



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Professur für Biotechnologie der Naturstoffe

**Untersuchung der Effekte von Genotyp und Umwelt auf die
Konzentration verschiedener Metabolite in *Fragaria* × *ananassa***

Annika Brigitte Haugeneder

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Harald Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wilfried Schwab
2. Prof. Dr. Michael Rychlik

Die Dissertation wurde am 26.06.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät TUM School of Life Sciences am 13.10.2020 angenommen.

„In the end, strawberries make the world just a little sweeter“

Marvin Brown, Favorite Farms, Inc.

XI North American Strawberry Symposium, Florida, 2019

Danksagung

Zur Verwirklichung dieser Arbeit haben viele Menschen auf unterschiedliche Weise beigetragen. Daher möchte ich an dieser Stelle „Danke“ sagen.

Der erste Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. Wilfried Schwab** für die Überlassung des Promotionsthemas und seine volle wissenschaftliche Unterstützung und Zuversicht. Danke für das entgegengebrachte Vertrauen für die selbstständige Bearbeitung des Projektes, aber auch die nötige Hilfestellung bei Fragen und Problemen.

Prof. Dr. Harald Luksch und **Prof. Dr. Michael Rychlik** danke ich für die Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten GoodBerry-Konsortium. Es war eine sehr bereichernde Erfahrung, in einem internationalen Team aus Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen verschiedener Forschungsgebiete zu arbeiten. Ein großes Dankeschön geht vor allem an **Dra. Sonia Osorio** für die Möglichkeit, einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt in ihrer Gruppe an der Universidad de Málaga zu absolvieren. Einen großen Dank auch an alle Mitglieder des *Departamento de Biología Molecular y Bioquímica* für die herzliche Aufnahme in ihre Gruppe, allen voran **Delphine Pott** und **Lidia Jiménez**.

Vielen Dank an **David Andlinger** am **Lehrstuhl für Lebensmittel- und Bioprozesstechnik** für die unkomplizierte Organisation der Texturmessungen und die Einweisungen für den *Texture Analyzer*.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der **Professur für Biotechnologie der Naturstoffe** danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima. Vielen Dank an **Heike** für die Hilfe mit allen organisatorischen Angelegenheiten. Ein ganz herzliches Dankeschön an **Tom** für so vieles: die Planung der Experimente, hilfreiche Denkanstöße bei der Durchführung und Auswertung, das Drucken von dringend benötigten Ersatzteilen, die Durchsicht dieser Arbeit und vor allem das Urvertrauen, dass man es bei einer nicht funktionierenden LC-MS nicht noch schlimmer, sondern nur noch besser machen kann. **Dr. Ruth Habegger** gilt mein Dank für die Unterstützung der CAD-Experimente im Gewächshaus und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen zum Anbau der Pflanzen. **Hannelore Meckl** und **Mechthild Mayershofer**, vielen Dank für eure Hilfe bei der Bestäubung und Ernte der CAD-Früchte. Danke auch an meine beiden Studentinnen **Weijie Li** und besonders **Valerie Rose** für die kräftige Unterstützung bei der Analyse der GoodBerry-Proben. Nicht zu vergessen natürlich alle Mittagspausen-Kaffeetrinker: **Elisabeth, Emilia, Soraya, Kate, Katja, Martina** und **Anja**, tausend Dank für zahlreiche Gespräche und ein immer offenes Ohr, sei es für Probleme aus dem Labor oder auch privat. Ihr habt mir durch so manch harte Nachmittage geholfen.

Meinem „inoffiziellen“ Mentor **Max Dietz** gilt vor allem der Dank zur Unterstützung meiner persönlichen Entwicklung. Danke für die Reflektion von außen und die nötigen Hinweise zur richtigen Zeit. Unsere Gespräche waren hilfreiche Impulse um die Motivation nicht zu verlieren und die nächsten Schritte klarer zu sehen.

Auch aus meinem persönlichen Umfeld möchte ich einigen Leuten danken. **Sebi, Christina, Lorenz, Anna, Zani, Kathi, Michl, Lara, Gerdi, Fabi** und **Gitti**, vielen Dank für Weihnachtsfeiern und Wanderungen, bei denen wir die allgemein bekannten Probleme der Doktorarbeiten besprachen, es dann aber auch gut sein lassen konnten, um uns anderen Themen des Lebens zu widmen. Auch die Bouldercrew mit **Flo, Franz, Conny, Flo** und **Sofia** hat einiges dazu beigetragen, die Laune spätestens Dienstagabends wieder zu bessern. Stay strong! Ein riesiges Dankeschön geht an alle, die mich schon zu Zeiten des Studiums in Freising begleitet haben. **Lena, Johanna, Simon, Moritz** und **Johannes**, Danke für all die gemeinsamen Erfahrungen und Erlebnisse und auch euch Danke für allzeit offene Ohren, egal zu welchem Thema. Liebe **Emilia**, auch wenn du natürlich zu den Freisingern gehörst, möchte ich dir noch einmal ganz besonders „Danke!“ sagen. Ich bin sehr froh, dass wir diese spannende und nicht immer einfache Zeit der Promotion zusammen durchgestanden haben und uns immer wieder gegenseitig motivieren konnten, ohne dabei unsere Freundschaft zu verlieren. Vielen Dank für alle Gespräche, alles Zuhören und alle Ermutigungen!

Heidi und **Josef**, herzlichen Dank für die Aufnahme des zurückgekehrten „Schwabenkinds“ und für unzählige Auszeiten vom Alltag im schönen Südtirol in den letzten Jahren.

Der größte Dank geht an meine Familie. **Meinen Eltern** danke ich für ihre Unterstützung, nicht erst in den letzten Jahren, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre. Danke für eure Zuversicht, so viele motivierende Worte auf meinem bisherigen Weg und die Gewissheit um einen bedingungslosen Rückhalt. Dasselbe gilt natürlich für **Stefanie** und **Max**. Danke euch beiden für den starken Zusammenhalt in jeder denkbaren Situation und so viele gemeinsame Erinnerungen!

Der Beste zum Schluss: Lieber **Jens**, ich bin dir unendlich dankbar für all deine Geduld, deine Gelassenheit und deinen unerschütterlichen Optimismus. Danke, dass du wann immer nötig einfach zuhörst und mir danach hilfst, die richtigen Strategien zu finden. Mit Dir an meiner Seite gehe ich entspannt und neugierig die nächsten Schritte in die Zukunft.

Publikationen

Haugeneder, Annika; Trinkl, Johanna; Härtl, Katja; Hoffmann, Thomas; Allwood, James William; Schwab, Wilfried (2018): Answering biological questions by analysis of the strawberry metabolome. *Metabolomics* 14 (11), Artikel 145. DOI: 10.1007/s11306-018-1441-x.

Joshi, Rakesh; Trinkl, Johanna; **Haugeneder, Annika;** Härtl, Katja; Franz-Oberdorf, Katrin; Giri, Ashok; Hoffmann, Thomas; Schwab, Wilfried (2019): Semirational design and engineering of grapevine glucosyltransferases for enhanced activity and modified product selectivity. *Glycobiology* 29 (11), S. 765 – 775. DOI: 10.1093/glycob/cwz056.

Vorträge

Haugeneder, Annika; Trinkl, Johanna; Schwab, Wilfried: Metabolic Profiling in Fruits of Strawberry Progenies Resulting from the Crossbreeding of Two Established Varieties „Senga Sengana“ and „Candongá“, 3er Congreso Chileno des Berries, 28./29.11.2017, PUC, Santiago de Chile, Chile

Haugeneder, Annika; Habegger, Ruth; Schwab, Wilfried: Profile der Sekundärstoffwechselprodukte von gentechnisch veränderten Erdbeerpflanzen, GHL Symposium, 03.05.2018, TUM, Dürnst, Deutschland

Haugeneder, Annika; Schwab, Wilfried: Modification of the Catalytic Activity of Glycosyltransferases by Site Directed Mutagenesis, Forschungsseminar der Lebensmittelchemie, 28.06.2018, TUM, Freising, Deutschland

Haugeneder, Annika; Trinkl, Johanna; Schwab, Wilfried: The GoodBerry-project: Gaining new insights in the metabolism of strawberry (*Fragaria × ananassa*), IX North American Strawberry Symposium, 03. – 06.02.2019, NASGA, Orlando, Florida, USA

Haugeneder, Annika: Impact of Environment and Genotype on Fresh Fruit Quality, Fruit Logistica, 06.02.2020, Berlin, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Publikationen	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
Abbildungsverzeichnis	XIII
Anhangsverzeichnis	XV
Zusammenfassung	XVII
Summary	XIX
1 Einleitung	1
1.1 Die Geschichte der Erdbeere	1
1.2 Erdbeerzüchtung	2
1.3 Erdbeeren und die menschliche Gesundheit	4
1.3.1 Ernährungsphysiologische Aspekte.....	4
1.3.2 Positive Effekte des Beerenkonsums.....	5
1.3.3 Allergische Reaktionen.....	6
1.4 Allergenes Fra a 1	8
1.4.1 Aufbau und Zugehörigkeit.....	8
1.4.2 Biologische Funktion.....	10
1.5 Primär- und Sekundärmetabolismus	11
1.5.1 Primärmetaboliten.....	11
1.5.2 Sekundärmetaboliten – Polyphenole.....	11
1.5.2.1 Strukturelle Grundlagen.....	11
1.5.2.2 Biosynthese der Polyphenole.....	13
1.5.2.3 Funktion in der Pflanze.....	18
1.5.3 Sekundärmetaboliten – Aromastoffe.....	19
1.5.3.1 Terpene.....	19
1.5.3.2 Alkohole, Aldehyde und Ester.....	20

1.5.3.3	Weitere Aromastoffe.....	21
1.5.3.4	Das Erdbeeraroma.....	22
1.6	Zusammenspiel von Umwelt und Genotyp	22
1.7	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Pflanzenmaterial	25
2.1.2	Chemikalien.....	27
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	29
2.1.4	Gentechnisch veränderte Organismen (GVOs)	33
2.1.5	Antikörper.....	33
2.1.6	SDS-Gele	34
2.1.7	Verbrauchsmaterial.....	34
2.1.8	Geräte.....	35
2.1.8.1	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS ⁿ , LC-MS).....	35
2.1.8.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) für Aromastoffe.....	38
2.1.8.3	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) für Primärmetabolite	39
2.1.8.4	<i>Texture Analyzer</i>	39
2.1.8.5	Sonstige Geräte	40
2.1.9	Software	41
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Polyphenole	42
2.2.1.1	Polyphenol-Extraktion Erdbeer-Proben.....	42
2.2.1.2	Polyphenol-Extraktion Kontrollstandard	42
2.2.1.3	Identifizierung der Phenylpropanoide in Erdbeerextrakten	42
2.2.1.4	Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole.....	44
2.2.1.5	Nachweisgrenzen der Polyphenole	47
2.2.1	Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)	49
2.2.1.1	Extraktion der VOCs.....	49

2.2.1.2	Identifizierung und Quantifizierung der VOCs.....	49
2.2.2	Primär-Metaboliten.....	51
2.2.2.1	Extraktion und Derivatisierung der Primär-Metaboliten	51
2.2.2.2	Identifizierung und Quantifizierung der Primär-Metaboliten	52
2.2.3	Fra a 1	53
2.2.3.1	Herstellung des rekombinanten Fra a 1.02-Proteins	53
2.2.3.2	Protein-Extraktion der Erdbeer-Proben.....	55
2.2.3.3	Protein-Extraktion des Erdbeer-Standards.....	56
2.2.3.4	Analyse des Fra a 1-Proteins mittels indirekt kompetitivem ELISA	56
2.2.4	Texturmessung mittels <i>Texture Analyzer</i>	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Identifizierung der Phenylpropanoide in <i>Fragaria</i>	59
3.2	Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole	61
3.3	GoodBerry.....	63
3.3.1	Polyphenole	63
3.3.1.1	Subdatenset ausgewählter Genotypen.....	68
3.3.1.2	Malonyl-Glucoside	71
3.3.1.3	Flavonol-Glucosid-Derivate und -Glucuronide	75
3.3.2	Fra a 1	76
3.3.3	Korrelationsanalysen	79
3.3.3.1	Polyphenole.....	79
3.3.3.2	Polyphenole und Fra a 1.....	82
3.3.3.3	Primär- und Sekundärmetabolismus	83
3.3.4	Einfluss von Umwelt und Genotyp auf die Gehalte der Polyphenole und des Proteins Fra a 1	86
3.4	CAD-Pflanzen	90
3.4.1	Textur.....	91
3.4.2	Polyphenole	91
3.4.3	Flüchtige Naturstoffe (Volatile organic compounds, VOCs)	94

4	Diskussion.....	97
4.1	Identifizierung der Phenylpropanoide in <i>Fragaria</i>	97
4.2	Polyphenolprofil der GoodBerry-Kreuzungspopulation	99
4.2.1	Biosynthese der Polyphenole.....	99
4.2.1.1	Flavanole.....	100
4.2.1.2	Verschiedene Malonyl-Glucoside, Glucoside und Glucuronide.....	103
4.2.1.3	Korrelationen zwischen den Gehalten verschiedener Polyphenol-Untergruppen....	107
4.2.2	Verknüpfung von Primär- und Sekundärmetabolismus.....	108
4.3	Fra a 1 innerhalb der GoodBerry-Kreuzungspopulation.....	110
4.4	Einfluss von Genotyp und Umwelt.....	112
4.5	Auswirkungen der Überexpression von CAD in „Mieze Schindler“	116
5	Fazit und Ausblick.....	119
6	Literatur	121
7	Anhang.....	133

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

E	Umwelt, englisch: <i>environment</i>	n.a.	nicht analysiert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	n.d.	nicht detektiert
EKS	Erdbeerkontrollstandard	NWG	Nachweisgrenze
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>	p	Signifikanzniveau
equ	Äquivalente, englisch: <i>equivalents</i>	pAK	Primärantikörper
<i>F.</i>	<i>Fragaria</i>	PR-Proteine	Pathogenese-assoziierte Proteine, englisch: <i>pathogenesis related</i>
F _{max}	Kraftmaximum	PSPG	<i>plant secondary product glycosyltransferase</i>
FW	Frischgewicht, englisch: <i>fresh weight</i>	QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
G	Genotyp	R	Korrelationskoeffizient
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie	R ²	Bestimmtheitsmaß
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus	RSP	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
IgE	Immunglobulin E	rFra a 1.02	rekombinantes Fra a 1.02 Protein
IS	interner Standard	rpm	Umdrehungen pro Minute, englisch: <i>revolutions per minute</i>
LB-Medium	Voll-Medium, englisch: <i>lysogeny broth</i>	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
LC-ESI-MS ⁿ	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie	t _R	Retentionszeit
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie	VOCs	flüchtige organische Verbindungen, englisch: <i>volatile organic compounds</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis	WT	Wildtyp
MS ¹	Massenspektrum		
MS ²	Fragmentierungsmuster		

Metabolite und Klassenbezeichnungen

A	Anthocyane	Ile	Isoleucin
Afz-Cat	(Epi)Afzelechin- (Epi)Catechin	Ino-ol	Inositol
		IsoMal	Isomaltose

Afz-Cat-Cat	(Epi)Afzelechin- (Epi)Catechin- (Epi)Catechin	Ka-Ac-Glc Ka-Cu-Glc	Kaempferol-Acetyl- Glucosid Kaempferol-Cumaryl- Glucosid
Ala	Alanin		
Asn	Asparagin	Kaf-Glc	Kaffeesäure-Glucosid
Asp	Asparaginsäure	Kaf-Glc-Es	Kaffeesäure-Glucose-Ester
Cat	Catechin	Ka-Glc	Kaempferol-Glucosid
Cat 3x	(Epi)Catechin Trimer	Ka-Glucu	Kaempferol-Glucuronid
Cu-Glc-Es/-Glc	Cumarsäure-Glucose-Ester/- Glucosid	Ka-Ma-Glc	Kaempferol-Malonyl- Glucosid
Cya-Glc	Cyanidin-Glucosid	Kes	Kestose
Cya-Ma-Glc	Cyanidin-Malonyl-Glucosid	Mal	Maltose
DHA	Dehydroascorbinsäure	Malat	Äpfelsäure
DMHF	2,5-Dimethyl-4-hydroxy- 3(2H)-furanon, Furaneol®	Maltot Met	Maltotriose Methionin
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy- 3(2H)-furanon, Mesifuran	oxo-Glutarat P	α -Ketoglutarsäure Phenylpropanoide
EpiAfz-Pel-Glc	EpiAfzelechin-Pelargonidin- Glucosid	Pel-Glc Pel-Ma-Glc	Pelargonidin-Glucosid Pelargonidin-Malonyl- Glucosid
Ery-ol	Erythritol		
ES	Ellagsäurederivate	Pel-Rut	Pelargonidin-Rutinosid
Esre	Ellagsäure	Phe	Phenylalanin
Fer-Glc-Es	Ferulasäure-Glucose-Ester	Pro	Prolin
Flava	Flavanole	Psre	Phosphorsäure
Flavo	Flavonole	Put	Putrescin
Fruc	Fructose	PyGlu	Pyroglutaminsäure
Fruc-6-P	Fructose-6-Phosphat	Pyruvat	Brenztraubensäure
Fuc	Fucose	Qu-Ac-Glc	Quercetin-Acetyl-Glucosid
Fumarat	Fumarsäure	Qu-Glc	Quercetin-Glucosid
GABA	γ -Aminobuttersäure	Quinat	Chinasäure
Gal-ol	Galactinol	Raf	Raffinose
Glcsre	Glucuronsäure	Rha	Rhamnose
Gln	Glutamin	s	sonstige Metabolite
Glu	Glutaminsäure	Sac	Saccharose
Gluc	Glucose	Ser	Serin
Gluc-6-P	Glucose-6-Phosphat	Si-Glc	Sinapinsäure-Glucosid

Glucopyr	1-O-Methyl- α -D-Glucopyranosid	Si-Glc-Es	Sinapin-Glucose-Ester
		Succinat	Bernsteinsäure
Gly	Glycin	Thr	Threonin
Glycerat	Glycerinsäure	Threonat	Threoninsäure
GSH	Glutathion	Tre	Trehalose
GSH ox	Glutathion oxidiert	Trp	Tryptophan
GSH red	Glutathion reduziert	Tyr	Tyrosin
HHDP	3,4,5,3',4'5'-Hexahydroxydiphensäure	Val	Valin
HHDP-Gal-Glc	HHDP-Galloyl-Glucosid	Xyl	Xylose
HSer	Homoserin	Zi-Glc-Es	Zimtsäure-Glucose-Ester
		Zitsre	Zitronensäure

Enzyme

ANR	Anthocyanidin-Reduktase	FH	Flavonoid-Hydroxylase
ANS	Anthocyanidin-Synthase	FHT	Flavanon-(3)-Hydroxylase
CAD	Zimtalkohol-Dehydrogenase, englisch: <i>cinnamyl alcohol dehydrogenase</i>	FLS	Flavanol-Synthase
CCR	Zimtsäure-CoA-Reduktase, englisch: <i>cinnamoyl-CoA reductase</i>	GT	Glykosyl-Transferase
CHI	Chalkon-Isomerase	HRP	Meerrettich Peroxidase, englisch: horseradish peroxidase
CHS	Chalkon-Synthase	LAR	Leucoanthocyanidin-Reduktase

Chemikalien

APS	Ammoniumperoxodisulfat	MeOH	Methanol
BCIP	(Dinatrium)-5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	MP	Milchpulver
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin)	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
DiECA	Natriumdiethyldithiocarbamat	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
DMF	Dimethylformamid	PVDF	Polyvinylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
EtOH	Ethanol	SDS	Sodiumdodecylsulfat
HCOOH	Ameisensäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittliche Gehalte ausgewählter Nährstoffe in Erdbeeren.....	4
Tabelle 2: Anbauregionen und Kultivierungsmethoden des GoodBerry-Projektes.	25
Tabelle 3: Probenanzahl im GoodBerry-Projekt 2017 und 2018.	25
Tabelle 4: Anzahl analysierter Fruchthälften zur Bestimmung der Festigkeit.	26
Tabelle 5: Chemikalien	27
Tabelle 6: Verwendete GVOs.	33
Tabelle 7: Verwendete Antikörper.	33
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und zugehörige Hersteller.	34
Tabelle 9: Sonstige Geräte und zugehörige Hersteller.	40
Tabelle 10: Retentionszeiten und m/z im MS^1 und MS^2 der Phenylpropanoid-Glucoside und -Glucose-Ester im negativen Modus.....	43
Tabelle 11: Mittels LC- MS^n im positiven Modus identifizierte Polyphenole in <i>Fragaria</i>	44
Tabelle 12: Mittels LC- MS^n im negativen Modus identifizierte Polyphenole in <i>Fragaria</i>	45
Tabelle 13: Übersicht über Korrekturfaktoren innerhalb der GoodBerry-Proben.....	47
Tabelle 14: NWGs der Polyphenole.....	48
Tabelle 15: Mittels GC-MS identifizierte flüchtige Metabolite in "Mieze Schindler".....	50
Tabelle 16: Optimierte ELISA-Parameter.....	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite geografische Verteilung verschiedener <i>Fragaria</i> -Spezies.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Antikörpers.....	7
Abbildung 3: Bekannte 3D-Strukturen ausgewählter PR-10 Proteine.....	9
Abbildung 4: Grundstrukturen ausgewählter Polyphenole.....	12
Abbildung 5: Strukturformeln der Aglykone bekannter Polyphenole in Erdbeere.....	13
Abbildung 6: Überblick über die Biosynthese der Polyphenole.....	14
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese.....	15
Abbildung 8: Übersicht über die Biosynthese der Flavonoide.....	16
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Biosynthese verschiedener Ellagsäurederivate.....	18
Abbildung 10: Vorstufen der Terpene.....	20
Abbildung 11: Vereinfachtes Syntheschema flüchtiger Aldehyde, Alkohole und Ester.....	21
Abbildung 12: Ionenspur und MS ¹ und MS ² -Spektrum des synthetisierten Ferulasäure-Glucosids und Ferulasäure-Glucose-Esters.....	59
Abbildung 13: Co-Chromatografien des Erdbeerkontrollstandards (EKS) mit verschiedenen Glucosiden und Glucose-Estern.....	60
Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der Polyphenole der EKS-Extrakte.....	61
Abbildung 15: Polyphenolprofil der Kreuzungspopulation 'Candong' x 'Senga Sengana' aus den Jahren 2017 und 2018.....	65
Abbildung 16: Histogramme der gemessenen Anthocyanidin-Glucosid-Konzentrationen.....	66
Abbildung 17: Erträge der Genotypen an den fünf Standorten.....	68
Abbildung 18: Polyphenolprofil ausgewählter Genotypen der GoodBerry-Kreuzungspopulation der Erntejahre 2017 und 2018.....	70
Abbildung 19: Einfluss des Genotyps auf die Bildung verschiedener Malonyl-Glucoside.....	72
Abbildung 20: Die Verteilung der Konzentration verschiedener Malonyl-Glucoside in unterschiedlichen Genotypen.....	74
Abbildung 21: Einfluss der Umwelt auf die Bildung der Flavonol-Malonyl-Glucoside.....	75
Abbildung 22: Einfluss der Umwelt auf die Bildung der Flavonol-Glucoside und Flavonol- Glucuronide.....	76
Abbildung 23: Fra a 1-Konzentrationen ausgewählter Genotypen der GoodBerry-Population.....	77
Abbildung 24: Genotyp- bzw. standortübergreifender Fra a 1-Gehalt ausgewählter Genotypen.....	78
Abbildung 25: Variation des Allergengehaltes in ausgewählten Genotypen.....	79
Abbildung 26: Korrelationsanalyse der Polyphenol-Gehalte der GoodBerry- Kreuzungspopulation.....	80
Abbildung 27: Korrelationen zwischen den verschiedenen Malonyl-Glucosiden-Gehalten (A) und den entsprechenden Glucosid-Gehalten (B).....	82

Abbildung 28: Korrelationen zwischen den Konzentrationen ausgewählter Polyphenole und des Fra a 1-Gehaltes.....	83
Abbildung 29: Korrelationen zwischen den Gehalten an Primär- und Sekundärmetaboliten.....	84
Abbildung 30: Statistischer Hintergrund zum Einfluss von Genotyp und Umwelt.	87
Abbildung 31: Einfluss von Genotyp und Umwelt auf die Gehalte der Sekundärmetaboliten und des Fra a 1-Proteins der GoodBerry-Kreuzungspopulation.....	88
Abbildung 32: Verschiedene Reifestadien und Gewebeproben der CAD-Pflanzen.	90
Abbildung 33: Texturmessung der CAD-Erdbeer-Früchte.	91
Abbildung 34: Polyphenol-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzengeweben bzw. Reifestadien der CAD-Linien.	92
Abbildung 35: Polyphenol-Profil der transgenen CAD-Pflanzen im Vergleich zur Kontrolllinie.	93
Abbildung 36: Konzentrationen der flüchtigen Komponenten in F64 und der Kontrolllinie.	96
Abbildung 37: Postulierter Syntheseweg der Flavanol-Oligomere.....	102
Abbildung 38: Entstehung der Flavonol-Acetyl-Glucoside während der Ionisierung im Negativmodus.....	104
Abbildung 39: Einfluss der Umwelt auf einzelne Genotypen.....	114

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Fragmentierungsmuster aller synthetisierten Phenylpropanoid-Referenzen.	133
Anhang 2: Polyphenolprofil der Kreuzungspopulation aus 'Senga Sengana' und 'Candong'a' im Erntejahr 2017 und 2018.....	134
Anhang 3: Konzentrationsspannen der Polyphenole und des Fra a 1-Gehalts innerhalb der GoodBerry-Population über zwei Erntejahre 2017 und 2018.....	135
Anhang 4: Korrelationsanalyse der Polyphenol-Gehalte und der Fra a 1-Konzentration im Allergen-Subdatenset.....	136
Anhang 5: Konzentrationsspannen der Primärmetabolite innerhalb der IFAPA-Proben der GoodBerry-Population im Erntejahr 2017.....	137
Anhang 6: Korrelationsanalyse der Konzentrationen von Primär- und Sekundärmetaboliten.....	139
Anhang 7: Konzentrationsspannen der Polyphenole in den CAD-Proben.....	140

Zusammenfassung

Erdbeeren gehören neben Äpfeln, Bananen, Trauben und Pfirsichen zu den beliebtesten Obstarten der Deutschen. Beim Beerenobst stehen sie sogar an erster Stelle. Weltweit wurden im Jahr 2018 ca. 8,3 Millionen Tonnen produziert, ungefähr die Hälfte davon in China und den USA. Neben gutem Geschmack bieten die Früchte auch zahlreiche positive gesundheitliche Aspekte. Sie sind reich an Folsäure und Vitamin C und ihr Konsum wirkt sich positiv auf verschiedene Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Diabetes aus. Darüber hinaus können *Fragaria*-Extrakte *in vitro* das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Die Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit werden vorwiegend den Polyphenolen als sekundäre Pflanzenstoffe zugeschrieben. Neben den gewünschten Inhaltsstoffen finden sich in Erdbeerfrüchten jedoch auch Pathogenese-assoziierten Proteine, alias PR-10 Proteine. Die 3D-Struktur der Fra a 1-Proteine aus *Fragaria* weist eine sehr hohe Ähnlichkeit mit der Struktur des Birkenpollenallergens Bet v 1 auf. Auf Grund dieser Analogie kann es zu einer Kreuzreaktion kommen, wobei durch den Verzehr von Erdbeeren eine allergische Reaktion hervorgerufen werden kann.

Sowohl Polyphenol- als auch der Fra a 1-Gehalt variieren zwischen verschiedenen Erdbeersorten. Doch auch die Umwelt ist ein wichtiger Faktor, welcher sich vor allem auf die Synthese der Sekundärmetabolite, aber auch der Allergie-auslösenden Proteine auswirkt. In dieser Arbeit wurde eine Kreuzungspopulation aus „Candongá“ × „Senga Sengana“ im Zuge des GoodBerry-Projektes untersucht. Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren an fünf verschiedenen Standorten in Europa von Südspanien bis Polen angebaut. Somit konnte der Einfluss des Genotyps G und der Umwelt E, sowie die Interaktion der beiden Komponenten, G × E, bestimmt werden. Mittels Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde ein Polyphenol-Profil der F1-Nachkommen, sowie der beiden Elternsorten erstellt. Von den spanischen Proben des ersten Erntejahres wurden außerdem Primärmetabolite anhand von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Der Fra a 1-Gehalt ausgewählter Genotypen wurde mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) quantifiziert.

Die Metabolite der Polyphenole konnten in fünf Klassen unterteilt werden: Anthocyane, Ellagsäurederivate, Flavanole, Flavonole und Phenylpropanoide. Korrelationsanalysen der Analyten ergaben einen sehr hohen Zusammenhang der Flavanol-Derivate, was auf die Bildung des Monomers (Epi)Catechin als Schlüsselstelle für die Synthese aller Flavanole hindeutet. Die starken Korrelationen des Monomers und der Oligomere deuten auf eine autokatalytische Polymerisierung hin, für die zunächst die Bildung eines Carbokations ausschlaggebend ist. Zwischen verschiedenen Glucosiden (Glc; Cyanidin-Glc, Pelargonidin-Glc, Kaempferol-Glc und Quercetin-Glc) wurden nur schwache Wechselwirkungen gefunden, was die Beteiligung verschiedener Glucosyl-Transferasen in deren Synthese bestätigt. Im Gegensatz dazu zeigte sich zwischen den beiden malonylierten Anthocyanen

Cyanidin-Malonyl-Glc und Pelargonidin-Malonyl-Glc ein sehr hoher Korrelationsfaktor von $R_{SP} = 0,72$, was auf die Umsetzung der beiden Glucoside durch dieselbe potentielle Malonyl-Transferase hindeutet. Dass lediglich in der Klasse der Flavonole zwei Glucuronide nachgewiesen werden konnten deutet wiederum auf eine sehr starke Substratspezifität möglicher Glucuronosyl-Transferasen hin. Zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus fanden sich nur vereinzelte Wechselwirkungen. Die beiden Stoffwechselwege laufen demnach in reifen Früchten größtenteils getrennt voneinander ab. Der Gehalt an Fra a 1 wies entgegengesetzte Korrelationen mit Anthocyanen und Flavonolen auf. Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der PR-10 Proteine in der Biosynthese der Polyphenole.

Die bioinformatische Auswertung der Einflüsse von G und E ergab, dass die Synthese der beiden malonylierten Anthocyan-Glucoside vorwiegend durch den Genotyp gesteuert wird. Der Standort hatte auf diese Metaboliten nur geringe Auswirkungen. Auch die Flavonol-Malonyl-Glucoside wiesen einen vorherrschenden Genotyp-Effekt auf, allerdings nicht so deutlich wie die Anthocyane. Alle weiteren Analyten wurden sowohl von G als auch von E geprägt. Das Ausmaß des Einflusses der beiden Komponenten variierte zwischen den einzelnen Metaboliten. Darüber hinaus gab es auch einzelne Genotypen, wie H085 oder die Elternsorte „Senga Sengana“, welche auch standortübergreifend relativ stabile Polyphenol-Profile aufwiesen. Anders als die Polyphenole erwies sich der Fra a 1-Gehalt als sehr stabil, unabhängig von G oder E.

Neben der GoodBerry-Population wurden auch *Fragaria*-Pflanzen drei transgener Zimtalkohol-Dehydrogenase-Linien (CAD) der Sorte „Mieze Schindler“ untersucht. In den transgenen Pflanzen (F62, F63 und F64) wurde CAD konstitutiv unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S Promotors exprimiert. Von F62-F64 und einer unveränderten Kontrolllinie wurden Blätter- und Wurzelproben, sowie Früchte verschiedener Reifestadien mittels LC-MS analysiert um Polyphenol-Profile zu erstellen. Von roten Früchten wurde zusätzlich anhand eines *Texture Analyzers* die Textur bestimmt und mit Hilfe von GC-MS flüchtige Aromastoffe untersucht. Lediglich im ersten Fruchtstadium (klein, grün) und in den Blättern zeigten sich gehäuft signifikante Unterschiede zwischen den Polyphenol-Konzentrationen der Kontrolle und der transgenen Linien. Allerdings handelte es sich hierbei nicht um universal gültige Differenzen. Für Textur und Aromastoffe verhielten sich F62-F64 und die Kontrolllinie sehr ähnlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Biosynthese der Sekundärmetaboliten innerhalb der *Fragaria*-Pflanzen ein sehr sensibles System ist. Neben dem genetischen Hintergrund spielen auch äußere Umwelteinflüsse eine bedeutende Rolle bei der Bildung der meisten Polyphenole. Doch auch wenn die beteiligten Gene einzelner Synthesewege bereits bekannt und charakterisiert sind gestaltet sich die gezielte Akkumulation einzelner Metaboliten und die Generierung gewünschter Eigenschaften durch die Überexpression dieser Enzyme aufgrund der noch nicht vollständig verstandenen Regulationsmechanismen weiterhin schwierig.

Summary

Strawberries are, among apples, bananas, grapes and peaches, one of the most consumed fruits in Germany. Regarding berries, they are even in first place. In the year 2018, about 8.3 tons have been produced worldwide, one third of which in China and the USA. Besides the sweet taste, the consumption of strawberries has numerous beneficial health aspects. They are rich in vitamin C and folic acid and they have a positive effect on several diseases, such as cardiovascular diseases or diabetes. Furthermore, the extracts of *Fragaria* fruits have been shown to inhibit the growth of tumor cells *in vitro*. Those beneficial health aspects are often claimed to be caused by polyphenols, a group of secondary plant metabolites. However, strawberries also contain pathogenesis-related proteins, alias PR-10 proteins. The 3D-structure of those proteins in *Fragaria* exhibits a high similarity to the major birch pollen allergen Bet v 1. Due to this analogy a possible cross reaction can cause allergic reactions due to the consumption of strawberry fruits.

The content of polyphenols and Fra a 1 varies within different strawberry cultivars. The environment is another big factor influencing particularly the synthesis of secondary metabolites, but also Fra proteins. In this thesis, a crossbreeding population deriving from „Candonga“ × „Senga Sengana“ has been evaluated during the course of the GoodBerry-project. The plants have been cultivated at five different locations in Europe from southern Spain to Poland over a period of two years. Thus, the influence of genotype G and environment E as well as the interaction of both, G × E, was investigated. The polyphenol content of the F1 siblings and both parental lines was determined *via* liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Furthermore, primary metabolites were analysed in the Spanish fruits of the first harvest year through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Fra a 1 was examined in selected genotypes by means of an indirect competitive ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

The identified polyphenols were classified into five groups: anthocyanins, ellagic acid derivatives, flavanols, flavonols and phenylpropanoids. Correlation analyses of the metabolites revealed close relations within the class of flavanols, indicating the synthesis of the monomer (epi)catechin as one of the key steps in the formation of flavanols. The high correlation values between the monomer and the oligomers suggest an autocatalytic polymerisation based on the presence of a carbocation. Between various glucosides (glc, cyanidin-glc, pelargonidin-glc, kaempferol-glc and quercetin-glc), only weak connections have been found confirming the participation of different glucosyl transferases for the glucosylation of different polyphenols. On the contrary, a very high correlation factor of $R_{SP} = 0.72$ was observed between the two malonylated anthocyanins cyanidin-malonyl-glucoside and pelargonidin-malonyl-glucoside. The formation of those two metabolites is most likely catalysed by the same potential malonyl transferase. Glucuronides could only be detected for the two flavonol kaempferol and quercetin, suggesting a strong substrate specificity of possible glucuronosyl

transferases. Between primary and secondary metabolism only occasional connections could be witnessed. This indicates that the two metabolic pathways run separately in ripe fruits. Between Fra a 1 and the classes of anthocyanins and flavonols a negative correlation was observed, giving another hint for the participation of PR-10 proteins in the biosynthesis of polyphenols.

The bioinformatic evaluation of the influences of G and E resulted in a strong genotype influence on the formation of the anthocyanin malonyl-glucosides. Here, environment played only a minor role. A great influence of G could also be observed on the flavonol malonyl-glucosides. However, it was not as clear as for the anthocyanin analogs. All further metabolites were affected by both G and E with varying extent. Furthermore, single genotypes such as H085 or the parent “Senga Sengana” presented relatively stable polyphenol contents throughout all investigated locations. In contrast, Fra a 1 turned out to be a very stable parameter within the crossbreeding-population, regardless of G and E.

In addition to the GoodBerry-population, transgenic *Fragaria* plants cultivar “Mieze Schindler” have been analysed. In the transgenic lines (F62, F63 and F64), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) was constitutively expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35 S promotor. Leaves, roots and fruits at different maturation stages from lines F62-F64 and the unchanged control line have been evaluated by LC-MS in order to investigate the polyphenol contents. Furthermore, the texture of red fruits has been analysed *via Texture Analyzer* and volatile aroma compounds have been determined in red fruits by means of GC-MS. Only in small green fruits and leaves a large number of significant differences could be observed. However, those differences were not consistent between all transgenic lines. Regarding texture and aroma compounds, F62-F64 and the control line displayed very similar behaviours.

The results of this thesis demonstrate that the biosynthesis of secondary metabolites in *Fragaria* plants is a very sensible system. Not only the genotype, but also environmental influences play an important role in the formation of most polyphenols. Although the enzymes involved in the different branches of the biosynthesis are already known and characterised, the targeted accumulation of single metabolites and the generation of desired attributes remains difficult due to the still unknown regulation mechanisms.

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte der Erdbeere

Die ersten schriftlichen Erwähnungen der Erdbeere (*Fragaria*, *F.*) aus der Pflanzenfamilie *Rosaceae* als Kulturpflanze reichen bis ins 13. Jahrhundert zurück. Allerdings wurde den Überlieferungen zufolge die wilde Walderdbeere *Fragaria vesca* zunächst nicht wegen ihres Nutzens als Nahrungsmittel kultiviert. Vielmehr wurde sie auf Grund der schönen Blüten als Zierpflanze in Gärten angesiedelt. (Darrow, 1966). Das Vorkommen wilder Erdbeerspezies erstreckt sich über Europa, Nordamerika und Teile Asiens, sowie an der Westküste Südamerikas. Die größte geographische Ausbreitung weist dabei die Spezies *F. vesca* auf, welche sowohl in Nordamerika und Europa, als auch in Teilen Asiens zu finden ist. In Nordamerika finden sich außerdem Erdbeerpflanzen der Gattung *F. virginiana*, während in Europa *F. viridis* und *F. moschata* heimisch sind. In Asien finden sich zahlreiche weitere wilde Erdbeerspezies, die jedoch eine viel kleinere geografische Ausbreitung aufweisen. An der Westküste Nord- und Südamerikas finden sich zudem native Vertreter der *F. chiloensis* (Hancock und Luby, 1993; Foltá und Davis, 2006; Liston *et al.*, 2014).

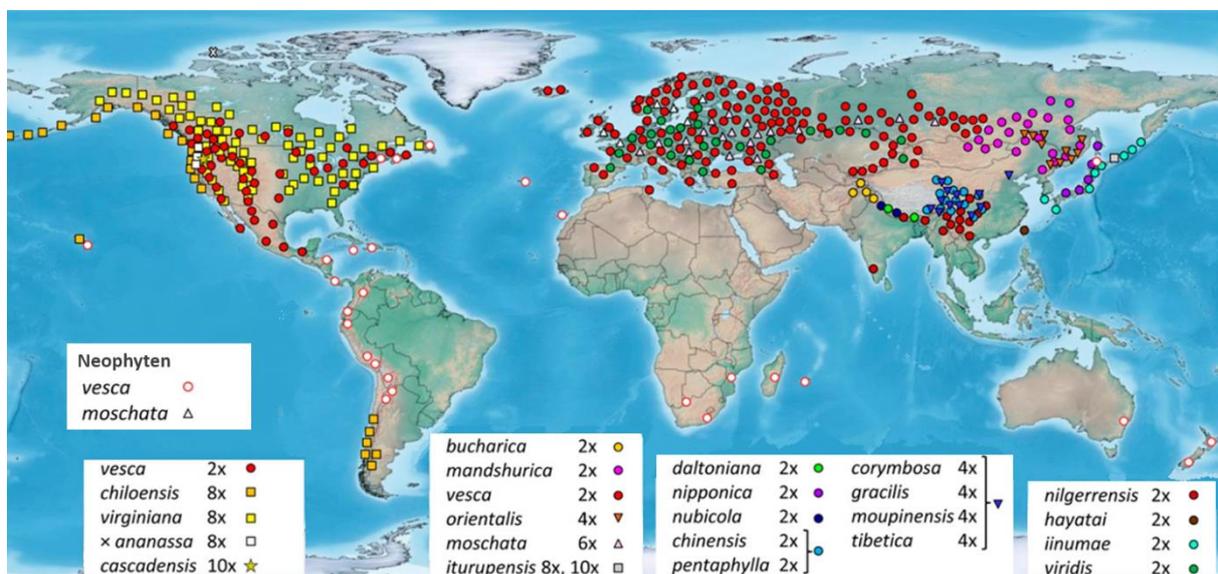


Abbildung 1: Weltweite geografische Verteilung verschiedener *Fragaria*-Spezies. nx gibt den Ploidiegrad an (Abbildung nach Liston *et al.*, 2014).

Zwischen dem 14. und 15. Jahrhundert wurde in Europa der Anbau der wilden Erdbeerarten *F. vesca*, *F. moschata* und *F. viridis* immer üblicher, wobei auch der Konsum der Erdbeerfrüchte immer mehr an Bedeutung gewann (Darrow, 1966). Im 17. Jahrhundert kamen außerdem *F. virginiana*-Pflanzen aus Nordamerika nach Europa, *F. chiloensis* folgte Anfang des 18. Jahrhunderts aus Südamerika. Die Versuche, beide Arten unabhängig voneinander zu kultivieren scheiterten zunächst. Erst durch Kreuzung der Beiden entstand Mitte des 18. Jahrhunderts die Hybride

Fragaria × *ananassa* (Duch) Guédès, welche erfolgreich angebaut werden konnte. (Hancock und Luby, 1993; Liston *et al.*, 2014). Für den europaweiten, kommerziellen Anbau und Vertrieb sind bei der FRUMATIS Datenbank der Europäischen Kommission zur Zeit über 600 Sorten registriert, wobei 97 % der Art *Fragaria* × *ananassa* angehören (European Commission, 2019).

In der deutschen Obsterzeugung stehen Erdbeeren heute mit 18.000 ha Anbaufläche und ca. 140.000 t Erdbeeren im Jahr 2016 in Deutschland auf Platz zwei hinter dem Apfel (30.000 ha/ ca. 1.000.000 t). Fast 99 % der in Deutschland erzeugten Erdbeeren wird frisch vermarktet, nur ca. 1 % wird für die Weiterverarbeitung genutzt. Zwischen 10.000 und 20.000 t frische Erdbeeren pro Jahr und ca. 10.000 t gefrorene Erdbeeren werden in andere europäische Länder exportiert, während im Jahr 2016 knapp 120.000 t frische Erdbeeren und 100.000 t gefrorene Erdbeeren importiert wurden. Frische Erdbeeren werden bis zu 70 % aus Spanien importiert, während 70 % der gefrorenen Erdbeeren zu wechselnden Anteilen aus Polen und China stammen (Garming *et al.*, 2018). Die weltweite Erdbeerproduktion betrug 2018 etwas mehr als 8,3 Millionen Tonnen. Knapp drei Millionen Tonnen wurden von China produziert, gefolgt von den USA (ca. 1,3 Mio. t), Mexiko (ca. 650.000 t) und Türkei (ca. 440.000 t) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020).

1.2 Erdbeerzüchtung

Mit der Entstehung der *F.* × *ananassa* begann Anfang des 19. Jahrhunderts zunächst in England, bald darauf aber auch in den USA die Züchtung und Kultivierung neuer Erdbeersorten (Hancock und Luby, 1993; Liston *et al.*, 2014). Die ersten neuen Züchtungen aus der Kreuzung von *F. virginiana* und *F. chiloensis* zeichneten sich vorwiegend durch größere, farblich schönere und besser schmeckende Früchte aus als bisherige Züchtungsversuche mit nur einer der beiden Elternpflanzen (Darrow, 1966). Bereits Ende des 18. Jahrhunderts entdeckte Antoine Nicholas Duchesne, dass es sich bei Erdbeerpflanzen um männliche, weibliche oder hermaphroditische Pflanzen handeln kann. In den beiden ersten Fällen sind sowohl männliche, als auch weibliche Pflanzen notwendig, um eine Fruchtproduktion zu gewährleisten. Um 1920 entdeckte man schließlich, dass unterschiedliche *Fragaria* Spezies unterschiedliche Chromosomenanzahlen aufweisen können. Der einfachste Chromosomensatz, wie ihn zum Beispiel *F. vesca* aufweist, umfasst dabei sieben Chromosomenpaare. *F. chiloensis* und *F. virginiana*, sowie *F.* × *ananassa* besitzen hingegen 56 Chromosomenpaare und sind somit octoploid. Kreuzungen zwischen Sorten unterschiedlicher Ploidiegrade erwiesen sich schon früh als sehr schwer. Mit dem neuen Wissen um die Ploidie der einzelnen Sorten konnten Züchtungen erstmals gezielter durchgeführt werden (Ichijima, 1926; Hancock und Luby, 1993; Liston *et al.*, 2014).

Die weitere Züchtung konzentrierte sich zunächst auf die Verbesserung bestimmter Attribute wie Geschmack und Fruchtgröße. Mit dem kommerziellen Anbau der Erdbeere rückten auch Eigenschaften wie Ertrag und Blütezeit, Resistenzen gegen bestimmte Pathogene oder Krankheiten und

die Toleranz von Hitze- oder Trockenstress in den Fokus der Züchter. Dabei beschränkte sich die Auswahl der Elternsorten zunächst auf die drei Arten *F. virginiana*, *F. chiloensis* und *F. × ananassa*. Gegen Mitte des 20. Jahrhunderts wurden auch wieder wilde *Fragaria*-Spezies zur Kreuzung verwendet, um die genetischen Grundlagen der neuen Züchtungen zu erweitern. Der gängige Ansatz war dabei jeweils die Kreuzung zweier Sorten mit wünschenswerten Eigenschaften und die Selektion und Vermehrung erfolgsversprechender Nachkommen der F1-Generation. (Hancock und Luby, 1993; Hancock *et al.*, 2001; Ulrich *et al.*, 2007). Mit Hilfe genetischer Marker wurde es möglich die genetische Vielfalt neuer Züchtungen zu bestimmen und gezielt zu vergrößern, sowie die Qualität der erhaltenen Sorten durch die eindeutige Identifizierung der Kultivare zu sichern. Außerdem entwickelten sich seit den späten 90er Jahren mit Hilfe der sogenannten Genkartierung weitere Marker für Krankheitsresistenzen, die Blütezeit oder einzelne Gene, wie die Flavanon-3-Hydroxylase FHT, Zimtalkohol-Dehydrogenase CAD (englisch: *cinnamyl alcohol dehydrogenase*) oder Anthocyanidin-Synthase ANS aus der Polyphenolbiosynthese. Ein wichtiger Schritt für die Identifizierung neuer Gene mit Hilfe der Genkartierung ist zunächst die Erstellung einer Kopplungskarte der genomischen Sequenz mit Markern aus einer octoploiden *Fragaria × ananassa* Kreuzungspopulation. Aufgrund der Komplexität des octoploiden Genoms war dieses bis vor kurzem nicht verfügbar weshalb lange auch die octoploiden Kopplungskarten mit dem Genom der diploiden *F. vesca* „Hawaii 4“ erstellt wurden. Der kommerziellen Nutzung genetischer Marker für gezielte Züchtung sind jedoch zum einen durch die hohen Kosten und zum anderen durch das Zusammenspiel verschiedener Gene zum Erreichen gewünschter Eigenschaften der Erdbeerpflanzen und Früchte auch heute noch Grenzen gesetzt (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2003; Folta und Davis, 2006; Sargent *et al.*, 2007; Gil-Ariza *et al.*, 2009; Whitaker, 2011; Bassil *et al.*, 2015; Hancock *et al.*, 2016).

