Sanz C, Farmaki T, Paneque M, Ortego F, Castañera P und Sánchez-Serrano J. J. 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14):8139–8144.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A und Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7):research0034.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S, Troggio M, Pruss D et al. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* BORKH.). *Nature Genetics*, 42(10):833–839.
- Vick B und Zimmerman D. 1987. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. *The Biochemistry of Plants*, 9:53–90.
- Vogt I, Wöhner T, Richter K, Flachowsky H, Sundin G. W, Wensing A, Savory E. A, Geider K, Day B, Hanke M.-V et al. 2013a. Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus × robusta* 5–*Erwinia amylovora*. *New Phytologist*, 197(4):1262–1275.
- Vogt J, Schiller D, Ulrich D, Schwab W und Dunemann F. 2013b. Identification of lipoxygenase (lox) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). *Tree Genetics & Genomes*, pages 1–19.
- Wakasa Y, Takahashi A, Niizeki M, Harada T, Hatsuyama Y und Sato T. 2003. Divergent expression of six expansin genes during apple fruit ontogeny. *European Journal of Horticultural Science*, 68(6).
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C und Qiu J.-L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9):947–951.

## Literaturverzeichnis

- Wasternack C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4): 681–697.
- Wilson R, Gardner H und Keller N. 2001. Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 14(8):980–987.
- Würdig J, Flachowsky H und Hanke M.-V. 2013. Studies on heat shock induction and transgene expression in order to optimize the Flp/FRT recombinase system in apple (*Malus × domestica* borkh.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(3): 457–467.
- Zhang B, Chen K, Bowen J, Allan A, Espley R, Karunairetnam S und Ferguson I. 2006. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *Journal of Experimental Botany*, 57(14):3825.
- Zhang B, Shen J, Wei W, Xi W, Xu C, Ferguson I und Chen K. 2010. Expression of Genes Associated with Aroma Formation Derived from the Fatty Acid Pathway during Peach Fruit Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10):6157–6165.
- Zhang C, Jin Y, Liu J, Tang Y, Cao S und Qi H. 2014. The phylogeny and expression profiles of the lipoxygenase (LOX) family genes in the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Scientia Horticulturae*, 170:94–102.
- Zhu S, Liu M und Zhou J. 2006. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 42(1):41–48.

# Liste der Veröffentlichungen

Auszüge aus der Arbeit 'Identifizierung des für verschiedene Fruchtester hauptverantwortlichen Lipoxygenasegens des Apfels' von Jörg Vogt wurden bereits veröffentlicht in:  
- folgenden Originalartikeln:

**Jörg Vogt, Doreen Schiller, Detlef Ulrich, Wilfried Schwab und Frank Dunemann** (2013). Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavor formation in apple (*Malus × domestica*). Tree Genetics & Genomes. DOI: 10.1007/s11295-013-0653-5

**Doreen Schiller, Carolina Contreras, Joerg Vogt, Frank Dunemann, Bruno Defilippi, Randolph Beaudry und Wilfried Schwab** (2015). A dual positional specific lipoxygenase functions in the generation of flavor compounds during climacteric ripening of apple. Horticulture Research, Nature Publishing Group, 2015, 2

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2011). Molekularbiologische Charakterisierung der Lipoxygenasegenfamilie des Apfels im Hinblick auf die Aromastoffproduktion in reifenden Früchten. Julius Kühn-Archiv 430: 20-28

**Jörg Vogt, Doreen Schiller, Wilfried Schwab und Frank Dunemann** (2013). Cloning and Characterization of Apple Lipoxygenase (LOX) Genes Putatively Involved in the Formation of Fruit Flavour Volatiles. Acta Horticulturae 976: 369-375

- folgenden Präsentationen und Postern:

**Jörg Vogt** (2010). Molekulare und biochemische Charakterisierung von Lipoxygenase (LOX) Kandidatengenen in Apfel (*Malus × domestica* BORKH.), die an der Biosynthese von Aromastoffen beteiligt sind. Präsentation gehalten beim Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Institutes.

**Jörg Vogt, Doreen Schiller, Wilfried Schwab und Frank Dunemann** (2011). Cloning and characterization of apple lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in the formation of fruit flavour volatiles. Präsentation gehalten beim 13th Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics.

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2011). Towards functional markers for apple aroma – Assessment of allelic diversity in members of the lipoxygenase (LOX) gene family. Poster präsentiert beim Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Institutes.

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2012). Survey of the lipoxygenase (LOX) gene family in apple (*Malus × domestica* BORKH.) and their expression during fruit ripening. Präsentation gehalten bei

## *Literaturverzeichnis*

der Plant Science Student Conference im IPK Gatersleben.