Phänotypische Merkmale, Fruchteigenschaften und –inhaltsstoffe sind außerdem nicht nur vom genetischen Hintergrund abhängig, sondern können auch stark durch Umweltfaktoren wie Temperatur, Sonnenstunden oder Niederschlag beeinflusst werden. Erdbeeren finden sich über weite geographische Standorte mit unterschiedlichen Umweltbedingungen verteilt. Zahlreiche Studien zeigen, dass sich gleiche *Fragaria*-Kultivare an unterschiedlichen Standorten zum Beispiel in Blütezeit, Pflanzenwachstum, Ertrag und Textur und Farbe der Früchte signifikant unterscheiden. Auch der Gehalt an Vitamin C, sekundären Pflanzenstoffen wie Polyphenolen oder Allergie-auslösenden Fra a 1-Protein variieren umweltbedingt. Durch diese Umweltabhängigkeit sind wiederum die Entwicklung standortübergreifender Genmarker und standortübergreifende Züchtung im Allgemeinen erschwert (Hancock und Luby, 1993; Whitaker, 2011; Tulipani *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2014; Mathey *et al.*, 2017; Palmieri *et al.*, 2017).

1.3 Erdbeeren und die menschliche Gesundheit

1.3.1 Ernährungsphysiologische Aspekte

Im Geschäftsjahr 2017/2018 verzehrten die Deutschen durchschnittlich knapp 70 kg Obst. Davon entfielen 3,5 kg auf Erdbeeren, womit sie hinter Äpfeln (21,3 kg), Bananen (12,4 kg), Trauben (5,3 kg) und Pfirsichen (3,9 kg) an fünfter Stelle stehen (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2019). Unter den Beerenobstsorten stehen die Erdbeeren damit vor Heidelbeeren und Himbeeren an erster Stelle (DFHV Deutscher Fruchthandelsverband e.V., 2019).

Tabelle 1: Durchschnittliche Gehalte ausgewählter Nährstoffe in Erdbeeren. Im Vergleich mit den beiden meistverzehrteten Obstsorten in Deutschland (Nährwertangaben nach Senser *et al.* (2004)).

Nährstoffgruppe	Nährstoff	Gehalt pro 100 g essbarem Anteil		
		Erdbeere	Apfel	Banane
Wasser		89,5 g	84,9 g	73,9 g
Kohlenhydrate	Fructose	2,3 g	5,7 g	3,4 mg
	Glucose	2,2 g	2,0 g	3,5 mg
	Saccharose	1,0 g	2,6 g	10,3 g
	Ballaststoffe	1,6 g	2,0 g	1,8 g
Organische Säuren	Zitronensäure	750 mg	30 mg	200 mg
	Äpfelsäure	305 mg	425 mg	360 mg
	Oxalsäure	16 mg	0,5 mg	-
Proteine		0,8 g	0,3 g	1,2 g
Fettsäuren	Linolsäure	135 mg	200 mg	35 mg
	Linolensäure	105 mg	45 mg	25 mg
Mineralstoffe	Eisen	640 µg	250 µg	350 µg
	Mangan	390 µg	45 µg	285 µg
	Zink	265 µg	100 µg	195 µg
Vitamine	Vitamin C	65 mg	12 mg	12 mg
	Vitamin B (ges.)	1 mg	0,6 mg	1,4 mg
	davon Folsäure	45 µg	8 µg	14 µg
	Vitamin E (ges.)	120 µg	490 µg	270 µg

Erdbeeren bestehen zu fast 90 % aus Wasser, gefolgt von ca. 7 g/100 g Kohlenhydraten. Unter den verdaulichen Kohlenhydraten finden sich vor allem die Monosaccharide Glucose und Fructose, sowie das Disaccharid Saccharose. Etwa ein Fünftel der Kohlenhydrate liegt als unverdauliche Ballaststoffe vor. Die restlichen Grundnährstoffe verteilen sich zu Anteilen zwischen 0,4 und 1 % auf Fett, Mineralstoffe, Proteine und organische Säuren (Senser *et al.*, 2004). Neben den Hauptnährstoffen

sind Erdbeeren reich an Vitamin C und Folsäure (Giampieri *et al.*, 2012). Die durchschnittlichen Gehalte ausgewählter Nährstoffe sind in Tabelle 1 dargestellt.

1.3.2 Positive Effekte des Beerenkonsums

In zahlreichen Studien wurde der Konsum von Beerenobst in Zusammenhang mit der menschlichen Gesundheit untersucht. Dabei zeigt sich eine Verbesserung des gesundheitlichen Zustandes in Bezug auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Ververidis *et al.*, 2007; Basu *et al.*, 2009; Burton-Freeman *et al.*, 2010) und Diabetes (Paquette *et al.*, 2017; Cory *et al.*, 2018), sowie in zahlreichen *in vitro*-Experimenten die Hemmung des Zellwachstums von Tumorzellen. Die krebsvorbeugende Wirkung konnte auch in Tierversuchen bestätigt werden (Olsson *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Dai und Mumper, 2010). Des Weiteren werden positive Effekte einer polyphenolreichen Ernährung in Zusammenhang mit Übergewicht und neurodegenerativen Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer beobachtet (Han *et al.*, 2007; Khoo *et al.*, 2017; Cory *et al.*, 2018).

Als Grund für die positiven Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit wird unter anderem die antioxidative Wirkung einiger bioaktiver Substanzen in den Beeren angenommen. Diese bioaktiven Substanzen können als Radikalfänger fungieren und der Oxidation von Enzymen, Proteinen, DNA und Fetten im menschlichen Körper entgegenwirken. Substanzen mit möglicher antioxidativer Kapazität sind zum Beispiel Vitamin C und Vitamin E, aber auch Polyphenole als sekundäre Pflanzenstoffe (Ververidis *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007; Battino *et al.*, 2009; Dai und Mumper, 2010; Khoo *et al.*, 2017). *In vitro* kann die antioxidative Kapazität von Gesamtexttrakten oder einzelnen Fraktionen davon mit Analysen wie dem sogenannten *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) oder *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) bestimmt werden. Die einzelnen Komponenten tragen dabei je nach Struktur und Konzentration in den Beeren zu unterschiedlichen Anteilen zur gesamten antioxidativen Kapazität bei (Ververidis *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008; Cerezo *et al.*, 2010). Darüber hinaus können aber auch komplexere Wirkmechanismen eine Rolle spielen. So können einzelne Polyphenole Gene inhibieren, die zum Beispiel Cytochrom P450-Enzyme kodieren, oder die Expression von Genen induzieren, die in Zusammenhang mit der natürlichen Zellabwehr stehen (Han *et al.*, 2007; Dai und Mumper, 2010; Khoo *et al.*, 2017). Auch die Wechselwirkung von Polyphenolen und Darmbakterien im menschlichen Verdauungstrakt gewinnt stark an Interesse. Erste Studien zeigen, dass durch pflanzliche Polyphenolextrakte das Wachstum hilfreicher Darmbakterien wie Bifidobakterien angeregt werden kann, während gesundheitsschädliche Bakterien reduziert werden können. (Cory *et al.*, 2018). Verschiedene Studien geben außerdem Hinweise darauf, dass nicht nur einzelne Komponenten der Beeren wie die Polyphenole oder Vitamin C ausschlaggebend sind für die Verbesserung der Gesundheit. Vielmehr trägt vermutlich die komplexe Mischung einer Frucht aus Polyphenolen und Vitaminen aber auch Ballaststoffen und Phytosterolen zu einem verbesserten Gesundheitszustand bei (Basu *et al.*, 2009; Paquette *et al.*, 2017).

Ein weiterer Aspekt, der bei der Beurteilung der gesundheitlichen Verbesserung durch Beerenkonsum beachtet werden muss, ist die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe, sowie deren Stabilität gegenüber Verdauung und Abbau im menschlichen Magen-Darm-Trakt. Manach *et al.* (2005) zeigten durch den Vergleich einer Vielzahl an Studien über die Bioaktivität von Polyphenolen, dass Gallussäure und Isoflavone die am besten absorbierten Metaboliten sind. Mit absteigender Absorptionsrate folgen Catechine, Flavanone und Quercetin-Glucoside. Am schlechtesten absorbiert werden polymere Quercetin-Derivate, die Proanthocyane, und Anthocyane. Neben der Struktur spielt jedoch auch die Matrix (z. Bsp. Wasser- oder Öl-Basis) eine Rolle bei der Absorption der Polyphenole. (Manach *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Besonders Anthocyane als Untergruppe der Polyphenole sind außerdem stark pH-sensibel. Der saure pH-Wert im Magen wirkt in diesem Fall stabilisierend und begünstigt die Aufnahme durch die Magenwand. Der neutrale pH-Wert im Darm verringert jedoch die Absorption. Unabhängig vom pH-Wert werden Pelargonidin-Derivate außerdem grundsätzlich besser absorbiert als Cyanidin-Derivate. Komplexere Moleküle wie zum Beispiel Ellagannine müssen zunächst in die Monomere gespalten werden, bevor sie im Körper absorbiert werden können, weshalb sie oft ohne Absorption bis in tiefere Darmbereiche gelangen (Giampieri *et al.*, 2012). Schließlich ändert sich die antioxidative Kapazität der Polyphenole auch durch Konjugation oder Abbau. So können bei nicht absorbierten Polyphenolen bereits im Magen durch Enzyme glucosidische Bindungen gespalten werden. Im Darm können aus höhermolekularen Verbindungen durch Darmbakterien die entsprechenden Monomere abgespalten und die Monomere wiederum zu kleineren phenolischen Säuren abgebaut werden. Alle über den Magen oder Darm absorbierten Moleküle unterliegen schließlich im menschlichen Stoffwechsel verschiedenen Konjugations-Reaktionen, wie Glucuronidierung, Methylierung oder Sulfatierung (Han *et al.*, 2007; Cerezo *et al.*, 2010; Giampieri *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2015). All diese Veränderungen der Molekülstruktur führen letztendlich auch zu einer veränderten antioxidativen Kapazität und Bioaktivität der Polyphenole. Da die genauen Mechanismen im menschlichen Organismus oft noch unerforscht sind, ist eine Übertragung von Ergebnissen aus *in-vitro*-Studien oft nicht möglich. Die gesundheitsfördernde Wirkung einer polyphenolreichen Diät bleiben jedoch unumstritten (Han *et al.*, 2007; Dai und Mumper, 2010; Tulipani *et al.*, 2011).

1.3.3 Allergische Reaktionen

Allergische Reaktionen können auch als Fehlfunktion des menschlichen Immunsystems angesehen werden. Das Immunsystem dient primär zur Abwehr verschiedener Pathogene, wie zum Beispiel Bakterien, Viren oder Pilzen. Dabei handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren und Abläufe. Es beginnt mit der Haut als erste Barriere und setzt sich im Körper mit den Schleimhäuten bis in den Verdauungs-Trakt fort. Dringen trotz der äußeren Schutzmaßnahmen Pathogene tiefer in den Körper ein, so wird das Immunsystem auf zellulärer Ebene angeregt. Hierbei wird zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem unterschieden. Als Teil des

angeborenen Immunsystems greifen zunächst die Granulozyten bei der Bekämpfung von Pathogenen ein, unterstützt werden sie von Mastzellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Können die Krankheitserreger durch die Funktionen des angeborenen Immunsystems nicht oder nicht vollständig abgetötet werden, wird auch das adaptive Immunsystem involviert. Hierzu gehören die sogenannten T- und B-Lymphozyten. Durch Rezeptoren auf ihrer Oberfläche können beide Zelltypen zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen unterscheiden. T-Zellen erkennen Peptide eines Antigens, die an bestimmten Glykoproteinen, den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen oder auch MHC-Molekülen (englisch: *major histocompatibility complex*) gebunden sind. B-Zellen hingegen erkennen die dreidimensionale Struktur von Proteinen und produzieren Antikörper, die sogenannten Immunglobuline. Insgesamt gibt es fünf Antikörperklassen, Immunglobulin A, D, E, G und M. Typische Antigene die zur Aktivierung der T- oder B-Lymphozyten führen sind Proteine oder Peptide von Pathogenen, seltener Lipide oder Kohlenhydrate. Das Besondere am adaptiven Immunsystem ist, dass es sich im Gegensatz zum angeborenen System mit Hilfe der Gedächtniszellen die molekularen Strukturen der Erreger merken und dadurch im Fall einer erneuten Infektion schneller aktiviert werden kann (Rink *et al.*, 2015; Murphy und Weaver, 2018).

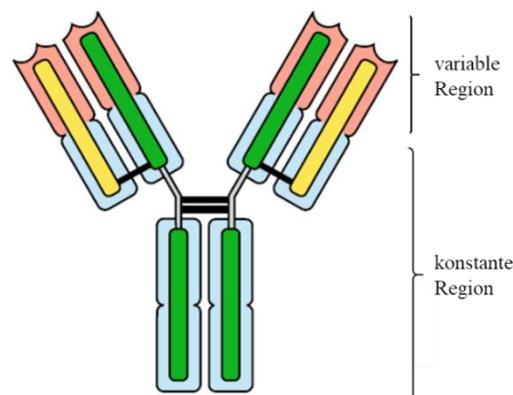


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Antikörpers. Blau hinterlegt: konstante Region, konstant für eine Antikörperklasse; rot hinterlegt: variable Region, spezifisch für die Antikörper-Antigen-Bindung. Grün: schwere Kette, gelb: leichte Kette. Modifiziert nach Murphy und Weaver (2018).

Bei einer Allergie handelt es sich um die Reaktion des adaptiven Immunsystems auf eigentlich harmlose Antigene, wie zum Beispiel Pollen, Nahrungsmittelbestandteile oder Medikamente. Grundsätzlich kann man zwischen vier verschiedenen Allergie-Klassen unterscheiden. Die Einteilung erfolgt nach den beteiligten Lymphozyten und gebildeten Antikörpern. Die häufigste Allergie ist die Typ-1-Allergie, bei der B-Lymphozyten und Immunglobulin E (IgE) involviert sind. Die erste Phase der allergischen Reaktion ist die Sensibilisierungsphase. Hierbei kommt es zum ersten Kontakt zwischen dem vermeintlichen Allergen und den B-Lymphozyten und infolge dessen zur Bildung von IgE-Antikörpern und deren Positionierung auf den Mastzellen. Beim zweiten Kontakt der betroffenen Person mit dem Antigen erkennen die IgE-Antikörper auf den Mastzellen den vermeintlichen Fremdkörper und induzieren die Ausschüttung verschiedener Mediatoren, wie Histamin, Proteoglykanen oder Proteasen.

Durch die Ausschüttung der Mediatoren kommt es zu den typischen allergischen Symptomen von Juckreiz, Hautrötungen und Schwellungen des Gewebes bis hin zum anaphylaktischen Schock. Die Typ-2-Allergie richtet sich nur gegen zellgebundene Antigene und wird durch Antikörper der Klasse G hervorgerufen. Auch bei Typ-3-Allergien sind Immunglobuline der Klasse G beteiligt, allerdings richten sie sich gegen frei vorliegende Antigene. Bei Typ-4-Allergien spielen hingegen T-Zellen die größte Rolle. Auch bei Allergien von Typ 2-4 erfolgt zuerst die Sensibilisierung. Im Gegensatz zu den Antikörpern der ersten drei Reaktionstypen können die T-Zellen bei einer Typ-4-Allergie das Allergen nicht direkt angreifen, weshalb es zu einer verzögerten sichtbaren Reaktion kommt. Allergien vom Typ 4 werden daher auch als Spättyp-Allergie bezeichnet (Ring, 2005; Rink *et al.*, 2015).

Bei einer allergischen Reaktion nach dem Konsum bestimmter Lebensmittel spricht man auch von einer Lebensmittelallergie. Die Zahlen an betroffenen Personen, variieren zwischen einem und 35 %, je nach Befragung der Patienten. Außerdem gibt es große geografische sowie demografische Unterschiede. Die häufigsten allergischen Reaktionen finden sich dabei nach dem Konsum von Milch, Eiern und Erdnüssen (Sicherer und Sampson, 2010). Nach EU-Verordnung Nr. 1169/2011 müssen zum Schutz der Konsumenten insgesamt 14 verschiedene Stoffgruppen gekennzeichnet werden, die Allergien oder Unverträglichkeiten auslösen können. Darunter befinden sich Milch, Eier und Erdnüsse, aber auch zum Beispiel glutenhaltiges Getreide, Fisch und Krebstiere, Sellerie und verschiedene Schalenfrüchte wie Mandeln oder Walnüsse (Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 2011). Zusätzlich zu den direkten allergischen Reaktionen kann es jedoch auch zu Kreuzreaktionen kommen. Hierbei erfolgt die Sensibilisierung gegebenenfalls zunächst über die Atemwege. Das Antigen, gegen welches Antikörper gebildet werden, kann zum Beispiel ein Protein aus Birkenpollen sein. Da Proteine der gleichen Familie in anderen Pflanzen wie zum Beispiel Apfel, Sellerie, Kirsche oder Erdbeere, eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, können die ursprünglich gegen Birkenpollen gebildeten Antikörper auch diese Proteine detektieren und somit zu einer allergischen Reaktion führen (Sicherer und Sampson, 2010; Sinha *et al.*, 2014; Franz-Oberdorf *et al.*, 2016). Die Nomenklatur der Allergie-auslösenden Proteine setzt sich aus der Gattung (drei Buchstaben), der Art (ein Buchstabe) und der Nummerierung chronologisch nach der Entdeckung zusammen.

1.4 Allergenes Fra a 1

1.4.1 Aufbau und Zugehörigkeit

Die Gruppe der Fra a 1-Proteine gehört zu den sogenannten Pathogenese-assoziierten Proteinen (PR-Proteine, englisch: *pathogenesis related*). PR-Proteine finden sich in allen Pflanzen und können auf Grund ihrer Ähnlichkeiten der Aminosäure-Sequenzen oder der enzymatischen Aktivität in insgesamt 17 Unterklassen aufgeteilt werden. Proteine, die unterschiedlichen Klassen von PR-Proteinen zugeordnet sind, können sich dabei sehr stark unterscheiden. PR-Proteine mit allergenem Potential

finden sich in acht der 17 Unterklassen, wobei die Fra a 1-Gruppe der Klasse 10 zugeordnet wird, also den PR-10-Proteinen (Sinha *et al.*, 2014).

Weitere Mitglieder der PR-10-Familie sind zum Beispiel Mal d 1 aus Apfel, Api g 1 aus Sellerie und Bet v 1 aus Birkenpollen (Hoffmann-Sommergruber, 2000; Sinha *et al.*, 2014). Sie zeichnen sich durch ein niedriges Molekulargewicht von ca. 17 kDa, sowie ein hochkonserviertes Aminosäure-Motiv, die sogenannte glycinreiche Schleife aus. Außerdem weisen sie eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Tertiärstruktur auf, bestehend aus sieben antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Strukturen, zwei kurzen α -Helices in der Nähe des N-Terminus und einer langen α -Helix am C-Terminus. Im Inneren des Proteins befindet sich ein Hohlraum, in welchem verschiedene Liganden eingelagert werden können. Von allen Strukturelementen weist die C-terminale α -Helix die meisten Variationen innerhalb der PR-10-Proteine auf (Fernandes *et al.*, 2013).

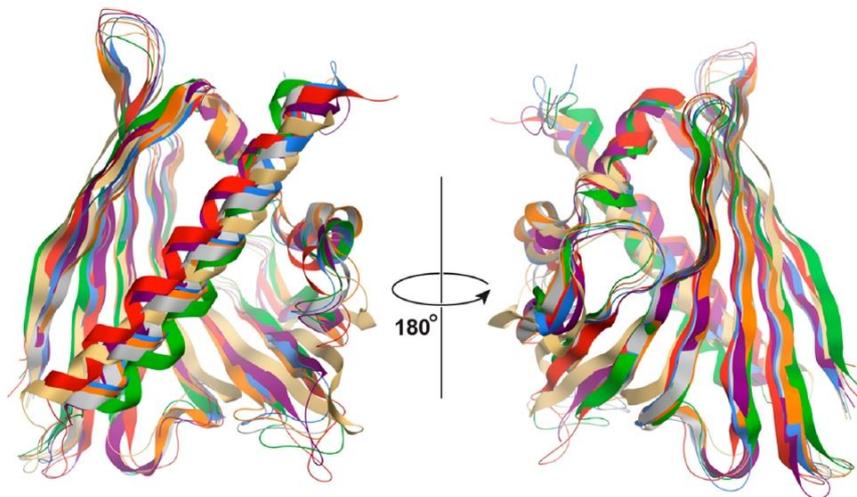


Abbildung 3: Bekannte 3D-Strukturen ausgewählter PR-10 Proteine. Blau: Bet v 1 (Birkenpollen), rot: Fra a 1 (Erdbeere), grün: Mal d 1 (Apfel), grau: Api g 1 (Sellerie), lila: Pru av 1 (Pflaume), orange: Dau c 1 (Karotte), gelb: Glc m 4 (Sojabohne). (Abbildung nach Ahammer *et al.*, 2017).

Bereits seit den 80er Jahren ist bekannt, dass Patienten mit einer Allergie gegen Birkenpollen auch allergische Reaktionen gegen verschiedene Lebensmittel wie Apfel oder Sellerie zeigen. Grund für diese Kreuzallergie ist die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Hauptallergen der Birke Bet v 1 und den PR-10-Proteinen der entsprechenden Obst- oder Gemüsesorten. Gegen Apfel und Sellerie, aber auch Birne, Karotte und Kartoffel konnte diese Kreuzreaktivität mit Patientenserum, welches IgE-Antikörper gegen Bet v 1 enthielt und Proteinextrakten der jeweiligen Lebensmittel über Immunoblots nachgewiesen werden (Ebner *et al.*, 1995). Mittlerweile gelten PR-Proteine als die größte Gruppe der Pflanzenallergene (Sinha *et al.*, 2014). Auch für die Gruppe der homologen Proteine in Erdbeere, Fra a 1, konnte mittels Pricktest und mit Seren von Birkenpollenallergikern im Basophilenaktivierungstest das Potential für eine Kreuzallergie nachgewiesen werden (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016).

1.4.2 Biologische Funktion

PR-Proteine sind vor allem in der Pflanzenabwehr gegen verschiedene Pathogene, wie zum Beispiel Pilze, Bakterien und Viren involviert. Sie können aber auch bei Befall durch Insekten oder nach Kontakt mit bestimmten Chemikalien gebildet werden. Manche PR-Proteine wirken auch als Enzyme. Bekannt sind zum Beispiel Glucanase-, Chitinase-, Endoproteinase-, Peroxidase- und Ribonuclease-Aktivität. Manche PR-Proteine fungieren auch als Lipidtransferproteine oder Defensine. Alle Vertreter einer Unterklasse der PR-Proteine weisen dabei üblicherweise die gleichen Funktionen auf. Die klassischen PR-Proteine werden erst durch den Pathogenbefall gebildet, manche sind jedoch auch dauerhaft exprimiert. (Hoffmann-Sommergruber, 2000; Sinha *et al.*, 2014). PR-10-Proteine nehmen in dieser Gruppe eine Sonderstellung ein, da ihre Funktionen in der Pflanze noch nicht eindeutig geklärt sind. Es ist bekannt, dass sie, wie andere PR-Proteine, bei verschiedenen Infektionen gebildet werden. Sie werden aber auch vermehrt bei Kälte, Trockenheit, oxidativem Stress, durch UV-Strahlung oder durch bestimmte Phytohormone exprimiert. Allerdings ist noch keine universale Funktion bekannt, die allen PR-10-Proteine gemein ist. Sie scheinen jedoch neben ihrer Rolle in der Pflanzenabwehr auch in der Biosynthese einiger Sekundärmetaboliten, sowie der Lagerung und dem Transport einiger Phytohormone beteiligt zu sein (Fernandes *et al.*, 2013).

Auch für die Gruppe der Fra a 1-Proteine konnten bereits mehrere Funktionen gezeigt werden. So führt die Infektion von in-vitro Pflanzenkulturen mit dem Pflanzenpathogen *Verticillium* zur erhöhten Expression einiger PR-10-Gene in Blättern und Wurzeln (Besbes *et al.*, 2019b). Auch unabhängig von Infektionen variiert das Expressionsniveau verschiedener Isoformen abhängig von Pflanzenorgan und Entwicklungsstadium. Für die Isoform Fra a 1.06 konnte außerdem eine Ribonukleaseaktivität nachgewiesen werden (Besbes *et al.*, 2019a). Des Weiteren gibt es Belege, dass Fra-Proteine niedermolekulare Polyphenole binden, wobei verschiedene Isoformen verschiedene Selektivitäten aufweisen. Dies legt die Funktion der Fra-Proteine als Transportproteine oder eine regulatorische Funktion nahe, um die Verfügbarkeit bestimmter Metaboliten während der Polyphenolbiosynthese zu gewährleisten und zu kontrollieren. Darüber hinaus könnten sie auch bei der Regelung der Expressionslevel einiger Gene der Polyphenolsynthese involviert sein (Casañal *et al.*, 2013).

1.5 Primär- und Sekundärmetabolismus

Prinzipiell lässt sich bei Pflanzen zwischen Primär- und Sekundär-Stoffwechsel unterscheiden, wobei Produkte des Primärstoffwechsels das Überleben der Pflanzen sichern. Der Sekundärstoffwechsel hingegen dient unter anderem dem Pflanzenwachstum und der Verteidigung gegen äußere Einflüsse oder der Anziehung von Bestäubern. Metaboliten des Primärstoffwechsels dienen oft als Vorstufen für Produkte des Sekundärstoffwechsels. Während der Primärstoffwechsel stets sehr ähnlich abläuft, variiert der Sekundärstoffwechsel sehr stark zwischen verschiedenen Pflanzengattungen (Beauvoit *et al.*, 2018; Pott *et al.*, 2019).

1.5.1 Primärmetaboliten

Der Primärstoffwechsel dient der Pflanze zur Energiegewinnung aus aufgenommenen Nährstoffen. Außerdem werden verschiedene Metaboliten gebildet, welche später als Vorstufen des Sekundärstoffwechsels dienen. Zu den Metaboliten des Primärstoffwechsels zählen Aminosäuren, Fettsäuren, organische Säuren wie Zitronensäure und Äpfelsäure, sowie Zucker und Zuckeralkohole (Beauvoit *et al.*, 2018). Primärmetaboliten können dabei über verschiedenen Stoffwechselwege synthetisiert werden. Drei wichtige Pfade sind die Glykolyse, der Citrat-Stoffwechsel und der Shikimisäure-Weg (Pott *et al.*, 2019). Korrelationsanalysen verschiedener Primärmetaboliten in Erdbeerfrüchten zeigten, dass die Gehalte einzelner Aminosäuren eng miteinander korrelieren. Eine zweite zusammenhängende Gruppe bilden die Zucker und Zuckeralkohole (Vallarino *et al.*, 2019).

1.5.2 Sekundärmetaboliten – Polyphenole

Polyphenole sind ubiquitär im gesamten Pflanzenreich und mit mehreren tausend bekannten Metaboliten eine der größten Klassen des Sekundärstoffwechsels. Sie reichen von kleinen Molekülen, wie den phenolischen Säuren, bis zu polymeren Strukturen wie den Ellagantanninen und Proanthocyanidinen (Bravo, 1998).

1.5.2.1 Strukturelle Grundlagen

Die gemeinsame Grundstruktur aller phenolischen Verbindungen zeichnet sich zunächst durch mindestens einen aromatischen C6-Ring (B-Ring) aus. Flavonoide als größte Gruppe innerhalb der Polyphenole weisen außerdem einen zweiten aromatischen C6-Ring (A-Ring) auf, welcher über einen nicht-aromatischen C3-Ring (C-Ring) mit dem B-Ring verbunden ist. Durch konjugierte Doppelbindungen kann sich das aromatische System der Polyphenole gegebenenfalls über das gesamte Molekül erstrecken, was dazu führt, dass die Verbindungen farbig wahrgenommen werden. Über

Kondensationsreaktionen einzelner Monomere können dann wiederum hoch-polymere Strukturen entstehen (Bravo, 1998; Ververidis *et al.*, 2007; Pott *et al.*, 2019).

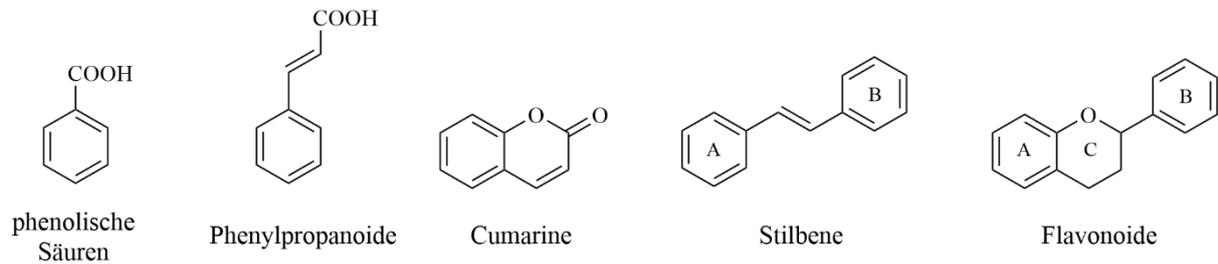


Abbildung 4: Grundstrukturen ausgewählter Polyphenole.

Die Erdbeerfrucht produziert vor allem Vertreter der Phenylpropanoide und Flavonoide. Phenylpropanoide dienen als Grundbausteine in der Lignin-Synthese. In der Gruppe der Flavonoide finden sich vor allem (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin als Flavanole, Kaempferol und Quercetin als Flavonole und Pelargonidin und Cyanidin aus der Gruppe der Anthocyane, welche für die rote Farbe der Erdbeerfrüchte verantwortlich sind. Daneben akkumulieren Erdbeeren auch Polymere wie die Procyanidine, die aus Monomeren der Untergruppe der Flavanole gebildet werden, sowie Ellagsäure und Ellagannine, deren Monomere auf die Gallussäure zurückzuführen sind. Vor allem die Ellagannine sind charakteristisch für die Pflanzenfamilie *Rosaceae*. Die genaue Zusammensetzung variiert je nach Pflanzengewebe, Entwicklungsstadium und Genotyp (Seeram *et al.*, 2006; Aaby *et al.*, 2007; Hanhieva *et al.*, 2011; Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013).

In der Natur liegen Polyphenole meist nicht frei vor, sondern in konjugierter Form als verschiedene Glykoside. In der Erdbeere sind die häufigsten Zuckerreste Glucose und Rhamnose als Monosaccharid, sowie Rutinose als Disaccharid. In anderen Pflanzen sind beispielsweise auch Galactose Glucuronsäure, Xylose oder Arabinose als Monosaccharide an Polyphenolen gebunden. Darüber hinaus finden sich auch Ester verschiedener organischer Säuren, wie Malonsäure, Essigsäure oder Fettsäuren. Auch die Konjugation mit Cumarsäure ist möglich. (Bravo, 1998; Aaby *et al.*, 2007; Hanhieva *et al.*, 2011). Durch die verschiedenen Konjugationen erhöht sich zum einen die Wasserlöslichkeit der Metaboliten, zum anderen erniedrigt sich die Reaktivität. Beides hat zur Folge, dass sie von der Pflanze besser transportiert und akkumuliert werden können (Ververidis *et al.*, 2007). Diese vielseitigen Modifikationsmöglichkeiten in Kombination mit der großen Vielzahl an verschiedenen Monomeren sorgen für die große strukturelle Vielfalt der Polyphenole.

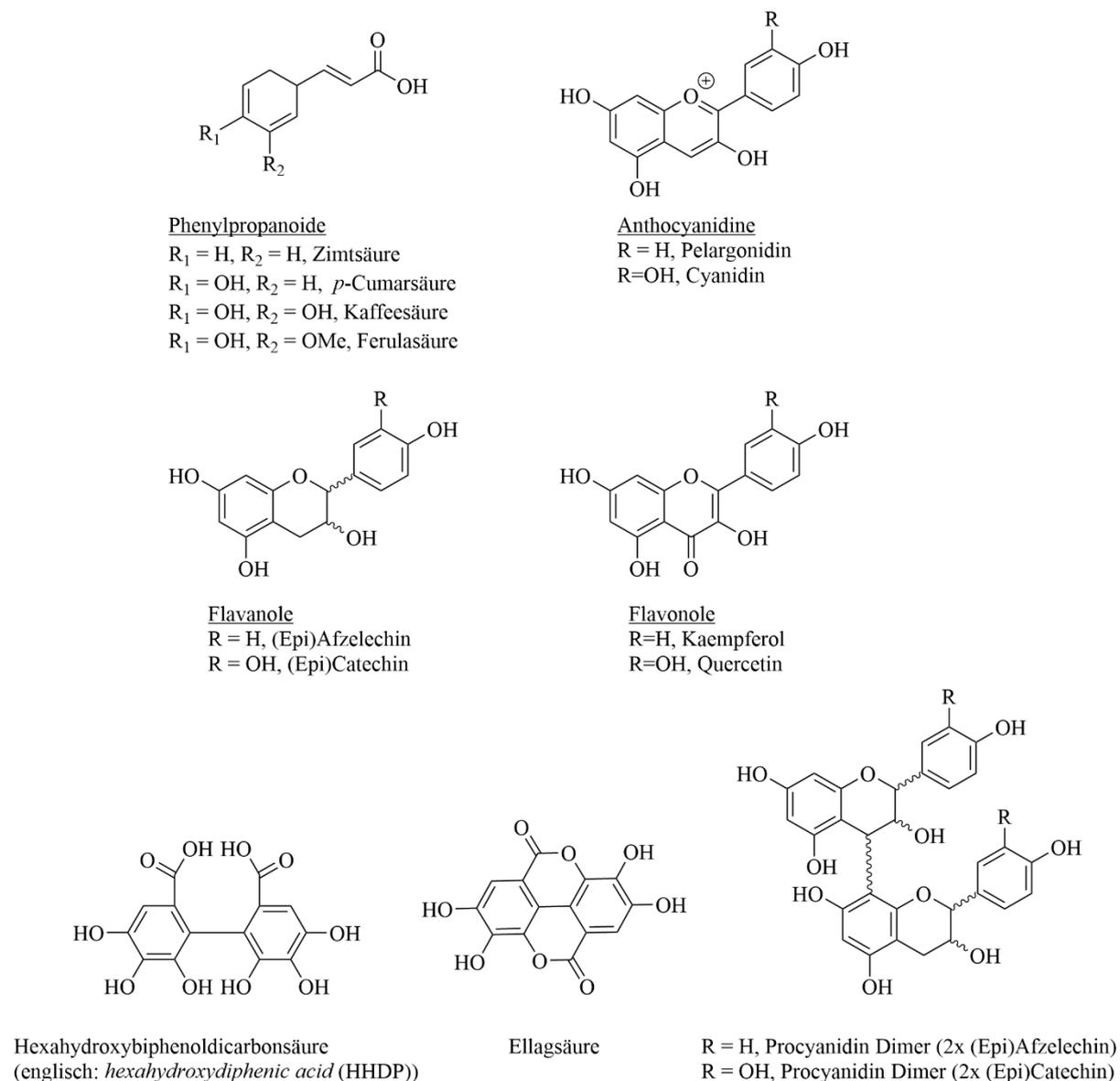


Abbildung 5: Strukturformeln der Aglykone bekannter Polyphenole in Erdbeere.

1.5.2.2 Biosynthese der Polyphenole

Zwischen 20 und 30 % des Kohlenstoffs welcher durch Photosynthese von Pflanzen aufgenommen wird, wird in der Biosynthese der Polyphenole geleitet (Ververidis *et al.*, 2007; Pott *et al.*, 2019). Dabei dient Phenylalanin als Vorstufe aller Polyphenole und stellt gleichzeitig die Verknüpfung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus dar. Gebildet wird es über den Shikimisäureweg aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat, welche wiederum aus dem Abbau von Glucose über die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg entstehen (Ververidis *et al.*, 2007; Caretto *et al.*, 2015). Katalysiert durch Phenylalanin-Ammoniak-Lyase und Zimtsäure-4-Hydroxylase wird *p*-Cumarsäure-CoA als nächstes wichtiges Intermediat gebildet. Hier teilt sich die Biosynthese in drei weitere Wege: die Phenylpropanoid- & Lignin-Synthese, die Stilben-Synthese und die

Flavonoid-Synthese (Ververidis *et al.*, 2007; Härtl *et al.*, 2017). Eine Sonderstellung nehmen Ellagsäurederivate ein, da sie nicht über Phenylalanin gebildet werden. Vielmehr trennt sich ihr Biosyntheseweg bereits im Skimisäureweg von der Synthese der weiteren Polyphenole ab. Als erstes Intermediat wird dabei β -Glucogallin aus Gallussäure gebildet (Schulenburg *et al.*, 2016).

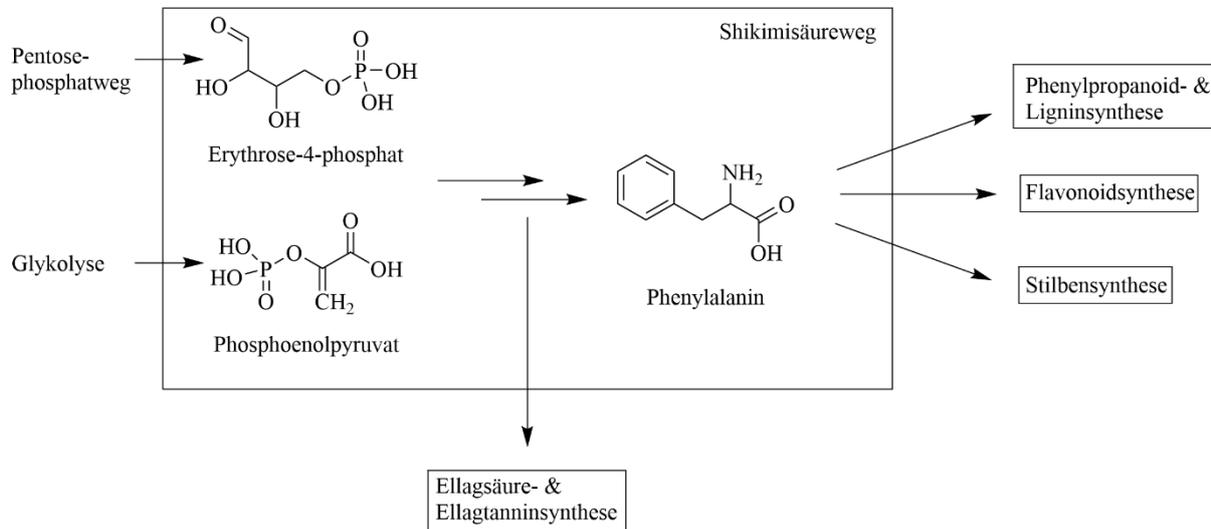


Abbildung 6: Überblick über die Biosynthese der Polyphenole. Modifiziert nach Caretto *et al.* (2015).

In der Erdbeere sind die Phenylpropanoid- & Lignin-Synthese, die Flavonoid-Synthese und die Ellagsäure- & Ellagtannin-Synthese relevant. Sie werden im Folgenden detaillierter erläutert.

Phenylpropanoid- & Lignin-Synthese

Grundbausteine für die Lignin-Synthese sind die Alkohole verschiedener Zimtsäurederivate oder auch Phenylpropanoide. Zuerst werden ausgehend von *p*-Cumaroyl-CoA die aktivierten Säuren Kaffeesäure-CoA, Ferulasäure-CoA, 5-Hydroxyferulasäure-CoA und Sinapinsäure-CoA mit Hilfe verschiedener Hydroxylasen und Methyl-Transferasen synthetisiert. Anschließend werden die Säuren enzymatisch katalysiert durch Zimtsäure-CoA-Reduktase (CCR, englisch: *cinnamoyl-CoA reductase*) und Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) zu ihren jeweiligen Aldehyden und Alkoholen reduziert. Die Alkohol-Monomere werden später an den Zellwänden über Peroxidasen, Oxidasen und Laccasen oxidiert. Über radikalische Polymerisationsreaktionen bildet sich schließlich das dreidimensionale Lignin-Netzwerk aus (Boerjan *et al.*, 2003). Die Untersuchung der verschiedenen Gene der Lignin-Synthese zeigte, dass feste Erdbeerfrüchte ein höheres Expressionslevel an CAD aufweisen, während sich weiche Früchte durch ein höheres CCR-Niveau auszeichnen (Salentjin *et al.*, 2003).

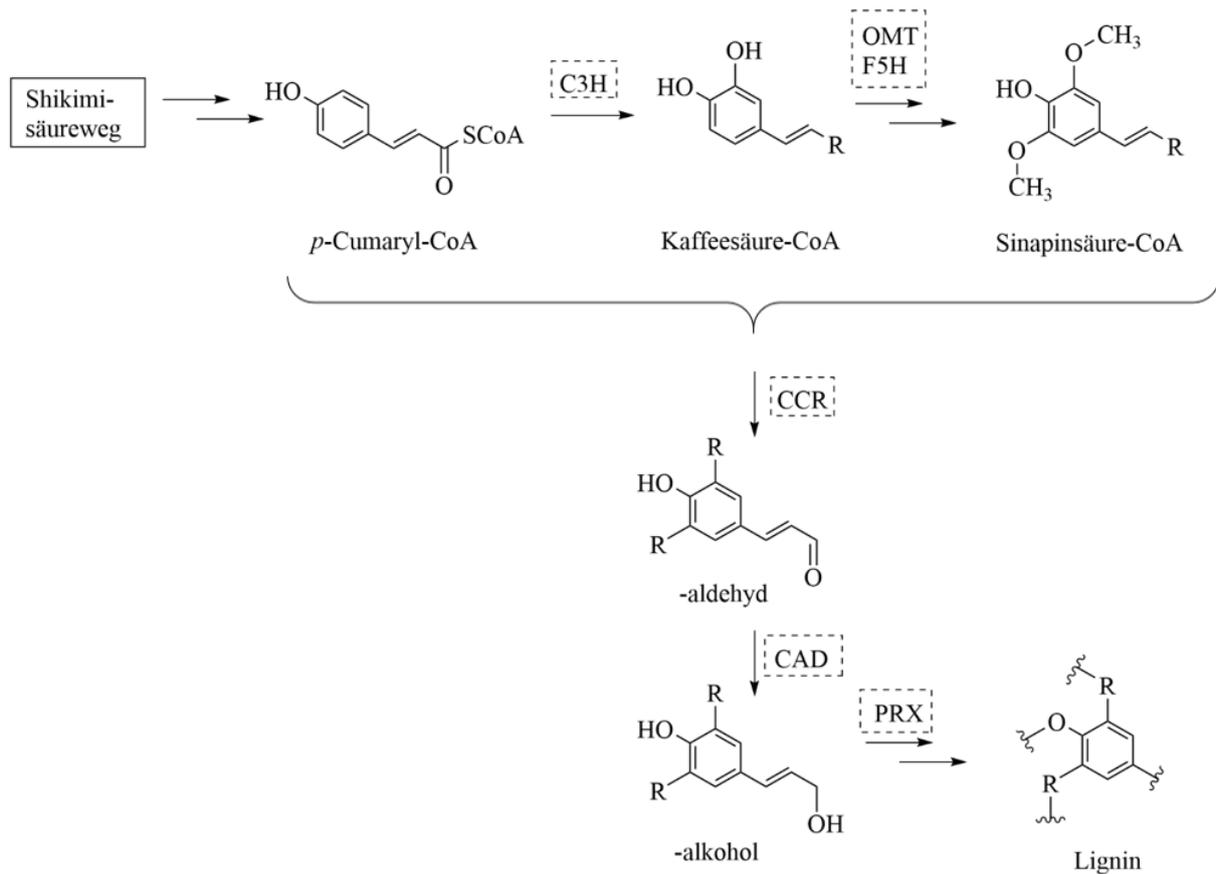


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese. Beteiligte Enzyme sind umrandet. C3H = *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, OMT = O-Methyl-Transferase, F5H = Ferulasäure-5-Hydroxylase, CCR = Zimtsäure-CoA-Reduktase, CAD = Zimtalkohol-Dehydrogenase, PRX = Peroxidase (nach Boerjan *et al.*, 2003).

Flavonoid-Synthese

Zu Beginn der Flavonoid-Synthese wird zunächst die Grundstruktur der Flavonoide (s. Abbildung 4) gebildet. Dazu wird enzymatisch katalysiert durch Chalcon-Synthase (CHS) das Grundgerüst der *p*-Cumarsäure über Addition von drei aktivierten Malonyl-CoA-Einheiten vergrößert und der A-Ring der Flavonoid-Struktur gebildet. Der Ringschluss zur Ausbildung des C-Rings wird durch das Enzym Chalcon-Isomerase (CHI) katalysiert. Ausgehend vom hierdurch synthetisierten Naringenin werden alle weiteren Flavonoide produziert (s. Abbildung 8). Durch Hydroxylierung am C3 des C-Rings wird zunächst Dihydrokaempferol gebildet, woraus durch Dehydrierung am C3 und C2 Kaempferol entsteht. Eine zusätzliche Hydroxylierung am C3' liefert Quercetin. Die Synthese der beiden Flavonole wird durch eine Flavanon- beziehungsweise Flavonoid-Hydroxylase (FHT bzw. FH) und das Enzym Flavonol-Synthase (FLS) katalysiert. Die Anthocyanidine Pelargonidin und Cyanidin entstehen durch Reduktion der Keto-Gruppe am C4 des C-Rings, was zunächst zur Bildung von Leucopelargonidin und Leucocyanidin führt. Durch anschließende Dehydratisierung, katalysiert durch Anthocyanidin-Synthase ANS bildet sich auch im C-Ring ein aromatisches System, welches sich nun über das gesamte Molekül erstreckt. Die Anthocyane erscheinen daher farbig.

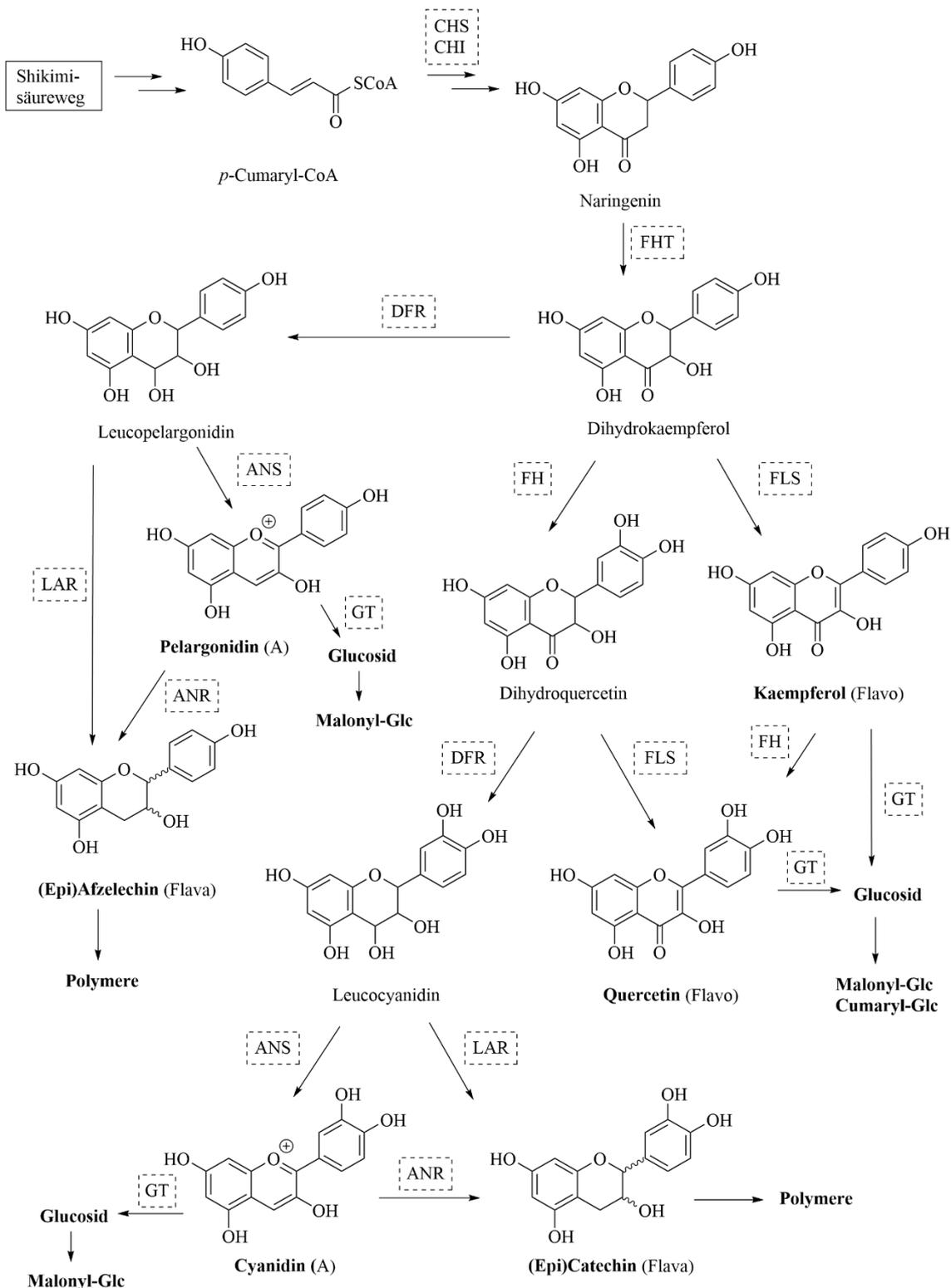


Abbildung 8: Übersicht über die Biosynthese der Flavonoide. Stabile Intermediate sind fett gedruckt, die jeweilige Unterklasse der Flavonoide ist in Klammern angegeben (A = Anthocyane, Flava = Flavanole, Flavo = Flavonole). Glc = Glucosid. Beteiligte Enzyme sind umrandet. CHS = Chalkon-Synthase, CHI = Chalkon-Isomerase, FHT = Flavanon-Hydroxylase, FH = Flavonoid-Hydroxylase, FLS = Flavonol-Synthase, DFR = Dihydroflavonol-Reduktase, ANS = Anthocyanidin-Synthase, LAR = Leucoanthocyanidin-Reduktase, ANR = Anthocyanidin-Reduktase, GT = Glucosyl-Transferase (nach Griesser *et al.*, 2008a; Grotewold, 2008; Härtl *et al.*, 2017).

Leucoanthocyanidin-Reduktasen (LAR) können jedoch auch die Dehydroxylierung der Leucoanthocyanidine am C4 des C-Rings katalysieren, was zur Bildung der Flavanole (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin führt. Alternativ können (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin auch durch Hydrierung der Anthocyane mit Hilfe der Anthocyanidin-Reduktase (ANR) synthetisiert werden. Durch Polymerisation der Flavanole entstehen die sogenannten Proanthocyanidine (Ververidis *et al.*, 2007; Carbone *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2011; Härtl *et al.*, 2017). Katalysiert durch verschiedene Transferasen, wie zum Beispiel Glucosyl-Transferasen, werden die so gebildeten Flavonoide in ihre konjugierte Form überführt, in welcher sie in den Pflanzen vorliegen (Griesser *et al.*, 2008a).

Wie eng die Phenylpropanoid- und Flavonoid-Synthese miteinander verknüpft sind, zeigen zum Beispiel Experimente mit herabregulierter Chalkon-Synthase. Auf der einen Seite wurden wie zu erwarten deutlich weniger Flavonoide gebildet, gleichzeitig konnte eine Verschiebung des Kohlenstoff-Flusses hin zu den Phenylpropanoiden und eine deutliche Erhöhung der Phenylpropanoid-Konzentration beobachtet werden (Hoffmann *et al.*, 2006). Auf umgekehrte Weise könnten auch Enzyme aus der Lignin-Biosynthese wie zum Beispiel Peroxidasen den Kohlenstoff-Fluss in Richtung der Phenylpropanoide lenken (Ring *et al.*, 2013). Auch innerhalb eines Synthesezweigs konkurrieren verschiedene Enzyme um dieselben Substrate. So resultierte die Herabregulierung der Glucosyl-Transferase FaGT1 zu einem in einer niedrigeren Konzentration an Pelargonidin-Glucosid und Pelargonidin-Malonyl-Glucosid in den Früchten. Gleichzeitig konnten erhöhte Konzentrationen der Flavanole nachgewiesen werden, welche ebenfalls aus den Anthocyanidinen oder deren Vorstufen gebildet werden können (Griesser *et al.*, 2008a).

Ellagsäure- & Ellagtannin-Synthese

Die Synthese der Ellagsäurederivate beginnt mit der Bildung des Gallussäure-Glucoseesters β -Glucogallin katalysiert durch die Glucosyl-Transferase FaGT2 (Schulenburg *et al.*, 2016). Anschließend werden katalysiert durch Acyl-Transferasen bis zu vier weitere Gallussäuremoleküle mit β -Glucogallin verestert, wobei β -Glucogallin auch als Donor fungiert. Aus der so entstandenen Pentagalloyl-Glucose werden durch Addition weiterer Gallussäuremoleküle an die Hydroxygruppen der bereits veresterten Gallussäurereste die sogenannten Gallotannine gebildet. Durch Oxidationsreaktionen können auch zwei Gallussäurereste der Pentagalloyl-Glucose unter Ausbildung von 3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphenyl (HHDP)-Gruppen vernetzt werden, wodurch die Ellagtannine entstehen. Durch Hydrolyse werden HHDP und das zugehörige Lakton, die Ellagsäure, aus den Ellagtanninen freigesetzt (Niemetz und Gross, 2005).

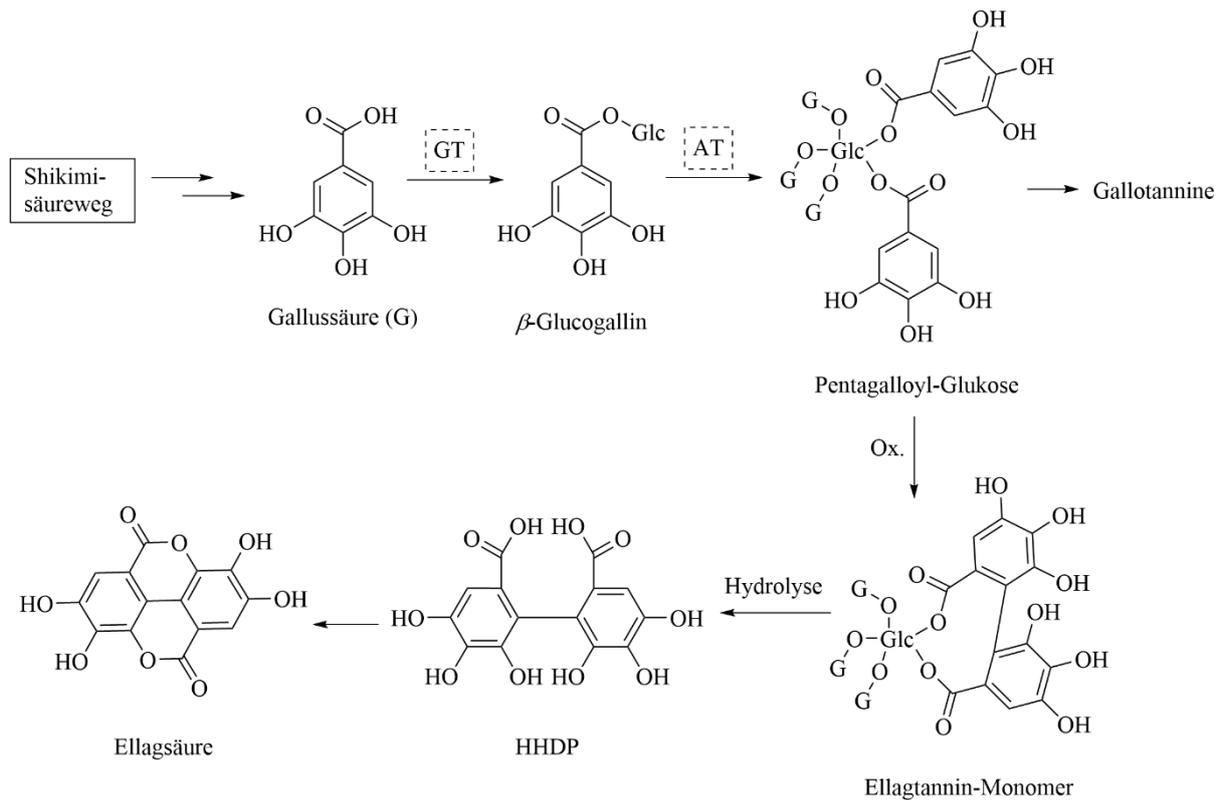


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Biosynthese verschiedener Ellagsäurederivate. Glc = Glucose, G = β -Glucogallin. Beteiligte Enzyme sind umrandet. GT = Glucosyl-Transferase, AT = Acyl-Transferase (nach Niemetz und Gross, 2005; Schulenburg *et al.*, 2016).

1.5.2.3 Funktion in der Pflanze

Polyphenole haben verschiedene Funktionen in der Pflanze. Anthocyane zum Beispiel färben die Blüten, wodurch Bestäuber angelockt werden sollen (Harborne und Williams, 2000; Ververidis *et al.*, 2007). Das größere Aufgabengebiet ist jedoch der Schutz der Pflanze vor schädlichen Umwelteinflüssen. Phenylpropanoide und Flavonoide absorbieren Energie im Bereich von 280–320 nm. Durch diese Eigenschaft bewahren sie Pflanzen vor DNA-Schädigungen durch energiereiche UV-Strahlung (Harborne und Williams, 2000; Brunetti *et al.*, 2013). Verschiedene Flavonoide weisen antimikrobielle Wirkungen auf. Vor allem Isoflavonoide, Flavane und Flavone verringerten den Pilzbefall in verschiedenen Pflanzenexperimenten (Harborne und Williams, 2000; Ververidis *et al.*, 2007). Catechine aus grünem Tee wurden antibakterielle Eigenschaften zugeschrieben (Ververidis *et al.*, 2007). Auch der Schutz vor Fraßfeinden durch verschiedene Flavonoide wurde beschrieben (Harborne und Williams, 2000). Außerdem können Flavonoide ähnlich wie beim Menschen auch in Pflanzen vor Oxidation schützen, indem sie als Radikalfänger fungieren. Insgesamt dienen verschiedenen Klassen der Polyphenole der Abwehr gegen verschiedene Arten von Schädigung. Welche Moleküle dabei genau gebildet werden, hängt wiederum stark von der jeweiligen Pflanzenart ab (Harborne und Williams, 2000; Ververidis *et al.*, 2007; Brunetti *et al.*, 2013). Neben schützenden

Funktionen fungieren Polyphenole in Pflanzen auch als Signalmoleküle. Sie können katabole Reaktionen zur Energiegewinnung regulieren und spielen eine wichtige Rolle beim interzellulären Transport des Pflanzenhormons Auxin, in dem sie die Aktivität einiger Proteinkinasen kontrollieren (Ververidis *et al.*, 2007; Brunetti *et al.*, 2013). Darüber hinaus können sie mit zellwachstumsregulierenden Proteinen interagieren (Brunetti *et al.*, 2013).

Auch in Erdbeerpflanzen konnten die verschiedenen schützenden Funktionen der Polyphenole vor zum Beispiel UV-Licht oder dem Befall von schädlichen Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die gebildeten Metaboliten sind dabei abhängig vom Entwicklungsstadium und Pflanzenorgan, aber auch von der UV-Strahlung und Krankheits- oder Schädlingsbefall (Hanhieva *et al.*, 2011; Besbes *et al.*, 2019b).

1.5.3 Sekundärmetaboliten – Aromastoffe

Der Konsum von Erdbeerfrüchten beruht nicht primär auf den wertgebenden ernährungsphysiologischen Inhaltsstoffen und positiven gesundheitlichen Aspekten. Viel ausschlaggebender ist der Geschmack. Dieser setzt sich aus dem Schmecken der Grundgeschmacksrichtungen, der Textur und dem Aroma zusammen (Schwab *et al.*, 2008). Verantwortlich für das wahrgenommene Aroma sind flüchtige organische Verbindungen (VOCs, englisch: *volatile organic compounds*). Bisher wurden knapp 1000 verschiedene flüchtige Substanzen in Erdbeeren nachgewiesen (Ulrich *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu den Polyphenolen sind sie, wie der Name bereits suggeriert, auf Grund ihres hohen Dampfdrucks leicht flüchtig. Auch sie fungieren als Sekundärmetaboliten in der Anziehung von Bestäubern, dem Schutz vor Krankheiten und Schädlingen und darüber hinaus der Kommunikation zwischen den Pflanzen (Haugeneder *et al.*, 2018).

1.5.3.1 Terpene

Terpene stellen die größte Klasse an Sekundärmetaboliten in Pflanzen dar. Als Grundbausteine dienen die beiden aktivierten C5-Körper Isopentenyl-Diphosphat und Dimethylallyl-Diphosphat, welche beide auf die Struktur des Isoprens zurückgeführt werden können. Sie werden in der Pflanze aus Pyruvat und Acetyl-CoA gebildet. Durch Kondensationsreaktionen der beiden aktivierten Grundbausteine entstehen die verschiedenen Terpene. Je nach Anzahl der Kohlenstoffatome spricht man von Monoterpenen (C₁₀), Sesquiterpenen (C₁₅), Diterpenen (C₂₀), Triterpenen (C₃₀), Tetraterpenen (C₄₀) oder Polyterpenen (>C₄₅) (Schwab *et al.*, 2008; Pott *et al.*, 2019).

Terpene können in flüchtige und nichtflüchtige Substanzen unterteilt werden. Wichtige Vertreter der nichtflüchtigen Terpene in Pflanzen sind die Carotinoide als Tetraterpene. Für die Geruchswahrnehmung sind jedoch die flüchtigen Terpene von Interesse. Hierbei handelt es sich um

kleinere Moleküle wie den Monoterpenen und Sesquiterpenen, welche durch verschiedene *Terpensynthasen* aus den Vorstufen (s. Abbildung 10) gebildet werden (Aharoni *et al.*, 2004; Pott *et al.*, 2019). In Erdbeerfrüchten finden sich vor allem Linalool als Monoterpen und Nerolidol als Sesquiterpen. In geringeren Mengen sind auch weitere Terpene wie Myrtenol, α -Pinen, oder α -Terpineol vorhanden. Die Zusammensetzung der gebildeten Terpene hängt vor allem von der Expression der einzelnen *Terpensynthasen* ab und variiert vor allem zwischen wilden *Fragaria*-Spezies und den Kulturerdbeeren (Aharoni *et al.*, 2004).

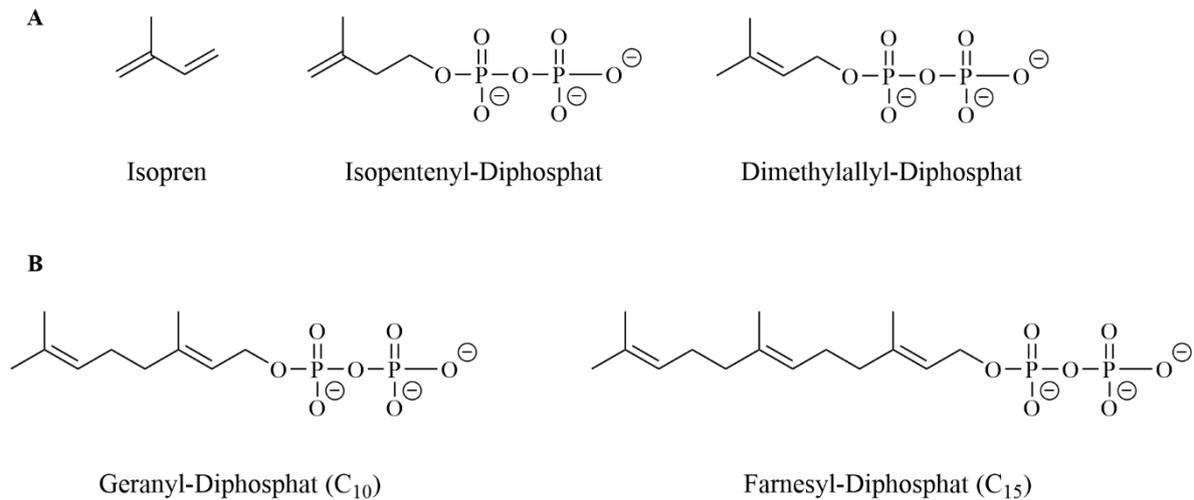


Abbildung 10: Vorstufen der Terpene. A: Isopren als Grundbaustein der Terpene. **B:** Geranyl-Diphosphat und Farnesyl-Diphosphat als Vorstufen der Monoterpene und Sesquiterpene.

1.5.3.2 Alkohole, Aldehyde und Ester

Kurzkettige Säuren, Aldehyde und Alkohole und Ester entstehen durch den Abbau von Produkten des Primärstoffwechsels. Vorstufen sind Fettsäuren und Aminosäuren, wobei unverzweigte Metabolite aus Fettsäuren gebildet werden, verzweigte und aromatische Verbindungen hingegen aus Aminosäuren. In beiden Fällen werden zunächst die jeweiligen Aldehyde synthetisiert, aus welchen wiederum die zugehörigen Alkohole gebildet werden können. Die Bildung der Alkohole wird durch verschiedene Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert. Bekannte Vertreter der VOCs sind (Z)-3-Hexenal, Hexenal und Hexanol, welchen eine „grün-grasige“ Note zugeschrieben wird und welche charakteristisch für viele Fruchtaromen sind (Schwab *et al.*, 2008; Pott *et al.*, 2019). Eine Vielzahl an Estern entsteht katalysiert durch Alkohol-Acyl-CoA-Transferasen. Als Substrat dienen Alkohole und durch Coenzym A aktivierte Säuren. Experimente mit FaAAT2, einer Alkohol-Acyl-Transferase aus Erdbeere, zeigten, dass die Bildung von Ethylbutanoat, Ethylhexanoat oder Methyl-2- und Methyl-3-methylbutanoat abhängig sind von der Expression der Alkohol-Acyl-CoA-Transferasen (Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

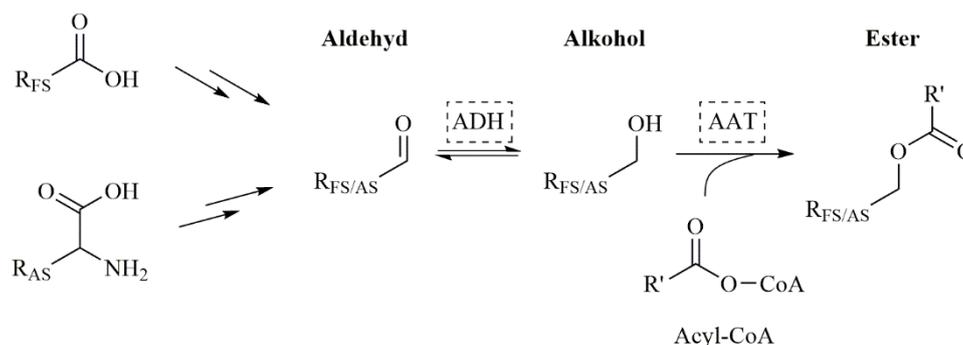


Abbildung 11: Vereinfachtes Syntheschema flüchtiger Aldehyde, Alkohole und Ester. FS = Fettsäure, AS = Aminosäure. Beteiligte Enzyme sind umrandet. ADH = Alkohol-Dehydrogenase, AAT = Alkohol-Acyl-CoA-Transferase (nach Schwab *et al.*, 2008).

Darüber hinaus sind cyclische Ester, die sogenannten Lactone, wichtige Aromastoffe in vielen Früchten. Sie bestehen meist aus acht bis zwölf Kohlenstoffatomen und entstehen aus Hydroxyfettsäuren. Je nach Position der Hydroxygruppe in der offenkettigen Fettsäure bilden sich Fünf- oder Sechsringe. Man unterscheidet zwischen γ -Lactonen (Fünfring) und δ -Lactonen (Sechsring) (Schwab *et al.*, 2008).

Ein Vergleich verschiedener Studien der flüchtigen Substanzen in Erdbeerfrüchten von Ulrich *et al.* (2018) zeigt, dass von den 30 meist identifizierten VOCs zwei Drittel auf Alkohole, Aldehyde, Säuren und Ester entfallen, wobei Ester mit 17 Komponenten mit Abstand die größte Gruppe darstellen. Die am häufigsten qualifizierten Ester sind Methyl- und Ethylhexanoat, Methyl- und Ethylbutanoat sowie Hexylacetat. Auch γ -Decalacton und γ -Dodecalacton sind in vielen Studien zu finden.

1.5.3.3 Weitere Aromastoffe

Eine weitere Gruppe der Aromastoffe sind die sogenannten Furanone und Pyrone. Die Besonderheit dieser Verbindungen ist, dass sie direkt aus den Kohlenhydrat-Vorstufen entstehen, ohne dass diese zunächst abgebaut werden. Eine Vorstufe des 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-Furanons, auch bekannt als Furaneol, ist D-Fructose-1,6-Diphosphat. Weitere Vertreter dieser Klasse sind Methoxyfuraneol, welches durch Methylierung aus Furaneol entsteht, Norfuraneol und Homofuraneol. Charakteristisch für *Fragaria* sind Furaneol und Methoxyfuraneol. (Schwab *et al.*, 2008; Pott *et al.*, 2019).

Auch aus den Phenylpropanoiden (s. 1.5.2.1) können geruchsaktive Verbindungen hervorgehen, die Phenylpropene. Zunächst werden Essigsäure-Ester der Phenylpropanoide gebildet. Durch enzymatisch katalysierte Reduktion der Ester entstehen die geruchsaktiven Phenylpropene, wie Eugenol oder Chavicol (Hoffmann *et al.*, 2011).

1.5.3.4 Das Erdbeeraroma

Unterschiedlichen Erdbeersorten werden unterschiedliche Aroma-Charakteristika zugeschrieben. Dazu gehören Attribute wie „süß“, „fruchtig“ oder „grün“, aber auch „Karamell“, „blumig“ oder „milch-artig“. Die unterschiedlichen Beschreibungen lassen sich durch die verschiedene Zusammensetzung der VOCs in den einzelnen Sorten erklären. Besonders stark unterscheiden sich dabei wilde und kultivierte Arten, was wiederum auf die Expression unterschiedlicher Gene zurückzuführen ist (Aharoni *et al.*, 2004; Ulrich *et al.*, 2007).

Um ausschlaggebend für das Erdbeeraroma zu sein, müssen die jeweiligen VOCs entweder in großen Mengen in den Früchten vorhanden sein oder einen niedrigen Geruchsschwellenwert aufweisen. Der Quotient aus Konzentration und Geruchsschwellenwert wird als Aromawert bezeichnet und ist ein Maß dafür, wie stark einzelnen Komponenten das Aroma beeinflussen. Bereits Ende der 90er Jahre konnten Ulrich *et al.* (1997) und Schieberle und Hofmann (1997) über den Aromawert die Anzahl der wichtigen Aromastoffe bei über 300 identifizierten VOCs in *Fragaria* auf jeweils zwölf Substanzen eingrenzen. Dazu gehören vorwiegend niedermolekulare Ester, (Z)-3-Hexenal, Furaneol und Methoxyfuraneol. Je nach untersuchter Sorte können auch Linalool, γ -Decalacton oder Methylanthranilat entscheidend sein. Schieberle und Hofmann (1997) zeigten außerdem, dass die Kombination der zwölf ausgewählten VOCs in gleicher Konzentration wie in der Erdbeerprobe ausreichend ist um ein Aroma-Rekombinat herzustellen, welches ein nahezu identisches Aromaprofil wie die Erdbeerfrucht aufweist. Durch Ausschließen einzelner Komponenten aus dem Rekombinat konnten sie außerdem Furaneol und (Z)-3-Hexenal als Schlüsselaromastoffe identifizieren (Schieberle und Hofmann, 1997).

1.6 Zusammenspiel von Umwelt und Genotyp

Die genaue Zusammensetzung des Metabolitenprofils in *Fragaria*-Pflanzen und Früchten hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine große Rolle spielt hierbei der genetische Hintergrund. So zeigen zahlreiche Studien unterschiedliche Gehalte verschiedener Unterklassen der Polyphenole oder einzelner Metaboliten in Abhängigkeit vom Genotyp. Dabei handelt es sich sowohl um rein quantitative Unterschiede, als auch um Differenzen in der qualitativen Zusammensetzung. Vertreter der Phenylpropanoide, sowie der Anthocyane und Flavonole unterscheiden sich dabei am deutlichsten. Von den Phenylpropanoiden weist Zimtsäure-Glucose-Ester die größten Differenzen auf. Wesentlich stabiler sind die Gehalte an Flavanolen und Ellagttanninen (Muñoz *et al.*, 2011; Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013; Palmieri *et al.*, 2017). Auch der Gesamtgehalt an Polyphenolen variiert geringer zwischen den einzelnen Sorten (Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013). Weniger die Art wie *F. vesca*, *F. moschata* oder *F. × ananassa*, als vielmehr die Sorte wie „Camarosa“ oder „Parker“ scheint ausschlaggebend für die unterschiedliche Zusammensetzung der Polyphenole zu sein (Muñoz *et al.*, 2011; Aaby *et al.*, 2012;

Ring *et al.*, 2013; Palmieri *et al.*, 2017). Neben den Polyphenolen variieren auch die Aromastoffe als Sekundärmetabolite in verschiedenen Sorten. Eine sehr charakteristische Verbindung ist dabei Methylantranilat, welches für das typische Aroma der Walderdbeere *F. vesca*, aber auch der oktaploiden Sorte „Mieze Schindler“ verantwortlich ist. Verschiedene Kultivare unterscheiden sich darüber hinaus in der Konzentration anderer flüchtiger Substanzen, wie kurzkettigen Estern, Alkoholen oder Aldehyden, sowie Terpenen (Ulrich *et al.*, 1997; Ulrich *et al.*, 2007).

Ebenfalls durch die Genetik beeinflusst sind unterschiedliche Metabolitenlevel zu verschiedenen Reifezeitpunkten. Hier lassen sich für Polyphenole unabhängig vom Genotyp zwei Trends erkennen: Die Konzentrationen an Anthocyanen und Phenylpropanoiden in Erdbeerfrüchten steigen mit zunehmender Reife, während Flavonole und Ellagsäurederivate abnehmen. Die sich ändernden Metaboliten-Konzentrationen korrelieren mit den Expressionsniveaus der entsprechenden Gene während der Fruchtreife. Mit zunehmender Reife stärker exprimiert werden unter anderem FaGT1, ANS, CHI, CHS und FHT, wobei mit CHS, CHI und FHT zwei Gene betroffen sind, die bereits zu Beginn der Polyphenolbiosynthese involviert sind (Kosar *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2011; Hanhieva *et al.*, 2011). Auch für die Aromastoff-Biosynthesegene konnte in den fortgeschrittenen Reifestadien eine höhere Genexpression nachgewiesen werden (Härtl *et al.*, 2017).

Mit der Umwelt beeinflusst ein weiterer Faktor zusätzlich zum genetischen Hintergrund maßgeblich die Komposition der Inhaltsstoffe. Bei den Polyphenolen variieren standortbedingt vor allem die Gruppen der Flavonole, Flavonole und Phenylpropanoide. Die Anthocyane hingegen werden als weitestgehend stabil gegenüber Umwelteinflüssen beschrieben (Carbone *et al.*, 2009; Palmieri *et al.*, 2017). Eine mögliche Ursache für unterschiedliche Polyphenolprofile an verschiedenen Standorten liegt in der schützenden Funktion der Polyphenole für die Pflanze. So kann stärkere UV-Strahlung oder eine erhöhte Pathogenbelastung die vermehrte Produktion von Sekundärmetaboliten wie Terpenen oder Flavonoiden anregen (Hanhieva *et al.*, 2011; Besbes *et al.*, 2019b).

Auch der Gehalt an Fra-Protein schwankt sortenabhängig. Allerdings ist die Variation des Allergengehalts wesentlich geringer als die der Sekundärmetabolite. Im Gegensatz zu den Polyphenolen und den Aromastoffen hat zudem die Sorte eine geringere Auswirkung als die Art (Tulipani *et al.*, 2011; Kurze *et al.*, 2018a). Zwischen verschiedenen Reifestadien variiert der Allergengehalt in Erdbeerfrüchten ebenfalls, allerdings erneut deutlich weniger stark als die Sekundärmetabolite. Je nach Genotyp kann der Gehalt an Fra a 1 während der Reife leicht ansteigen oder leicht absinken (Tulipani *et al.*, 2011). Zusätzlich wird der Fra a 1-Gehalt durch klimatische Einflüsse gesteuert. In zwei aufeinander folgenden Jahren wurden unterschiedliche Fra a 1-Gehalte in reifen Erdbeerfrüchten derselben Sorte nachgewiesen. Allerdings sind die Schwankungen der Protein-Konzentrationen durch äußere Einflüsse erneut deutlich weniger ausgeprägt als die der Polyphenole oder VOCs (Tulipani *et al.*, 2011; Kurze *et al.*, 2018a).

Betrachtet man die Kombination aus Genotyp (G) und Umwelteinflüssen (E, englisch: *environment*) auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe reifer Erdbeerfrüchte, so fällt sowohl für Sekundärmetaboliten als auch für Fra a 1 auf, dass unterschiedliche Genotypen unterschiedlich stark durch verschiedene Standorte oder Anbaujahre beeinflusst werden. Während manche Genotypen auch in unterschiedlichen Anbauregionen oder –jahren noch sehr ähnliche Metabolitenprofile aufweisen, finden sich in anderen Genotypen ein Vielfaches der Konzentration in Abhängigkeit der äußerlichen Faktoren wie Sonnenstunden, Niederschlag oder Temperatur (Carbone *et al.*, 2009; Tulipani *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 2017). Für die qualitative und quantitative Komposition einer Erdbeere sind also nicht alleine G oder E verantwortlich, sondern vielmehr das Zusammenspiel von beiden, $G \times E$.

1.7 Ziel der Arbeit

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Frage, in welchem Maße sich der genetische Hintergrund verschiedener Genotypen und die Umwelteinflüsse verschiedener Anbauorte auf das Polyphenolprofil von *Fragaria × ananassa* Früchten auswirken. Es wurde untersucht, in wie fern die beiden Faktoren G und E miteinander wechselwirken und ob einer der beiden Faktoren einen stärkeren Einfluss auf einzelne Metabolite oder Metabolitklassen hat. Hierfür wurden die Früchte einer Kreuzungspopulation aus den etablierten Kultivaren „Candongga“ und „Senga Sengana“ mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie untersucht. Bei „Candongga“ handelt es sich um eine Sorte, die sehr gut an warme, trockene Klimabedingungen angepasst ist, während „Senga Sengana“ auf dem nordeuropäischen Markt angesiedelt ist. Die gesamte Kreuzungspopulation wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren an fünf verschiedenen Standorten in verschiedenen Klimazonen in Europa von Südspanien bis Polen angebaut. Unter denselben Gesichtspunkten wurden die Früchte dieser Population mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*) auf ihren Fra a 1-Allergengehalt untersucht.

Des Weiteren wurde die Funktion der Alkohol-Dehydrogenase CAD in *F. × ananassa* Pflanzen und Früchten analysiert. Charakterisiert wurden transgene Erdbeerpflanzen der Sorte „Mieze Schindler“, in welchen die CAD konstitutiv unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S Promotors exprimiert wurde. Dafür wurde das Polyphenolprofil verschiedener Pflanzenorgane wie Blätter, Wurzeln und Blüten, sowie die Früchte in verschiedenen Reifestadien untersucht. Ergänzend wurden das Aromaprofil reifer Früchte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie und die Textur bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Kreuzungspopulation des GoodBerry-Projektes

Im Zuge des GoodBerry-Projektes wurde mit einer F1-Kreuzungspopulation aus den bereits etablierten Erdbeersorten „Candongä“ und „Senga Sengana“ gearbeitet. Die Pflanzen wurden an fünf Standorten in Europa nach den jeweils vorherrschenden Kultivierungsmethoden angebaut (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Anbauregionen und Kultivierungsmethoden des GoodBerry-Projektes.

Land	Geographische Koordinaten	Standort	Kultivierung
Frankreich	(44°85'N)	Ciref	Gewächshaus, erdelose Kultur
Deutschland	(51°8'42''N)	Hansabred	freies Feld, im Boden
Spanien	(37°12'22''N)	IFAPA	Tunnel, im Boden
Polen	(51°95'N)	INHORT	freies Feld, im Boden
Italien	(43°31'N, 13°36'E)	UPM	freies Feld, im Boden

In den Jahren 2017 und 2018 wurden die reifen Früchte geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach Abschluss der Ernte in drei biologische Replikate unterteilt. Die biologischen Replikate eines Genotyps wurden jeweils getrennt unter permanenter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und anschließend bis zur Extraktion bei -80 °C gelagert. Die genauen Probenzahlen pro Jahr sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Probenanzahl im GoodBerry-Projekt 2017 und 2018.

Land	Standort	Proben 2017	Proben 2018
Frankreich	Ciref	19 Genotypen	50 Genotypen
Deutschland	Hansabred	19 Genotypen	61 Genotypen
Spanien	IFAPA	18 Genotypen	61 Genotypen
Polen	INHORT	14 Genotypen	57 Genotypen
Italien	UPM	17 Genotypen	57 Genotypen
an allen Standorten vorhanden		12 Genotypen	47 Genotypen

Transgene CAD-Erdbeerpflanzen

Von der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe wurden drei transgene Linien (F62, F63 und F64) sowie eine Kontroll-Linie der Sorte „Mieze Schindler“ zur Verfügung gestellt. In den drei transgenen Linien wurde im Vorfeld jeweils in unabhängigen Transformations-Ereignissen das Zimtalkohol-Dehydrogenase-Gen überexprimiert (vergleichbar mit Lunkenbein *et al.*, 2006b). Die Linien umfassten jeweils 15 bzw. 16 Individuen und wurden im Gewächshaus in Töpfen über einen Zeitraum von zwei Jahren kultiviert. Für die Analyse der Polyphenole wurden im Jahr 2018 von allen Pflanzen Fruchtproben in fünf verschiedenen Entwicklungsstadien (grün, klein weiß, groß weiß, teilweiße rot und rot), sowie Blatt- und Wurzelproben (jeweils Mischproben aus jungen und alten Blättern bzw. Wurzeln) genommen. Alle Proben wurden zunächst intakt in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach Abschluss der Ernte in drei biologische Replikate unterteilt. Die biologischen Replikate wurden jeweils einzeln unter permanenter Kühlung zu feinem Pulver gemörsert und anschließend bis zur Extraktion bei -80 °C gelagert. Für die Analyse der flüchtigen organischen Verbindungen wurden im Jahr 2019 rote Früchte der Linie F64 und der Kontrolllinie geerntet. Die Proben wurden intakt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Am Tag der Extraktion wurden jeweils 2 - 3 Früchte (ca. 4 g) unter permanenter Kühlung zu feinem Pulver gemörsert. Pro Linie wurden drei Replikate aufgearbeitet. Für die Festigkeitsbestimmung mittels *Texture Analyzer* wurden im Jahr 2018 frische, rote Früchte jeder Linie direkt nach der Ernte analysiert. Die Probenanzahl für die Texturanalyse ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Anzahl analysierter Fruchthälften zur Bestimmung der Festigkeit.

Linie	CAD Kontrolle	F62	F63	F64
Anzahl Fruchthälften	63	68	71	69

Probenmaterial für die Kontrollstandards

Für die Analyse der Polyphenole und des Fra a 1-Gehaltes wurden zwei Erdbeerkontrollstandards (EKS) verwendet. Hierfür wurden jeweils frische, kommerziell erhältliche Erdbeerfrüchte in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter permanenter Kühlung zu feinem Pulver gemörsert. Das Pulver beider Standards wurde bis zur Extraktion bei -80 °C gelagert. Die Sorte der Erdbeeren war für keinen der beiden Standards bekannt.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
(Dinatrium-)5-Brom-4-chlor-3-oxindolylphosphat (BCIP)	$C_8H_8BrClNO_4P$	Carl Roth
(E)-2-Hexenal	$C_6H_{10}O$	Sigma-Aldrich
(E)-2-Hexenyl-Acetat	$C_8H_{14}O_2$	Sigma-Aldrich
2 × Laemmli Puffer		Bio-Rad
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (DMHF) Furaneol®	$C_6H_8O_3$	Fluka
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF), Mesifuran	$C_7H_{10}O_3$	Sigma-Aldrich
2-Methylethyl-Butanoat	$C_7H_{14}O_2$	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1), 30 %	$C_3H_5NO/C_7H_{10}N_2O_2$	Carl Roth
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat	$Al_2(SO_4)_3 \times 16 H_2O$	Carl Roth
Ameisensäure (HCOOH)	CH_2O_2	Carl Roth
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	$C_{16}H_{19}N_3NaO_4S$	Carl Roth
Benzaldehyd	C_7H_6O	Sigma-Aldrich
Benzoessäure	$C_7H_6O_2$	Sigma-Aldrich
Benzylacetat	$C_8H_{10}O_2$	Fluka
Biochanin A	$C_{16}H_{12}O_5$	Sigma-Aldrich
Borsäure	H_3BO_3	Carl Roth
Brillant Blau G 250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Sigma Aldrich
Butansäure	$C_4H_8O_2$	Carl Roth
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	Carl Roth
Cobaltchlorid Hexahydrat	$CoCl_2 \times 6 H_2O$	Fluka
Cystein (rein)	$C_3H_7NO_2S$	Acros Organics
Diethylether	$(C_2H_5)_2O$	Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Carl Roth
Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Carl Roth
Dinatriumhydrogencarbonat	Na_2CO_3	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Carl Roth
Eisenchlorid Hexahydrat	$FeCl_3 \times 6 H_2O$	Fluka

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Essigsäure, 100 %	$C_2H_4O_2$	Carl Roth
Ethanol (EtOH)	C_2H_6O	VWR
Ethyl-Butanoat	$C_6H_{12}O_2$	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2 H_2O$	Carl Roth
Ferulasäure	$C_{10}H_{10}O_4$	Fluka
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Carl Roth
Harnstoff	CH_4N_2O	Carl Roth
Hefeextrakt		Carl Roth
Hexanal	$C_6H_{12}O$	Fluka
Hexansäure	$C_6H_{12}O_2$	Fluka
Hexyl-Acetat	$C_8H_{16}O_2$	Fluka
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Carl Roth
Isopropanol	C_3H_8O	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	Carl Roth
Kaffeesäure	C_9H_8O	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth
Kupferchlorid Dihydrat	$CuCl_2 \times 2 H_2O$	Fluka
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Carl Roth
Manganchlorid Tetrahydrat	$MnCl_2 \times 4 H_2O$	Carl Roth
<i>m</i> -Cumarsäure	$C_9H_8O_3$	Sigma-Aldrich
Menthol	$C_{10}H_{20}O$	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH) „Baker HPLC Analyzed“	CH_4O	J.T. Baker
Methanol, „HiPerSolv CHROMANORM für die LC-MS“	CH_4O	Sigma-Aldrich
Milchpulver		Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Carl Roth
Natriumchlorid	$NaCl$	Carl Roth
Natriumdiethyldithiocarbamat Trihydrat (DiECA)	$C_5H_{10}NS_2Na \times 3H_2O$	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	Merck
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Fluka
Natriumhydroxid	$NaOH$	Sigma Aldrich
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$	Carl Roth
Nonanal	$C_9H_{18}O$	Fluka
Nonanol	$C_9H_{20}O$	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Nonansäure	C ₉ H ₁₈ O ₂	Sigma-Aldrich
<i>o</i> -Cumarsäure	C ₉ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich
<i>o</i> -Phosphorsäure, 85 %	H ₃ PO ₄	Carl Roth
<i>p</i> -Cumarsäure	C ₉ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich
Phenylmethansulfonylflourid (PMSF)	C ₇ H ₇ FO ₂ S	Sigma-Aldrich
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) „Polyclar V“	(C ₆ H ₉ NO) _n	Erbslöh
Profinity™ IMAC Ni-charged Resin		BioRad
Protease-Inhibitor Tabletten (<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>)		Roche
Protein-Marker 10 – 180 kDa (<i>PageRuler</i>)		Thermo Fisher Scientific
Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbin, BSA)		Sigma-Aldrich
Roti®-Nanoquant-Lösung		Carl Roth
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Südzucker AG
Schwefelsäure, 96 %	H ₂ SO ₄	Merck
Sinapinsäure	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Fluka
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Carl Roth
Stickstoff, flüssig	N ₂	Linde
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth
Trypton		Carl Roth
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Carl Roth
Zimtsäure	C ₉ H ₈ O ₂	Fluka
Zinkchlorid	ZnCl ₂	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	Carl Roth

2.1.3 Puffer und Lösungen

Kulturmedien

Voll-Medium	10 g/L Trypton
(LB-Medium, englisch: <i>lysogeny broth</i>)	10 g/L NaCl
	5 g/L Hefeextrakt

M9-Salzlösung	600 mM Na ₂ HPO ₄ 220 mM KH ₂ PO ₄ 187 mM NH ₄ Cl 85 mM NaCl
M9-100 × Spurenelementlösung	13,4 mM EDTA 3,1 mM FeCl ₃ × 6 H ₂ O 0,62 mM ZnCl ₂ 162 μM H ₃ BO ₃ 76 μM CuCl ₂ × 2 H ₂ O 42 μM CoCl ₂ × 6 H ₂ O 8,1 μM MnCl ₂
M9-Medium	10 % v/v M9-Salzlösung 4 % v/v Saccharoselösung (25 % v/v) 1 % v/v M9-100 x Spurenelementlösung 0,2 % v/v MgSO ₄ (1M) 0,01 % v/v CaCl ₂ (1M)

Proteinextraktion und -aufreinigung nach Expression in Escherichia coli (E. coli)

Rückfaltungspuffer pH = 7,5 (HCl)	500 mM NaCl 30 mM TRIS 15 mM Imidazol
--------------------------------------	---

Denaturierungspuffer	8 M Urea 500 mM NaCl 30 mM TRIS 15 mM Imidazol
----------------------	---

Elutionspuffer pH = 7,5 (HCl)	300 mM NaCl 250 mM Imidazol 30 mM TRIS
----------------------------------	--

Carbonatpuffer pH = 9	Lösung 1: 10 mM NaHCO ₃ Lösung 2: 10 mM Na ₂ CO ₃ → Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH = 9 einstellen
10 × Oberpuffer (Gelelektrophorese)	1,92 M Glycin 25 mM TRIS 34,7 mM SDS
Oberpuffer (Gelelektrophorese)	10 x Oberpuffer 1:10 mit H ₂ O MQ verdünnen
kolloidale Coomassie Färbelösung	20 % v/v EtOH 5 % w/v Al ₂ (SO ₄) ₃ 2 % v/v H ₃ PO ₄ 0,1 % v/v Brillant Blau G 250
Entfärbelösung	10 % v/v EtOH 7 % v/v Essigsäure
Transferpuffer (Western Blot)	200 mM Glycin 25 mM TRIS 20 % v/v MeOH
Blockierpuffer (Western Blot)	3 % w/v Milchpulver und Waschpuffer
Waschpuffer (Western Blot)	140 mM NaCl 20 mM TRIS 0,1 % v/v Tween 20
Farbreagenzien Western Blot	61 mM NBT in 70 % DMF 135 mM BCIP in H ₂ O MQ

Proteinextraktion aus Erdbeerfrüchten und Detektion mittels ELISA

Extraktionspuffer (10 × Björkstén Puffer)	200 mM KH_2PO_4 200 mM K_2HPO_4 100 mM DiECA 20 mM EDTA 5 % w/v PVPP 0,5 % v/v Tween 20 <i>vor Verwenden:</i> 0,5 mM PMSF 1 Protease-Inhibitor-Tablette pro 25 mL
10 × Dialysepuffer pH = 7,4 (NaOH)	1,5 M NaCl 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
Dialysepuffer	10 x Dialysepuffer 1:10 mit H_2O MQ verdünnen
PBS-Puffer pH = 7,4	Lösung 1: 150 mM NaCl 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ Lösung 2: 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ → Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH = 7,4 einstellen
PBST-Puffer	0,05 % v/v Tween 20 in PBS-Puffer
Blockierlösung	1 % w/v Milchpulver in PBS-Puffer bzw. 2 % w/v Milchpulver in PBS-Puffer

2.1.4 Gentechnisch veränderte Organismen (GVOs)

Alle GVOs waren bereits in der internen Stammsammlung als Kryokulturen vorhanden und wurden ohne weitere Veränderung verwendet.

Tabelle 6: Verwendete GVOs.

Bakterienstamm	Vektor	Zielprotein	Charakteristika	Ursprung
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	pQE70	Fra a 1.02	Hauptallergen der Erdbeere	<i>Fragaria</i>
<i>E. coli</i> Waksman	-	-	<i>E. coli</i> Waksman Wildtyp	-
<i>E. coli</i> Waksman	pGEX4T1	UGT84A43	katalysiert Esterbindung	<i>Rubus ideaus</i>
<i>E. coli</i> Waksman	pGEX4T1	UGT72B27	katalysiert Glucosidbindung	<i>Vitis vinifera</i>
<i>E. coli</i> Waksman	pGEX4T1	UGT73A15	katalysiert Glucosidbindung	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>E. coli</i> Waksman	pGEX4T1	UGT84A49	katalysiert Esterbindung	<i>F. × ananassa</i>
<i>E. coli</i> Waksman	pGEX4T1	UGT84A41	katalysiert Esterbindung	<i>F. × ananassa</i>

2.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Charakteristika	Konzentration	Hersteller
KUR-Fra (IgE)	spezifischer Antikörper aus Kaninchen, polyklonal	0,9 mg/mL	Davids Biotechnologie
Anti-Kaninchen-HRP (IgG)	Sekundär Antikörper, polyklonal	1,00 mg/mL	Carl Roth
Anti-Kaninchen-AP (IgG)	Sekundär Antikörper, polyklonal	1,00 mg/mL	Carl Roth

2.1.6 SDS-Gele

Sammelgel (7 %)	3,7 mL H ₂ O MQ
(Menge für 2 Gele)	1,4 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)
	750 µL TRIS (1M; pH = 6,8)
	60 µL SDS (10 % w/v)
	60 µL APS (10 % w/v)
	10 µL TEMED
Trenngel (16 %)	8 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)
(Menge für 2 Gele)	2,9 mL H ₂ O MQ
	1,9 mL TRIS (1,5 M; pH = 8,8)
	75 µL SDS (10 % w/v)
	75 µL APS (10 % w/v)
	3 µL TEMED

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und zugehörige Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
25 mL <i>Deep Well</i>	„hitplate 25“	HJ-Bioanalytik
Mikrotiterplatten		
Dialyseschlauch	ZelluTrans, MWCO 3500	Carl Roth
Filterpapier Western Blot	Rotilabo® Blottingpapiere, Dicke: 0,35 mm	Carl Roth
LVis Platte	1200-680-102	BMG Labtech
Membran Western Blot	Roti® PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran, Porengröße: 0,45 µg	Carl Roth
Mikrotiterplatte Bradford	96-Well Platte Microtiter™, flacher Boden	Thermo Fisher
Mikrotiterplatte ELISA	96-Well Platte immunoGrade™, flacher Boden	Brand
Zubehör	Telos Filtration Column (15 mL)	Kinesis
Affinitätschromatographie	Telos Column Caps (15 mL) Telos Luer Cap	

2.1.8 Geräte

2.1.8.1 Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MSⁿ, LC-MS)

System I:

System I wurde für die Analyse aller Proben des GoodBerry-Projektes verwendet.