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2012). Screening the apple lipoxygenase (LOX) gene family for members involved in defense responses to microbial pathogens and insects. Poster präsentiert bei der Genome Research Working Group Conference of the GPZ, Thema: "Plant Stress and Genomics".

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2012). Progress in molecular characterization of members of the apple lipoxygenase (LOX) gene family involved in volatile metabolism. Präsentation gehalten beim Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Institutes.

**Jörg Vogt und Frank Dunemann** (2013). Characterization of the Apple Lipoxygenase Family. Präsentation gehalten bei der Plant Science Student Conference am IPB Halle.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen Danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Dr. Frank Dunemann, der mir als Projektbetreuer dieses Thema überlassen hat. Seine kritischen Anmerkungen und sein Einsatz führten dieses Projekt zu einem außerordentlich zufriedenstellenden Abschluss.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. M.-Viola Hanke und Herrn Dr. Henryk Flachowsky bedanken, die mir wiederholt durch Anregungen geholfen haben, mich wissenschaftlich und persönlich weiterzuentwickeln und mir in persönlichen Gesprächen neue Perspektiven eröffnet haben.

Unschätzbar wertvoll war der fruchtbare Austausch zwischen den zur Zeit meiner Arbeit ebenfalls an ihrer Promotion arbeitenden Kollegen, namentlich Erik Szentgyörgyi, Thomas Wöhner, Isabelle Vogt, Juliane Würdig, Stefanie Wenzel, Markus Bestfleisch, Giulia Miolli und Kathleen Weigl. Bei allen Mitarbeitern des Julius-Kühn Institutes Dresden-Pillnitz – Institut für Züchtungsforschung an Obst bedanke ich mich für die Hilfe im Laboralltag und für die offenen Ohren bei allerlei Fragen und Anregungen. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Edgar Schliephake (JKI - Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg) danken, dass er es mir ermöglichte mit dem Infektionsversuch mit Blutläusen eigene Erfahrungen bei der Planung und Etablierung eines Versuches zu sammeln.

Die regelmäßigen Treffen und die durch einen freundschaftlichen Ton geprägte Kommunikation innerhalb der Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab (TU München, Biotechnologie der Naturstoffe) und der Doktorandin Doreen Schiller machten dieses Projekt sehr erfolgreich.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller und ihrer Arbeitsgruppe für die hilfreichen Anmerkungen über die gesamte Zeit des Projektes und die Betreuung im Rahmen des Promotionsverfahrens. Auch gilt mein Dank den Gutachtern, Prüfern, Mitgliedern der Kommission, sowie den Korrekturlesern Frank Dunemann, Henryk Flachowsky und Erik Szentgyörgyi.

Abschließend möchte ich meiner Familie, besonders meiner Frau danken, dass ich mich bei meiner Arbeit selbst zu verwirklichen kann, ohne auf die Freuden einer Familie verzichten zu müssen.



# Lebenslauf

Name: Jörg Vogt  
Geburtsdatum: 27.10.1985  
Geburtsort: Dresden  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung

ab 10/2010 Promotionsstudium (Biologie) an der  
Technische Universität Dresden  
10/2005 – 09/2010 Diplomstudium der Biologie an der  
Technische Universität Dresden  
07/2004 Abitur am Marie-Curie-Gymnasium Dresden

## Berufliche Erfahrungen

04/2011 – 10/2015 Wissenschaftliche Hilfskraft bei Praktika der  
Technischen Universität Dresden  
07/2010 – 12/2013 Wissenschaftlicher Angestellter am  
Julius Kühn-Institut  
04/2008 – 07/2010 Studentische Hilfskraft bei Praktika der  
Technischen Universität Dresden  
10/2007 – 11/2007 Studentische Hilfskraft bei Praktika der  
Technischen Universität Dresden  
08/2004 – 09/2005 Freiwilliges Ökologisches Jahr





# Erklärungen

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Die praktischen Arbeiten wurden vorrangig am Julius-Kühn Institut Dresden-Pillnitz, damals Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, heute Institut für Züchtungsforschung an Obst, durchgeführt. Sie wurden im Zeitraum von Juli 2010 bis Dezember 2013 ausgeführt. Die Dissertationsschrift wurde im Zeitraum von Juli 2010 bis November 2015 unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Ludwig-Müller angefertigt.

## **Anerkennung der Promotionsordnung**

Ich erkenne die Promotionsordnung der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an. Hiermit erkläre ich, dass ich noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen habe und dass die vorliegende Arbeit bei keiner anderen Hochschule oder Universität eingereicht wurde.

## **Straffreiheit**

Ich erkläre, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind. Dies wird gegenüber dem Prüfungsamt durch ein Führungszeugnis nachgewiesen.