HPLC-System	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies
Entgaser	Vakuum Degasser G1379A, Agilent Technologies
Pumpe	Quarternäre Pumpe G1311A, Agilent Technologies
Injektor	Autosampler G1313A, Agilent Technologies
Injektionsvolumen	5 µL
Trennsäule	Luna 3u C18(2)Å, 150 × 2 mm, Phenomenex
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 × 2 mm
Säulenofen	Säulenofen G1316A, Agilent Technologies
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: H ₂ O (MQ) + 0,1 % v/v HCOOH B: MeOH + 0,1 % v/v HCOOH
Flussrate	0,2 mL/Min.
Gradient	0 – 50 % B in 30 Min. 50 – 100 % B in 5 Min. 100 % B für 15 Min. 100 – 0 % B in 5 Min. 0 % B für 10 Min.
DAD	Dioden Array Detector G1315B, Agilent Technologies $\lambda = 210, 280, 360, 520, 570$ nm kontinuierliche Spektrenaufnahme $\lambda = 190 – 600$ nm
MS	Bruker Daltonics <i>esquire 3000^{plus}</i> , Ionenfalle, Bruker Daltonics
<i>Spraygas</i>	Stickstoff, 30,00 psi
Trockengas	Stickstoff, 9 L/Min., 330 °C
Auflösung	13 000 <i>m/z</i> /s Einheitsauflösung
Scanbereich	<i>m/z</i> = 50 – 975
Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	30 000 (positiv), 10 000 (negativ)
Max. Akkumulationszeit	200 ms
<i>Active Exclusion</i>	aus
Mittelung	5 Spektren

Zielmasse (SPS)	400 m/z (smart)
Kapillarspannung	± 4000 V
Endplattenspannung	± 3500 V (= Kapillarspannung -500 V)
MS/MS	Auto-tandem MS ² -Einstellungen
Kollisionsgas	Helium 5.0, $4,21 \times 10^6$ bar
Kollisionsspannung	1,0 V

Mit der Zielmasse (SPS) $m/z = 400$ im „smart“-Modus ergeben sich automatisch weitere Einstellungen für die Ionenfalle:

Skimmer	± 40 V
Kapillarenausgang	± 121 V
Oct 1 DC	$\pm 12,0$ V
Oct 2 DC	$\pm 1,7$ V
Octopol RF Amplitude	150,0 Vpp
Lens 1	$\mp 5,0$ V
Lens 2	∓ 60 V

System II:

System II wurde für die Analyse aller Proben der CAD-Pflanzen verwendet.

HPLC-System	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies
Entgaser	Vakuum Degasser G1379A, Agilent Technologies
Pumpe	2 \times Kapillarpumpe G1376A, Agilent Technologies
Injektor	Autosampler G1313A, Agilent Technologies
Injektionsvolumen	5 μ L
Trennsäule	Luna 3u C18(2) \AA , 150×2 mm, Phenomenex
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4×2 mm
Säulenofen	Säulenofen G1316A, Agilent Technologies
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: H ₂ O (MQ) + 0,1 % v/v HCOOH B: MeOH + 0,1 % v/v HCOOH
Flussrate	0,2 mL/Min.

Gradient	0 – 50 % B in 30 Min. 50 – 100 % B in 5 Min. 100 % B für 15 Min. 100 – 0 % B in 5 Min. 0 % B für 10 Min.
VWD	Variable Wavelength Detector G1314A, Agilent Technologies $\lambda = 280 \text{ nm}$
MS	Agilent 6340 Ion Trap LC-MS, Ionenfalle, Agilent Technologies
<i>Spraygas</i>	Stickstoff, 30,00 psi
Trockengas	Stickstoff, 9 L/Min., 330 °C
Auflösung	26 000 $m/z/s$ Einheitsauflösung
Scanbereich	$m/z = 50 - 1000$
Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	100 000(positiv), 70 000 (negativ)
Max. Akkumulationszeit	200 ms
<i>Active Exclusion</i>	an, nach 2 Spektren
Mittelung	2 Spektren
Zielmasse (SPS)	400 m/z (smart)
Kapillarspannung	$\pm 4000 \text{ V}$
Endplattenspannung	$\pm 3500 \text{ V}$ (= Kapillarspannung -500 V)
MS/MS	Auto-tandem MS ² -Einstellungen
Kollisionsgas	Helium 5.0, $4,21 \times 10^6 \text{ bar}$
Kollisionsspannung	1,0 V

Mit der Zielmasse (SPS) $m/z = 400$ im „smart“-Modus ergeben sich automatisch weitere Einstellungen für die Ionenfalle:

Skimmer	$\pm 40 \text{ V}$
Kapillarenausgang	$\pm 121 \text{ V}$
Oct 1 DC	$\pm 8,0 \text{ V}$
Oct 2 DC	$\pm 1,7 \text{ V}$
Octopol RF Amplitude	171,0 V _{pp}
Lens 1	$\mp 5,0 \text{ V}$
Lens 2	$\mp 60 \text{ V}$

2.1.8.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) für Aromastoffe

GC-System	Agilent 7890 Gas Chromatograph
Trennsäule	VF-5MS, 30 m, 25 mm, 0.25 µm, Agilent
Vorsäule	3 m, 25 mm, 0.25 µm, Agilent
Autosampler	Gerstel MultiPurpose Sampler, MPS 2XL
CIS Injektor	Start: 60 °C für 1 Min, danach 10 °C/Min. auf 240 °C, 240 C für 1 Min.
Injektion	V = 1 µL, v = 50 µL/s
Nadelspülung	2× mit MeOH (v = 5 µL/s aufziehen; 50 µL/s injizieren) 1× mit Probe (1 µL)
	Injektion 2× mit MeOH (v = 5 µL/s aufziehen; 50 µL/s injizieren)
Ofen Anpassungszeit	1 s
Ofen Temperatur	Start: 50 °C für 2 Min., danach 10 °C/Min auf 325 °C, 325 °C für 3 Min.
Trägergas	Helium, 1,2 mL/Min.
Einlass	programmierbare Temperatur-Verdampfung (PTV), 200 °C
Einlassmodus	<i>splitless</i>
Flussrate Einlass	1,2 mL/Min.
Septumspülung	3 mL/Min.
Spülzeit Einlass	90 s
Spülfluss Einlass	20 mL/Min.
Allgemeine Flussrate	21,2 mL/Min.
Transferleitung	300 °C
MS	<i>Time of flight</i> (TOF), Pegasus® 4D GC×GC TOF MS, Leco
Aufzeichnungsverzögerung	170 s
Ionenquelle	250 °C
Ionisierungsenergie	70 eV
Massendefekt	Manuell
Scanbereich	$m/z = 35 - 800$
Aufzeichnungsrate	50 Spektren/s
Detektorspannung	1850 V
Autotune MS	ja

2.1.8.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) für Primärmetabolite

GC-System	Agilent 7890 B Gaschromatograph
Trennsäule	MDN-35, 30 m, 0.32 mm, 0.25 µm, SUPELCO
Injektor	PAL Autosampler-System, Agilent
Injektionsvolumen	1 µL
Nadelspülung	vor und nach jeder Injektion
Ofen Temperatur	Start: 80 °C für 2 Min., danach 15 °C/Min auf 330 °C, 330 °C für 6 Min.
Trägergas	Helium, 2 mL/min
Einlass	programmierbare Temperatur-Verdampfung (PTV), 200 °C
Einlassmodus	<i>split & splitless</i>
Allgemeine Flussrate	2 mL/min
Transferleitung	250 °C
MS	<i>Time of flight</i> (TOF) Pegasus HT, Leco
Aufzeichnungsverzögerung	170 s
Ionenquelle	250 °C
Ionisierungsenergie	70 eV
Massendefekt	0
Scanbereich	$m/z = 70 - 600$
Aufzeichnungsrate	20 Spektren/s
Detektorspannung	1700 - 1850 V
Autotune MS	ja

2.1.8.4 *Texture Analyzer*

<i>Texture Analyzer</i>	TA-XT2i, Stable Micro Systems
Messkammer	500 g
Stempeldurchmesser	5 mm
Testmodus	Kompression
Prä-Test-Geschwindigkeit	0,5 mm/s
Test-Geschwindigkeit	0,5 mm/s
Post-Test-Geschwindigkeit	10 mm/s
Zielmodus	Distanz
Distanz	5 mm
Auslöser	Auto (Kraft)
Auslösekraft	2 G

2.1.8.5 Sonstige Geräte

Tabelle 9: Sonstige Geräte und zugehörige Hersteller.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Fedegari FVA3/A1	ibs tecnomara
Blotapparatur	V10-SDB	Biosteps
Elektrophoreseapparatur	CRTV100	Carl Roth
Gefriertrocknungsanlage	Savant Modulyo D	Thermo Electron Corporation
Gefriertruhe (-80 °C)	MDF-794	Sanyo
Heizblock	Thermomixer comfort	eppendorf
Magnetrührer	MR2002	Heidolph Instruments
	RSM-01 HS	Pheonix Instrument
Milli-Q-Anlage	Purelab Classic	Elga
Mini-Vakuum-Konzentrator	RVC 2-18	Martin Christ
Mixer	<i>Personal Blender</i> PB 250	Tribest Corporation
pH-Meter	pH 50+ DHS	XS Instruments
<i>Plate Reader</i>	ClarioStar	BMG Labtech
<i>Plate Washer</i>	Columbus	Tecan
Rotationsschüttler	L26	Labinco
Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph
Schüttelinkubator	GFL3032	Gesellschaft für Labortechnik
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus/Thermo Scientific
Stromquelle	E835	Consort
	EV245	Consort
Ultraschallbad	Sonorex RK103H	Bandelin
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 2070	Bandelin
Vakuumpumpe	302099	Ilmvac
	RV18	edwards
	E2M2	edwards
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	Precisa 125 A	Precisa Balances
	TP-214	Denver Instruments
	ScalTec SPB61	Oxford Laboratory
Wippschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments
	Enduro Mini Mix	Labnet International Inc.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	5415R	eppendorf
	4K15C	Sigma Laborzentrifugen
	2K15	Sigma Laborzentrifugen
Zweistrahlfotometer	evolution100	Thermo Electron Corporation

2.1.9 Software

LC-MS Auswertung	DataAnalysis 6.2, Bruker Daltonics QuantAnalysis 6.2, Bruker Daltonics
GC-MS Auswertung (VOCs)	LECO® ChromatTOF® 4.50.8.0 optimized for Pegasus® 4D, LECO Corporation
GC-MS Auswertung (Primärmetaboliten)	TagFinder04 Java 8, Update 241, Oracle AMDIS 2.70
ELISA-Messung und Auswertung	ClarioStar 5.21R2, BMG Labtech MARS DataAnalysis Software 3.20R2, BMG Labtech
Statistische Auswertung	R 3.5.0, R Core Team RStudio 1.1.453, RStudio Team
sonstige Software	ChemDraw Professional, 16.0.0.82 (68), PerkinElmer Informatics

2.2 Methoden

2.2.1 Polyphenole

2.2.1.1 Polyphenol-Extraktion Erdbeer-Proben

Die Extraktion der Polyphenole wurde vergleichbar zu Ring *et al.* (2013) durchgeführt. Für jeden Genotyp bzw. jede Linie und jedes Pflanzengewebe wurden jeweils drei biologische Replikate aufgearbeitet, bestehend aus je 500 ± 10 mg. Die Proben wurden zunächst mit 250 μ L des internen Standards (IS) Biochanin A ($c = 0,7$ mM in MeOH) versetzt und 1 Min. gevortext. Nach Zugabe von 250 μ L MeOH („Baker HPLC Analyzed“) und erneutem vortexen wurden die Proben 10 Min. im Ultraschallbad aufgeschlossen und 20 Min. zentrifugiert (16 000g, 4 °C). Der klare Überstand wurde abgenommen und der Rückstand zwei weitere Male mit jeweils 500 μ L MeOH extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden am Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt und die getrockneten Rückstände in 35 μ L H₂O MQ rückgelöst. Die Extrakte wurden erneut 1 Min. gevortext, 10 Min. im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (16 000g, 4 °C, 20 Min.). Der klare Überstand wurde in Probengefäße überführt und mittels LC-MS analysiert (s. 2.1.8.1). Für die GoodBerry-Kreuzungspopulation wurde jedes biologische Replikat einmal gemessen (n pro Genotyp = 3 Messungen). Die Proben der CAD-Pflanzen wurden jeweils zwei Mal vermessen (n pro Linie/Gewebe = 6 Messungen).

2.2.1.2 Polyphenol-Extraktion Kontrollstandard

200 g des Pulvers für den EKS wurde analog zur Probenextraktion aufgearbeitet. Im ersten Schritt wurden 100 mL IS (Biochanin A, $c = 0,7$ mM) und 100 mL MeOH zur Extraktion verwendet. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Rückstand zwei weitere Male mit jeweils 200 mL MeOH extrahiert. Die vereinigten Überstände wurde zunächst am Rotationsverdampfer eingengt und das restliche Wasser über Nacht mittels Gefriertrocknung entfernt. Das getrocknete Extrakt wurde in 14 mL H₂O MQ resuspendiert, 1 Min. gevortext, 10 Min. im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (16 000g, 4 °C, 20 Min.). Ein Teil des klaren Überstandes wurde aliquotiert und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Der Rest des Überstandes wurde bei -80 °C gelagert und bei Bedarf aliquotiert. Bei jeder Analyse mittels LC-MS wurde der EKS mitgeführt, um tagesabhängige Messschwankungen zu korrigieren.

2.2.1.3 Identifizierung der Phenylpropanoide in Erdbeerextrakten

Zur eindeutigen Qualifizierung wurden zunächst mit Hilfe von Glycosyl-Transferasen (GT) Glucoside und Glucose-Ester ausgewählter Phenylpropanoide produziert und unter identischen Bedingungen mittels LC-MS analysiert.

Produktion der Referenzsubstanzen

Aus der internen Bakterienstammsammlung wurden drei GVOs ausgewählt, die bevorzugt Esterbindungen katalysieren, sowie zwei GVOs zur Bildung von Glucosidbindungen (s. Tabelle 6). Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp (WT) desselben Bakterienstamms ohne Vektor pGEX4T1 und ohne GT-Insert kultiviert. Die Bakterien wurden in M9-Medium mit 0,14 mM Ampicillin (WT ohne Ampicillin) bei 37 °C kultiviert, bis sie eine optische Dichte von 1 erreicht hatten. Die Bakterienkulturen wurden bei Raumtemperatur zentrifugiert (2900g) und anschließend in frischem M9-Medium mit 0,14 mM Ampicillin (WT ohne Ampicillin) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,4 M IPTG zur Induktion und zweistündiger Inkubation (18 °C, 300 Umdrehungen pro Minute (rpm, englisch: *revolutions per minute*)) zur Expression der Enzyme wurden pro GT und Substrat je 5 mL in 25 mL *Deep Well* Mikrotiterplatten aliquotiert. Anschließend wurden 50 µL 10 %ige Substratlösung zugegeben. Nach zwei Tagen Inkubationszeit (18 °C, 300 rpm) wurden die Zellkulturen in frische Zentrifugenröhrchen überführt, zwei Mal zentrifugiert (5500g, Raumtemperatur, 20 Min.) und die gebildeten Glucoside und Glucose-Ester im Überstand mittels LC-MS analysiert.

Analyse der Referenzsubstanzen mittels LC-MS

Alle Referenzsubstanzen wurden unter gleichen Bedingungen wie die Erdbeerextrakte analysiert (s. 2.1.8.1). Tabelle 10 zeigt die ermittelten Retentionszeiten (t_R), Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) des Pseudomolekülions im Massenspektrum (MS^1) und die Fragmentierungsmuster (MS^2) im negativen Modus. Falls nicht anders anderweitig angegeben, handelt es sich um Ionen des Typs $[M-H]^-$.

Tabelle 10: Retentionszeiten und m/z im MS^1 und MS^2 der Phenylpropanoid-Glucoside und -Glucose-Ester im negativen Modus. Die Referenzsubstanzen sind in alphabetischer Reihenfolge geordnet. Fragmente im MS^2 sind nach absteigender Intensität geordnet.

Referenz	Abkürzung	t_R [min]	MS^1 [m/z]	MS^2 [m/z]
Ferulasäure-Glucose-Ester	Fer-Glc-Es	23,4	355	193, 217, 175, 235, 295, 160, 134
Ferulasäure-Glucosid	Fer-Glc	22,4	355	193
Kaffeesäure-Glucose-Ester	Kaf-Glc-Es	19,0	341	179, 161, 135, 203
Kaffeesäure-Glucosid	Kaf-Glc	22,5	341	179, 135
<i>m</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester	<i>m</i> -Cu-Glc-Es	24,4	371 [$M+COOH$] ⁻	325, 163, 285, 235, 205
<i>m</i> -Cumarsäure-Glucosid	<i>m</i> -Cu-Glc	23,2	325	163
<i>o</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester	<i>o</i> -Cu-Glc-Es	26,8	325	265, 163, 205, 119
<i>o</i> -Cumarsäure-Glucosid	<i>o</i> -Cu-Glc	27,3	325	163, 119

Referenz	Abkürzung	t _R [min]	MS ¹ [m/z]	MS ² [m/z]
<i>p</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester	<i>p</i> -Cu-Glc-Es	22,0	325	163, 145, 187, 119, 205, 235, 267
<i>p</i> -Cumarsäure-Glucosid	<i>p</i> -Cu-Glc	23,3	325	163
Sinapinsäure-Glucose-Ester	Si-Glc-Es	24,0	385	223, 205, 247, 325
Sinapinsäure-Glucosid	Si-Glc	23,7	385	223
Zimtsäure-Glucose-Ester	Zi-Glc-Es	30,2	355	309, 147, 207

[M+HCOO]⁻

Co-Chromatographie des Erdbeerstandards

Zur eindeutigen Zuordnung der Glucoside bzw. Glucose-Ester von *o*-, *m*- und *p*-Cumarsäure sowie Kaffeesäure und Ferulasäure in den Erdbeerextrakten wurden Co-Chromatographien durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 µL EKS (s. 2.2.1.2) mit 700 µL der jeweiligen Referenzsubstanz versetzt und erneut unter identischen Bedingungen mittels LC-MS vermessen.

2.2.1.4 Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole

Alle weiteren Polyphenole wurden mit Hilfe der internen Datenbank an Hand von Retentionszeit t_R, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis *m/z* des Mutterions im Massenspektrum MS¹ und dem charakteristischen Fragmentierungsmuster MS² identifiziert. Sie können in die fünf Unterklassen Anthocyane (A), Ellagsäurederivate (ES), Flavanole (Flava), Flavonole (Flavo) und Phenylpropanoide (P), sowie sonstige Metabolite (s) eingeteilt werden. Falls nicht anderweitig angegeben, handelt es sich um Ionen des Typs [M+H]⁺ bzw. [M-H]⁻.

Tabelle 11: Mittels LC-MSⁿ im positiven Modus identifizierte Polyphenole in *Fragaria*. Die Metaboliten sind nach aufsteigender Retentionszeit geordnet. Fragmente im MS² sind nach absteigender Intensität geordnet.

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	MS ¹ [m/z]	MS ² [m/z]
s	Glutathion reduziert*	GSH red	4,4	308	179, 162, 233
s	Glutathion oxidiert*	GSH ox	9,0	613	484, 482, 338
A	Epiafzelechin-Pelargonidin-Glucosid	Epiafz-P-Glc	21,4	705	543
A	Cyanidin-Glucosid	Cya-Glc	22,8	449	287
A	Pelargonidin-Glucosid	Pel-Glc	24,0	433	271
A	Pelargonidin-Rutinosid	Pel-Rut	26,0	579	433, 271
A	Cyanidin-Malonyl-Glucosid	Cya-Ma-Glc	28,5	535	287
A	Pelargonidin-Malonyl-Glucosid	Pel-Ma-Glc	29,8	519	475, 433, 271

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	MS ¹ [m/z]	MS ² [m/z]
IS	Biochanin A (IS)	-	40,2	285	270, 123, 229

*Gemeinsam quantifiziert als Glutathion (GSH).

Tabelle 12: Mittels LC-MSⁿ im negativen Modus identifizierte Polyphenole in *Fragaria*. Die Metaboliten sind nach aufsteigender Retentionszeit geordnet. Fragmente im MS² sind nach absteigender Intensität geordnet.

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	MS [m/z]	MS ² [m/z]
s	Äpfelsäure	Malat	3,1	133	115
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 1 ¹	(Epi)Cat 3x	13,3	865	695, 577, 575, 287
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin ¹	(Epi)Afz-(Epi)Cat	14,5	849	289
Flava	Procyanidin B3	Procy B3	18,2	577	425, 407, 451, 559, 289
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 2 ¹	(Epi)Cat 3x 2	18,6	865	695, 577, 575, 287
Flava	Procyanidin B1	Procy B1	18,9	577	425, 289, 407, 451
P	Kaffeensäure-Glucose-Ester ^{II}	Kaf-Glc-Es	19,1	341	179, 161, 203
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 3 ¹	(Epi)Cat 3x 3	19,3	865	695, 577, 575, 287
ES	HHDP-Galloyl-Glucosid	HHDP-gal-glc	20,1	633	301, 463
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 1	(Epi)Afz-(Epi)Cat 1	20,6	561	289
Flava	Catechin	Cat	20,7	289	245, 205, 179
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 2	(Epi)Afz-(Epi)-Cat 2	21,5	561	289
P	<i>p</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester/-Glucosid*	<i>p</i> -Cu-Glc-Es/-Glc	22,3	325	325, 163, 117
P	Ferulasäure-Glucose-Ester	Fer-Glc-Es	23,7	355	193, 217 175
P	Zimtsäure-Glucose-Ester	Zi-Glc-es	30,2	355	309, 207, 147
				[M+HCOO] ⁻	
Flavo	Quercetin-Glucosid	Qu-Glc	34,3	463	301
Flavo	Quercetin-Glucuronid	Qu-Glu	34,8	477	301

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	MS [m/z]	MS ² [m/z]
ES	Ellagsäure	Esre	35,5	301	301
Flavo	Quercetin-Acetyl-Glucosid ^{▲,I}	Qu-Ac-Glc	36,3	505	301
Flavo	Kaempferol-Glucosid	Ka-Glc	36,7	447	285, 301, 255, 327
Flavo	Kaempferol-Glucuronid	Ka-Glu	37,0	461	285
Flavo	Kaempferol-Malonyl-Glucosid [▲]	Ka-Ma-Glc	37,5	533	285
Flavo	Kaempferol-Acetyl-Glucosid ^{▲,I}	Ka-Ac-Glc	37,8	489	285
Flavo	Kaempferol-Cumaryl-Glucosid	Ka-Cu-Glc	38,5	593	285
IS	Biochanin A (IS)	-	40,2	283	268

*Eindeutige Zuordnung auch mit Referenzsubstanzen (s. 2.2.1.3) nicht möglich.

^I Nur mit LC-MS-System I detektiert.

^{II} Nur mit LC-MS-System II detektiert.

[▲]Bei den Flavonol-Acetyl-Glucosiden handelt es sich vermutlich um Ionisierungsartefakte der jeweiligen Flavonol-Malonyl-Glucoside. Für die weitere Arbeit wird daher immer die Summe aus Ka-Ac-Glc und Ka-Ma-Glc, beziehungsweise Qu-Ac-Glc und Qu-Ma-Glc betrachtet.

Alle Peaks waren über den gesamten Messzeitraum basisliniengrennt. Der Gehalt der Metaboliten wurde semi-quantitativ als Äquivalente (equ) des internen Standards bestimmt. Er berechnet sich gemäß der nachfolgenden Formel.

$$c_{Metabolit} = \frac{m_{IS} \times A_{Metabolit}}{A_{IS} \times m_{Probe}} \times 1000$$

Wobei gilt:

c _{Metabolit}	Konzentration Metabolit [ppm IS equ]
m _{IS}	Masse interner Standard [µg], hier: 50 µg
m _{Probe}	Einwaage Probe [mg]
A _{IS}	Peakfläche interner Standard [mAU]
A _{Metabolit}	Peakfläche Metabolit [mAU]

Da die Proben frisch eingefroren wurden, bezieht sich die Konzentrationsangabe für alle Proben auf das Frischgewicht (FW, englisch: *fresh weight*).

In den Extrakten des EKS (vgl. 2.2.1.2) wurden die Polyphenole identisch zu den Proben identifiziert und quantifiziert. Da sich die Messungen über einen langen Zeitraum erstreckten, wurden

die Proben nach Auswertung der EKS-Ergebnisse in drei Gruppen eingeteilt. Die Einordnung erfolgte anhand der einzelnen Messperioden und ist in Tabelle 13 dargestellt. Für die Gruppen 2 und 3 wurden für jeden Metaboliten anhand der Werte des EKS Korrekturfaktoren ermittelt. Die berechneten Konzentrationen der Proben wurden anschließend mit den entsprechenden Faktoren korrigiert.

Tabelle 13: Übersicht über Korrekturfaktoren innerhalb der GoodBerry-Proben.

Gruppe	Proben	Korrekturfaktor
1	alle Standorte 2017	nein
2	Ciref 2018, Hansabred 2018, IFAPA 2018	ja, zu EKS Gruppe 1
3	Inhort 2018, UPM 2018	ja, zu EKS Gruppe 1

2.2.1.5 Nachweisgrenzen der Polyphenole

Die Nachweisgrenzen (NWGs) wurden für beide LC-MS-Systeme separat mit Leerläufen angefertigt. Hierfür wurden dieselben Einstellungen verwendet wie für Probenläufe (s. 2.1.8.1), jedoch ohne Injektion. Zunächst wurde analog zur Berechnung der relativen Metabolit-Konzentrationen die Konzentration der Hintergrundsignale c_{Rausch} berechnet. Als Hintergrundpeaks dienten Peaks mit derselben Retentionszeit und demselben m/z -Verhältnis wie die jeweiligen Metabolite. Als Probeneinwaage m_{Probe} wurden 500 mg angenommen, als Peakfläche des internen Standards A_{mIS} der gemittelte Wert alle Proben- und EKS-Läufe im Jahr 2018 ($n = 985$). Somit ergibt sich:

$$c_{\text{Rausch}} = \frac{m_{\text{IS}} \times A_{\text{Rausch}}}{A_{\text{mIS}} \times m_{\text{Probe}}} \times 1000$$

Wobei gilt:

c_{Rausch}	Konzentration der Hintergrundsignale [ppm IS equ]
m_{IS}	Masse interner Standard [μg], hier: 50 μg
m_{Probe}	Einwaage Probe [mg], hier: 500 μg
A_{mIS}	mittlere Peakfläche interner Standard [mAU]
$A_{\text{Metabolit}}$	Peakfläche Hintergrundpeak [mAU]

Mithilfe der so errechneten Hintergrundkonzentration c_{Rausch} wurde schließlich über folgende Formel die Nachweisgrenze für jeden Metaboliten ermittelt.

$$NWG = MW + 10 * SD$$

Wobei gilt:

NWG	Nachweisgrenze [ppm IS equ]
MW	Mittelwert c_{Rausch} [ppm IS equ]
SD	Standardabweichung der Einzelmesswerte für c_{Rausch}

Tabelle 14: NWGs der Polyphenole. n.d. = Metabolit wurde mit diesem System nicht detektiert.

Klasse	Metabolit	NWG [ppm IS equ]	
		System I	System II
A	Cyanidin-Glucosid	18,1	0,8
A	Cyanidin-Malonyl-Glucosid	4,2	1,1
A	Epiafzelechin-Pelargonidin-Glucosid	1,3	0,3
A	Pelargonidin-Glucosid	136,1	1,2
A	Pelargonidin-Malonyl-Glucosid	19,7	1,0
A	Pelargonidin-Rutinosid	15,8	1,0
ES	Ellagsäure	8,0	0,3
ES	HHDP-Galloyl-Glucosid	1,9	0,1
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 1	1,3	0,1
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 2	1,3	0,04
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin- (Epi)Catechin 1	0,4	n.d.
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin- (Epi)Catechin 1	0,1	n.d.
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin- (Epi)Catechin 2	0,6	n.d.
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin- (Epi)Catechin 3	0,5	n.d.
Flava	Catechin	1,3	0,2
Flava	Procyanidin B1	1,8	0,05
Flava	Procyanidin B3	2,3	0,05
Flavo	Kaempferol-Acetyl-Glucosid	4,9	n.d.
Flavo	Kaempferol-Cumaryl-Glucosid	2,1	0,1
Flavo	Kaempferol-Glucosid	12,7	0,3
Flavo	Kaempferol-Glucuronid	2,5	0,3
Flavo	Kaempferol-Malonyl-Glucosid	1,8	0,3
Flavo	Quercetin-Acetyl-Glucosid	2,8	n.d.

Klasse	Metabolit	NWG [ppm IS equ]	
		System I	System II
Flavo	Quercetin-Glucosid	1,9	0,3
Flavo	Quercetin-Glucuronid	6,9	0,4
P	Kaffeesäure-Glucose-Ester	n.d.	0,7
P	Ferulasäure-Glucose-Ester	1,0	0,1
P	<i>p</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester/-Glucosid	1,5	0,2
P	Zimtsäure-Glucose-Ester	1,9	0,1
s	Äpfelsäure	3,2	0,05
s	Glutathion oxidiert	1,5	0,9
s	Glutathion reduziert	32,8	0,8

2.2.1 Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)

2.2.1.1 Extraktion der VOCs

Die gesamte Extraktion der VOCs wurde in Glasgefäßen durchgeführt. Das Lösungsmittel Diethylether wurde vor der Extraktion destilliert und bis zur Extraktion lichtgeschützt aufbewahrt. 2 g frisch gemörseretes Erdbeerpulver wurden mit 15 mL H₂O MQ und 5 mL Diethylether, sowie 3 µL Menthol (*c* = 0,6 mM in EtOH), 1 Min gevortext und anschließend und zentrifugiert (5000 g, 4 °C, 10 Min). Die Diethylether-Phase wurde abgenommen und in einem Spitzkolben auf Eis gelagert. Die wässrige Phase wurde vier weitere Male mit jeweils 5 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden über Na₂SO₄ getrocknet, in einen neuen Spitzkolben überführt und das Lösungsmittel über eine Vigreuxkolonne abgedampft. Der verbleibende Extrakt wurde mit Stickstoff auf ca. 150 – 200 µL eingengt und mittels GC-MS analysiert (2.1.8.2).

2.2.1.2 Identifizierung und Quantifizierung der VOCs

Die Identifizierung der VOCs erfolgte an Hand der internen Datenbank. Falls vorhanden, wurden Referenzsubstanzen unter denselben Bedingungen wie die Probenextrakte vermessen. Die Metabolite wurden anhand ihrer Retentionszeit *R_t* sowie ihren charakteristischen Fragmentierungsmustern zugeordnet. Alle Zuordnungen mit einer Übereinstimmung der Datenbank < 70 % wurden nicht gewertet. Alle identifizierten VOCs sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Mittels GC-MS identifizierte flüchtige Metabolite in "Mieze Schindler". Die Metaboliten sind nach aufsteigender Retentionszeit geordnet. $[m/z]$ bezieht sich auf die jeweils charakteristische Masse, welche zur Quantifizierung verwendet wurde.

Klasse	Metabolit	R _t [s]	$[m/z]$	Übereinstimmung	Referenz
Ester	Ethyl-Butanoat	229	88	70 %	ja
Aldehyd	Hexanal	230	56, 72	> 90 %	ja
Säure	Butansäure	244	86	> 90 %	ja
Ester	1-Methylethyl-Butanoat	266	71, 89	> 80 %	nein
Aldehyd	(E)-2-Hexenal	280	83	> 90 %	ja
Ester	Methyl-Acetat	300	59	> 80 %	nein
Säure	Pentansäure	320	60	> 80 %	nein
Ester	Propyl-Butanoat	322	89	> 90 %	nein
Ester	Methyl-Hexanoat	348	74, 87	> 90 %	nein
Ester	Methyl-2-Hexenoat	392	87	> 70 %	nein
Aldehyd	Benzaldehyd	395	77, 106	> 90 %	ja
Ester	Ethyl-Hexanoat	424	88	> 70 %	nein
Ester	Hexyl-Acetat	437	84	> 80 %	ja
Säure	Hexansäure	453	60	> 90 %	ja
Ester	1-Methylethyl-Hexanoat	461	99, 117	> 70 %	nein
Alkohol	Benzylalkohol	466	79, 108	> 90 %	nein
Furanon	Mesifuran (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon)	486	142	> 70 %	ja
Säure	2-Hexensäure	513	114	> 80 %	nein
Furanon	Furaneol® (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon)	500	128	> 90 %	ja
Aldehyd	Nonanal	531	96	> 90 %	ja
Ester	Methyl-Nicotinat	571	78	> 90 %	nein
Ester	Benzylacetat	587	108	> 80 %	ja
Alkohol	1-Nonanol	596	70	> 70 %	ja
Säure	Benzoessäure	605	105	> 80 %	ja
Terpen	Menthol (IS)	606	81	> 80 %	ja
Säure	Nonansäure	686	60	> 90 %	ja
Ester	Methyl-Anthranilat	747	119	> 90 %	ja
Ester	Octyl-Butanoat	774	89	> 80 %	nein
P	Zimtsäure	826	147	> 70 %	ja
Ester	Octyl-Hexanoat	919	117	> 80 %	nein

Klasse	Metabolit	R _t [s]	[m/z]	Übereinstimmung	Referenz
Ester	Lauryl-Acetat	936	61	> 70 %	nein
Lacton	γ-Dodecalacton	993	85	> 80 %	nein

Die Quantifizierung der flüchtigen Komponenten erfolgte mit Hilfe der charakteristischen Masse m/z , bei welcher die jeweilige Substanz einen basislinien-getrennten Peak zu anderen Peaks des gleichen m/z aufweist. Der relative Gehalt jedes Metaboliten wurde als Äquivalente des Internen Standards Methanol wie folgt berechnet.

$$c_{\text{Metabolit}} = \frac{A_{\text{Metabolit}}}{A_{\text{IS}}}$$

Wobei gilt:

$c_{\text{Metabolit}}$	Konzentration Metabolit [IS equ]
A_{IS}	Peakfläche interner Standard
$A_{\text{Metabolit}}$	Peakfläche Metabolit (<i>unique mass</i>)

Sind zwei charakteristische Massen in Tabelle 15 aufgeführt, so wurde zunächst für jede der Massen das IS equ berechnet und anschließend die Summe beider IS equ verwendet.

2.2.2 Primär-Metaboliten

Die Probenaufarbeitung und Auswertung der Daten erfolgte im Zuge eines Forschungsaufenthaltes in der Gruppe von Dra. Sonia Osorio, Dept. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias an der Universidad de Málaga. Alle benötigten Materialien, Geräte und Software wurden von der Forschungsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2.2.1 Extraktion und Derivatisierung der Primär-Metaboliten

Für jeden Genotyp wurden drei biologische Replikate extrahiert und analysiert. Pro Replikat wurden 120 ± 2 mg gefrorenes Fruchtpulver eingewogen, mit 1200 μL Ribitol als IS ($c = 50 \mu\text{M}$ in MeOH) versetzt und gevortext. Das Gemisch wurde für 15 Min. bei 70 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1500g, 4 °C, 15 Min.). 60 μL des Überstandes wurden abgenommen und am Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingeeingt. Um Keto-Enol-Tautomerie und somit Mehrfachpeaks zu verhindern, wurden 60 μL Methoxyamin Hydrochlorid ($c = 360 \text{ mM}$ in Pyridin) zugegeben und die Probe bei 37 °C für 2 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 120 μL Derivatisierungsmix, bestehend aus *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid und Fettsäuremethylestermix im Verhältnis 1:0,03 zugegeben und 30 Min. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Der Fettsäuremethylestermix enthielt Methylester der Fettsäuren C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0,

C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0 und C30:0 zu gleichen Teilen. Nach der Derivatisierung wurden 180 µL des Überstandes in ein neues Probengefäß überführt und mittels GC-MS analysiert (2.1.8.3). Jede Probe wurde im *split* und *splitless* Modus gemessen. Als Leerprobe wurde jeden Tag eine Probe ohne Fruchtmaterial mitgeführt.

2.2.2.2 Identifizierung und Quantifizierung der Primär-Metaboliten

Die Chromatogramme in *split* und *splitless* Modus wurden getrennt voneinander ausgewertet. In jeder Gruppe wurden die Chromatogramme zunächst über die Retentionszeiten der Fettsäuremethylester ausgerichtet. Die einzelnen Metabolite wurden mit der javabasierten Software TagFinder mit Hilfe der internen Datenbank, sowie Literaturdaten qualifiziert und quantifiziert. Als Grundlage für die Identifizierung dienten dabei Retentionszeiten und charakteristische Fragmentierungsmuster. Glucose, Fructose, Saccharose und Zitronensäure wurden im *split* Modus analysiert, alle weiteren Metabolite im *splitless* Modus. Die Quantifizierung erfolgte über die charakteristische Masse m/z als Equivalente des IS Ribitol.

Klasse	Metabolit	Abkürzung	R _t [s]	[m/z]
Aminosäure	Alanin	Ala	202	116
Carboxylsäure	Brenztraubensäure	Pyruva	216	174
Aminosäure	Valin	Val	264	144
Aminosäure	Isoleucin	Ile	310	158
Aminosäure	Glycin	Gly	316	174
anorg. Säure	Phosphorsäure	Psre	324	299
Aminosäure	Prolin	Pro	329	142
Zuckersäure	Glycerinsäure	Glycerat	335	189
Aminosäure	Serin	Ser	347	218
Carboxylsäure	Bernsteinsäure	Succinat	355	247
Aminosäure	Theronin	Thr	358	218
Carboxylsäure	Fumarsäure	Fumarat	360	245
Aminosäure	Homoserin	HSer	393	218
Zuckeralkohol	Erythritol	Ery-ol	397	205
Carboxylsäure	Äpfelsäure	Malat	428	233
Aminosäure	γ-Aminobuttersäure	GABA	439	174
Aminosäure	Asparaginsäure	Asp	444	232
Zuckersäure	Threonsäure	Threonat	445	292
Aminosäure	Methionin	Met	461	176
Aminosäure	Glutamin	Gln	478	227
Zucker	Xylose	Xyl	479	217
Zuckeralkohol	Ribitol (IS)	-	487	319

Klasse	Metabolit	Abkürzung	R _t [s]	[m/z]
Amiosäurederivat	Pyroglutaminsäure	PyGlu	492	156
Aminosäure	Glutaminsäure	Glu	493	246
Zucker	Rhamnose	Rha	501	117
Polyamin	Putrescin	Put	502	174
Zucker	Fucose	Fuc	507	117
Carboxylsäure	α -Ketoglutarsäure	oxo-Glutarat	509	198
Aminosäure	Phenylalanin	Phe	516	291
Aminosäure	Asparagin	Asn	534	188
Carboxylsäure	Chinasäure	Quinat	561	345
Zuckerderivat	1-O-Methyl- α -D-Glucopyranoisid	Glucopyr	595	204
Uronsäure	Glucuronsäure	GlcA	601	333
org. Säure	Dehydroascorbinsäure	DHA	607	316
Alkohol	Inositol	Ino-ol	635	305
Aminosäure	Tyrosin	Tyr	639	218
Zuckerderivat	Fructose-6-Phosphat	Fruc-6-P	745	315
Zuckerderivat	Glucose-6-Phosphat	Gluc-6-P	754	387
Aminosäure	Tryptophan	Trp	768	202
Zucker	D-Maltose	Mal	645	204
Zucker	Trehalose	Tre	851	191
Zucker	Isomaltose	IsoMal	883	204
Zuckerderivat	Galactinol	Gal-ol	913	204
Zucker	Raffinose	Raf	1003	217
Zucker	Kestose	Kes	1003	217
Zucker	Maltotriose	Maltotr	1050	217
Zucker	D-Fructose	Fruc	563	307
Zucker	D-Glucose	Gluc	573	307
org. Säure	Zitronensäure	Zitsre	576	273
Zucker	Saccharose	Sac	816	361

2.2.3 Fra a 1

2.2.3.1 Herstellung des rekombinanten Fra a 1.02-Proteins

Der GVO zur Produktion des rekombinanten Fra a 1.02-Proteins (rFra a 1.02) wurde im Vorfeld von Katrin Franz-Oberdorf hergestellt und war als Kryokultur vorrätig (s. 2.1.4). Die Bakterien *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pQE70 *fra a1.02* wurden bei 37 °C in LB-Medium (s. 2.1.3) mit 0,1 mM

Chloramphenicol und 0,3 mM Ampicillin bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur zur Expression des Fra a 1.02-Proteins mit 1 mM IPTG versetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert (18 °C, 200 rpm). Am nächsten Tag wurde die Kultur zentrifugiert (5000g, 4 °C, 10 Min.), der Überstand verworfen und die Bakterienpellets bei -80 °C eingefroren.

Extraktion des rekombinanten Proteins aus den Zellen

Zur Extraktion des rFra a 1.02 aus den Bakterien wurden die Pellets zunächst in 10 mL Rückfaltungspuffer (s. 2.1.3) mit 1 mM β -Mercaptoethanol und 1 mM PMSF resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall (50 %, Cycle 5, 1 Min., 3 Wiederholungen) unter Kühlung auf Eis aufgeschlossen. Nach anschließendem Zentrifugieren (10 000g, 4 °C, 20 Min.) wurde der Überstand mit dem löslichen Protein verworfen. Der Rückstand, welcher Einschlusskörperchen des rFra a 1.02 enthält, wurde in 7 mL Denaturierungspuffer (s. 2.1.3) rückgelöst und über Nacht drehend bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (10 000g, 4 °C, 30 Min.) wurde der Überstand in einen Dialyseschlauch (MWCO 3500) überführt und zur Aufreinigung des Proteins über Nacht bei 4 °C gegen Rückfaltungspuffer (pH = 7,5) dialysiert. Am nächsten Tag wurde das rückgefaltete rFra a 1.02 durch Zentrifugieren (10 000g, 4 °C, 20 Min.) von restlichen Zellbestandteilen oder Proteinaggregaten abgetrennt.

Aufreinigung und Überprüfung der Reinheit

Zur Weiteren Aufreinigung des rFra a 1.02 folgte eine Affinitätschromatographie mit Hilfe des gekoppelten His-Tags. Hierfür wurde der Überstand der Proteinextraktion auf eine Säule mit 500 μ L Profinity™ IMAC Ni-charged Resin gegeben und 2 h drehend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde zunächst der erste Durchfluss aufgefangen und die Säule zwei Mal mit je 10 mL Rückfaltungspuffer gewaschen. Zur Elution des rFra a 1.02 wurde sie insgesamt sieben Mal für 5 Min. mit jeweils 300 μ L Elutionspuffer (s. 2.1.3) inkubiert und die Elutionsfraktionen getrennt aufgefangen und auf Eis gelagert. Zuletzt wurde die Säule erneut mit 10 mL Rückfaltungspuffer gewaschen.

Bradford und SDS-PAGE

Die Proteinkonzentration der einzelnen Elutionsfraktionen, sowie des Durchflusses und der Waschfraktionen wurde nach Bradford (1976) mit Hilfe des Roti®-Nanoquant Assays ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in Mikrotiterplatten. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Es wurde ein 7 %iges Sammelgel und 16 %iges Trenngel (s. 2.1.6) verwendet. Das Probengemisch aus Proteinlösung, H₂O MQ und 2 \times Laemmli-Puffer wurde mit jeweils 10 μ g Protein vorbereitet, für 5 Min. auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 40 μ L Probengemisch und als Größenmarker 5 μ L PageRuler auf das Gel geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 3,5 h bei 100 V. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mit kolloidaler Coomassie Färbelösung. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit der Entfärbelösung entfernt.

Western Blot

Zur Verifizierung des produzierten rFra a 1.02 wurden die Proteine mittels Western Blot von einem SDS-Gel auf eine Trägermembran übertragen und anschließend selektiv die Banden des rekombinanten Fra a 1.02-Proteins mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Das SDS-Gel wurde zunächst für 10 Min. in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde in EtOH aktiviert und 5 Min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden von Anode zu Kathode der Western Blot Apparatur je zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, die aktivierte Membran, das SDS-Gel und erneut zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gestapelt. Dabei sollten sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befinden, da dies die Proteinübertragung stören kann. Anschließend wurden die Proteine bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h auf die Membran transferiert. Die Membran wurde über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ schüttelnd in Blockierpuffer (s. 2.1.3) inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie fünf Mal für jeweils 5 Min. in Waschpuffer (s. 2.1.3) gewaschen und anschließend für 1 h in einer Lösung des spezifischen KUR-Fra Primärantikörpers in Blockierpuffer ($c = 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$) inkubiert ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, schüttelnd). Nach erneutem Waschen ($5 \times 5 \text{ Min.}$) mit Waschpuffer wurde die Membran für 1 h in einer Lösung des Anti-Kaninchen Sekundärantikörpers in Blockierpuffer ($c = 0,13 \text{ } \mu\text{g/mL}$) inkubiert ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, schüttelnd), an welchen eine Alkalische Phosphatase zur Umsetzung der Detektionsreagenzien gebunden war. Nach erneutem Waschen ($5 \times 5 \text{ Min.}$) mit Waschpuffer und zweimaligem Waschen (je 5 Min.) mit Detektionspuffer (s. 2.1.3) wurde die Membran schließlich mit 20 mL Detektionspuffer mit $50 \text{ } \mu\text{L}$ NBT und $25 \text{ } \mu\text{L}$ BCIP im Dunkeln unter Schütteln inkubiert, bis eine Farbreaktion zu sehen war.

Lagerung

Nach Bestätigung der Reinheit wurden alle rFra a 1.02-Fractionen eines Zellpellets in einen Dialyseschlauch (MWCO 3500) überführt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen Carbonatpuffer ($\text{pH} = 9,0$; s. 2.1.3) dialysiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinlösung erneut zentrifugiert ($16\,000g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 Min.). Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht im Gefriertrockner lyophilisiert. Das gereinigte, gefriergetrocknete rFra a 1.02 wurde in 1 mM Cystein-Lösung aufgenommen und die Konzentration mittels nanodrop am *Plate Reader* überprüft (Proteinspezifischer Faktor rFra a 1.02 = 0,54). Die Konzentration wurde auf $700 - 1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ eingestellt, die Lösung aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.2 Protein-Extraktion der Erdbeer-Proben

Die Extraktion der Proteine aus den Erdbeerfrüchten erfolgte nach Vassilopoulou *et al.* (2007). Für jeden Genotyp wurden pro Standort und Jahr drei biologische Replikate aufgearbeitet. Zunächst wurde 1 g gefrorenes Erdbeerpulver eingewogen und mit 2 mL Extraktionspuffer (s. 2.1.3) versetzt. Das Gemisch wurde für 30 Min. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ drehend inkubiert und anschließend zentrifugiert ($5100g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 Min.). Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß und direkt im Anschluss bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dialyseschläuche (MWCO 3500) überführt. Zur Aufreinigung wurden die Extrakte über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen PBS-Puffer

(s. 2.1.3) dialysiert. Am nächsten Tag wurden 1,8 mL der Proteinlösung in ein frisches Eppendorfgesäß überführt und erneut zentrifugiert (16 000g, 4 °C, 10 Min.). Der klare Überstand wurde direkt zur Analyse mittels indirekt kompetitivem ELISA eingesetzt (s. 2.2.3.4)

2.2.3.3 Protein-Extraktion des Erdbeer-Standards

Die Extraktion des EKS erfolgte analog zur Probenextraktion. Parallel zur Probenaufarbeitung wurde 1 g EKS extrahiert und auf jeder ELISA-Platte mitgeführt, um tagesabhängige Messschwankungen auszugleichen.

2.2.3.4 Analyse des Fra a 1-Proteins mittels indirekt kompetitivem ELISA

Vor dem Verwenden einer neu hergestellten Proteincharge wurde jeweils eine Testplatte erstellt, um die ELISA-Parameter zu optimieren. Hierbei handelt es sich um die Konzentration des rFra a 1.02 zur Beschichtung der Platte, die Konzentration des Primärantikörpers (pAK) und die Konzentration des Milchpulvers (MP) der Blockierlösung. In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Proteinchargen gearbeitet. Die optimalen Parameter für die verschiedenen Chargen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Optimierte ELISA-Parameter. Die Konzentrationen stellen jeweils die Endkonzentrationen im Well dar. rFra a 1.02 = rekombinantes Fra a 1.02 Protein, pAK = Primärantikörper, MP = Milchpulver.

Chargen-Nr.	c(rFra a 1.02) [$\mu\text{g/mL}$]	c(pAK) [$\mu\text{g/mL}$]	c(MP) [% w/v]
1	0,5	2,0	1,0
2	1,0	1,0	2,0

Zu Beginn wurden alle Wells der Mikrotiterplatte mit 100 μL rFra a 1.02 ($c = 0,5$ bzw. 1,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$) in PBS-Puffer (s. 2.1.3) beschichtet. Zwei Wells, die später als Leerwert dienten, wurden mit 100 μL PBS-Puffer ohne rFra a 1.02 beschichtet. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte entleert, vier Mal am *Plate Washer* mit jeweils 300 μL PBST-Puffer (s. 2.1.3) gewaschen und nach dem letzten Waschschrift komplett trocken geklopft. Anschließend wurden alle freien Bindungsstellen in den Wells blockiert, indem jedes Well mit 200 μL 1 %ige bzw. 2 %ige (w/v) Blockierlösung (s. 2.1.3) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Nach erneutem Waschen ($4 \times 300 \mu\text{L}$ PBST) wurden die Probenextrakte, die Standards für die Kalibrierkurve und der Primärantikörper auf die Platte gegeben. Die Standards wurden mit rFra a 1.02 hergestellt. Insgesamt wurden sieben Kalibrierpunkte in technischen Duplikaten mit Konzentrationen von 0,01 ng/L bis 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in PBST-Puffer gemessen. Die Konzentrationen stellen die Endkonzentrationen im Well nach Zugabe von Standard und Primärantikörper dar. Die Extrakte der Erdbeerproben und des Erdbeerstandards (s. 2.2.3.2 und 2.2.3.3) wurden in zwei verschiedenen Verdünnungen in PBST-Puffer (1:2 und 1:4 nach Zugabe des Primärantikörpers im Well) mit drei technischen Replikaten pro Verdünnung vermessen. Sowohl von den Standards, als auch von den

entsprechenden Verdünnungen der Proben wurden zunächst 50 μL auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Für den Leerwert wurden 50 μL PBST-Puffer verwendet. Anschließend wurde in jedes Well 50 μL einer Lösung des spezifischen KUR-Fra Primärantikörpers in PBST-Puffer ($c(\text{pAK}) = 2,0$ bzw. $1,0 \mu\text{g/mL}$ im Well) gegeben und die Platte für 3 h bei 4°C inkubiert.

Nach fünf Waschschritten (je 300 μL PBST) folgte die Zugabe des Anti-Kaninchen Sekundärantikörper, an welchen die Meerrettich Peroxidase (HRP, englisch: horseradish peroxidase) gebunden war. Zu jedem Well wurden 100 μL des Sekundärantikörpers in PBST ($c = 1 \text{ ng/mL}$) gegeben und die Platte anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten sechs weitere Waschschriffe am *Plate Washer* (je 300 μL PBST), bevor zu jedem Well 100 μL des Substrats TMB gegeben wurde. Durch die Umsetzung des TMB durch die HRP am Sekundärantikörper kommt es zu einer Farbreaktion von farblos zu blau, welche umgekehrt proportional zum Allergengehalt der Probe verläuft. Nach ca. 25 Min. wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 μL 2M H_2SO_4 gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau zu gelb führte. Die Messung der Absorption erfolgte am *Plate Reader* bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge.

2.2.4 Texturmessung mittels *Texture Analyzer*

Um die Festigkeit der CAD-Erdbeerfrüchte zu bestimmen, wurden die reifen, frischen Früchte halbiert und soweit möglich beide Hälften mittels *Texture Analyzer* vermessen (s. 2.1.8.2). Für jede Frucht wurde die Kraftkurve aufgezeichnet, die nötig war, den Stempel ab dem ersten Kontakt mit der Erdbeere mit einer festgelegten Geschwindigkeit eine definierte Strecke zu bewegen. Als Vergleichswert der Festigkeit diente das Kraftmaximum (F_{max}) jeder Kurve.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Phenylpropanoide in *Fragaria*

Die Glucoside und Glucose-Ester verschiedener Phenylpropanoide wurden enzymatisch mit Hilfe von rekombinanten Glucosyltransferasen als Referenzsubstanzen für die späteren LC-MS-Analysen synthetisiert. Alle enzymatisch produzierten Referenzen der Phenylpropanoide (Zimtsäure-Glucosid, Cumarsäure-Glucosid (*m*-, *o*-, *p*-), Cu-Glc-Es (*m*-, *o*-, *p*-), Kaffeesäure-Glucosid, Kaf-Glc-Es, Ferulasäure-Glucosid, Fer-Glc-Es, Sinapinsäure-Glucosid und Si-Glc-Es) konnten mittels MS¹ und MS² bestätigt werden. Abbildung 12 zeigt am Beispiel der Ferulasäure die charakteristische Fragmentierung der Glucoside (links) und der Glucose-Ester (rechts). Der Glucose-Rest der Glucoside wurde als Ganzes abgespalten, was durch den typischen Massenverlust von m/z 162 deutlich wurde. Bei der Fragmentierung der Glucose-Ester hingegen entstanden mehrere Tochterionen.

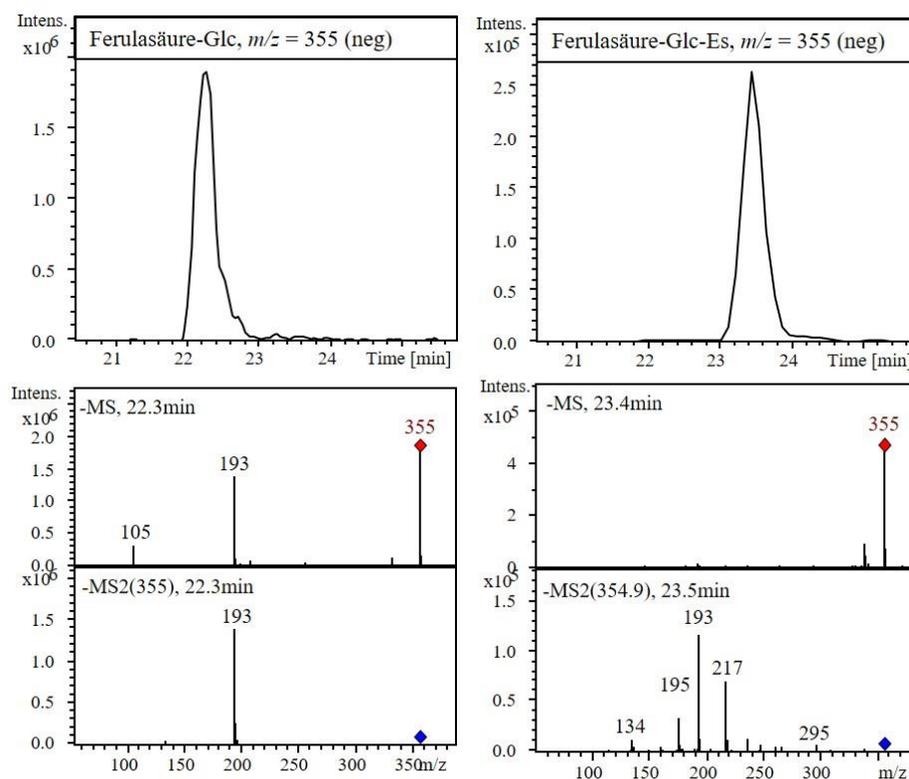


Abbildung 12: Ionenspur und MS¹ und MS²-Spektrum des synthetisierten Ferulasäure-Glucosids und Ferulasäure-Glucose-Esters.

Der größte Massenpeak im MS² ergab sich auch hier durch die Abspaltung von Glucose (-162) unter Entstehung des Aglykons, im Fall der Ferulasäure mit m/z 193. Daneben fanden sich jedoch mehrere weitere Fragmente. Dieses unterschiedliche Verhalten der Fragmentierung der Glucoside und Glucose-Ester konnte für alle untersuchten Referenzen beobachtet werden (s. Anhang 1).

Mit Hilfe der Retentionszeiten (s. Tabelle 10) und Co-Chromatografien konnten in den Erdbeerfrüchten Zimtsäure-Glucose-Ester, Kaffeesäure-Glucose-Ester und Ferulasäure-Glucose-Ester qualifiziert werden. Da bei den Messungen der Probenextrakte im LC-MS-System I zeitgleich mit Kaffeesäure-Glucose-Ester eine weitere Substanz mit dem gleichen Masse-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 341$ eluierte, welches allerdings ein anderes Fragmentierungsmuster als die synthetisierten Kaffeesäure-Referenzen aufwies, wurde Kaffeesäure-Glucose-Ester in der weiteren Arbeit in den GoodBerry-Proben nicht als Metabolit quantifiziert. Im LC-MS-System II trat dieses Problem nicht auf, weshalb Ka-Glc-Es bei der Analyse der CAD-Proben als Metabolit quantifiziert werden konnte. *p*-Cumarsäure-Glucosid und *p*-Cumarsäure-Glucose-Ester wiesen als Referenzsubstanzen unterschiedliche Retentionszeiten auf. In der Co-Chromatographie zeigte sich allerdings in der Mischung mit EKS keine eindeutige Trennung mit dem verwendeten LC-MS-System (s. Abbildung 13). Im weiteren Verlauf wurde deshalb nicht zwischen den beiden Metaboliten unterschieden.

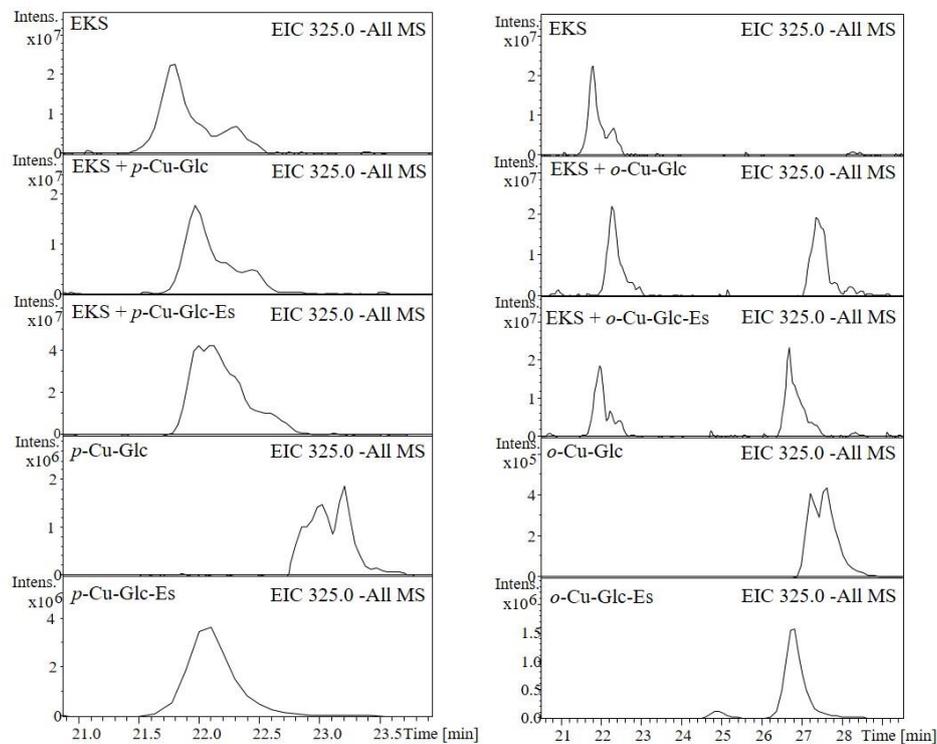


Abbildung 13: Co-Chromatografien des Erdbeerkontrollstandards (EKS) mit verschiedenen Glucosiden und Glucose-Estern. Links: Keine Eindeutige Identifizierung des Peaks mit m/z 325 und $R_t = 22,0$ Min als *p*-Cu-Glc oder *p*-Cu-Glc-Es möglich. **Rechts:** *o*-Cu-Glc und *o*-Cu-Glc-Es können als Metabolite in Erdbeere ausgeschlossen werden.

3.2 Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole

Alle weiteren Polyphenole wurden mit Hilfe der internen Datenbank und Literaturdaten identifiziert. Die Retentionszeit t_R , das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z des Mutterions (MS^1) und das charakteristische Fragmentierungsmuster (MS^2) sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 (Kapitel 2.2.1.4) aufgelistet. Neben den Phenylpropanoiden (P) handelte es sich um Metabolite aus den Klassen der Anthocyane (A), Ellagsäurederivate (ES), Flavanole (Flava), Flavonole (Flavo), sowie sonstige Metabolite (s).

Zur Kontrolle der Messungen wurde an jedem Tag das Extrakt des Erdbeerkontrollstandards (EKS, s. 2.2.1.2) unter denselben Bedingungen wie die Proben mittels LC-MS vermessen und ausgewertet (s. 2.1.8.1 und 2.2.1.4). Dadurch konnte die Trennleistung des chromatographischen Systems täglich beobachtet werden. Nach Abschluss der Messungen wurde anhand einer Hauptkomponentenanalyse die Stabilität der Quantifizierung mittels des verwendeten LC-MS/MS-Systems über einen längeren Zeitraum analysiert (s. Abbildung 14).

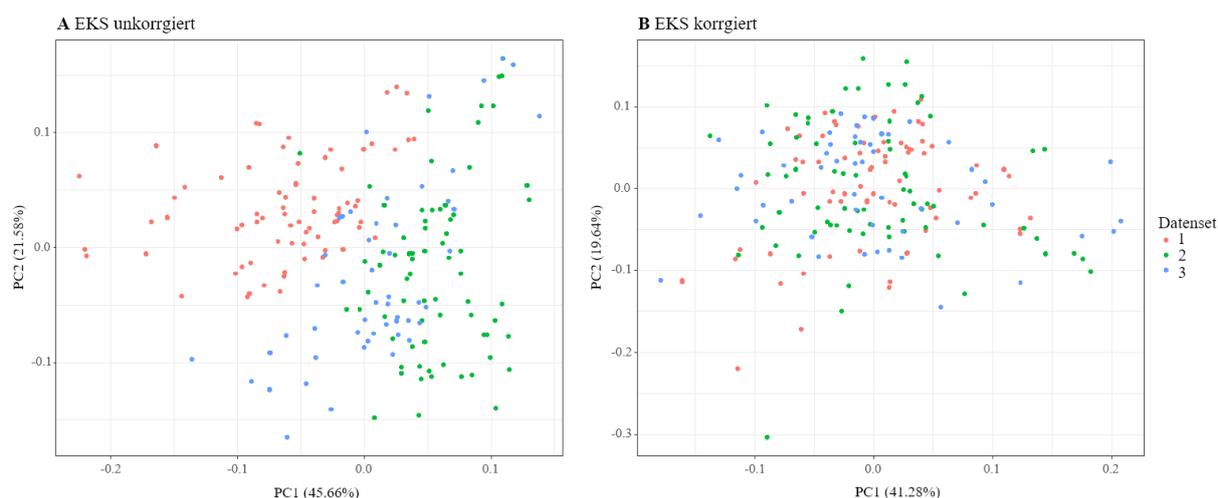


Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der Polyphenole der EKS-Extrakte. A: Analyse der unkorrigierten Konzentrationen, **B:** Analyse der korrigierten Konzentrationen. Die einzelnen Datensets sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet (rot: Gruppe 1 - 2017; blau: Gruppe 2 - 2018-1; grün: Gruppe 3 - 2018-2)

Abbildung 14 A zeigt die Analyse der unkorrigierten Konzentrationen der im EKS analysierten Metaboliten. Vor allem die Proben der Gruppe 1 (rot), welche alle Daten aus dem Erntejahr 2017 umfasst, zeigt eine deutliche räumliche Trennung von den Daten aus 2018 (blau und grün). Doch auch innerhalb der Extrakte die mit den Proben des zweiten Erntejahres gemessen wurden zeigt sich eine Auftrennung in zwei Gruppen. Da alle EKS-Extrakte aus einer Extraktion stammten und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert wurden, sind die unterschiedlichen Analyten-Konzentrationen auf Schwankungen des Messsystems zurückzuführen. Für Gruppe 2 und Gruppe 3 wurden daher für jeden Metaboliten Korrekturfaktoren ermittelt, um die berechneten Konzentrationen an die der Gruppe 1 anzugleichen. Somit konnte der Einfluss des Messzeitpunktes auf die ermittelten Metaboliten-Gehalte

eliminiert werden. Abbildung 14 B verdeutlicht die Notwendigkeit und die Wirksamkeit der Korrekturfaktoren. Die Konzentrationen der Gruppen 2 und 3 der EKS-Extrakte wurden mit Hilfe der Korrekturfaktoren zunächst korrigiert und anschließend erneut eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Im Gegensatz zu den unkorrigierten Werten war nun keine Auftrennung der Extrakte zu erkennen. Vielmehr zeigte sich eine homogene Vermischung aller EKS-Proben, unabhängig vom Messzeitpunkt. Dieselben Korrekturfaktoren wurden auf die berechneten Konzentrationen aller Proben aus Datenset 2 und 3 angewendet. Dadurch kann für die weitere Arbeit davon ausgegangen werden, dass beobachtete Unterschiede in den Konzentrationen verschiedener Metaboliten auf der unterschiedlichen Polyphenol-Zusammensetzung der einzelnen Genotypen beruhen. Mögliche Schwankungen des Messsystems hingegen konnten durch diese Maßnahme ausgeschlossen werden.

3.3 GoodBerry

Im GoodBerry-Projekt wurde das Polyphenol-Profil einer Kreuzungspopulation aus „Senga Sengana“ und „Candongga“ mittels LC-MS untersucht. Von ausgewählten Genotypen wurde mit Hilfe eines ELISAs auch der Allergengehalt bestimmt. Sowohl für die Polyphenole als auch für Fra a 1 wurde der Einfluss von Umwelt und Genotyp auf die Bildung der einzelnen Metabolite betrachtet. Darüber hinaus wurden die Korrelationen innerhalb der Polyphenole, sowie in zwei Subdatensets mit Fra a 1 beziehungsweise dem Primärstoffwechsel analysiert.

Die Elternsorte „Candongga“ wurde von Johanna Trinkl im Zuge ihrer Promotion untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Nachkommen der F1-Population mit beiden Elternsorten wurden die von ihr generierten Ergebnisse für „Candongga“ auch in dieser Arbeit verwendet.

3.3.1 Polyphenole

Im Polyphenolprofil der Kreuzungspopulation (s. Abbildung 15) sind 28 Sekundärmetabolite der Unterklassen Anthocyane, Ellagsäurederivate, Flavanole, Flavonole und Phenylpropanoide, sowie Glutathion und Äpfelsäure zu finden. Eine Liste aller identifizierten Metaboliten findet sich in Kapitel 2.2.1.4. Die Gehalte der einzelnen Metabolite in Abbildung 15 sind als Prozentanteile der jeweils höchsten gemessenen Konzentration pro Analyt im gesamten Datenset angegeben von 0 % (blau) bis 100 % (rot). Für die Standorte wurden jeweils die Mittelwerte der Proben für die Erntejahre 2017 und 2018 farblich dargestellt. Ein eindeutiger Einfluss der Standorte auf die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite war zunächst nicht zu erkennen, da die Farbkodierung der einzelnen Anbauorte keine Gruppierung der Proben nach Ländern zeigte. Bei genauerer Betrachtung fanden sich kleinere Cluster, welche teilweise auf die Standorte zurückzuführen waren. Diese sind in Abbildung 15 durch gestrichelte Umrandungen und die Nummerierung von eins bis acht kenntlich gemacht. Jede dieser Gruppen wies verschiedene Charakteristika auf, wie zum Beispiel hohe Anthocyan-, Flavanol- oder Flavonol-Konzentrationen oder die Kombination mehrerer Attribute. Die detaillierte Zusammensetzung wird im Folgenden genauer erläutert.

Die Proben mit hohen Flavanol-Gehalten teilten sich in zwei Gruppen auf. Gruppe 1 (vgl. Abbildung 15) enthielt fast ausschließlich Proben von Hansabred (Deutschland, blauer Ländercode), Gruppe 3 hingegen überwiegend Proben von Ciref (Frankreich, türkiser Ländercode). Gruppe 1 wies zusätzlich höhere Gehalte an Flavonolen auf, während Gruppe 3 durch hohe Gehalte an Pel-Glc und Pel-Ma-Glc charakterisiert wurde. In beiden Gruppierungen befanden sich auch Genotypen aus anderen Ländern. Dabei handelte es sich teilweise um dieselben Genotypen, wie z. Bsp. H059 aus Inhort (Polen) im Hansabred-Cluster (1) oder H013 und H105 aus IFAPA (Spanien) in der Ciref-Gruppe (3). Auf der anderen Seite fand sich mit H076 aus Inhort unter den Deutschland-Proben ein Genotyp, der in Deutschland angebaut einen niedrigeren Flavanol-Gehalt aufwies und somit nicht im Hansabred-

Flavanol-Cluster zu finden war. Daraus ergibt sich ein erster Hinweis, dass nicht alleine der Standort ausschlaggebend für die Synthese bestimmter Polyphenole ist.

Auch für mittlere Flavanol-Konzentrationen sind in Abbildung 15 zwei Cluster zu erkennen. Gruppe 2 beinhaltete vorwiegend Proben aus IFAPA und Ciref. Die Mehrheit der Genotypen innerhalb dieser Fraktion war jeweils nur aus einem der beiden Länder vorhanden. Für diese Anordnung waren demnach primär äußere Einflüsse verantwortlich. Gruppe 4 wurde von Genotypen aus UPM (Italien) gebildet. Im Gegensatz zur IFAPA/Ciref-Gruppe (2) zeichneten sie sich zusätzlich durch sehr hohe Konzentrationen an *p*-Cu-Glc-Es/-Glc aus. Die Gehalte der anderen Phenylpropanoide, Zi-Glc-Es und Fer-Glc-Es, verhielten sich verglichen mit *p*-Cu-Glc-Es/Glc sehr unterschiedlich. Es zeigten sich zudem große Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Substanzen mit 0 bis 40 ppm IS equ für Fer-Glc-Es und 60 bis 660 ppm IS equ für *p*-Cu-Glc-Es/-Glc. Alle Vertreter dieser Gruppe akkumulierten außerdem hohe Gehalte an Procyanidin B3.

Circa zwei Drittel der Population zeichnete sich durch niedrigere Flavanol-Gehalte aus. Die Konzentrationsspanne lag dabei zwischen 0 und 150 ppm IS equ. Procyanidin B1 und B3 waren in höheren Mengen vorhanden mit bis zu 280 bzw. 480 ppm IS equ. Eine Auffälligkeit der Flavanole ist, dass alle Vertreter dieser Unterklasse innerhalb eines Genotyps gleiche prozentuale Konzentrationen aufwiesen. Im Gegensatz zu den Phenylpropanoiden wurden innerhalb einer Probe also entweder hohe Konzentrationen aller Metabolite oder niedrige Konzentrationen aller Metabolite dieser Unterklasse nachgewiesen.

Eine weitere Anhäufung von Proben aus dem italienischen Anbaugebiet wurde durch vergleichsweise niedrige Konzentrationen aller Metabolite, unabhängig von der Metabolitengruppe charakterisiert (Gruppe 6). Innerhalb dieser Gruppe fanden sich auch vier Genotypen aus Spanien. Zwei Genotypen (H016 und H055) akkumulierten sowohl in Italien als auch in Spanien nur geringe Metabolitmengen. Zwei weitere Proben (H051 und H056) des Clusters stammten aus Spanien, die italienischen Pendanten hingegen enthielten höhere Konzentrationen einzelner Metabolite und fielen somit aus der Gruppe.

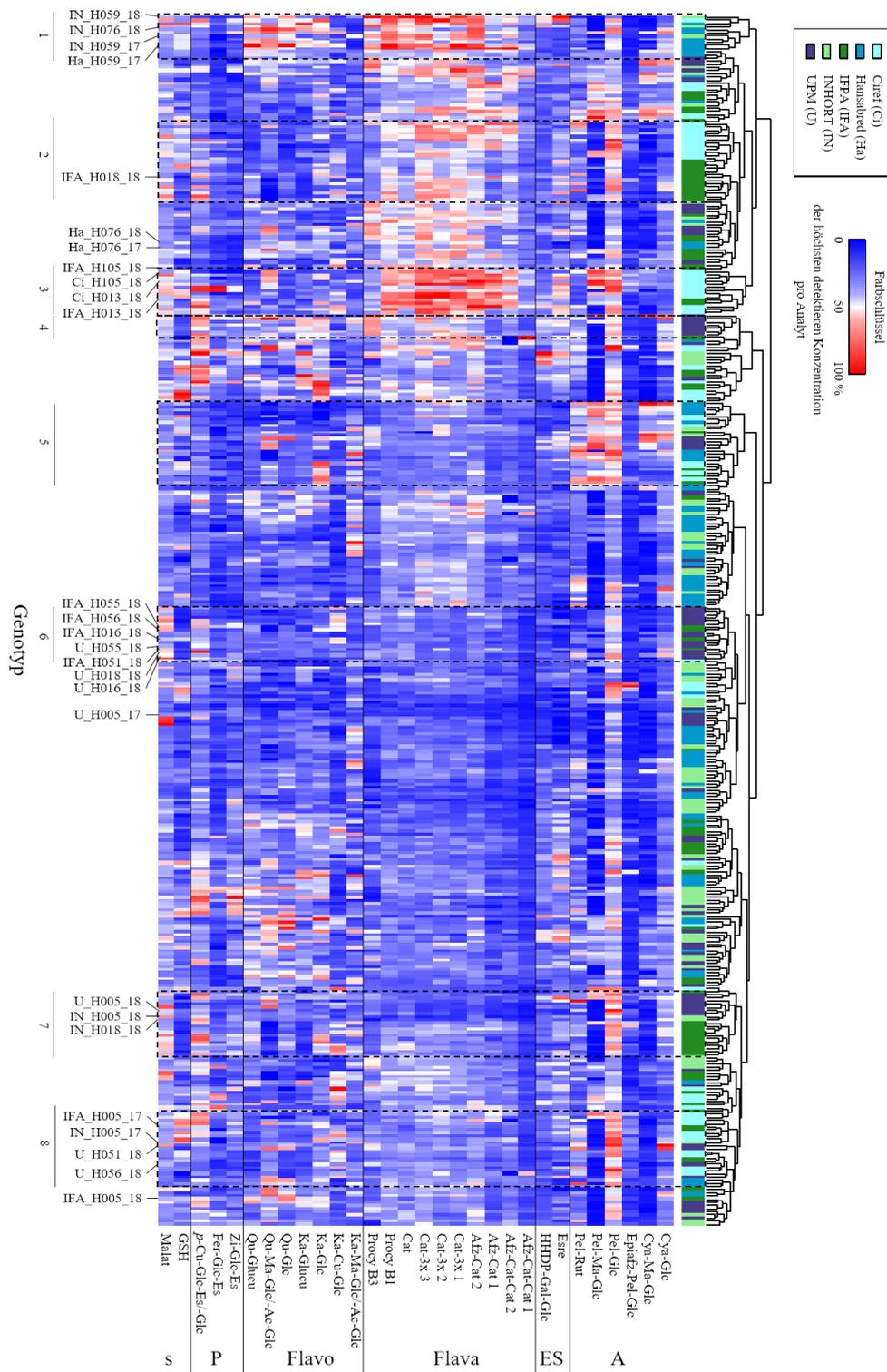


Abbildung 15: Polyphenolprofil der Kreuzungspopulation 'Candong' x 'Senga Sengana' aus den Jahren 2017 und 2018. 2017 wurden 87 und 2018 286 Genotypen analysiert. Die jeweiligen Anbaustandorte sind in der rechten Spalte farblich kodiert. Jede der anderen Spalten stellt den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten eines Genotyps dar. Die Abkürzungen der Polyphenolklassen sind A = Anthocyane, ES = Ellagsäurederivate, Flava = Flavanole, Flavo = Flavonole, P = Phenylpropanoide, s = sonstige Metabolite. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin. Die Proben sind wie folgt kodiert: Name des Standorts (Ci, Ha, IFA, IN, U)_Genotyp mit vorgestelltem H für den Züchter Hansabred_Jahr (2017 oder 2018). 1 – 8 zeigt Gruppierungen innerhalb des Datensets.

Die letzte Standort-Gruppe 7 enthielt Proben aus UPM (Italien) und IFAPA (Spanien). Charakteristisch waren vor allem hohe Gehalte des Anthocyanins Pelargonidin-Glucosid. Innerhalb dieser Fraktion befanden sich mit H005 und H018 auch zwei Genotypen aus Polen aus dem Jahr 2018. Im Erntejahr 2018 war H005 aus UPM ebenfalls in dieser Gruppierung, 2017 hingegen wies dieser Genotyp eine sehr niedrige Pel-Glc-Konzentration auf. In Spanien erzielte H005 zwar in beiden Erntejahren hohe Pel-Glc-Gehalte, allerdings unterschied sich die Zusammensetzung der restlichen Polyphenole zu stark, um innerhalb des Italien/Spanien-Clusters zu liegen. Im Gegensatz dazu verhielt sich H018 an allen Standorten gänzlich unterschiedlich. Angebaut in Italien fiel er beispielsweise in Gruppe 5, die sich durch insgesamt niedrige Polyphenol-Gehalte auszeichnete. In Spanien hingegen lag er im IFAPA/Ciref-Cluster mit mittleren Flavanol-Konzentrationen (Gruppe 2).

Die länderspezifischen Gruppen 2, 3 und 7 zeichneten sich unter anderem durch hohe Gehalte des Anthocyanidins Pel-Glc aus. Auch Cluster 5 und 8 wiesen dieses Attribut auf. Allerdings gruppierten sich vor allem die Proben der Fraktion 5 vollkommen standortunabhängig. Ein weiteres Merkmal dieser Gruppe waren Cya-Ma-Glc und Pel-Ma-Glc, welche beide in hohen Mengen in Erdbeergenotypen dieser Gruppe akkumuliert wurden. Für viele andere Genotypen war das jeweilige Glucosid als Vorstufe in großen Mengen vorhanden, die Umsetzung zum Malonyl-Glucosid erfolgte jedoch augenscheinlich nicht (s. Gruppe 2, 7, 8 in Abbildung 15).

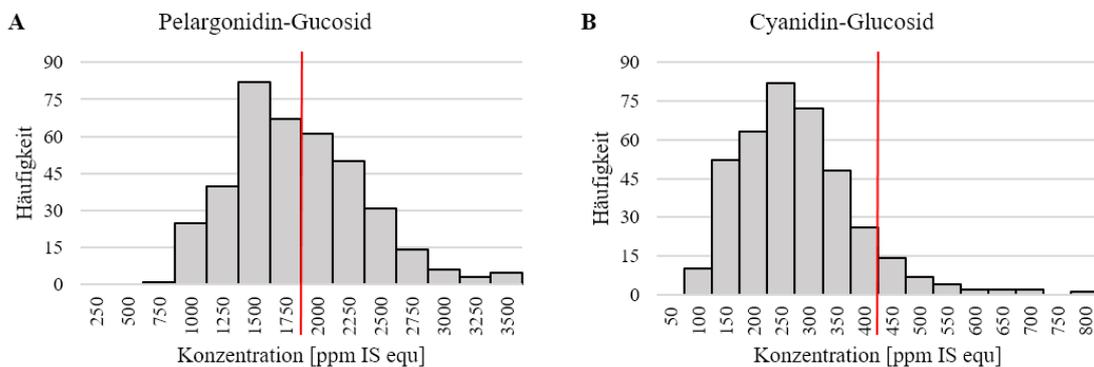


Abbildung 16: Histogramme der gemessenen Anthocyanidin-Glucosid-Konzentrationen. **A:** Verteilung der Pelargonidin-Glucosid-Konzentrationen und **B:** Verteilung der Cyanidin-Glucosid-Konzentrationen in der GoodBerry-Population über beide Erntejahre. Die Konzentrationsbereiche für Pelargonidin-Glc sind in 250 ppm IS equ abgedeckt, für Cyanidin-Glc in 50 ppm IS equ. 250 steht für den Bereich zwischen 0 und 250 ppm; 500 für 250 bis 500 ppm usw. Die rote Linie stellt jeweils den Gehalt von 50 % der höchsten gemessenen Konzentration dar.

Die beiden Anthocyan-Glucoside, die in allen Genotypen detektiert werden konnten, wiesen ein sehr unterschiedliches Akkumulationsverhalten auf. Die Häufigkeit der verschiedenen gemessenen Konzentrationen sind in Abbildung 16 dargestellt. Für Pel-Glc zeigte ungefähr die Hälfte der Population zwischen 50 und 100 % der höchsten detektierten Konzentration (3500 ppm IS equ, s. Abbildung 16 A).

Als niedrigster Gehalt wurde 720 ppm IS equ gleich 20% des Maximalwertes bestimmt. Für Cya-Glc reichte die Spanne von 50 bis 780 ppm IS equ. Im Gegensatz zu Pel-Glc lag der Großteil der Proben bei weniger als 50 % des maximalen Gehaltes mit wenigen Ausnahmen an höheren Cya-Glc-Konzentrationen (s. Abbildung 16 B).

Für die Flavonole ließ sich keine eindeutige Standort-Gruppierung erkennen. Auch innerhalb der Untergruppe waren keine klaren Muster zu erkennen, wie zum Beispiel für die Flavanole. Zwar existierten einige Genotypen innerhalb des Hansabred-Clusters (1), welche allesamt hohe Konzentrationen der verschiedenen Quercetin-Derivate vorwiesen, es gab aber auch zahlreiche Proben mit niedrigen Gehalten aller Flavonole. Oft fanden sich allerdings auch stark unterschiedliche Mengen der einzelnen Flavonole innerhalb einer Probe, also innerhalb eines Genotyps an einem Standort. Die gemessenen Werte bewegten sich für alle Kaempferol-Derivate zwischen 0 und 190 ppm IS equ. Quercetin-Glc und -Ma-Glc wiesen jeweils Werte zwischen 0 und 50 ppm IS equ auf, Quercetin-Glucuronid war in höheren Mengen mit bis zu 600 ppm IS equ vertreten. Ähnlich wie für die malonylierten Anthocyane fanden sich auch für Ka-Ma-Glc und Qu-Ma-Glc keine Gruppen aufgrund der Anbauorte. Der Vergleich der beiden Derivate mit ihren Vorstufen ergibt vereinzelt ebenfalls Genotypen, in denen Ka-Glc bzw. Qu-Glc präsent sind, die jeweiligen -Ma-Glc hingegen nicht. Allerdings ist dieses Phänomen für die Flavonole nicht so stark ausgeprägt wie für die Anthocyane.

Betrachtet man das Verhalten der einzelnen Genotypen an verschiedenen Standorten in beiden Anbaujahren (s. Anhang 2), so findet man auch hier einige Gruppierungen. Der Elternteil „Senga Sengana“ zeichnete sich an fast allen Standorten durch einen niedrigen Flavanol-Gehalt aus. Im Gegensatz dazu besaßen Genotypen wie H059, H071, H103 und H124 vorwiegend hohe Flavanol-Konzentrationen. H072, H076 und H082 fanden sich in einer Gruppe mit viel *p*-Cu-Glc-Es/-Glc, Genotyp H107 hingegen zeichnete sich durch sehr hohe Anteile an malonylierten Anthocyan-Glucosiden aus. All diese Genotypen fanden sich jedoch nicht nur in den beschriebenen Fraktionen, sondern wiesen an einzelnen Standorten auch andere Polyphenolprofile auf. Auf der anderen Seite gab es auch zahlreiche Genotypen, wie zum Beispiel H050, H085 oder H106, sowie die Elternlinie „Candongga“, welche deutlich sensibler auf unterschiedliche Anbaubedingungen und Umweltfaktoren reagierten. Sie verhielten sich bezüglich der analysierten Polyphenole je nach Standort sehr unterschiedlich und konnten somit nicht auf Grund ihres genetischen Hintergrundes gruppiert werden.

Im gesamten Datenset ließen sich also Gruppierungen nach Standort und nach Genotyp beobachten. Allerdings konnte zunächst keinem der beiden ein überwiegender oder alleiniger Effekt zugeordnet werden. Sowohl für die umweltbedingten als auch für die Genotypen-Cluster waren einige Ausnahmen zu sehen. So fanden sich innerhalb verschiedener Umwelt-Gruppierungen auch Genotypen aus anderen Anbauregionen und einzelne Genotypen waren über die gesamte Bandbreite des Datensets verstreut.

3.3.1.1 Subdatenset ausgewählter Genotypen

Um das Verhalten einzelner Genotypen in Bezug auf genetischen Hintergrund und Umwelteinflüsse zu untersuchen, wurde im Folgenden ein Subdatenset bestehend aus acht Genotypen und den beiden Elternsorten betrachtet. Bei den ausgewählten Genotypen handelte es sich um diejenigen, die über beide Erntejahre an allen fünf Anbauorten eine erfolgreiche Ernte erzielt hatten (s. Abbildung 17, Datenerhebung durch Projektpartner). Anhand dieses Kriteriums wurden „Candongä“, „Senga Sengana“, H005, H072, H085, H089, H103, H107 und H124 ausgewählt.

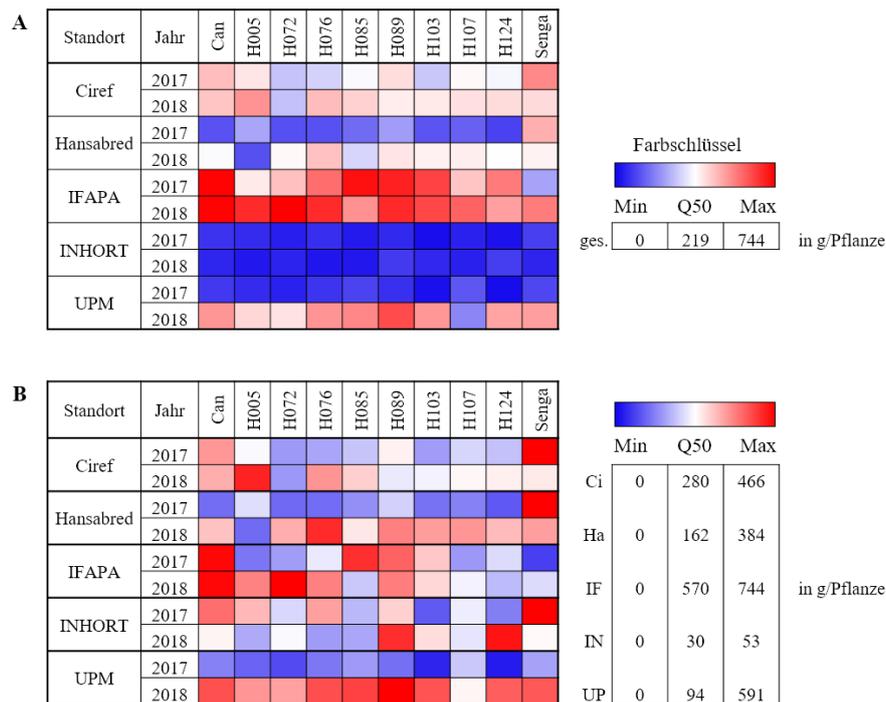


Abbildung 17: Erträge der Genotypen an den fünf Standorten. A: Farbgebung bezogen auf das gesamte Datenset. **B:** Farbgebung bezogen auf die einzelnen Standorte. Maximum und Quantil 50 (Q50) wurden ggf. pro Standort berechnet und sind den Tabellen unter dem Farbschlüssel zu entnehmen. Can = „Candongä“, Senga = „Senga Sengana“.

Für Abbildung 17 A wurde die Farbgebung bezogen auf das komplette Subdatenset gewählt. Dadurch wurde der starke Einfluss der Umwelt auf die Erträge sichtbar. Doch auch an den einzelnen Standorten (Abbildung 17 B) offenbarten sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. H089 zählte an den meisten Anbauorten zu den guten Kandidaten, während H107 nahezu durchweg mittlere bis unterdurchschnittliche Erträge lieferte. Andere Genotypen, wie z. Bsp. H005 oder H076 erzielten in den verschiedenen Ländern und Jahren sehr unterschiedliche Erntemengen. Die beiden Elternsorten erwiesen sich hinsichtlich ihres Ertrags sehr gut an die klimatischen Bedingungen ihrer Hauptanbauländer angepasst.

Die Heatmap der Polyphenol-Profile (s. Abbildung 18) zeigt die Gehalte der einzelnen Metabolite als prozentualen Anteil der jeweils höchsten gemessenen Konzentration pro Analyt von 0 % (blau) bis 100 % (rot) innerhalb des Subdatensets. Der insgesamt höchste oder niedrigste ermittelte

Gehalt der gesamten F1-Population kann dabei außerhalb des Subdatensets liegen. Betrachtet man zunächst erneut die beiden Elternsorten, so stellt man fest, dass diese sich nicht nur hinsichtlich ihres Ertrags unterschieden. Im GoodBerry-Projekt wiesen sie darüber hinaus unabhängig vom Anbauland stark kontrastierende Polyphenolprofile auf. „Senga Sengana“ produzierte höhere Anthocyan-Gehalte, „Candongga“ wiederum bildete deutlich größere Mengen an Flavanolen. In der Gruppe der Flavonole konnten je nach Metabolit in jeweils einer der beiden Linien höhere Konzentrationen nachgewiesen werden, bei den Phenylpropanoiden besaß „Candongga“ mehr *p*-Cu-Glc-Es/-Glc als „Senga Sengana“. Damit bildeten sie jedoch keineswegs die jeweiligen Maxima und Minima der Kreuzungspopulation. Einzelne Nachkommen der F1-Generation akkumulierten teilweise höhere oder niedrigere Konzentrationen an Einzelmetaboliten als die Elternsorten.

Die einzelnen Genotypen der Subpopulation zeigten in ihren Polyphenolprofilen deutliche Ähnlichkeiten mit den Elternteilen. H107 und H124 ließen sich im Anthocyan-Profil „Senga Sengana“ zuordnen, das Flavanol-Profil hingegen ähnelte „Candongga“. Insgesamt waren die Polyphenolmuster von H107 und H124 vergleichbar. H005, H085 und H089 verhielten sich genau umgekehrt und glichen in den Anthocyanen „Candongga“, die Flavonole erinnerten jedoch an „Senga Sengana“. Bezüglich der Phenylpropanoide stimmten vor allem H072 und H085 mit „Candongga“ überein. H072 und H076 zeigten insgesamt sehr ähnliche Polyphenol-Spektren und entsprachen beide stark „Candongga“.

Bei genauerer Analyse der einzelnen Polyphenol-Unterklassen fiel wie bereits im gesamten Datenset auch im Subdatenset die Gruppe der Flavonole durch den gleichmäßigen prozentualen Anteil aller Vertreter innerhalb eines Genotypen auf. Die Elternlinie „Candongga“, sowie H072, H076, H103, H107 und H124 zeichneten sich durch hohe Flavanol-Gehalte aus, „Senga Sengana“, H005, H085 und H089 hingegen durch niedrige Konzentrationen. Welche Mengen an Flavanolen ein Genotyp bildete, wurde überwiegend durch die Genetik und weniger durch den Standort beeinflusst. Mit H076 in Inhort im Jahr 2017 und H124 in UPM im Jahr 2018 gab es aber auch Ausnahmen von dieser Regel. Bei der Bildung der Dimere bevorzugten „Candongga“, H072, H076, H103 und H124 Procyanidin B1 anstatt Procyanidin B3, bei der Bildung der Trimere Afz-Cat-Cat bildete „Candongga“ vermehrt ein anderes Isomer als der Rest der Subpopulation. Genotyp H072 favorisierte außerdem reine (Epi)Catechin-Di- und Trimere gegenüber gemischten Polymeren bestehend aus (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

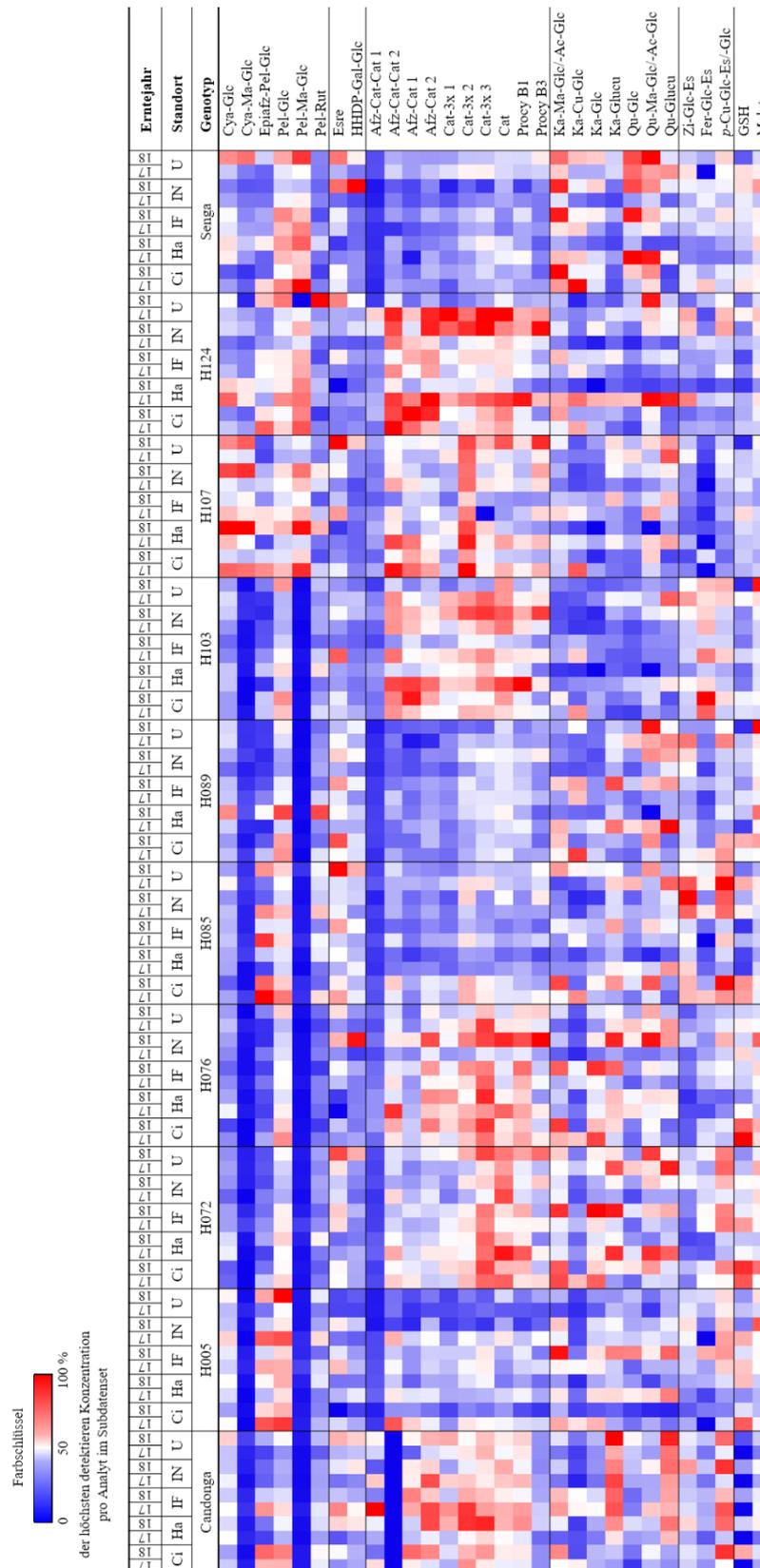


Abbildung 18: Polyphenolprofil ausgewählter Genotypen der GoodBerry-Kreuzungspopulation der Erntejahre 2017 und 2018. Jede Spalte stellt den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten eines Genotyps dar. Die Spalten sind nach Genotyp in aufsteigender Reihenfolge geordnet. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin. Abkürzungen der Standorte: Ci = Ciref, Ha = Hansabred, IF = IFAPA, IN = Inhort, U = UPM.

In der Untergruppe der Flavonole waren keine klaren Regeln zur Bildung der verschiedenen Derivate ersichtlich. „Senga Sengana“ zeigte an den meisten Standorten hohe Konzentration an Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc, sowie Que-Ma-Glc und Que-Ma-Glc/-Ac-Glc, „Candongga“ hingegen bildete an allen Standorten außer Frankeich (Ciref) bevorzugt die jeweiligen Glucuronide. Bei den Nachkommen gab es keine standortübergreifenden Präferenzen für die Synthese einzelner Flavonole. H103 und H107 wiesen generell niedrige Konzentrationen aller Flavonole auf, bei H005 und H124 bildeten einzelne Standorte (IFAPA 2018 bzw. Hansabred 2017) mit höheren Flavonol-Gehalten die Ausnahme. In den restlichen vier Genotypen wurden je nach Standort und Metabolit sehr unterschiedliche Flavonol-Konzentrationen nachgewiesen.

In der Gruppe der Anthocyane stach Genotyp H107 durch hohe Konzentrationen hervor, gefolgt von H124 und „Senga Sengana“. Am auffälligsten war jedoch die starke Abhängigkeit der Bildung von Pel-Ma-Glc und Cya-Ma-Glc vom Genotyp. So wurden zum Beispiel die höchsten Gehalte an Pel-Glc und Epiäpfz-Pel-Glc in H005 und H085 erzielt, Pel-Ma-Glc war jedoch unabhängig vom Anbauland nicht nachzuweisen. In etwas abgeschwächter Form konnte derselbe Effekt auch für „Candongga“, H072, H076, H089 und H103 beobachtet werden. Gleichzeitig lag in diesen Genotypen auch Cya-Ma-Glc unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu waren beide malonylierten Anthocyane in H107, H124 und „Senga Sengana“ je nach Standort in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Die Synthese der Glucoside sowie des Pel-Rutinosids war weder alleine durch Standort noch durch Genotyp beeinflusst.

Ellagsäure und HHDP-Gal-Glc waren bis auf wenige Ausnahmen in allen Proben in vergleichbaren Mengen vorhanden. Auch Glutathion und Äpfelsäure zeigten nur an einzelnen Standorten höhere Konzentrationen. Eine Beeinflussung der Konzentrationen dieser Analyten durch einzelne Genotypen wurde nicht beobachtet.

3.3.1.2 Malonyl-Glucoside

Insgesamt konnten vier verschiedene Malonyl-Glucoside nachgewiesen werden, jeweils zwei für die Unterklassen der Anthocyane und der Flavonole. In der Heatmap (Abbildung 18) wurde für die Anthocyan-Malonyl-Glucoside bereits die starke Abhängigkeit vom Genotyp deutlich. Für die Flavonol-Malonyl-Glucoside war dieser Effekt zunächst nicht zu sehen. So wurden die höchsten Gehalte an Ka- und Que-Ma-Glc/-Ac-Glc im Subdatenset von „Senga Sengana“ gebildet, der Elternlinie, in welcher auch die Anthocyan-Ma-Glc nachgewiesen werden konnten. Allerdings bildeten die beiden Genotypen H107 und H124 ähnliche Mengen der Flavonol-Ma-Glc wie die restliche Subpopulation, obwohl sie deutlich höhere Anthocyan-Ma-Glc-Konzentrationen aufwiesen.

Abbildung 19 zeigt das gegenteilige Verhalten der Malonyl-Glucoside innerhalb der beiden Unterklassen der Anthocyane und Flavonole für die gesamte GoodBerry-Population. Für die beiden

Anthocyan-Ma-Glc (oben) ließ sich eine klare Auftrennung des Datensets in zwei Gruppen erkennen. Die eine Gruppe (rot) zeigt einen proportionalen Zusammenhang zwischen Pel-Glc und dem Nachfolgeprodukt Pel-Ma-Glc (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient $R_{SP} = 0,51$; Signifikanzniveau $p \leq 0,001$) bzw. Cya-Glc und Cya-Ma-Glc ($R_{SP} = 0,74$; $p \leq 0,001$). Diese Korrelation galt unabhängig von den einzelnen Standorten. Die zweite Gruppe (schwarz) hingegen wies teilweise sehr hohe Konzentrationen der Glucoside auf, welche jedoch nicht zu den jeweiligen Malonyl-Glucosiden umgesetzt wurden. Vielmehr wurden die Glucoside in dieser Gruppe in den Früchten als Endprodukt akkumuliert. Die Einteilung der Proben in diese beiden Gruppen basierte nur auf dem Gehalt an Pel-Mal-Glc. Eine Konzentration von $c > 200$ ppm IS equ wurde als Grenze zwischen den beiden Fraktionen definiert. Dass diese Einteilung der Genotypen auch für die Mengen an Cya-Ma-Glc angewendet werden konnte, deutet darauf hin, dass beide Anthocyanidin-Glucoside in der Erdbeerfrucht vom gleichen Enzym umgesetzt werden.

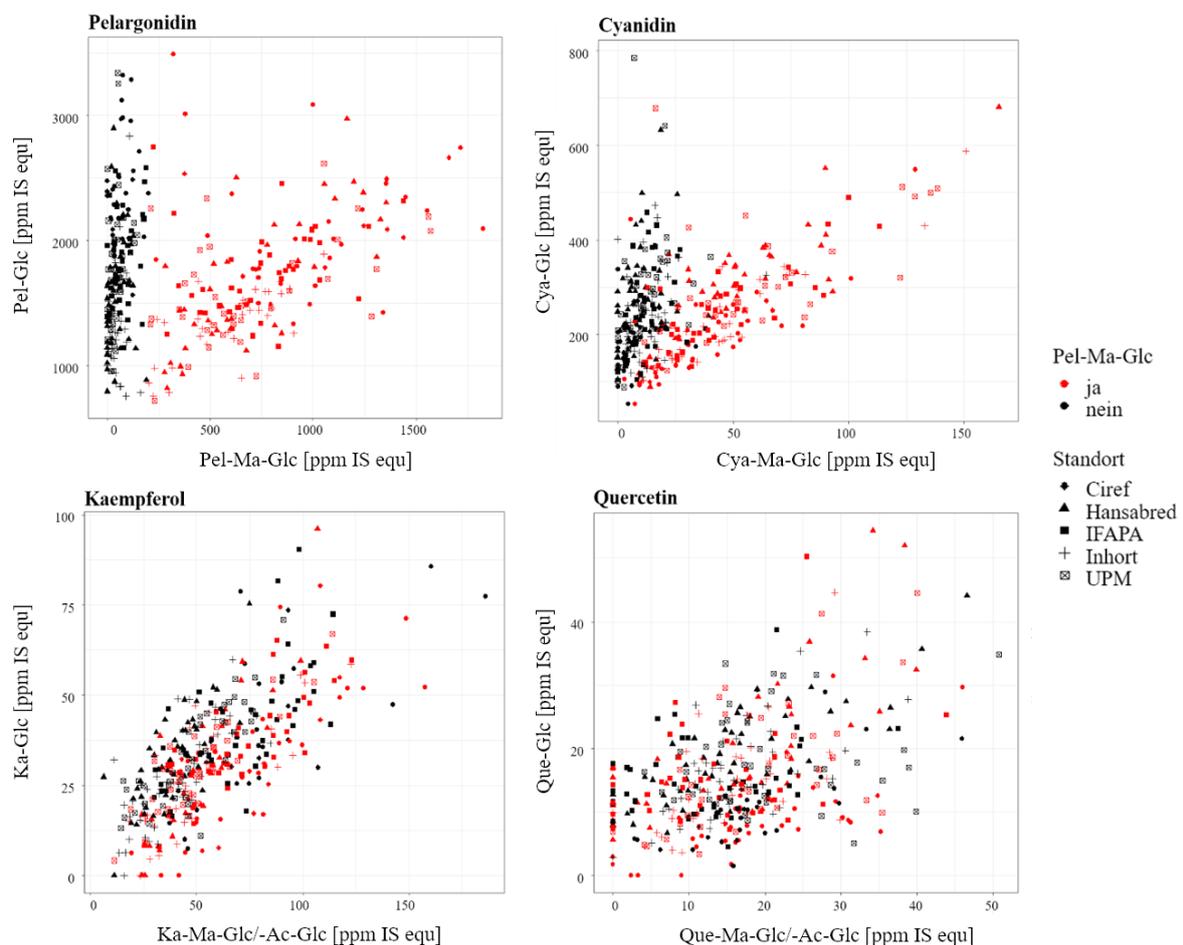


Abbildung 19: Einfluss des Genotyps auf die Bildung verschiedener Malonyl-Glucoside. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Konzentration des jeweiligen Malonyl-Derivates von der Konzentration des potentiellen Glucosid-Vorläufers Grundlage für die Farbgebung ist der Pel-Ma-Glc-Gehalt der einzelnen Genotypen. Die verschiedenen Standorte sind durch unterschiedliche Symbole dargestellt.

Für die beiden Flavonol-Malonyl-Glucoside hingegen ergab sich ein anderes Bild. Wie in Abbildung 19 klar festzustellen, konnte die Einteilung der Proben auf Grund des Pel-Ma-Glc-Gehaltes

nicht ohne weiteres für die Flavonol-Ma-Glc übernommen werden. Darüber hinaus war auch keine klare Auftrennung der Genotypen in zwei verschiedenen Gruppen zu erkennen. Vielmehr schien, im Gegensatz zu den Anthocyanen, für Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc für die gesamte Population ein linearer Zusammenhang zwischen dem Glucosid und dem nachfolgenden Ma-Glc/-Ac-Glc zu gelten mit $R_{SP} = 0,73$ ($p \leq 0,001$). Für Que-Ma-Glc/-Ac-Glc war die Linearität zwischen den beiden Metaboliten nicht eindeutig gegeben ($R_{SP} = 0,49$; $p \leq 0,001$). Eine Trennung der Population in zwei verschiedene Fraktionen war jedoch auch in diesem Fall nicht möglich.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Polyphenol-Unterklassen spiegelte sich auch in den Konzentrationen der jeweiligen Malonyl-Glucoside wieder. Wie in Abbildung 20 deutlich wird, zeigten sich für Pel-Mal-Glc auch hier zwei klar getrennte Gruppen. Cya-Ma-Glc verhält sich ähnlich. In beiden Fällen befand sich die Elternsorte „Candongá“ in der Gruppe mit niedrigen Ma-Glc-Konzentrationen, während in „Senga Sengana“ hohe Konzentrationen nachgewiesen wurden. Die beiden Flavonol-Ma-Glc allerdings wiesen eine einheitliche Verteilung über die gesamte Population auf. Zwar zeigte sich auch hier die Tendenz, dass „Candongá“ weniger Flavonol-Ma-Glc bildete als „Senga Sengana“, allerdings war nicht erkenntlich, dass bestimmte Genotypen unabhängig vom Standort größere Mengen an Ka- oder Que-Ma-Glc/-Ac-Glc produzierten. Die alleinige Abhängigkeit der Synthese der Malonyl-Glucoside vom Genotyp gilt also für die Gruppe der Anthocyane, nicht aber für die Klasse der Flavonole.

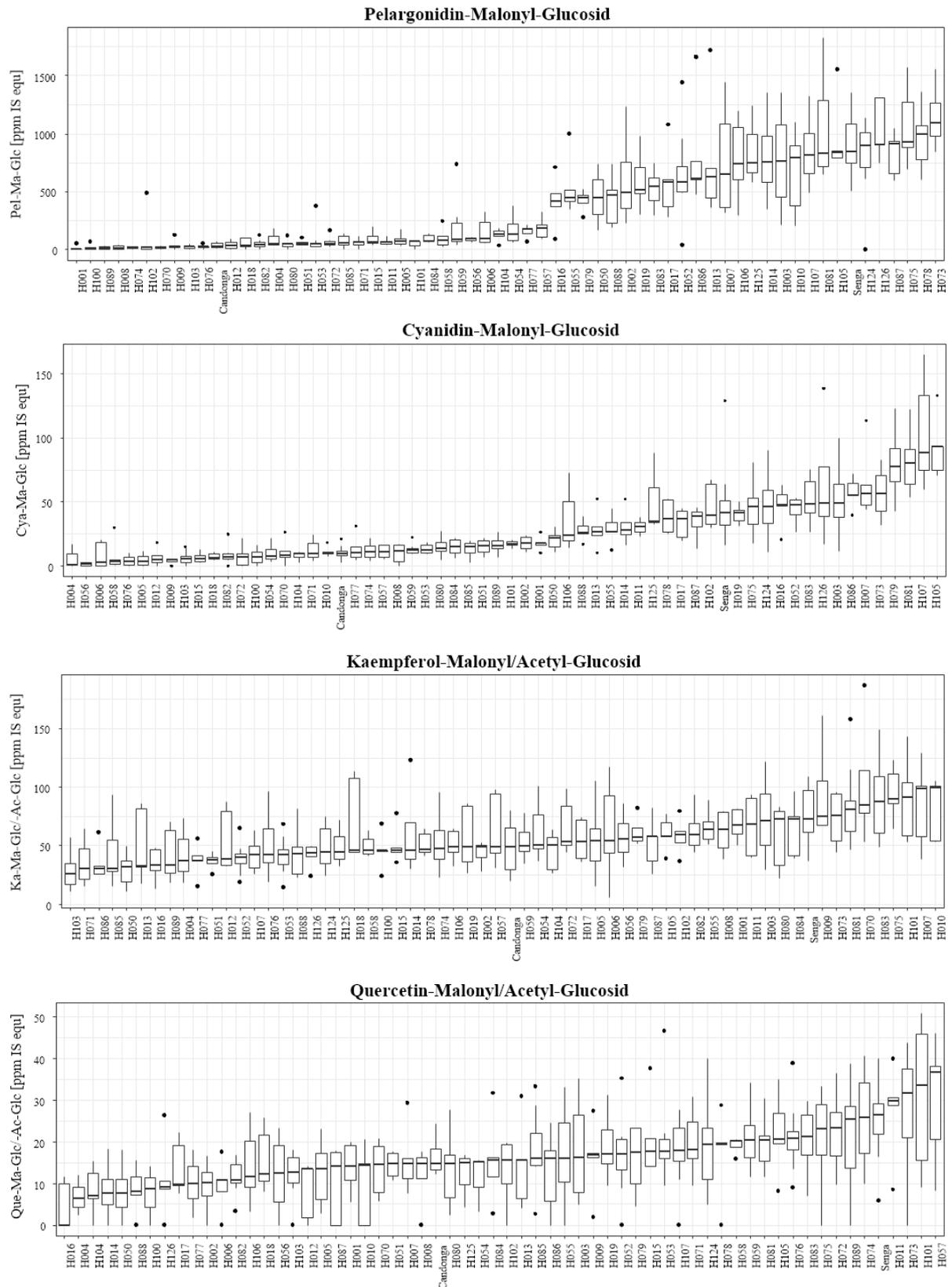


Abbildung 20: Die Verteilung der Konzentration verschiedener Malonyl-Glucoside in unterschiedlichen Genotypen. Eine Box symbolisiert jeweils alle gemessenen Werte eines Genotyps, unabhängig von Anbauland oder Anbaujahr, die durchgezogene Linie zeigt den Median. Die Proben sind nach aufsteigendem Median geordnet. Ausreißer sind durch einen Punkt gekennzeichnet.

3.3.1.3 Flavonol-Glucosid-Derivate und -Glucuronide

Wie unter Punkt 3.3.1.2 erläutert, wurde die Bildung der Flavonol-Malonyl-Glucoside nicht überwiegend durch den Genotyp beeinflusst. Eine nähere Untersuchung ergab, dass auch die Umwelt nicht der primäre Faktor war (vgl. Abbildung 21). Es zeigte sich keine Auftrennung der Proben in Abhängigkeit der einzelnen Standorte. Die Daten der Anbauländer, durch unterschiedliche Farben in Abbildung 21 kenntlich gemacht, lagen als homogene Mischung vor. Somit konnte für die Flavonol-Malonyl-Glucoside, im Gegensatz zu den Anthocyan-Malonyl-Glucosiden, keine einzelne bestimmende Größe (Genotyp oder Umwelt) ausgemacht werden.

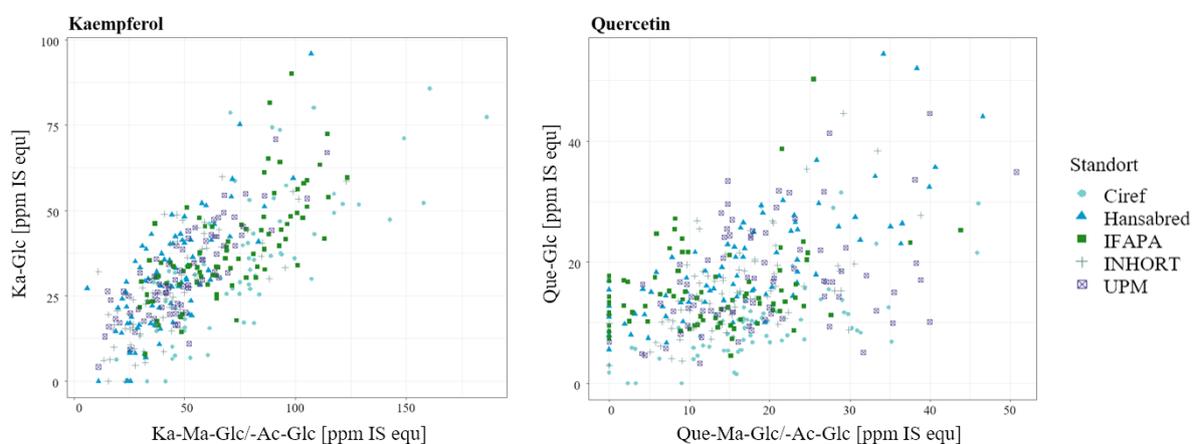


Abbildung 21: Einfluss der Umwelt auf die Bildung der Flavonol-Malonyl-Glucoside. Die einzelnen Standorte sind durch unterschiedliche Farben und Symbole dargestellt.

Als weitere Metaboliten konnten in der Klasse der Flavonole zwei Glucuronide identifiziert werden. In Abbildung 22 ist der Umwelteinfluss auf die Bildung der beiden Glucuronide im Vergleich zu den jeweiligen Glucosid-Derivaten dargestellt. Als Glucosid-Derivate wurde die Summe aller identifizierten Glucosid-Derivate der jeweiligen Flavonole (Kaempferol und Quercetin) einschließlich der Cumaryl-Glucosid-Derivate und Ma-Glc/-Ac-Glc gebildet.

Genotypen, die an den Standorten IFAPA (grün) und Ciref (türkis) geerntet wurden zeigten tendenziell höhere Gehalte an Kaempferol-Glucuronid als an Kaempferol-Glucosid-Derivaten. Dies galt jedoch nicht für alle Proben aus Spanien (IFAPA) und Frankreich (Ciref). An den Anbaustandorten Hansabred (Deutschland), Inhort (Polen) und UPM (Italien) wurden die verschiedenen Glucoside und Glucuronide gleichermaßen akkumuliert. Für Quercetin waren die Verhältnisse zwischen den Glucosid- und Glucuronid-Konzentrationen generell gleichmäßiger über die Standorte verteilt als für Kaempferol. Trotzdem zeigten auch hier die Genotypen, die am Standort Ciref (türkis) geerntet wurden die Neigung zur Bildung der Glucoside. Erdbeeren, die am Standort IFAPA (grün) gepflückt wurden tendierten für Quercetin hingegen vermehrt zur Synthese der Glucuronide. Genotypen, die am Anbaustandort Hansabred, Inhort und UPM wuchsen zeigten auch für Quercetin ein ausgeglichenes Verhältnis

zwischen Glucosiden und Glucuroniden. Bei allen beobachteten Standort-Effekten auf die Flavonol-Gehalte handelte es sich allerdings lediglich um Tendenzen, nicht um eindeutige Trends.

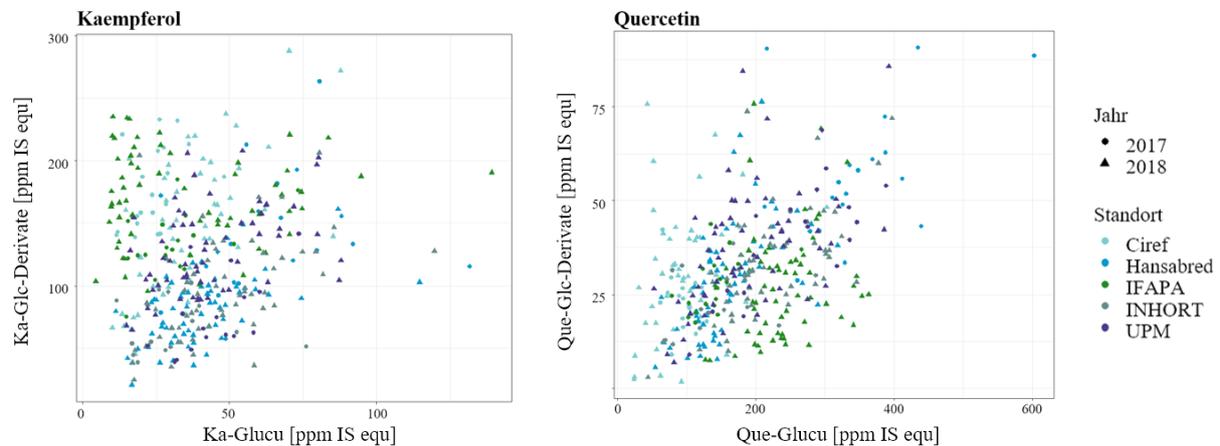


Abbildung 22: Einfluss der Umwelt auf die Bildung der Flavonol-Glucoside und Flavonol-Glucuronide. Die Summe der Ka-Glc-Derivate setzt sich aus Ka-Glc, Ka-Cu-Glc und Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc zusammen. Die Summe der Que-Glc-Derivate bildet sich aus Que-Glc und Que-Ma-Glc/-Ac-Glc. Die verschiedenen Anbauorte sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet, die Anbaujahre durch verschiedene Symbole.

3.3.2 Fra a 1

Im Zuge des GoodBerry-Projektes wurde von den beiden Elternsorten, sowie den Genotypen H050, H053, H071, H076, H083 und H103 der Fra a 1-Allergengehalt mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelt. Die Ergebnisse für „Candongá“ wurden von Johanna Trinkl zur Verfügung gestellt. Abbildung 23 zeigt die gemessenen Konzentrationen der einzelnen Genotypen an den verschiedenen Anbauorten in zwei Anbaujahren 2017 und 2018.

Die Spanne des Allergengehaltes der GoodBerry-Proben reichte im Median von 0,6 $\mu\text{g/g}$ FW („Senga Sengana“, IFAPA, 2017) bis 2,3 $\mu\text{g/g}$ FW (H053, Ciref, 2018). Insgesamt lagen die Werte für 2017 und 2018 in einem sehr ähnlichen Bereich mit einem Median aller Messwerte von jeweils 1,2 $\mu\text{g/g}$ FW in beiden Jahren. Die ermittelten Allergengehalte waren außerdem über alle Standorte gleichmäßig verteilt, ein eindeutiger Einfluss von Umweltfaktoren auf die Fra a 1-Konzentration war nicht zu erkennen. Bei den beiden Eltern wies „Senga Sengana“ tendenziell eine geringere Allergenkonzentration auf. 2018 wurde allerdings der niedrigste Fra a 1-Gehalt aller analysierten Proben in „Candongá“ gemessen. Eine deutlich höhere oder niedrigere Allergenkonzentration in einem der F1-Genotypen an allen Standorten war ebenfalls nicht zu erkennen.

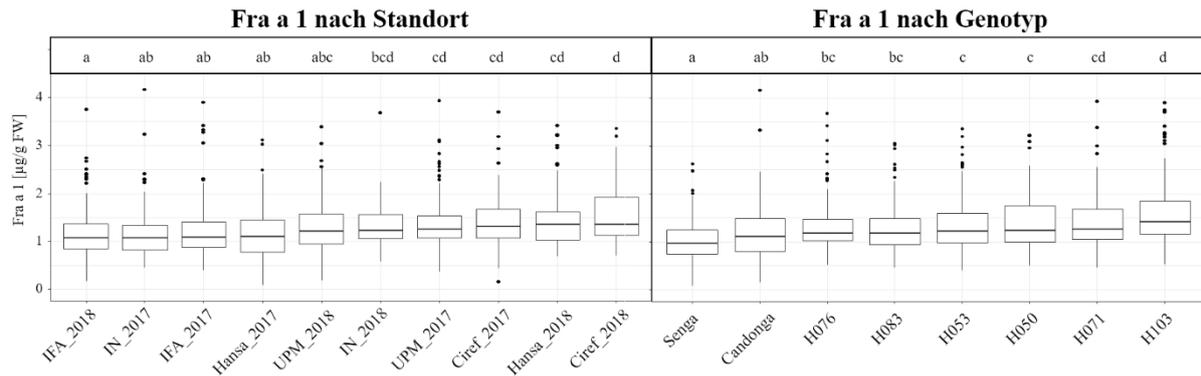


Abbildung 24: Genotyp- bzw. standortübergreifender Fra a 1-Gehalt ausgewählter Genotypen. Links: Eine Box stellt alle gemessenen Proben eines Standortes dar. IFA = IFAPA, IN = Inhort, Hansa = Hansabred. **Rechts:** Eine Box verdeutlicht alle Messwerte eines Genotyps, unabhängig vom Anbauort. Die durchgezogene Linie einer Box zeigt den Median, die x-Achse ist für jede Seite nach aufsteigendem Median geordnet. Ausreißer sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Der Buchstabencode (a-d) zeigt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern bzw. Genotypen mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Auch die nach Genotypen zusammengefassten Messwerte (Abbildung 24, rechts) lagen innerhalb einer schmalen Spanne. Die niedrigsten Fra-Konzentrationen fanden sich in den Elternsorten. „Candonga“ unterschied sich signifikant (Kruskall-Wallis-Test, Dunn-Bonferoni-Test, $p \leq 0,05$) von H053, H050, H071 und H103, „Senga Sengana“ von allen F1-Nachkommen. H103 grenzte sich mit signifikant höherem Allergengehalt von allen Genotypen außer H071 ab. Auch der genetische Hintergrund zeigte somit einen Einfluss auf die gebildete Menge an allergenem Fra a 1-Protein.

Abbildung 25 stellt das Verhalten der einzelnen Genotypen unter verschiedenen Umweltbedingungen dar. „Senga Sengana“ und „Candonga“ zeigten dabei relativ konstante Fra a 1-Konzentrationen an allen Standorten. Auch H071 und H103 wiesen eine sehr gleichmäßige Verteilung über alle Länder und beide Jahre auf. H076 und H083 bildeten beide in Deutschland (Hansabred) deutlich höhere Mengen an Fra a 1. Am stärksten durch äußere Komponenten beeinflusst wurden H050 und H053, erkennbar durch die große Varianz der Messwerte zwischen den einzelnen Proben. Für H053 war außerdem eine starke Abhängigkeit von den einzelnen Standorten zu beobachten. Die Proben eines Standortes aus beiden Jahren fanden sich hier immer im gleichen Messbereich, mit den höchsten Werten in Frankreich (Ciref) und den niedrigsten in Deutschland. Ebenfalls stark standortabhängig verhielt sich H071, allerdings waren hier die Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern nicht so groß wie bei H053. Für die restlichen Genotypen hatten die beiden Anbaujahre teilweise einen größeren Einfluss auf den Allergengehalt als die geografischen Standorte.

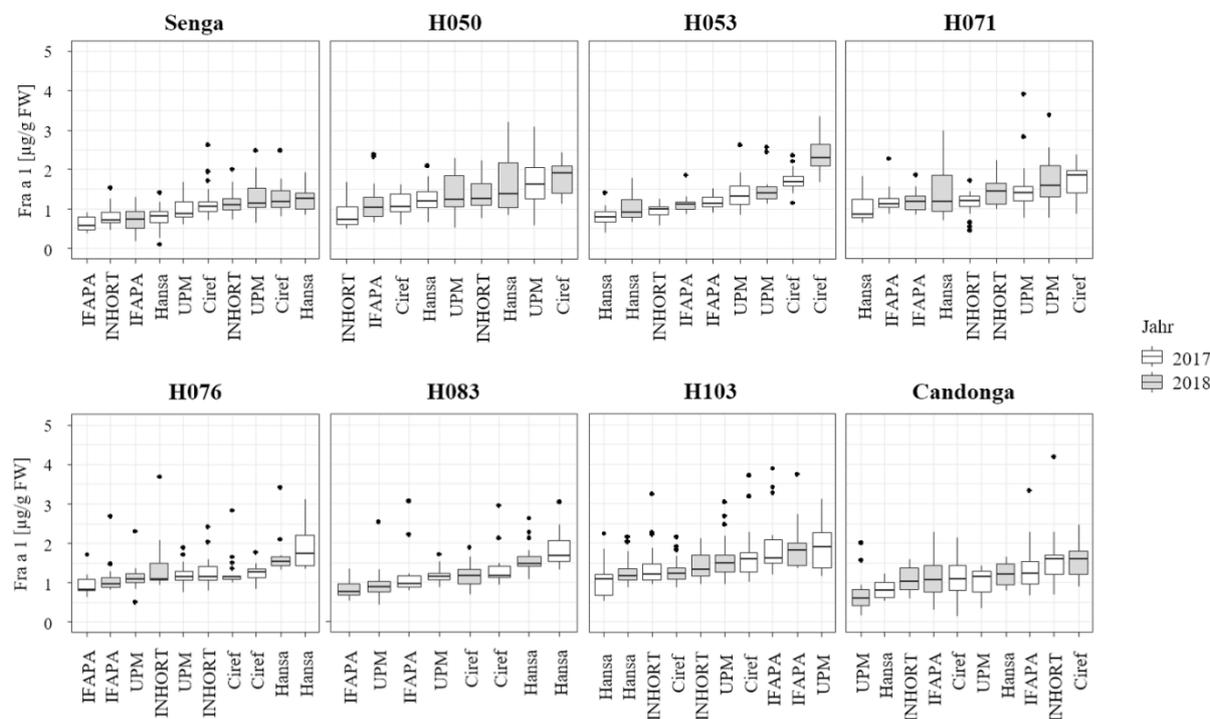


Abbildung 25: Variation des Allergengehaltes in ausgewählten Genotypen. Hansa = Hansabred. Eine Box verdeutlicht alle Messwerte eines Genotyps an einem Anbauort in einem Erntejahr. Die durchgezogene Linie zeigt den Median an, die Standorte sind nach aufsteigendem Median geordnet. Ausreißer sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Die beiden Anbaujahre sind durch unterschiedliche Farben der Boxen kenntlich gemacht.

3.3.3 Korrelationsanalysen

Um herauszufinden, welche der untersuchten Metabolit-Konzentrationen innerhalb der Kreuzungspopulation aus „Senga Sengana“ und „Candonga“ korrelierten, wurden die Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten R_{SP} für die Beziehung der einzelnen Analytgehalte untereinander berechnet. R_{SP} kann einen Wert zwischen -1 und 1 annehmen, wobei negative Werte eine entgegengesetzte Korrelation bedeuten und positive Werte eine direkte Korrelation. Je näher R_{SP} an -1 beziehungsweise 1, desto größer ist der Zusammenhang. Nichtsignifikante Korrelationen mit $p \geq 0,05$ wurden nicht berücksichtigt.

3.3.3.1 Polyphenole

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für alle detektierten Polyphenole dargestellt. Nichtsignifikante Korrelationen sind durch ein graues Kreuz gekennzeichnet, direkte Korrelationen durch einen roten Punkt, entgegengesetzte durch einen blauen Punkt.

Das auffälligste Korrelationscluster fand sich in der Klasse der Flavanole. Wie bereits in den Heatmaps in Kapitel 3.3.1 zu erkennen, bildete ein Genotyp jeweils ähnliche Konzentrationen aller analysierten (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin-Derivaten. Für die Rangkorrelationskoeffizienten

ergaben sich Werte zwischen 0,48 und 0,90. Lediglich für das Dimer Procyanidin B3 fanden sich etwas schwächere Korrelationen mit R zwischen 0,35 und 0,49. War also ein Flavanol in einer Probe vorhanden, so waren alle anderen Vertreter dieser Klasse ebenfalls in ähnlichen relativen Konzentrationsbereichen präsent.

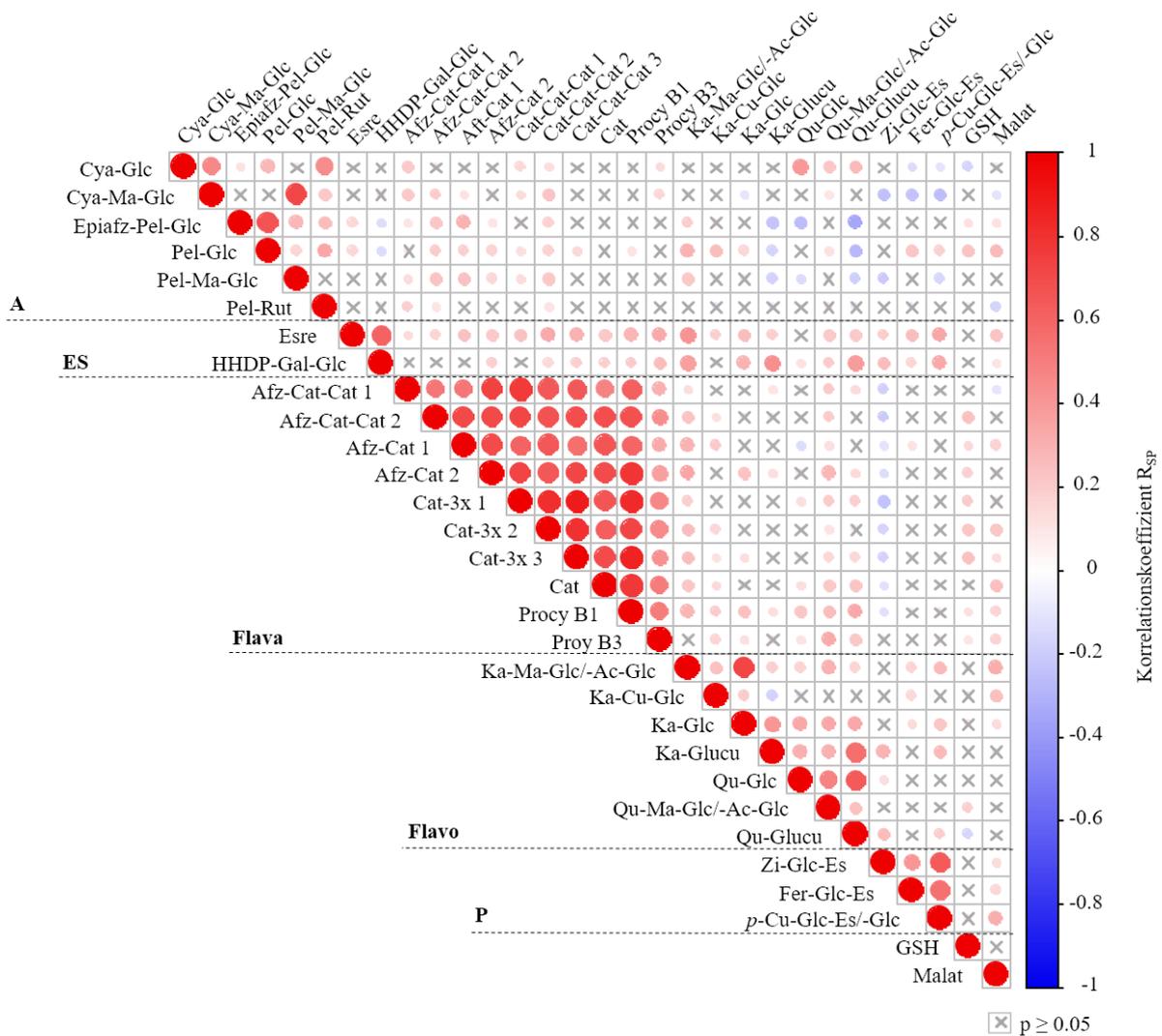


Abbildung 26: Korrelationsanalyse der Polyphenol-Gehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation. Die Punkte stellen den Korrelationskoeffizienten R_{SP} zwischen zwei Metaboliten dar, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Abkürzungen der Untergruppen: A = Anthocyane, ES = Ellagsäurederivate, Flava = Flavanole, Flavo = Flavonole, P = Phenylpropanoide. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

Auch innerhalb der anderen Polyphenol-Gruppen waren sehr viele direkte Korrelationen zu erkennen. Die zwei Ellagsäure-Derivate korrelierten mit $R_{SP} = 0,60$ und zwischen den einzelnen Phenylpropanoiden zeigten sich hohe signifikante Zusammenhänge mit R_{SP} zwischen 0,44 und 0,66.

Zwischen den verschiedenen Anthocyanen wiesen die beiden Malonyl-Glucoside Pel-Ma-Glc und Cya-Ma-Glc mit $R_{SP} = 0,72$ die höchste Korrelation auf. Die Vorstufe Cya-Glc zeigte mit Cya-Ma-Glc ebenfalls einen soliden Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,39. Pel-Glc und Pel-Ma-Glc hingegen zeigten lediglich eine schwache Korrelation ($R_{SP} = 0,17$). Darüber hinaus fand sich eine starke Wechselwirkung zwischen Pel-Glc und Epiafz-Pel-Glc ($R_{SP} = 0,72$), sowie zwischen Cya-Glc und Pel-Rut ($R_{SP} = 0,49$). Die zwei reinen Anthocyan-Glucoside korrelierten mit $R = 0,24$ nur gering, ebenso die beiden Pel-Derivate Pel-Rut und Pel-Glc ($R_{SP} = 0,31$).

Der stärkste Zusammenhang unter den Flavonolen zeigte Malonyl-Glc Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc und seine Vorstufe Ka-Glc mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,73. Die entsprechenden Quercetin-Metabolite Qu-Ma-Glc/-Ac-Glc und Qu-Glc wiesen mit $R_{SP} = 0,41$ eine ähnlich gute Wechselwirkung wie das Anthocyan-Paar Cya-Glc/Cya-Ma-Glc auf. Der Zusammenhang zwischen den beiden Flavonol-Ma-Glc war allerdings wesentlich schwächer ($R_{SP} = 0,32$) als zwischen den zwei Anthocyan-Ma-Glc. Eine deutlich bessere Korrelation wurde für die beiden Flavonol-Glucuronide mit $R_{SP} = 0,51$ beobachtet. Qu-Glucu hing darüber hinaus stark mit Qu-Glc zusammen ($R_{SP} = 0,67$). Die restlichen Korrelationen verschiedener Flavonole bewegten sich zwischen $R_{SP} = 0,17$ und 0,36. Die Ausnahme hiervon bildete Kaempferol-Cumaryl-Glucosid, dessen Konzentration mit nahezu keiner anderen Konzentration der Flavonole korrelierte. Mit Ka-Glucu zeigte sich sogar eine leicht entgegengesetzte Korrelation ($R_{SP} = -0,17$).

Die Korrelationen zwischen Metaboliten unterschiedlicher Untergruppen sind wesentlich schwächer als innerhalb einer Klasse. Zi-Glc-Es als Phenylpropanoid wies einen leichten negativen Zusammenhang mit allen Flavanolen auf (R_{SP} zwischen -0,09 und -0,26), sowie mit Cya-Ma-Glc und Pel-Ma-Glc ($R_{SP} = -0,19/ -0,20$) auf. Zwischen Fer-Glc-Es und *p*-Cu-Glc-Es/-Glc und den Flavanolen gab es keinen signifikanten Zusammenhang, mit den beiden Anthocyanidin-Ma-Glc ebenfalls einen leicht entgegengesetzten Trend ($R_{SP} = -0,14$ bis -0,18). Epiafz-Pel-Glc, Pel-Glc und Pel-Ma-Glc zeigten außerdem leicht negative Korrelationen mit Ka-Glucu, Que-Glc und Que-Glucu (R_{SP} zwischen -0,16 und -0,38). Im Gegensatz dazu fanden sich zwischen Ellagsäure sowie HHDP-Gal-Glc und nahezu allen weiteren Polyphenolen bis auf die Klasse der Anthocyane positive Korrelationen.

In Abbildung 27 wird der Zusammenhang der verschiedenen Malonyl-Glucoside und Glucoside innerhalb des GoodBerry-Datensets genauer betrachtet. Bei den Malonyl-Glucosiden (A) wurde die starke Korrelation zwischen den beiden Anthocyanidin-Glucosiden erneut deutlich, welche jedoch mit keinem der beiden Flavonol-Malonyl-Glucoside beobachtet werden konnte. Wie bereits beschrieben, fiel die Korrelation zwischen den beiden Flavonol-Malonyl-Glucosiden deutlich schwächer aus. Darüber hinaus gab es außerdem schwache Wechselwirkungen zwischen Pel-Ma-Glc und Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc ($R_{SP} = 0,24$), sowie den beiden an Position C3' hydroxylierten Derivaten Cya-Ma-Glc und Que-Ma-Glc/-Ac-Glc ($R_{SP} = 0,12$). Zwischen Ka- und Cya-Ma-Glc beziehungsweise Qu- und Pel-Ma-Glc kam es zu keinen signifikanten Korrelationen.

Für die Glucoside (B) war die stärkste Korrelation mit $R_{SP} = 0,42$ zwischen Qu-Glc und Cya-Glc zu sehen. Pel-Glc und Ka-Glc korrelierten ebenfalls, allerdings deutlich schwächer ($R_{SP} = 0,20$). Auch innerhalb der beiden Klassen waren die bereits bekannten direkten Verbindungen zwischen Pel-Glc und Cya-Glc sowie Ka-Glc und Qu-Glc zu finden. Unterschieden sich die Metabolite im Rest an Position C3' (-H/-OH), so kam es erneut zu keinen signifikanten Korrelationen, wenn sie nicht derselben Unterklasse der Polyphenole angehörten.

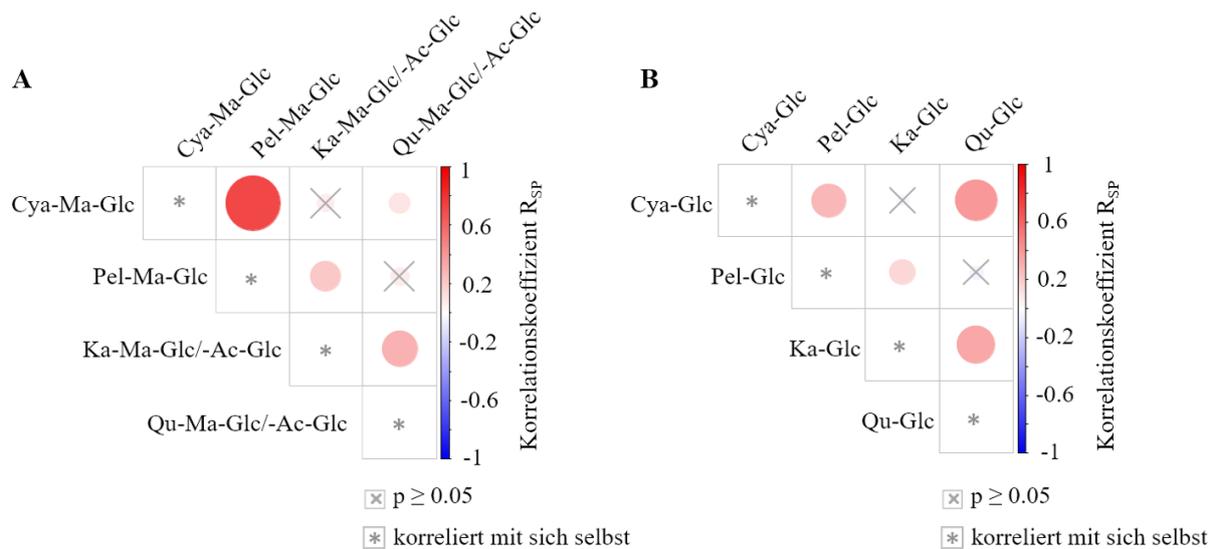


Abbildung 27: Korrelationen zwischen den verschiedenen Malonyl-Glucosiden-Gehalten (A) und den entsprechenden Glucosid-Gehalten (B). Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten R_{SP} zwischen zwei Metaboliten, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Graue Sterne stellen die Korrelation der Metaboliten mit sich selbst dar ($R_{SP} = 1$).

3.3.3.2 Polyphenole und Fra a 1

Um die Korrelationen zwischen den Polyphenolen und dem PR-Protein Fra a 1 zu berechnen, wurde das Subdatenset der Genotypen verwendet, für die der Allergengehalt bestimmt wurde (s. Kapitel 3.3.2). Die Wechselwirkung aller Polyphenole mit Fra a 1 sind in Anhang 4 zu finden. Die Beziehungen zwischen den einzelnen Sekundärmetaboliten wurden dort ausgegraut, da es nur das Subdatenset spiegelt, nicht die komplette Population. Für Fra a 1 konnten Korrelationen mit Analyten aus den Gruppen der Anthocyane und der Flavonole nachgewiesen werden. Diese sind in Abbildung 28 detailliert dargestellt.

Auffällig war, dass es sich bei allen signifikanten Wechselwirkungen um entgegengesetzte handelte. Ein hoher Allergengehalt korrelierte mit niedrigeren Anthocyan- und Flavonol-Konzentrationen. Die Werte des Korrelationskoeffizienten R_{SP} liegen dabei alle in einem sehr ähnlichen Bereich zwischen -0,23 und -0,29. In der Klasse der Anthocyane (Abbildung 28 A) standen vor allem

die Malonyl-Glucoside, sowie Cya-Glc in gegenläufiger Beziehung mit Fra a 1, während in der Gruppe der Flavonole (Abbildung 28 B) die Glucuronide und die Glucoside betroffen waren. Die Konzentrationen der Flavonol-Malonyl-Glucoside sowie Pel-Glc hingegen zeigten keine signifikante Korrelation mit dem Allergengehalt.

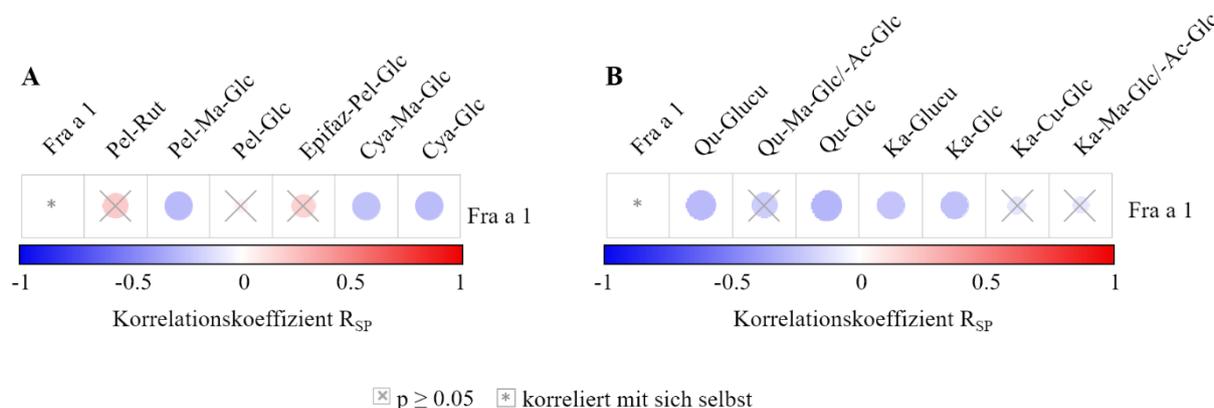


Abbildung 28: Korrelationen zwischen den Konzentrationen ausgewählter Polyphenole und des Fra a 1-Gehaltes. A: Fra a 1 und Anthocyane. **B:** Fra a 1 und Flavonole. Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten R_{SP} zwischen zwei Metaboliten, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Graue Sterne stellen die Korrelation der Metaboliten mit sich selbst dar ($R_{SP} = 1$).

3.3.3.3 Primär- und Sekundärmetabolismus

Für die Proben des Erntejahres 2017 aus IFAPA wurden neben den Sekundärmetaboliten auch die Primärmetaboliten analysiert. Die Arbeiten hierfür wurden im Zuge eines Forschungsaufenthaltes an der Universidad de Málaga in der Gruppe von Dra. Sonia Osorio, Dept. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, durchgeführt. Abbildung 29 zeigt die Korrelationen zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus für diese Proben. Es wurden deutlich weniger signifikante Wechselwirkungen zwischen den beiden Stoffwechselwegen gefunden, als innerhalb der Sekundärmetabolite oder Primärmetabolite (vgl. Abbildung 26 und Anhang 6). Bei den signifikanten Korrelationen handelte es sich außerdem überwiegend um entgegengesetzte Korrelationen.

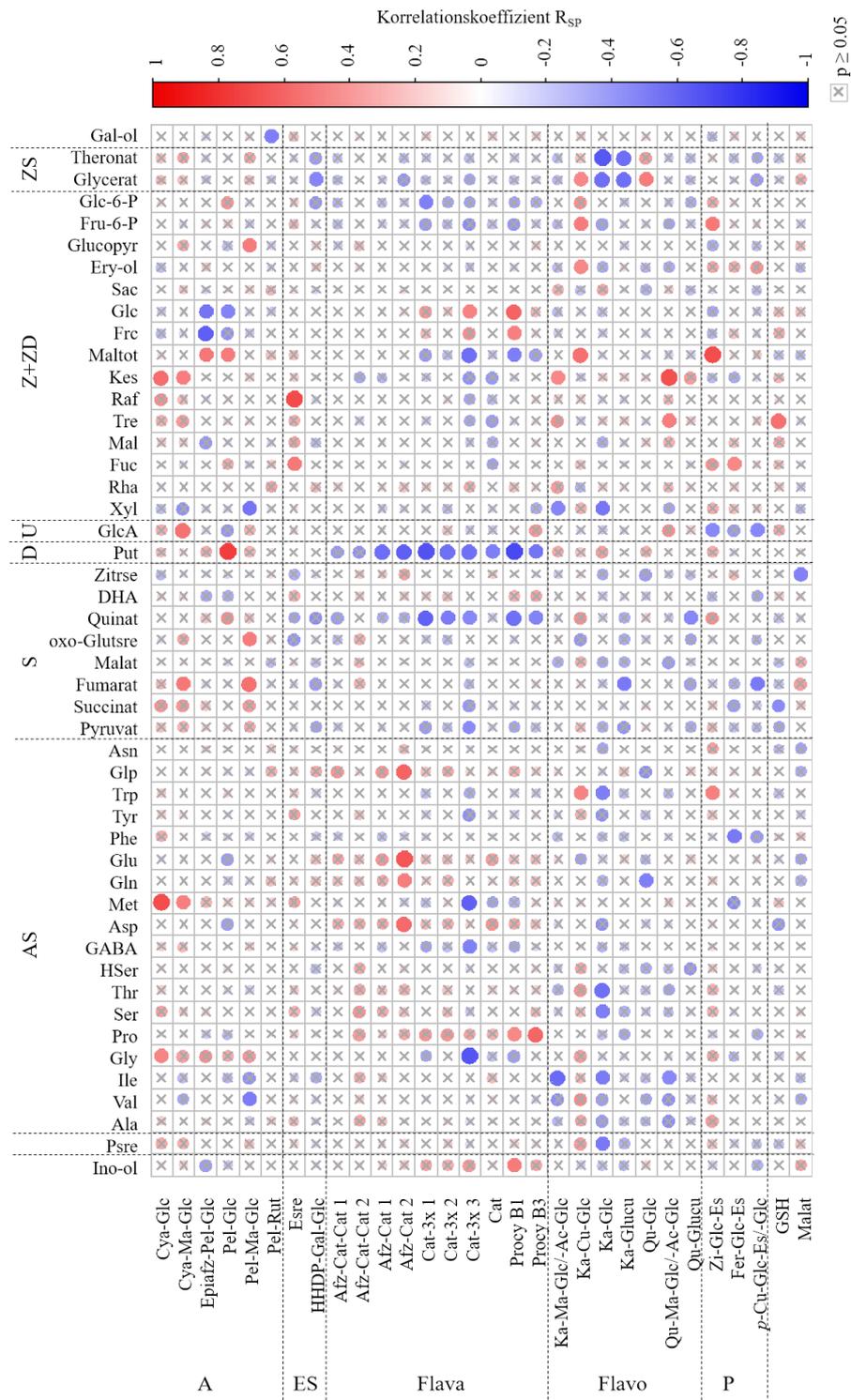


Abbildung 29: Korrelationen zwischen den Gehalten an Primär- und Sekundärmetaboliten. Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten R_{SP} zwischen zwei Metaboliten, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Abkürzungen der Untergruppen: A = Anthocyane, AS = Aminosäure, D = Diamin, ES = Ellagsäurederivate, Flava = Flavanole, Flavo = Flavonole, P = Phenylpropanoide, S = organische Säuren, U = Uronsäure, Z+ZD = Zucker und Zuckerderivate, ZS = Zuckersäuren. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

Die häufigste Wechselwirkung bestand zwischen Putrescin (Put) und der gesamten Gruppe der Flavanoole mit R_{SP} -Werten zwischen -0,45 und -0,71. Die (Epi)Catechin-Di- und Trimere standen außerdem in konkurrierender Beziehung mit Quinat ($R_{SP} = -0,31$ bis $-0,60$), welche allerdings nicht für das Monomer oder die gemischten Polymere aus (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin nachgewiesen wurden. Pel-Glc zeigte eine starke positive Korrelation mit Putrescin ($R_{SP} = 0,71$) und stellte damit die Ausnahme innerhalb der Anthocyane dar. Zwischen Epiafz-Pel-Glc und Pel-Glc und Glucose (Glc) bestand erneut eine entgegengesetzte Wechselwirkung ($R_{SP} = -0,66/-0,62$), ebenso zwischen Epiafz-Pel-Glc und Fructose (Frc) mit $R_{SP} = -0,66$. Die Korrelation zwischen Pel-Glc und Frc erwies sich als nicht-signifikant. Epiafz-Pel-Glc und Pel-Glc wiesen außerdem eine positive Korrelation mit Maltotriose auf ($R_{SP} = 0,64/0,56$), die Cyanidin-Derivate hingegen mit Kestose ($R_{SP} = 0,41/0,22$).

Kestose zeigte darüber hinaus eine direkte Wechselwirkung mit den Flavanol-Ma-Glc/-Ac-Glc ($R_{SP} = 0,45/0,61$). In der Gruppe der Flavanoole konkurrierten des Weiteren Ka-Glc und Ka-Glucu mit den Zuckersäuren Glycerat und Threonat (R_{SP} zwischen $-0,66$ und $-0,77$). Die Phenylpropanoide standen in entgegengesetzter Beziehung mit Glucuronsäure (R_{SP} zwischen $-0,38$ und $-0,50$), für Fer-Glc-Es war dieser Zusammenhang jedoch nicht signifikant.

Alle analysierten Aminosäuren korrelierten nur vereinzelt mit den Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Met mit Cya-Glc und Cya-Ma-Glc ($R_{SP} = 0,55$ und $0,34$) oder dem Flavanol-Trimer Cat-3x 3 ($R_{SP} = -0,45$), Pro mit Procy B1 und B3 ($R_{SP} = 0,42$ und $0,49$) oder Trp mit Ka-Cu-Glc und Zi-Glc-Es ($R_{SP} = 0,52/0,58$). Dabei handelte es sich jedoch um Ausnahmen. Eine klare Korrelation zwischen einer oder mehreren Aminosäuren und einer Gruppe der Polyphenole oder ein bestimmtes Korrelationsmuster wurden nicht beobachtet. Die Aminosäure Phenylalanin, welche an der Schlüsselstelle zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus steht, zeigte nur mit dem Phenylproanoid Fer-Glc-Es eine konkurrierende Wechselwirkung ($R_{SP} = -0,66$). Zu allen anderen Sekundärmetaboliten wies sie keine signifikante Korrelation auf.

Außer Quinat gab es bei den untersuchten organischen Säuren bis auf Einzelfälle ebenfalls keine weiteren auffallenden gruppenübergreifenden Wechselwirkungen. Auch für die Zucker, Zuckerderivate und Zuckersäuren gab es neben den beschriebenen paarweise aufgetretenen Korrelationen keine weiteren gehäuft direkten oder gegenläufigen Beziehungen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel.

3.3.4 Einfluss von Umwelt und Genotyp auf die Gehalte der Polyphenole und des Proteins Fra a 1

In Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 wurde bereits deutlich, dass Genotyp (G) und Umwelt (E) die Bildung verschiedener Polyphenole, sowie des allergenen Proteins Fra a 1 beeinflussen. In diesem Kapitel soll die Frage geklärt werden, wie stark die einzelnen Metabolite von den beiden Faktoren geprägt wurden. Um den Beitrag der beiden Komponenten G und E abzuschätzen, wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 zur Hilfe genommen.

Wie in Abbildung 30 unter dem Punkt „Korrelationsanalysen“ zu erkennen, zeigten die einzelnen Metabolite verschieden starke Korrelationen in Abhängigkeit der einzelnen Genotypen (Genotypeneffekt) oder Anbauländer (Standorteffekt). Dieser Zusammenhang zwischen der Konzentration der Analyten und G bzw. E kann durch den Korrelationskoeffizienten R ausgedrückt werden, welcher einen Wert zwischen 1 und -1 annehmen kann, je nach Stärke der Korrelation. Dabei bedeutet $R = 0$ keinerlei Zusammenhang zwischen der Konzentration und G oder E. Je näher R an 1 liegt, desto stärker die positive Korrelation, je näher an -1, desto stärker die negative. Umgekehrt heißt das, je näher R an 1 oder -1, desto stärker unterscheidet sich die Konzentration eines Metaboliten zwischen verschiedenen Genotypen oder an verschiedenen Standorten, desto stärker also der Einfluss von G oder E. Je weiter sich R an 0 nähert, desto kleiner der Einfluss, da sich in diesem Fall das Level eines Metaboliten in verschiedenen Genotypen oder Ländern nicht ändert. Da es dabei irrelevant ist, ob es sich um einen positiven oder negativen Zusammenhang handelt, wurde mit dem Quadrat von R, dem Bestimmtheitsmaß R^2 gearbeitet. Hierfür galt: Je größer R^2 , desto größer der Einfluss von G oder E. Nach Berechnung der R^2 -Werte für jeden Metaboliten in Abhängigkeit von G sowie E, konnten diese wiederum für jeden Analyten in einem sogenannten *Beeswarm*-Diagramm aufgetragen werden. Das Beispiel-Diagramm unter „vereinfachte grafische Darstellung“ in Abbildung 30 stellt mögliche denkbare Szenarien dar. Wird ein Metabolit ausschließlich durch genetische Faktoren beeinflusst, so finden sich ausschließlich hohe R^2 -Werte für G und gleichzeitig sehr niedrige Werte für E (Reihe „G“). Der umgekehrte Fall tritt ein für einen sehr starken Umwelteinfluss in Kombination mit nahezu keiner genetischen Einwirkung (Reihe „E“). Spielen beide Faktoren eine große Rolle in der Bildung der Metabolite, so ergibt sich Bild „G+E (stark)“, wird die Konzentration hingegen weder durch G noch durch E kontrolliert, so erhält man lediglich sehr niedrige Werte für R^2 (Reihe „keiner“). Vermischen sich beide Einflüsse, erweist sich jedoch keiner der beiden als dominant, so zeigt sich ein Muster wie „G+E“.

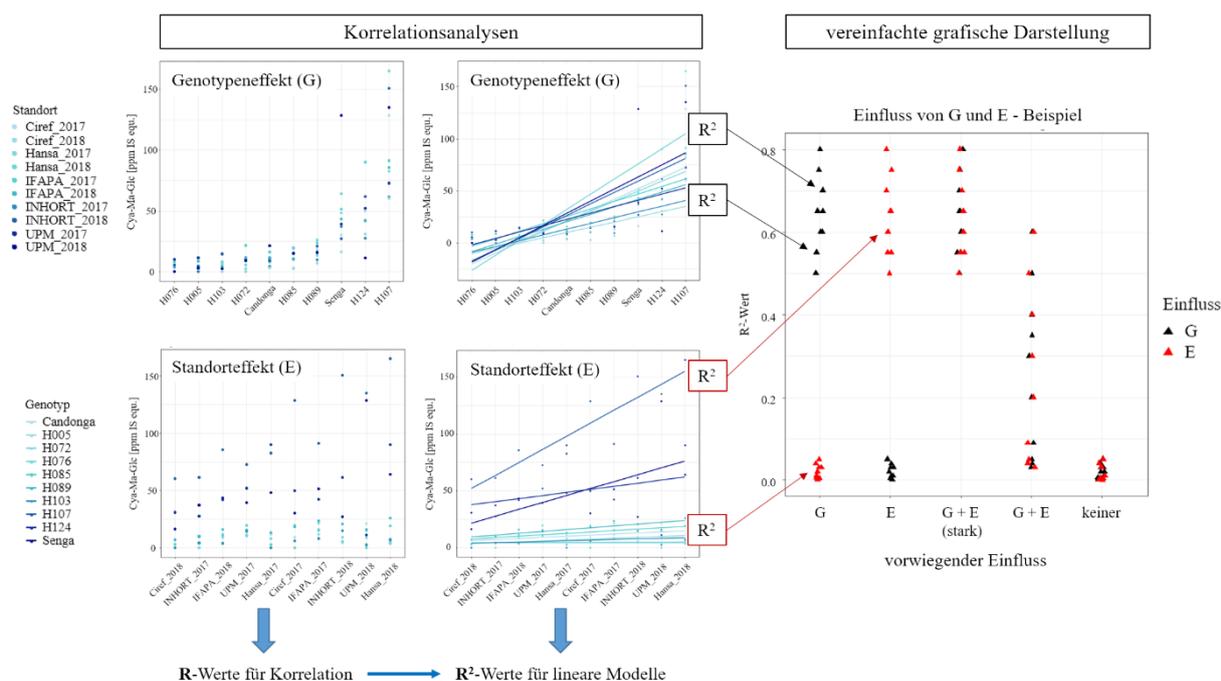


Abbildung 30: Statistischer Hintergrund zum Einfluss von Genotyp und Umwelt. G = Einfluss der Genotypen, E = Einfluss der Umwelt. **Links:** Die Auswirkung von Genotyp und Umwelt am Beispiel von Cya-Ma-Glc. **Rechts:** Beispiel einer $G \times E$ -Grafik mit verschiedenen Szenarien anhand theoretischer Daten.

Für die Kreuzungspopulation ist dieser Zusammenhang in Abbildung 30 am Beispiel von Cya-Ma-Glc dargestellt. Wie bereits in den Heatmaps in Abbildung 15 und Abbildung 18 ersichtlich, wies Cya-Ma-Glc eine starke Abhängigkeit vom Genotyp auf. Dies wurde auch in den beiden Schaubildern zum Genotypeneffekt in Abbildung 30 erneut deutlich: Die Konzentrationen variierten stark zwischen den Genotypen, was R^2 -Werte zwischen 0,28 und 0,53 (s. Abbildung 31) zur Folge hatte. In Abbildung 30 ist dies durch die ansteigenden Regressionsgeraden zu erkennen. Ein Standorteffekt war aus den Heatmaps in Kapitel 3.3.1 nicht ersichtlich. Die Korrelationsanalyse zeigte, dass für die Mehrheit der Genotypen die Cya-Ma-Glc-Konzentration nicht zusätzlich durch Umweltfaktoren beeinflusst wurde. Die Regressionsgeraden verliefen nahezu parallel zur x-Achse (Abbildung 30), was in R^2 -Werten zwischen 0,004 und 0,18 resultierte (Abbildung 31). Drei Werte zwischen 0,23 und 0,25 (Abbildung 31) bzw. drei nicht-parallele Regressionsgeraden (Abbildung 31) wiesen jedoch auf einen leichten Einfluss des Anbaulandes auf den Gehalt an Cya-Ma-Glc hin.

Als Datengrundlage für die Berechnungen der R^2 -Werte der GoodBerry-Population dienten acht Genotypen, von denen an allen fünf Standorten in beiden Anbaujahren Daten vorhanden waren, sowie die beiden Elternsorten. Dabei handelte es sich namentlich um H005, H072, H076, H085, H089, H103, H107 und H124. Die beiden Erntejahre wurden als separate Standorte betrachtet. Somit ergaben sich insgesamt zehn Genotypen und zehn Standorte. Eine Ausnahme bildeten die Werte für Fra a 1. Da hierfür die Daten an allen Standorten nur für vier Genotypen inklusive Elternsorten (H076, H103, „Senga Sengana“ und „Candonga“) verfügbar waren, wurden die R^2 -Werte für den Allergengehalt nur mit Proben aus Ciref 2017, IFAPA 2018, Hansabred 2017 und 2018 und UPM 2017 und 2018

berechnet. Bei den somit verfügbaren Genotypen handelte es sich um H050, H053, H076, H083 und H103, sowie „Candongga“ und „Senga Sengana“. Der Einfluss von G und E innerhalb der Kreuzungspopulation ist in Abbildung 31 dargestellt. Alle R^2 -Werte $\leq 0,2$ wurden als nicht signifikant eingestuft (grau). Alle $R^2 \geq 0,02$ verdeutlichen die Bedeutung von G (schwarz) oder E (rot) für die Synthese der verschiedenen Polyphenole, sowie des PR10-Proteins Fra a 1.

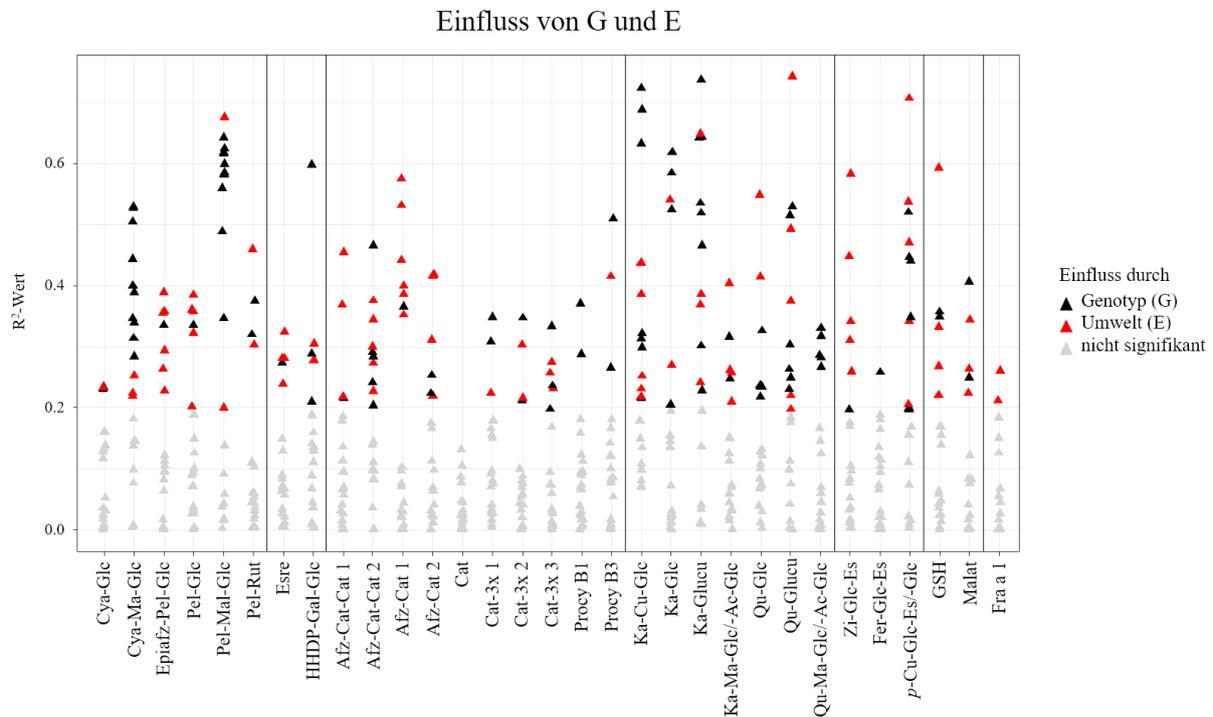


Abbildung 31: Einfluss von Genotyp und Umwelt auf die Gehalte der Sekundärmetaboliten und des Fra a 1-Proteins der GoodBerry-Kreuzungspopulation. Die Dreiecke symbolisieren den Einfluss des Genotypen G (schwarz) oder der Umwelt (rot) auf die einzelnen Metabolite. Ein graues Dreieck bedeutete keinen signifikanten Einfluss. Die vertikalen Linien dienen zur Unterteilung in die verschiedenen Unterklassen. Von links nach rechts: Anthocyane, Ellagsäurederivate, Flavonole, Flavonole, Phenylpropanoide, sonstige, Fra-Protein. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

In der Gruppe der Anthocyane stachen Cya-Ma-Glc und Pel-Ma-Glc hervor, welche beide vorherrschend durch den genetischen Hintergrund kontrolliert wurden. Pel-Ma-Glc wies dabei eine stärkere Abhängigkeit von G auf als Cya-Ma-Glc. E spielte für beide eine untergeordnete Rolle. Die restlichen Anthocyane wurden hingegen vorwiegend durch E beeinflusst. Die Bildung der beiden Ellagsäure-Derivate wurde gleichermaßen von Umwelt und Genotyp gesteuert, lediglich ein Genotyp zeigte eine größere Auswirkung auf den Gehalt an HHDP-Gal-Glc. Die Klasse der Flavonole konnte in zwei Fraktionen aufgeteilt werden: Di- und Trimere aus (Epi)Afzelechin und (Epi)Catechin und reine (Epi)Catechin-Polymere. Die erste Gruppe wurde durch eine starke Umwelt-Abhängigkeit charakterisiert, während auf die zweite Fraktion der Genotyp einen größeren Einfluss ausübte. Das Monomer Catechin zeigte sich weder durch E noch durch G signifikant geprägt. Bei der Betrachtung der beiden Malonyl-Glucoside in der Gruppe der Flavonole, wurde für Qu-Ma-Glc/-Ac-Glc

ausschließlich eine Beeinflussung durch den Genotyp nachgewiesen, ähnlich wie für die beiden Anthocyanidin-Ma-Glc. Die ermittelten R^2 -Werte waren für Qu-Ma-Glc/-Ac-Glc allerdings etwas niedriger als für Pel und Cya, was einen etwas schwächeren Einfluss nahelegte. Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc hingegen zeigte, wie bereits in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, erneut ein anderes Verhalten: Es fanden sich zwar ebenfalls Hinweise auf die Bedeutung des genetischen Hintergrundes für die Synthese von Ka-Ma-Glc/-Ac-Glc, stärker als die Konzentrationen der anderen Malonyl-Glucoside hing der Gehalt jedoch auch von den Anbaubedingungen ab. Die restlichen Ka- und Qu-Derivate zeigten sich von beiden Komponenten G und E geprägt. Der Genotyp erwies sich dabei als einflussreicher auf die Ka-Derivate, die Qu-Derivate hingegen zeigten einen etwas höheren Einfluss der Umwelt auf. In der gesamten Gruppe der Flavanole spiegelte sich ein sehr ausgeprägtes Zusammenspiel aus G und E wider.

Die Phenylpropanoide verhielten sich sehr unterschiedlich. Für Zi-Glc-Es fand sich überwiegend die Kontrolle durch Umweltfaktoren, während für *p*-Cu-Glc-Es/-Glc die Wirkung von G und E zu sehen war. Fer-Glc-Es hingegen zeigte sich weder durch G noch durch E signifikant beeinflusst. GSH und Äpfelsäure zeichneten sich durch eine Kombination aus Genotypen- und Standort-Effekten aus. Für die Produktion des Allergens Fra a 1 konnte lediglich ein geringer Einfluss der Umwelt nachgewiesen werden.

3.4 CAD-Pflanzen

Für das CAD-Projekt wurden von der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe drei transgene *Fragaria*-Linien (F62, F63 und F64), sowie eine Kontrolllinie der Sorte „Mieze Schindler“ zur Verfügung gestellt. In den Pflanzen von F62, F63 und F64 war das Enzym Zimtalkohol-Dehydrogenase unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S Promotors konstitutiv exprimiert. Mit Hilfe verschiedener analytischer Verfahren sollten Unterschiede zwischen der Kontrolllinie und den Transgenen nachgewiesen werden. Im ersten Erntejahr (2018) wurde von allen Linien die Textur der roten Früchte an Hand eines *Texture Analyzers* bestimmt. Außerdem wurde mittels LC-MS ein Polyphenolprofil der Früchte in verschiedenen Reifestadien, sowie von Blätter- und Wurzelproben erstellt. Im zweiten Erntejahr (2019) wurde die Zusammensetzung der flüchtigen Komponenten mit Hilfe von GC-MS analysiert.

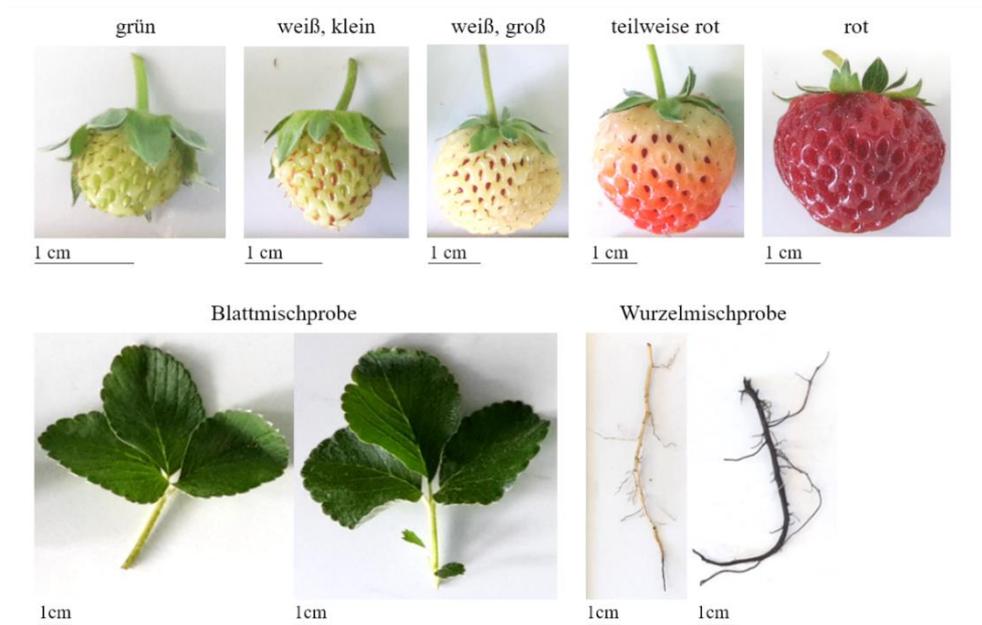


Abbildung 32: Verschiedene Reifestadien und Gewebeproben der CAD-Pflanzen. Für die Blatt- und Wurzelmischproben wurden junge und alte Blätter bzw. Wurzeln gesammelt und gemeinsam extrahiert.

In Abbildung 32 sind die verschiedenen Reifestadien der Früchte zum jeweiligen Erntezeitpunkt, sowie die Zusammensetzung der Blatt- und Wurzelmischproben zu sehen. Zwischen den transgenen Linien und der Kontrolle waren keine physiologischen Unterschiede erkennbar.

3.4.1 Textur

Für die Texturmessung wurden reife Erdbeeren direkt nach der Ernte halbiert und die Fruchthälften vermessen. Für jede Messung ergab sich eine Kraftkurve wie in Abbildung 33 A zu sehen. Die Kraftmaxima (Peak Force Cycle 1) der einzelnen Hälften sind in Abbildung 33 B für jede Linie aufgetragen.

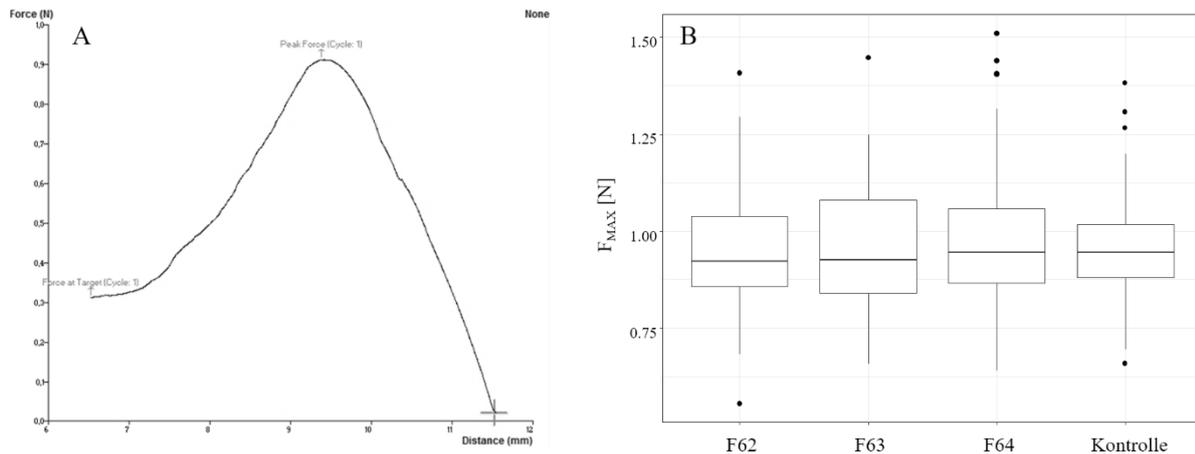


Abbildung 33: Texturmessung der CAD-Erdbeer-Früchte. **A:** Typischer Kraftkurvenverlauf. Kurvenmaximum Peak Force = F_{MAX} . **B:** Ergebnis der Texturmessung. Eine Box stellt alle Messwerte einer transgenen Linie F62 – F64 bzw. der Kontrolllinie dar. Die durchgezogene Linie markiert den Median. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet.

Es zeigte sich weder zwischen den transgenen Linien, noch im Vergleich von F62-64 mit der Kontrolllinie ein Unterschied in der Textur der Früchte. Der Median lag für alle Proben zwischen 0,92 N (F62) und 0,95 N (F64). Auch nach Kruskal-Wallis ergab sich kein signifikanter Unterschied innerhalb des Datensets ($p = 0,84$).

3.4.2 Polyphenole

Mit Hilfe von LC-MS Analysen wurden von verschiedenen Reifestadien der Kontrolllinie und der transgenen Linien ein Polyphenolprofil der Früchte, sowie von Blätter- und Wurzelproben erstellt. Das Polyphenol-Profil aller „Mieze-Schindler“-Früchte veränderte sich über die verschiedenen Reifestadien. Die Anthocyane wurden erst in späteren Fruchtstadien gebildet (Abbildung 34). Ebenso stiegen die Konzentrationen der Phenylpropanoide mit zunehmender Fruchtreife. Vertreter der Flavanole, Flavonole und Ellagsäurederivate hingegen nahmen mit der Entwicklung von grün nach rot ab. In den Blättern fanden sich große Mengen an Ellagsäurederivaten, Flavanolen und Flavonolen, sowie *p*-Cu-Glc-Es/-Glc. Die höchsten Flavanol-Konzentrationen konnten in Wurzeln nachgewiesen werden, neben Ellagsäurederivaten und Kaf-Glc-Es. Abbildung 34 zeigt beispielhaft die Entwicklung einzelner Polyphenole in den Früchten, sowie den Gehalt in Wurzeln und Blättern.

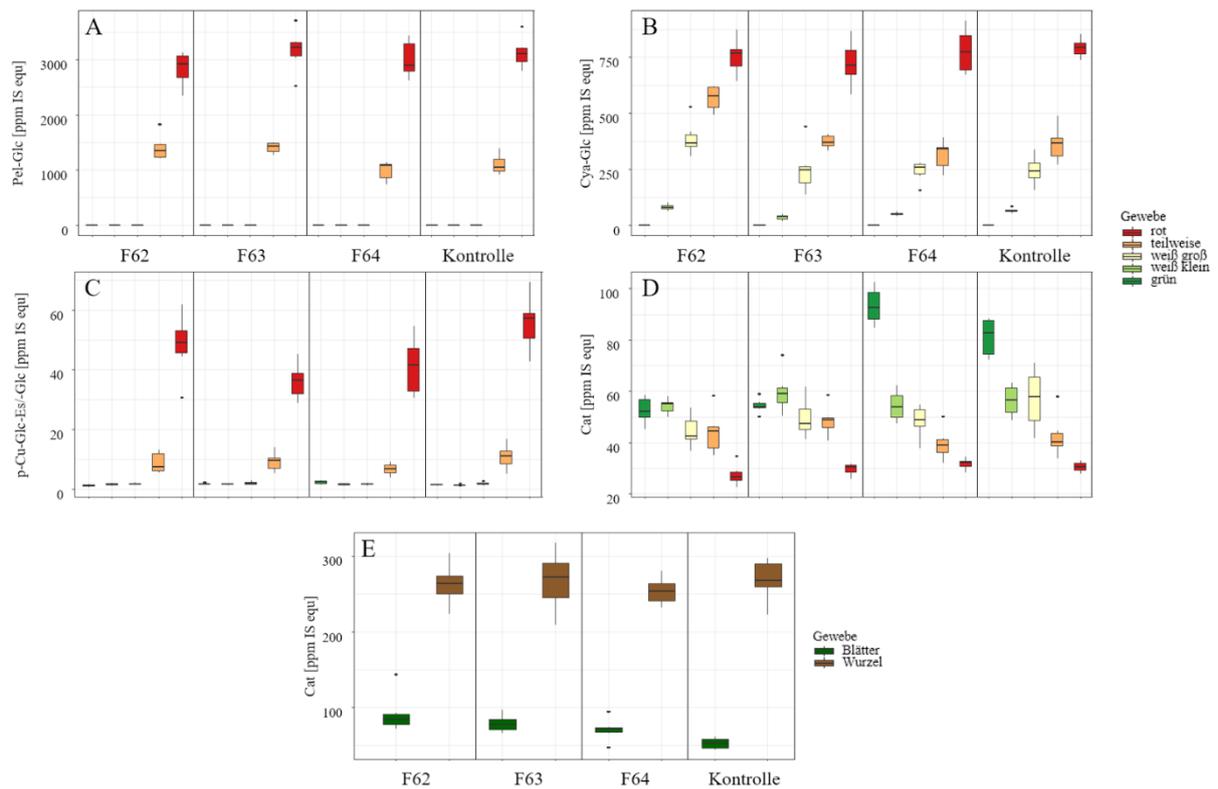


Abbildung 34: Polyphenol-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzengeweben bzw. Reifestadien der CAD-Linien. Gezeigt sind die beiden Anthocyane Pel-Glc (A) und Cya-Glc (B), sowie *p*-Cu-Glc-Es-/Glc (C) und Catechin (D) in Früchten verschiedener Reifestadien (grün bis rot) und in Blätter- und Wurzelproben Catechin (E). Eine Box repräsentiert jeweils sechs Replikate einer Linie. Die durchgezogene Linie markiert den Median. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet.

Dabei wird deutlich, dass es zwar die beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzengeweben und Reifestadien gab, jedoch keine deutlichen Differenzen zwischen der Kontrolllinie und den transgenen Linien F62, F63 und F64. Für Catechin (Abbildung 34 D) schienen sich die Linien zunächst zu unterscheiden, mit zunehmender Reife glichen sich die Metabolitenlevel jedoch an. Auch für die restlichen Metabolite ergaben sich für einzelne Linien oder Reifestadien abweichende Werte. Allerdings zeichnete sich kein eindeutiger universal geltender Unterschied zwischen allen transgenen Linien und der Kontrolle ab. Um kleinere, aber dennoch signifikante Differenzen zu ermitteln wurden daher mittels *t*-Test die Signifikanzen für jede transgene Linie im Vergleich mit der nicht modifizierten Linie berechnet. Abbildung 35 veranschaulicht die Konzentrationen der einzelnen Metabolite in F62, F63 und F64 als Äquivalente der Kontrolle. Ein Verhältnis von 1 (weißes Feld) bedeutet die gleiche Menge in transgener Linie und Kontrolle. Rot verdeutlicht größere Mengen in der jeweiligen transgenen Pflanze, während blau niedrigere Gehalte im Vergleich zur Kontrolle darstellt.

rot			teilweise rot			weiß, groß			weiß, klein			grün			Blätter			Wurzeln			
F62	F63	F64	F62	F63	F64	F62	F63	F64	F62	F63	F64	F62	F63	F64	F62	F63	F64	F62	F63	F64	
			**			**			*	**	*										Cya-Mal-Glc
			**			*			**	**	**										Cya-Glc
**		*																			Epiafz-Pel-Glc
			*	**																	Pel-Glc
**			*	**		*															Pel-Mal-Glc
			**			*							*	**		**	**		**		Esre
	**	*										**	**								HHPD-Gal-Glc
		*									*	**	**	*	**	**	**	**			Afz-Cat 1
											**	**	*	*	*			**			Afz-Cat 2
						*					**	**	*	*	**	*					Cat
			*								*					*					Procy B1
											**	*	**	**		*					Procy B3
		*	**				**				**	**		*	**						Ka-Cu-Glc
	*	*	*			*		**			**		*			**					Ka-Glc
						*		*		**	**	**	*	*		**					Ka-Glucu
			*					**			**										Ka-Ma-Glc
**						*					*		*	*	*						Qu-Glc
	*	**						**					*	*	**						Qu-Glucu
																			**		Fer-Glc-Es
	**	**		*								*	**	*	**						Kaf-Glc-Es
	*	*																			p-Cu-Glc-Es/-Glc
	*	*		*	**		*														Zi-Glc-Es
*	*		*	**		*								*	*						GSH
			*	*							**	**		*	*	**		*	**		Malat

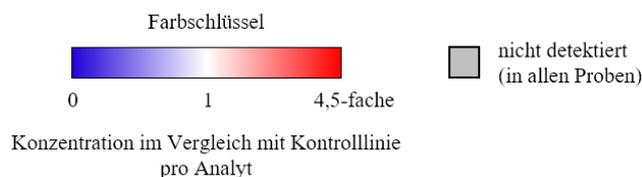


Abbildung 35: Polyphenol-Profil der transgenen CAD-Pflanzen im Vergleich zur Kontrolllinie. Jede Spalte stellt den Mittelwert aus sechs Replikaten einer Probe dar. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin. Analyten mit grauen Feldern wurden weder in der Kontrolllinie noch in den Linien F62-F64 detektiert. Signifikanzen nach *t*-Test zwischen Kontrolle und den transgenen Linien sind mit * ($p \leq 0,05$) bzw. ** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

In den roten Früchten fanden sich in allen transgenen Linien vorwiegend niedrigere Gehalte an Sekundärmetaboliten als in der Kontrolle. Signifikante Unterschiede zeigten sich vereinzelt in den Gruppen der Anthocyane, Ellagsäurederivate und Phenylpropanoide, sowie für drei Flavonole. Im teilweise roten Stadium fiel vor allem F62 aus der Reihe mit signifikant höheren Anthocyan- und Flavonol-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu wies F64 in allen Bereichen niedrigere Konzentrationen als die Kontrolle auf. Es handelte sich jedoch nicht um signifikante Unterschiede. Auch für große weiße und kleine weiße Früchte lagen die Hauptunterschiede in den Anthocyanen und Flavonolen. Signifikante Differenzen blieben auch hier meist Einzelfälle. Lediglich Cya-Ma-Glc und Cya-Glc zeigten in allen

transgenen Linien signifikant andere Mengen als in der Kontrolllinie. Allerdings fanden sich in F63 und F64 niedrigere in F62 hingegen höhere Gehalte. Die meisten und einheitlichsten Unterschiede zwischen transgenen und nicht-modifizierten Pflanzen waren in grünen Früchten und Blättern zu sehen. Grüne Früchte der Linien F62 und F63 enthielten signifikant niedrigere Flavanol- und Flavonol-Konzentrationen als die Kontrolle. F64 wies nur leicht, aber dennoch signifikant größere Mengen an Flavanol, sowie Ellagsäure und HHDP-Gal-Glc auf. In Blättern zeigten sich ebenfalls linienübergreifend höhere Flavanol-Gehalte. Die Klasse der Flavonole beinhaltete für die Linien F62 und F64 zwar viele signifikante Unterschiede, allerdings handelte es sich dabei je nach Metabolit um höhere oder niedrigere Konzentrationen als in der Kontrolle. Darüber hinaus wurden deutlich größere Mengen des Phenylpropanoids *p*-Cu-Glc-Es/-Glc detektiert. Weitere Phenylpropanoide konnten in den Blattproben nicht identifiziert werden. Wurzelproben zeichneten sich durch sehr hohe Flavanol-Konzentrationen aus, dabei gab es jedoch nahezu keine Differenzen zwischen den transgenen Linien und der Kontrolle. Auch in den übrigen Metaboliten gab es meist keine signifikanten Unterschiede.

Ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolllinie und allen drei transgenen Linien wurde durch die zielgerichtete Analyse bekannter Metabolite auch im Polyphenol-Profil der CAD-Pflanzen nicht gefunden.

3.4.3 Flüchtige Naturstoffe (Volatile organic compounds, VOCs)

Durch die Analyse der flüchtigen Komponenten in den Extrakten reifer Früchte mittels GC-MS konnten 31 Metabolite, sowie der interne Standard Menthol identifiziert und qualifiziert werden. Bei fast der Hälfte der Analyten handelte es sich um Ester (15), gefolgt von Säuren (6), Aldehyden (4) und Alkoholen (2). Außerdem fanden sich jeweils ein Lacton und Phenylpropanoid, sowie Furaneol und Mesifuran. Die genaue Identifizierung ist in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Abbildung 36 zeigt den Vergleich der Konzentrationen der einzelnen VOCs als Äquivalente des internen Standards Menthol zwischen der transgenen Linie F64 (weiß) und der Kontrolle „Mieze Schindler“ (grau).

In den ersten drei Reihen in Abbildung 36 finden sich fast alle identifizierten Ester. Weitere sind in Reihe 4 (Benzylacetat), Reihe 5 (Hexyl-Acetat) und Reihe 8 (Lauryl-Acetat) vorhanden. Es gab Ester mit höheren Konzentrationen in F64 (z. Bsp. Methyl-Hexanoat und Methyl-Nicotinat) oder höheren Konzentrationen in der Kontrolle (z. Bsp. Octyl-Butanoat und Methyl-Acetat). Die meisten Ester waren jedoch im Median in nahezu gleichen Mengen in beiden Linien vorhanden (z. Bsp. Ethyl-Butanoat, 1-Methylethyl-Butanoat oder Methyl-2-Hexenoat). Trotz fehlender eindeutiger Differenzen zwischen F64 und Kontrolle zeigte sich unter den Methyl- und Ethyl-Estern die Tendenz, in der transgenen Linie in größeren Mengen vorhanden zu sein. Des Weiteren schwankten für diese Ester die Gehalte in F64-Früchten sehr stark. Die Messwerte der Kontrolle lagen für 1-Methylethyl-Butanoat und -Hexanoat,

Ethyl-Butanoat und –Hexanoat, Methyl-Hexanoat, Methyl-2-Hexenoat und Methyl-Anthranilat für alle Replikate innerhalb eines kleinen Messbereiches.

Die Konzentrationen für dieselben Metabolite wiesen in F64 Abweichungen um den Faktor 3 bis 30 auf. Am stärksten betroffen von dieser Schwankung war der für „Mieze Schindler“ charakteristische Ester Methyl-Anthranilat. Auch wenn der Median der Messwerte sich für viele der Ester nicht deutlich unterschied, so wurden sie in den Früchten der Kontrolllinie zumindest in stabileren Konzentrationen nachgewiesen.

Die Säuren (in Reihe 4 (Benzoessäure), 5 (2-Hexensäure) und 6 zu finden) waren stets in höheren Gehalten in der Kontrolle präsent, mit Ausnahmen von Benzoessäure (gleiche Konzentration in F64 und Kontrolle). Von den Aldehyden (Reihe 4 (Benzaldehyd), 5 (Hexanal, (E)-2-Hexenal) und 7 (Nonanal)) wurden durchweg in der Kontrolle höhere Mengen synthetisiert. Die beiden Alkohole hingegen wiesen erneut gegensätzliches Verhalten auf, mit Benzylalkohol (Reihe 4) in höheren Konzentrationen in der Kontrolle, 1-Nonanol (Reihe 7) hingegen in größeren Menge in F64. Furaneol, Mesifuran, γ -Dodecalacton und Zimtsäure (Reihe 7 und 8) waren im Median in größeren Mengen in der unveränderten Kontrolllinie zu finden.

Trotz der zahlreichen Abweichungen zwischen den Früchten der transgenen und der nicht-modifizierten Linie, konnten lediglich für Benzaldehyd und Benzylalkohol signifikant niedrigere Gehalte in F64 nachgewiesen werden. Für alle anderen untersuchten Metabolite ergab sich nach *t*-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % keine signifikante Differenz. Es blieb auch mit der Analyse der VOCs lediglich bei leichten Tendenzen der Beeinflussung der „Mieze Schindler“-Früchte durch die Überexpression des CAD-Enzyms.

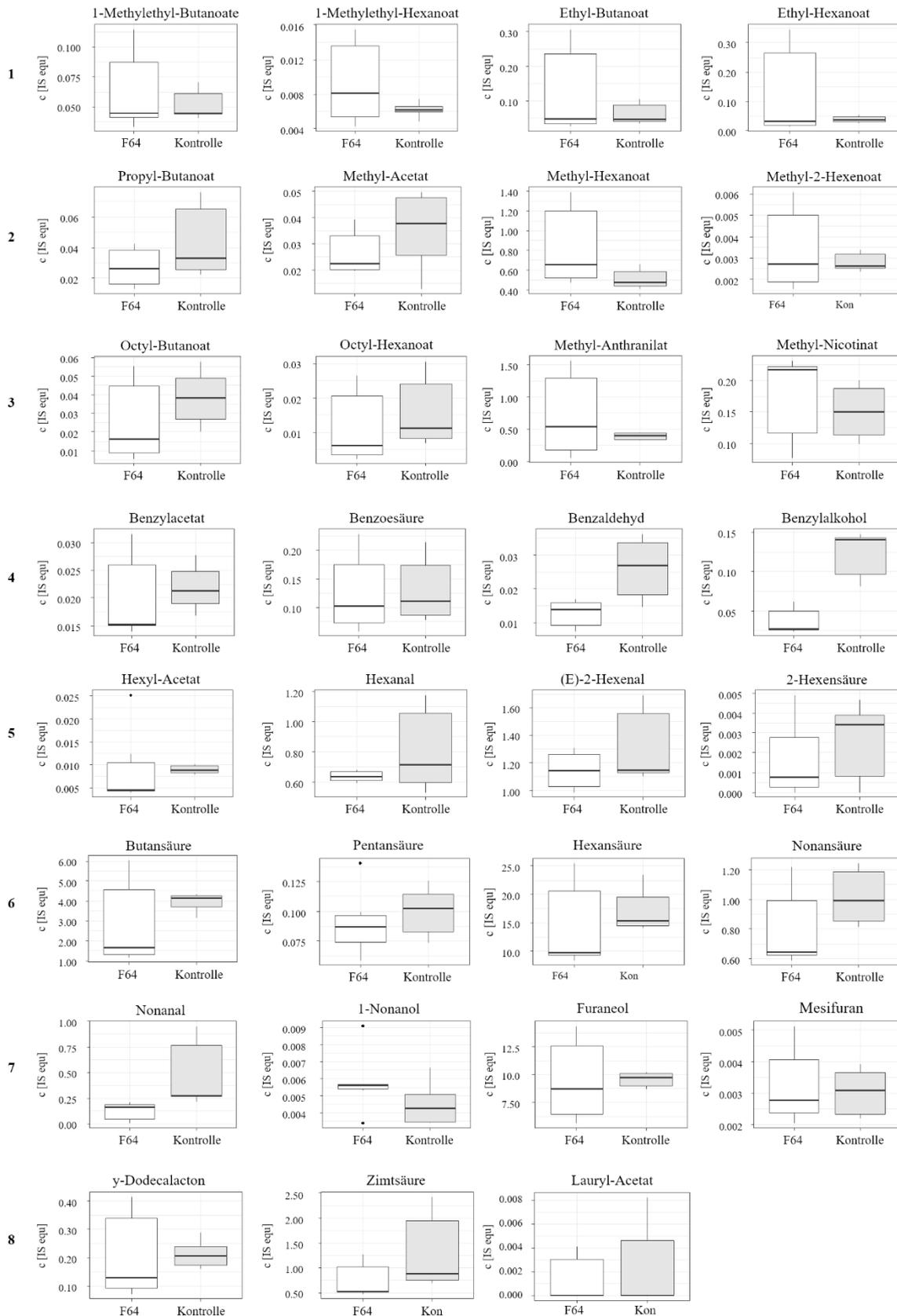


Abbildung 36: Konzentrationen der flüchtigen Komponenten in F64 und der Kontrolllinie. Die Konzentrationen wurden mittels GC-MS analysiert und als IS equ berechnet. Eine Box repräsentiert jeweils sechs Replikate einer Linie (drei biologische \times zwei technische Replikate). Die durchgezogene Linie markiert den Median. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet. Die Boxen der Kontrolllinie sind grau gefärbt.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung der Phenylpropanoide in *Fragaria*

Phenylpropanoide liegen in Pflanzen zur besseren Stabilisierung und Löslichkeit in glycosylierter Form vor (Bravo, 1998; Ververidis *et al.*, 2007; Hanhieva *et al.*, 2011). Da mit Ausnahme der Zimtsäure alle Phenylpropanoide sowohl eine Säure-Gruppe, als auch eine oder mehrere Hydroxy-Gruppen aufweisen (s. Abbildung 5), besteht die Möglichkeit, dass sie in der Natur als Zucker-Ester oder als Glykoside vorliegen. Daher wurden mit Hilfe gentechnisch veränderter *E. coli*-Bakterien die entsprechenden Referenzsubstanzen synthetisiert. Drei der genutzten GVOs exprimierten die Proteinsequenz verschiedener Glycosyltransferasen (GT) zur Katalyse von Ester-Bindungen, zwei weitere für die Synthese der Glykoside (vgl. Tabelle 6). Bei der Verwendung von Zimtsäure als Edukt konnte der Zimtsäure-Glucose-Ester gebildet und mittels LC-MS² nachgewiesen werden. UGT72G27 und UGT73A15, welche die Synthese der Glykoside katalysieren, setzten Zimtsäure nicht um (s. Anhang 1). Die selektive Umsetzung der Zimtsäure durch Ester-bildende GTs wurde bereits ausführlich untersucht. Außer Zimtsäure akzeptierte rekombinantes FaGT2-Protein (UGT84A41) zudem *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure als Substrate (Lunkenbein *et al.*, 2006a). In dieser Arbeit wurde ebenfalls UGT84A41 aus *Fragaria* zur Synthese der Ester eingesetzt. Darüber hinaus wurden mit UGT84A49 aus Erdbeere und UGT84A43 aus Himbeere zwei weitere Enzyme derselben UGT-Subfamilie eingesetzt, die ebenfalls die Bildung von Esterbindungen katalysierten. Somit konnten die Produkte aller getesteten Phenylpropanoide je nach verwendeter GT als „Glucosid“ oder „Ester“ klassifiziert werden.

Neben der Einteilung über die jeweilige GT zeigten sich für die gebildeten Ester und Glucoside auch unterschiedliche MS²-Fragmentierungsmuster. Patras *et al.* (2018) beschrieben unter sehr ähnlichen Messbedingungen, dass die Glucose-Einheit der Glucoside stets intakt abgespalten wurde, erkennbar durch einen neutralen Massenverlust von -162 Da. Die durch UGT72G27 und UGT73A15 gebildeten Phenylpropanoid-Glucoside zeigten ebenfalls diese charakteristische Fragmentierung (s. Abbildung 12 und Anhang 1). Sie führte zur Bildung des einfach negativ geladenen Ions der Aglykone [M-H]⁻. Eine weitere Abspaltung von Kohlenstoffdioxid wurde für *p*-Cumarsäure geschildert und führte zu einem Fragment-Ion mit *m/z* 119 (Patras *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnte die Abspaltung von CO₂ mit 44 Da aus dem Aglykon für alle Cumarsäure-Derivate, sowie Kaffeesäure beobachtet werden. Durch die Fragmentierung der Ester-Verbindungen entstand ebenfalls das Aglykon [M-H]⁻ als Haupt-Fragment-Ion im MS²-Spektrum. Daneben fanden sich jedoch zahlreiche weitere Peaks, was nahelegt, dass die Glucose-Einheit der Ester-Bindung nicht immer intakt freigesetzt wurde. Nach Patras *et al.* (2018) kann es bei Ester-Derivaten auch zur partiellen Abspaltung von C₂H₄O₂, C₃H₆O₃ oder C₄H₈O₄-Fragmenten aus dem Zuckerring kommen, welche einen Massenverlust

von -60 Da, -90 Da oder -120 Da zur Folge haben. Die Abtrennung eines Fragmentes mit der Masse 60 Da zeigte sich auch in dieser Studie für die Fragmentierung des synthetisierten Ferulasäure-Glucose-Esters, Sinapinsäure-Glucose-Esters und aller Cumarsäure-Glucose-Ester (s. Abbildung 12 und Anhang 1).

Die Kombination spezifischer MS²-Fragmentierungen und der selektiven Synthese der Ester und Glucoside durch verschiedene GTs ermöglichte eine eindeutige Identifizierung aller Referenzsubstanzen. Da in den Fruchtexttrakten die Konzentrationen der einzelnen Metabolite teilweise zu gering waren, um eindeutige MS²-Fragmentierungs-Muster zu generieren, wurden die vermuteten Phenylpropanoide in den Erdbeerproben zusätzliche mit Hilfe einer Co-Chromatographie bestätigt. Lediglich für *p*-Cu-Glc-Es/-Glc ergab sich auch über die Co-Chromatographie keine eindeutige Zuordnung (vgl. Abbildung 13). In der Literatur werden Phenylpropanoid-Zucker-Derivate überwiegend als Hexoside oder P-Glucose angegeben. Eine genaue Identifizierung als Ester oder Glucosid erfolgt oft nicht (Kajdžanoska *et al.*, 2010; Hanhieva *et al.*, 2011; Aaby *et al.*, 2012). Patras *et al.* (2018) beschreiben zwei Isomere des *p*-Cu-Glc-Es in Erdbeere, welche sich lediglich in der Stellung der Hydroxy-Gruppe an Position 1 der Glucose unterscheiden (α -Glc und β -Glc). Die NMR-Analyse einiger *p*-Cumaryl-Verbindungen aus Erdbeerblättern bewies, dass auch bei komplexeren Molekülen die Verknüpfung der *p*-Cumarsäure und verschiedenen Glucose-Derivaten immer über die Säuregruppe unter Bildung des Esters abläuft (Hanhineva *et al.*, 2009). Da in dieser Arbeit alle weiteren Phenylpropanoide der Erdbeer-Extrakte als Ester identifiziert wurden (Zi-Glc-Es, Ka-Glc-Es, Fer-Glc-Es), liegt die Annahme nahe, dass es sich auch bei dem *p*-Cumarsäure-Derivat um den Ester handelt.

4.2 Polyphenolprofil der GoodBerry-Kreuzungspopulation

Bei den untersuchten Polyphenolen in der Kreuzungspopulation aus „Candonga“ und „Senga Sengana“ handelte es sich um Vertreter der Anthocyane, Flavanole, Flavonole und Phenylpropanoide. Daneben konnten zwei Ellagsäurederivate, GSH und Äpfelsäure nachgewiesen werden. Die Identifizierung der einzelnen Metabolite (s. Tabelle 11 und Tabelle 12) stimmen mit Angaben in der Literatur überein (Hanhieva *et al.*, 2011; Giampieri *et al.*, 2012; Aaby *et al.*, 2012). Die Analyten wiesen dabei je nach Standort und Genotyp variierende Konzentrationen auf. Die Elternsorten stellten einen kontrastierenden Genpool zur Synthese der Polyphenole, welcher durch die unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Unterklassen sichtbar wurde. So fanden sich in „Candonga“ beispielsweise relativ hohe Gehalte der Flavanole, während „Senga Sengana“ größere Mengen an Anthocyanen synthetisierte (vgl. Abbildung 18). Diese Eigenschaften fanden sich in den Genotypen der F1-Generation in unterschiedlicher Zusammensetzung wieder. Die Randminima und –maxima wurden dabei nicht in den Eltern, sondern in einzelnen F1-Genotypen gemessen. Je nach Metabolit variierte die genaue Verteilung der Proben. Dieses Verhalten ist für Polyphenole in Erdbeere (Urrutia *et al.*, 2016), aber auch in Traube (Hernández-Jiménez *et al.*, 2013) oder Himbeere (Stewart *et al.*, 2007) bekannt. Außerdem lässt es sich auch auf weitere Qualitätsmerkmale von Erdbeerfrüchten, wie zum Beispiel den Vitamin C-Gehalt oder flüchtige Aromastoffe (Olbricht *et al.*, 2007; Cruz-Rus *et al.*, 2011) und phänotypische Merkmale wie Pflanzengröße, Fruchtform und –größe (Olbricht *et al.*, 2007; Cruz-Rus *et al.*, 2011, 2011; Urrutia *et al.*, 2015) ausweiten. Einzelne Genotypen der GoodBerry-Population (H072 und H076, s. Abbildung 18) zeigten ein sehr ähnliches Polyphenol-Profil wie die Mutter „Candonga“. Es wurde mit Hilfe der Analyse genetischer Marker (*Diversity arrays technologies* und *Affymetrix*) von Projektpartnern aus Frankreich (Dr. Béatrix Denoyes, INRA) und Spanien (Dr. Irida Amaya Saavedra, IFAPA) bestätigt, dass es sich auch bei diesen beiden Genotypen um heterozygote Nachkommen handelt. Die GoodBerry-Segregationspopulation und das Subset ausgewählter Genotypen verhielten sich also vergleichbar mit anderen zuvor untersuchten Kreuzungspopulationen. Sie waren somit geeignet, den Zusammenhang einzelner Metabolite weiter zu untersuchen, um mögliche Rückschlüsse auf deren Synthese in der Pflanze zu gewinnen, sowie den Einfluss von Genotyp und Umwelt dabei zu analysieren.

4.2.1 Biosynthese der Polyphenole

Innerhalb der GoodBerry-Population wiesen einzelne Subgruppen auffallende Charakteristika auf. Dabei handelte es sich um die gesamte Klasse der Flavanole, sowie einzelne Metabolite der Anthocyane und der Flavonole. Im Folgenden werden Analyten dieser Untergruppen, sowie die Beziehung zwischen Metaboliten verschiedener Polyphenol-Klassen näher betrachtet.

4.2.1.1 Flavanole

Charakteristisch für die Gruppe der Flavanole erwiesen sich sehr ähnliche relative Konzentrationen aller Metabolite innerhalb eines Genotyps. Dies zeigte sich bereits deutlich in den Heatmaps (s. Abbildung 15 und Abbildung 18). Die Korrelationsanalysen deckten zusätzlich sehr enge Zusammenhänge innerhalb dieser Fraktion auf (s. Abbildung 26). Die Korrelationskoeffizienten reichten von 0,35 bis zu 0,90. Wurde viel Catechin nachgewiesen, so lagen auch die Di- und Trimere in großen Mengen vor und umgekehrt. Von großer Bedeutung für die Synthese aller Flavanole ist also zunächst die Bildung des Monomers (Epi)Catechin. Für die Umsetzung der Vorstufen Leucocyanidin und Leucopelargonidin bzw. Cyanidin und Pelargonidin zu den jeweiligen Flavanol-Monomeren sind zwei Reduktasen verantwortlich, LAR und ANR (Ververidis *et al.*, 2007; Carbone *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2014). In Samen der Pflanze *Medicago truncatula* konnte der direkte Zusammenhang zwischen ANR und der Synthese der Flavanole bereits nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2016). Auch in transgenen *Fragaria* × *ananassa* Früchten verursachte die Herabregulierung von ANR im reifen Stadium geringere Konzentrationen des Monomers Catechin sowie verschiedener Flavanol-Dimere im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Früchten (Fischer *et al.*, 2014). Doch auch die Umwandlung der Anthocyane in die gebildeten Glucoside durch Glucosyl-Transferasen hat Auswirkungen auf die Bildung der Flavanole, wie *in vivo*-Experimente von Griesser *et al.* (2008a) zeigten. Eine geringere Syntheserate der Anthocyane Pel-Glc und Pel-Ma-Glc in den Früchten durch die Herabregulierung von FaGT1 resultierte in ihrer Studie in erhöhten Epiafzelechin, Epicatechin und Catechin-Konzentrationen. Im GoodBerry-Datenset wurden keine entgegengesetzten Korrelationen zwischen Anthocyanen und Flavanolen beobachtet (vgl. Abbildung 26). Trotzdem kann die Konkurrenz zwischen der Bildung der Anthocyane und der Flavanole auf Grund unterschiedlicher GT-Enzymaktivitäten in verschiedenen Genotypen nicht komplett ausgeschlossen werden. Gemeinsam mit LAR und ANR, welche zur Bildung der Flavanol-Monomere essentiell sind, ergeben sich somit verschiedene plausible Ursachen für das beobachtete Akkumulationsverhalten. In der GoodBerry-Population sind besonders „Senga Sengana“, aber auch H005, H085 und H089 betroffen (s. Abbildung 18). Vor allem in „Senga Sengana“ und H005 konnten die konkurrierenden Anthocyane nachgewiesen werden, Flavanole hingegen wurden nur in geringen Konzentrationen gefunden. Möglicherweise besitzen LAR oder ANR in diesen Genotypen nur eine niedrige Enzymaktivität. Denkbar ist aber auch eine starke GT-Aktivität in diesen Genotypen, welche Cyanidin und Pelargonidin in großem Maße umsetzt. Somit fehlten dem Enzym ANR potentielle Substrate zur Synthese der Flavanole.

Vorangehende Syntheseschritte liefern mögliche Erklärungen für die Bildung der Monomere, nicht jedoch für die hohen Korrelationskoeffizienten innerhalb der gesamten Untergruppe. Der genaue Mechanismus der Polymerisation der Flavanole ist bisher ungeklärt. Jiang *et al.* (2015) konnten die Bildung der Trimere aus dem Dimer Procyanidin B2 in nicht-enzymatischen *in vitro*-Assays als mögliche autokatalytische Reaktion nachweisen. Der postulierte Mechanismus ist in Abbildung 37 [2] dargestellt. Die Bildung eines Carbokations ist hierbei essentiell. Allerdings war die Umsetzungsrate

sehr gering (5-10 %) und die Bildung der Dimere aus Epicatechin unter identischen Bedingungen erfolgte nicht. Die Dimerisierung von Catechin in Anwesenheit von Eisen und Weinsäure oder Äpfelsäure wurde bereits 1997 beschrieben. Allerdings handelte es sich bei den Produkten nicht um eine direkte Verknüpfung zweier Catechin-Moleküle sondern um Verbindungen der Struktur Cat-Säure-Cat, welche nicht mit den Metaboliten in Erdbeere übereinstimmen (Fulcrand *et al.*, 1997). Enzymatisch katalysierte Polymerisationen werden ebenfalls oft erwogen. Eine diskutierte Möglichkeit ist die Oxidation der Anthocyane mit Hilfe des Enzyms Polyphenol-Oxidase, was ebenfalls zur Bildung eines Carbokations führen könnte (Dixon *et al.*, 2005). Vor allem bezüglich der Dimerisierung der Flavanole herrschte allerdings noch lange große Unklarheit (Pourcel *et al.*, 2005; Rousserie *et al.*, 2019).

Erst kürzlich wiesen Wang *et al.* (2020) indirekt die Existenz von Carbokationen in Pflanzenextrakten nach. Die Verwendung verschiedener Lösungsmittel, wie Methanol, Ethanol oder Propanol während der Extraktion ergab die jeweiligen Epicatechin-4-*O*-Ether. Mit Hilfe deuterierten Methanols wiesen sie diese als Reaktionsprodukte der Extraktion nach, welchen die Existenz des Carbokations zu Grunde liegt. In Extrakten herabregulierter ANR-Arabidopsis-Mutanten lagen die Epicatechin-4-*O*-Ether, aber auch alle weiteren Flavanol-Di- und Trimere in deutlich geringeren Konzentrationen vor als in Extrakten der Kontrollpflanzen. Die Überexpression von ANR und LAR, sowie des Transkriptionsfaktors MYB5b in transgenen Tabakpflanzen führte darüber hinaus zur vermehrten Bildung der Flavanole und gleichzeitig geringeren Konzentrationen der Anthocyane. Die Autoren schlussfolgerten demnach, dass die Bildung der Carbokationen, ebenso wie die Bildung des Monomers Epicatechin durch das Enzym ANR katalysiert wird (vgl. Abbildung 37 [1]). Durch Inkubation der Extrakte der transgenen ANR-Tabakblüten mit Catechin bzw. Epicatechin konnte außerdem vermehrt die Bildung der beiden Dimere Proyanidin B1 bzw. Procyanidin B2 beobachtet werden, was die Schlüsselrolle der Carbokationen in der Polymerisierung der Flavanole erneut unterstreicht (Wang *et al.*, 2020).

Die sehr hohen Korrelationswerte aller Flavanole innerhalb der GoodBerry-Population stützen die Annahme von Wang *et al.* (2020), dass die Bildung des Carbokations als wichtiges Intermediat der Polymerisierung durch dieselben Enzyme katalysiert wird wie die Synthese der Monomere. Andernfalls müssten auch Genotypen existieren, in denen die Monomere gebildet werden, die Umsetzung zu den Oligomeren jedoch nicht erfolgt. In allen Genotypen mit hohem Catechin-Gehalt wurden allerdings auch alle weiteren Flavanole in ähnlichen relativen Konzentrationen nachgewiesen. Des Weiteren wurde keine Akkumulation der Endprodukte bei gleichzeitiger Abwesenheit des Monomers beobachtet. Dies spricht für Reaktionsmechanismus von Jiang *et al.* (2015) als plausible Nebenreaktion, in welchem bei der Bildung des Carbokations stets ein Monomer-Molekül freigesetzt wird (s. Abbildung 37).

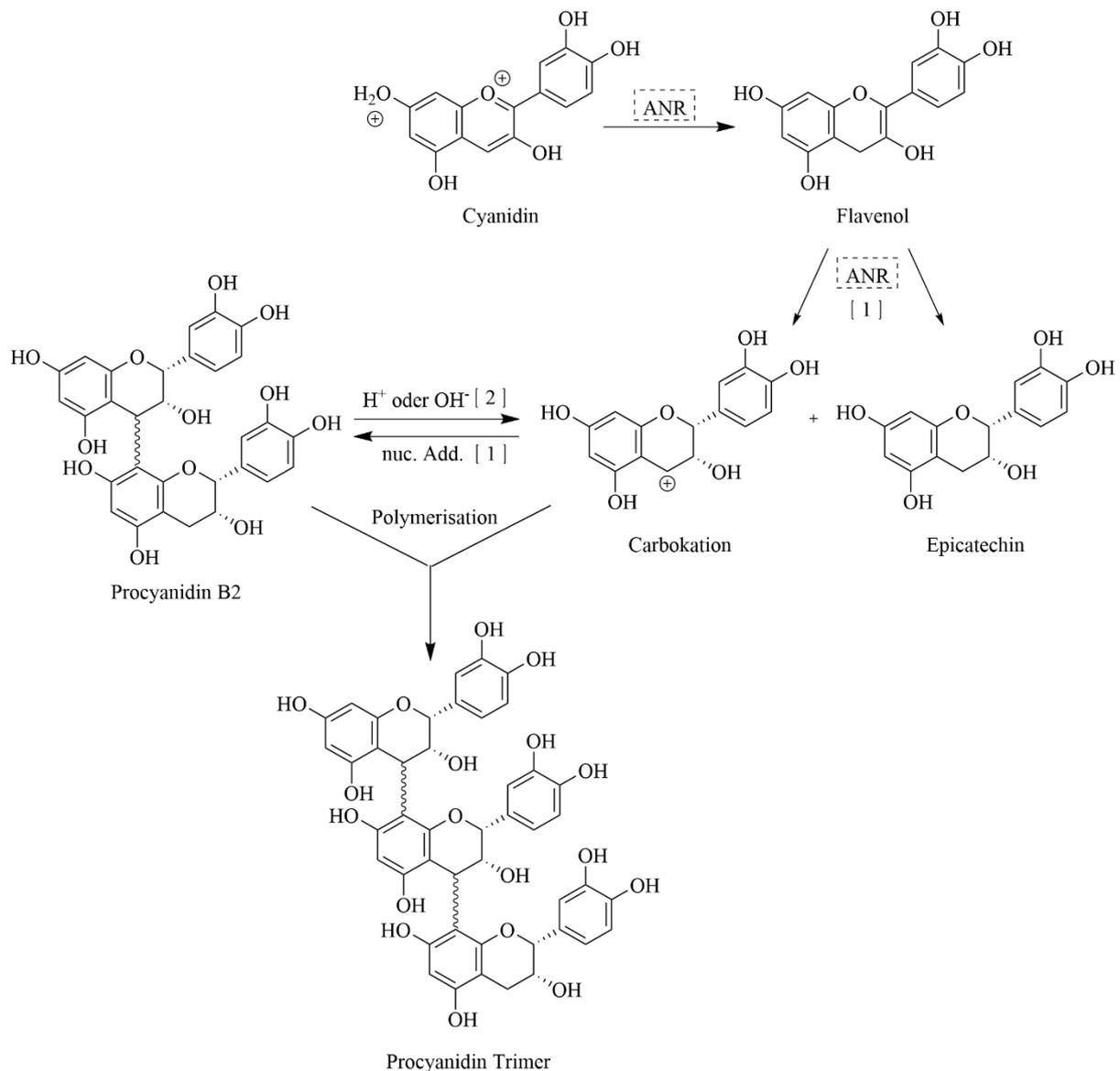


Abbildung 37: Postulierter Syntheseweg der Flavanol-Oligomere. Verschiedene Möglichkeiten der Carbokation-Bildung. ANR = Anthocyanidin-Reduktase; nuc. Add = nucleophile Addition [1] Katalyse durch ANR und anschließende nucleophile Additionsreaktion zur Bildung der Dimere, nach Wang *et al.* (2020) [2] Hydrolyse von Procyanidin B2, anschließende Polymerisation zur Bildung der Trimere nach Jiang *et al.* (2015). Die Reaktion lief unter sauren (H⁺) und alkalischen (OH⁻) Bedingungen ab.

Flavanolen, besonders den Oligomeren, werden viele Eigenschaften im Pflanzenabwehr-Mechanismus zugeschrieben. Sie gelten als Schutz gegen Pilze, Bakterien und Viren, aber auch gegen Fraßfeinde (Harborne und Williams, 2000; Ververidis *et al.*, 2007; Caretto *et al.*, 2015). Durch Infektion mit *Verticillium dahliae* wurden in Wurzeln und Stielen der infizierten Pflanzen signifikant höhere Catechin und Epicatechin-Konzentrationen nachgewiesen (Besbes *et al.*, 2019b). Da die Synthese der Flavanole stark durch den Genotyp gesteuert wurde (s. Abbildung 15 und Abbildung 18) könnten Genotypen wie zum Beispiel H124, H103 oder H076 für die weitere Züchtung neuer Kultivare mit hohen Flavanol-Konzentrationen und eventuell gesteigerter Pflanzenabwehr dienen.

4.2.1.2 Verschiedene Malonyl-Glucoside, Glucoside und Glucuronide

Malonyl-Glucoside

Die Malonyl-Glucoside der Anthocyane unterschieden sich in ihrem Verhalten deutlich von allen anderen analysierten Polyphenolen. Unabhängig vom Standort waren sie in einzelnen Genotypen entweder in größeren Mengen vorhanden oder nicht nachweisbar. Dabei spielte die Konzentration der jeweiligen Vorstufen Pel-Glc und Cya-Glc keine Rolle (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 18). Die Bildung war demnach lediglich von der genetischen Ausstattung der einzelnen F1-Nachkommen abhängig. Die beiden Eltern zeigten ebenfalls unterschiedliches Verhalten. „Senga Sengana“ synthetisierte die Malonyl-Glucoside, „Candongga“ hingegen nicht (s. Abbildung 18 und Abbildung 20). Die Anwesenheit malonylierter Metabolite in Erdbeere ist schon länger bekannt (Withopf *et al.*, 1997). Auch Anthocyanidin-Malonyl-Glucoside wurden bereits mehrfach in Erdbeerfrüchten identifiziert (Kajdžanoska *et al.*, 2010; Hanhieva *et al.*, 2011; Giampieri *et al.*, 2012; Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013). Dabei gab es auch in diesen Studien Sorten oder Genotypen, in denen die Vorstufe in gleichen Konzentration nachgewiesen wurde, die Umsetzung zum Malonyl-Glucosid allerdings nicht für alle Genotypen erfolgte. Für Pel-Ma-Glc war dieser Effekt stets stärker ausgeprägt als für Cya-Ma-Glc (Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013). Auch in der GoodBerry-Population zeigte Pel-Ma-Glc eine schärfere Trennung zwischen den Genotypen auf als Cya-Ma-Glc (s. Abbildung 19). Möglicherweise ist die Ursache hierfür die weitaus höhere Pel-Glc Konzentration (Pel-Glc: bis zu 3500 ppm IS Equ, Cya-Glc: bis zu 780 ppm IS equ). Die Anhäufung der beiden Glucoside ohne Bildung der Malonyl-Glucoside in einigen Proben deutet stark auf die Beteiligung eines Acyl-Transferase-Enzyms hin. Bisher bekannte Acyl-Transferasen in Erdbeere sind Alkohol-Acyl-Transferasen. Sie spielen vor allem in der Synthese der flüchtigen Ester-Verbindungen eine Rolle, welche für das Erdbeeraroma verantwortlich sind (Aharoni *et al.*, 2000; Beekwilder *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2006; Cumplido-Laso *et al.*, 2012). Die Untersuchung der Enzymaktivität von Alkohol-Acyl-Transferasen mittels Rohproteinextrakten ergab Genotypen-abhängige Aktivitätsmuster (Carbone *et al.*, 2006), wie sie auch in der GoodBerry-Population für die Anthocyan-Malonyl-Glucoside beobachtet wurden. Eine spezifische Malonyl-Transferase wurde für die Anthocyane der Erdbeere jedoch noch nicht beschrieben.

Neben den Anthocyanidin-Malonyl-Glucosiden wurden in dieser Arbeit auch die Malonyl-Glucoside der Flavonole Kaempferol und Quercetin nachgewiesen. Diese sind in der Literatur ebenfalls bereits bekannt (Kajdžanoska *et al.*, 2010; Hanhieva *et al.*, 2011). In den GoodBerry-Proben wurde neben Ka-Ma-Glc zur gleichen Retentionszeit Kaempferol-Acetyl-Glucosid mit m/z 489 identifiziert. Unter ähnlichen Messbedingungen konnten die Peaks für Kaempferol-Malonyl-Glucosid und Kaempferol-Acetyl-Glucosid allerdings mit einem Retentionszeitunterschied von 1,5 Min. deutlich getrennt werden (Kajdžanoska *et al.*, 2010). Dass in den GoodBerry-Proben der vermeintliche Ka-Ac-Glc-Peak nahezu identisch mit Ka-Ma-Glc eluierte ($R_t = 37,8$ bzw. $37,5$ Min.), spricht sehr stark dafür, dass es sich bei den Flavonol-Ac-Glc um Messartefakte der Flavonol-Ma-Glc handelt. Durch

Abspaltung von CO₂ (-44 Da) entsteht bei der Ionisierung der Malonyl-Glucoside im negativen Modus der Pseudopeak der Acetyl-Glucoside (s. Abbildung 38). Für die Quantifizierung der Flavonol-Malonyl-Glucoside wurde daher stets die Summe aus Flavo-Ma-Glc und Flavo-Ac-Glc berücksichtigt. Unter dieser Annahme zeichnete sich in den GoodBerry-Proben für die Flavonol-Malonyl-Glucoside keine deutliche Abhängigkeit vom Genotyp ab (s. Abbildungen 18-20). Im positiven Modus wurde die CO₂-Abspaltung nicht beobachtet. Die beiden Anthocyanidin-Malonyl-Glucoside zeigten demnach jeweils nur einen Peak, welcher zur semi-quantitativen Bestimmung herangezogen wurde.

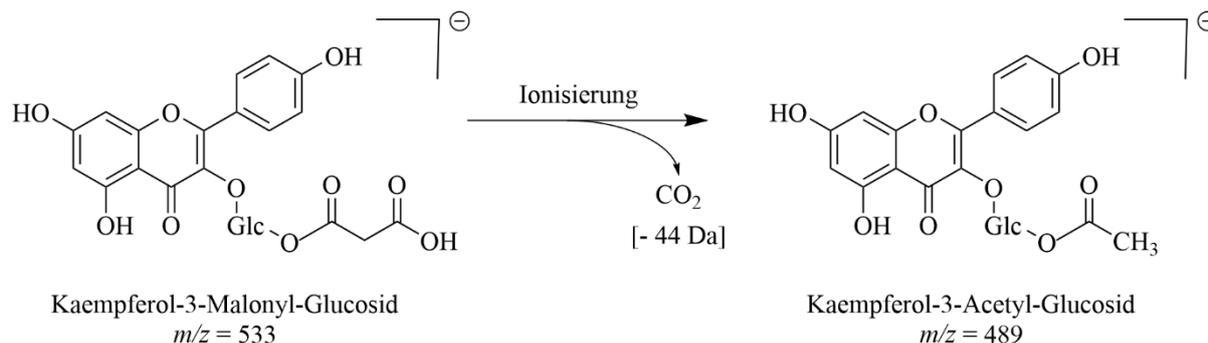


Abbildung 38: Entstehung der Flavonol-Acetyl-Glucoside während der Ionisierung im Negativmodus. Gezeigt am Beispiel des Kaempferol-Malonyl-Glucosid. Glc = Glucose.

Auch die Korrelationsanalysen aller Malonyl-Glucoside (Abbildung 27 A) bestätigte den starken Zusammenhang der Bildung der Anthocyanidin-Malonyl-Glucoside. Die Flavonol-Malonyl-Glucoside zeigten hingegen nur schwache Wechselwirkungen untereinander und mit den Anthocyanen. Die Synthese der beiden Anthocyanidin-Malonyl-Glucoside wird womöglich von demselben Enzym gesteuert, während die Flavonol-Malonyl-Glucoside vermutlich von anderen Malonyl-Transferasen gebildet werden. Experimente zur Substratspezifität der Alkohol-Acyl-Transferase SAAT aus Erdbeere offenbarten ein breites Substratspektrum, von einfachen Alkoholen wie Ethanol oder Propanol bis hin zu Terpenen wie Geraniol oder Farnesol. Es zeigte sich auch, dass strukturell ähnliche Moleküle wie 1-Heptanol, 1-Octanol und 1-Nonanol ähnlich gut umgesetzt wurden. Auf der anderen Seite konnten auch kleine stereochemische Unterschiede wie die Konformation einer Doppelbindung zwischen Geraniol und Nerol die Aktivität des Enzyms halbieren (Aharoni *et al.*, 2000; Beekwilder *et al.*, 2004). Ein ähnliches Verhalten der unbekannt Malonyl-Transferasen legt die Korrelationen der analysierten Malonyl-Glucoside nahe. Möglicherweise besitzen sie eine Substratpräferenz zu Anthocyanen, setzen aber auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit auch Flavonol-Glc um. Letztere allerdings mit reduzierter Syntheserate.

Glucoside

Die Synthese der Glucoside wird durch Glycosyl-Transferasen katalysiert. Diese GTs sind in der Pflanzen- und Tierwelt ubiquitär. Alle GTs welche Sekundärmetabolite in Pflanzen glycosylieren gehören der UGT Familie 1 an und zeichnen sich durch eine hochkonservierte Sequenz aus 4 Aminosäuren aus, die sogenannte PSPG-Box (*plant secondary product glycosyltransferase*). Der

Substratbereich deckt verschiedene Flavonoid-Gruppen, aber auch Steroide oder Pflanzenhormone wie Auxin ab (Gachon *et al.*, 2005). Anders als die Malonyl-Transferasen sind Glycosyl-Transferasen in Erdbeere bereits weiter erforscht. Für Sekundärmetabolite sind zwei Gruppen GTs charakterisiert: Eine Gruppe zur Umsetzung flüchtiger Aromastoffe (Song *et al.*, 2016) und eine zweite in der Polyphenol-Biosynthese. Die Polyphenol-GTs unterscheiden sich wiederum in der Bildung von Glucosiden und Estern. Ester-katalysierende GTs können dabei sowohl Substrate innerhalb des Phenylpropanoid-Stoffwechsels, als auch der Ellagsäure-Synthese glucosylieren (Lunkenbein *et al.*, 2006a; Schulenburg *et al.*, 2016). Zur Bildung der Flavonoid-Glucoside wurden drei GTs bereits ausführlich charakterisiert. Durch Herabregulierung von FaGT1 *in vivo* konnte Pelargonidin als Hauptsubstrat identifiziert werden (Griesser *et al.*, 2008a). FaGT6 und FaGT7 hingegen wurde die Glucosylierung der Flavonole Quercetin und Kaempferol zugeschrieben (Griesser *et al.*, 2008b). In der GoodBerry-Population wurden nur schwache Korrelationen zwischen den Anthocyan-Glucosiden und den Flavonol-Glucosiden gefunden ($R_{SP} = 0,24$ bzw. $0,34$). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass verschiedene GTs in der Synthese der Flavonoid-Glucoside involviert sind, welche jeweils ein anderes Substrat präferieren. In den einzelnen Genotypen könnten diese wiederum in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert sein, wodurch unterschiedliche Mengen der verschiedenen Glucoside synthetisiert werden. Des Weiteren akzeptierten alle bisher charakterisierten GTs neben den Hauptsubstraten auch weitere Substanzen. *In vitro* verhielten sich strukturähnliche Moleküle auch in Bezug auf die Umsetzungsrate stets vergleichbar. Mit zunehmenden Unterschieden wurden die Substrate zwar weiterhin glycosyliert, die Produktrate nahm jedoch ab (Lunkenbein *et al.*, 2006a; Griesser *et al.*, 2008b; Griesser *et al.*, 2008a; Song *et al.*, 2015; Schulenburg *et al.*, 2016). Daraus ergibt sich auch für die Biosynthese *in vivo* ein weiteres potentielles Szenario. Möglicherweise sind nicht vier verschiedene GTs in der Erdbeerfrucht exprimiert, welche jeweils ihr Hauptsubstrat umsetzen. Es ist auch denkbar, dass die einzelnen Glucoside von derselben GT gebildet werden. Je nach Substratverfügbarkeit und auf Grund der GT-eigenen Substratspezifität findet die Glucosylierung jedoch in sehr unterschiedlichem Ausmaß statt, weshalb keine Korrelation zwischen den einzelnen Glucosiden erkennbar ist.

Der stärkste Zusammenhang innerhalb der Glucoside fand sich zwischen Cya-Glc und Qu-Glc ($R_{SP} = 0,42$). Der Grund für diese Korrelation liegt womöglich nicht in den Glucosyltransferasen, sondern in einem vorherigen Schritt der Biosynthese. Cyanidin und Quercetin sind, im Gegensatz zu Pelargonidin und Kaempferol, an der C3'-Position hydroxyliert (vgl. Abbildung 5). Die Integration der zusätzlichen Hydroxy-Gruppe wird durch Hydroxylasen katalysiert, welche zur Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme gehören (Ververidis *et al.*, 2007). Rekombinantes F3'H-Protein aus *F. vesca* und *F. × ananassa* hydroxylierte Naringenin, Dihydrokaempferol und Kaempferol mit nahezu gleichen Umsetzungsraten (Schwinn *et al.*, 2014). Damit akzeptierte es alle möglichen Substrate innerhalb der Flavonoid-Biosynthese zur Bildung von Quercetin und Cyanidin (vgl. Abbildung 8). Eine Analyse der Expressionsniveaus von F3'H in *F. × ananassa* und *F. vesca* zeigte, dass in *F. × ananassa* „Elsanta“ die Expression mit zunehmender Reife abnimmt, während sie in *F. vesca* „Red Wonder“ zunächst

zunimmt und in der reifen Frucht nur leicht abfällt. Bei vergleichbarem Gesamtanthocyan-Gehalt enthielt *F. vesca* jedoch deutlich mehr Cya-Glc (53 %) als *F. × ananassa* (12 %), was F3'H als Schlüsselenzym für die Hydroxylierungsreaktionen nahelegt (Thill *et al.*, 2013). Auch in den GoodBerry-Genotypen ist die Expression von F3'H und somit die Synthese der beiden Aglykone der naheliegende Grund für die gute Korrelation zwischen Qu-Glc und Cya-Glc.

Erschwerend kommt bei der Korrelationsanalyse der Glucoside hinzu, dass es sich nicht um die Endprodukte der Biosynthese handelt, wie zum Beispiel bei den Malonyl-Glucosiden. Die gebildeten Glucoside können ihrerseits als Substrate für die Bildung der Malonyl- und Cumaryl-Glucoside dienen. Als Konkurrenzreaktion kann außerdem die Konjugation der Aglykone mit Glucuronsäure ablaufen. Darüber hinaus sind die Aglykone als Vorstufen der Glucoside nicht in nachweisbaren Mengen in den Früchten vorhanden. Eine genauere Betrachtung der Beziehung zwischen Edukt und Produkt wie für die Malonyl-Glucoside oder die Flavanol-Oligomere in einzelnen Genotypen ist somit nicht möglich.

Glucuronide

In Pflanzen ist die Glucuronidierung der Sekundärmetabolite nicht als gängige Konjugationsreaktion beschrieben (Ververidis *et al.*, 2007; Grotewold, 2008). Trotzdem wurden Flavonol-Glucuronide bisher in Erdbeere mehrfach identifiziert (Kajdžanoska *et al.*, 2010; Hanhieva *et al.*, 2011; Giampieri *et al.*, 2012) und konnten auch im Zuge dieser Arbeit in den Früchten nachgewiesen werden. Im menschlichen Verdauungstrakt werden Glucuronidierungen der Polyphenole als gängige Reaktionen beschrieben (Han *et al.*, 2007; Giampieri *et al.*, 2012). Auch verschiedene Quercetin- und Kaempferol-Glucuronide werden im menschlichen Metabolismus mit Hilfe der UDP-Glucuronosyl-Transferasen gebildet (Viscupicová *et al.*, 2008; Perez-Vizcaino *et al.*, 2012). In Pflanzen sind verschiedene UDP-Glucuronosyl-Transferasen ebenfalls bekannt (Osmani *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2018). Sie gehören wie die GTs zur UGT Familie 1 und zeichnen sich durch die PSPG-Box aus. Entscheidend ob das Enzym UDP-Glucose oder UDP-Glucuronsäure als Zucker-Donor akzeptiert ist oft nur der Austausch einer Aminosäure, wobei Arginin vermutlich die Stabilisierung der Glucuronsäure im aktiven Zentrum der Glucuronosyl-Transferasen stärkt. Dabei können je nach 3D-Struktur der Proteine Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen relevant sein (Osmani *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2010). Darüber hinaus weisen Glucuronosyl-Transferasen eine stark ausgeprägte Substratspezifität auf. Schon eine zusätzliche Hydroxygruppe kann erhebliche Unterschiede in der Umsetzungsrate zur Folge haben (Osmani *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2009). Für die Glucuronidierung der Flavonole Kaempferol und Quercetin ist bereits eine Glucuronosyl-Transferase aus Wein charakterisiert. Auch hier zeigte sich eine sehr starke Substratspezifität. Neben den beiden Flavonolen wurde keines der sonstigen getesteten Polyphenole (Anthocyane, Flavonole, Phenylpropanoide, Flavone, und Stilbene) umgesetzt (Ono *et al.*, 2010). In den GoodBerry-Proben konnten ebenfalls nur Glucuronide der Flavonole nachgewiesen werden, für alle anderen Klassen wurden keine gefunden. Dies spricht auch in *Fragaria* für eine hohe Substratspezifität potentieller UDP-

Glucuronosyl-Transferasen. Der Korrelationsfaktor zwischen Ka-Glucu und Qu-Glucu liegt mit $R_{SP} = 0,51$ zwischen dem der Anthocyan-Malonyl-Glucoside ($R_{SP} = 0,72$) und der Glucoside ($R_{SP} = 0,24-0,42$). Somit lässt sich an Hand der Metabolitendaten keine Aussagen darüber machen, ob in der Synthese der Flavonol-Glucuronide in der Kreuzungspopulation lediglich eine oder mehrere Glucuronosyl-Transferasen beteiligt sind.

Enzyme in der Biosynthese

Im Allgemeinen kann mittels Metaboliten- und Korrelationsanalysen über die Beteiligung verschiedener Enzyme in der Biosynthese nur spekuliert werden. Anschließende Klonierung und biochemische Charakterisierung der Gene, wie zum Beispiel für verschiedene GTs bereits beschrieben, können erste Vermutungen bestätigen (Lunkenbein *et al.*, 2006a; Griesser *et al.*, 2008b; Schulenburg *et al.*, 2016). Erst in anschließenden *in vivo*-Experimenten mit transgenem Pflanzenmaterial kann durch Herabregulierung und Überexpression der jeweiligen Zielgene die Funktion in der Pflanze endgültig belegt werden (Hoffmann *et al.*, 2006; Griesser *et al.*, 2008a; Hoffmann *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2013). Darüber hinaus sind für die Expression einzelner Gene verschiedene Transkriptionsfaktoren essentiell. Für *Fragaria* ist FaMYB10 einer der bekanntesten und bisher am meisten erforschten. Er spielt eine wesentliche Rolle in der Expression der meisten Gene innerhalb der Polyphenol-Synthese. Daneben sind jedoch auch Transkriptionsfaktoren bekannt, welche gezielter für die Expression der Enzyme einzelner Stoffwechselwege verantwortlich sind, wie zum Beispiel FaMYB1 für die Bildung der Anthocyane oder FaPCL1 für die Flavanol- und Flavonol-Synthese (Medina-Puche *et al.*, 2014; Pillet *et al.*, 2015; Whitaker *et al.*, 2020).

4.2.1.3 Korrelationen zwischen den Gehalten verschiedener Polyphenol-Untergruppen

Die bedeutendste Korrelation zwischen Metaboliten unterschiedlicher Klassen ergab sich für das Phenylpropanoid Zi-Glc-Es und die Gruppe der Anthocyane und Flavanole. Zi-Glc-Es findet sich zu Beginn der Polyphenol-Synthese, kurz vor der Abtrennung der Lignin-Biosynthese von der Bildung der Flavonoide (Ververidis *et al.*, 2007). Durch Herabregulierung der Chalcon-Synthase am Startpunkt der Flavonoid-Synthese in Erdbeerfrüchten wurden in einer Studie von Ring *et al.* (2013) zum einen wie erwartet weniger Anthocyane gebildet. Gleichzeitig beobachteten die Autoren festere Früchte auf Grund eines erhöhten Lignin-Gehaltes. Die Blockade der Flavonoid-Synthese führte demnach zu einer erhöhten Lignin-Synthese u.a. auch durch gleichzeitige Induktion eines Peroxidase-Gens (Ring *et al.*, 2013). Die negative Korrelation zwischen Zimtsäure und anderen Flavonoiden deutet auch in der hier untersuchten „Candongä“ × „Senga Sengana“-Kreuzungspopulation auf eine Konkurrenz dieser beiden Synthesewege hin. Werden durch hohe Enzymaktivitäten innerhalb eines Syntheseweigs große Mengen der verfügbaren Kohlenstoff-Biomasse verbraucht, fehlt diese an anderen Stellen. Übermäßige Produktion der Flavonoide führt demnach zu geringeren Konzentrationen der Phenylpropanoide und

umgekehrt. In der Korrelationsanalyse (vgl. Abbildung 26) wurde dies durch negative Korrelationskoeffizienten sichtbar.

Anders hingegen Ellagsäure und HHDP-Galloyl-Glucosid, welche mit nahezu allen Polyphenolen direkte Korrelationen aufwiesen. Die Tendenz zu vorwiegend positiven Korrelationen zwischen Flavonoiden und Ellagsäurederivaten wurde bereits in anderen Erdbeerkultivaren beschrieben (Aaby *et al.*, 2012). Diese zwei grundlegenden Synthesewege scheinen weniger zu konkurrieren als die Bildungszweige von Lignin und Flavonoiden. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in der Sonderstellung der Ellagsäure-Synthese, welche früher als die Polyphenol-Synthese am Übergang von Primär- zu Sekundärmetabolismus abgetrennt wird (vgl. Abbildung 6; Schulenburg *et al.*, 2016).

4.2.2 Verknüpfung von Primär- und Sekundärmetabolismus

Der benötigte Kohlenstoff für den Sekundärmetabolismus stammt aus Reaktionen des Primärmetabolismus. Die Schlüsselstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel bildet die Synthese der Aminosäure Phenylalanin über den Shikimisäureweg (vgl. Abbildung 6; Pott *et al.*, 2019). In den GoodBerry-Proben fanden sich nur sehr wenige signifikante Korrelationen zwischen Metaboliten des Primär- und des Sekundärstoffwechsels (s. Abbildung 29). Dies stimmt mit Ergebnissen von Fait *et al.* (2008) überein. In ihrer Studie wurden Nüsschen und Fruchtbodengewebe über verschiedene Reifestadien hinweg getrennt mittels LC- und GC-MS analysiert. Auch diese Autoren fanden vermehrt starke Zusammenhänge zwischen Metaboliten innerhalb des Primärstoffwechsels oder innerhalb des Sekundärstoffwechsels und weniger zwischen Analyten der unterschiedlichen Synthesewege. Darüber hinaus zeigten sie in den Nüsschen-Proben deutlich mehr Korrelationen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel als im Fruchtbodengewebe. Eine weitere Netzwerk-basierte Analyse der Korrelationsdaten zu verschiedenen Reifestadien verdeutlichte außerdem, dass sowohl in Nüsschen als auch im Fruchtbodengewebe die Zahl der Korrelationen mit zunehmender Reife abnimmt. Im grünen Stadium sind auch im Fruchtboden noch vereinzelt stark signifikante Korrelationen zwischen Primär- und Sekundärmetaboliten zu finden, im roten Stadium hingegen nur noch zwischen Analyten des Sekundärstoffwechsels. Auch in den Nüsschen verringert sich der Austausch zwischen den beiden Synthesewegen im Laufe der Fruchtreife (Fait *et al.*, 2008). In den GoodBerry-Proben wurden Fruchtboden und Nüsschen gemeinsam gemörsert und extrahiert. Allerdings blieben die Nüsschen bei diesem Prozess weitgehend intakt. Außerdem überwiegt der Massenanteil des Fruchtbodens den Anteil an Nüsschen. Die GoodBerry-Korrelationen spiegeln also vorwiegend die Korrelationen in Fruchtboden-Extrakten wider. Darüber hinaus handelt es sich um rote Früchte, in welchen nach Fait *et al.* (2008) deutlich weniger Korrelationen zwischen Primär- und Sekundärmetaboliten vorhanden sind. Betrachtet man allerdings die Qualität der Korrelationen, so ergeben sich starke Unterschiede zwischen den Ergebnissen. So wurden zum Beispiel auch von Fait *et al.* (2008). Zusammenhänge zwischen Putrescin und Quinat mit den Flavanolen beschrieben, allerdings als direkte Korrelation, nicht

entgegengesetzt wie in den GoodBerry-Genotypen. Für alle Anthocyane wiesen sie eine entgegengesetzte Korrelation mit Maltose und einen direkten Zusammenhang mit Saccharose nach, welche in dieser Arbeit nicht zu beobachten waren. Auch die hier beschriebenen Beziehungen zwischen Flavanolen oder Phenylpropanoiden und einzelnen Primärmetaboliten wurden von Fait *et al.*, 2008 nicht nachgewiesen. Die sporadischen Wechselwirkungen der Aminosäuren mit Metaboliten des Sekundärstoffwechsels stimmen hingegen wieder überein. Demnach laufen Primär- und Sekundärmetabolismus im Fruchtboden im reifen Stadium offenbar größtenteils getrennt voneinander ab.

Stress wie zum Beispiel Wasserknappheit oder Pilzinfektionen hat allerdings sehr ähnliche Effekte auf Primär- und Sekundärmetabolite. In beiden Fällen wurden vermehrt Zucker und Polyphenole nachgewiesen (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Ripoll *et al.*, 2014). Allerdings bleibt dabei ungeklärt, ob durch den Stress primär einer der beiden Stoffwechselwege betroffen ist und den anderen ebenfalls beeinflusst, oder ob beide unabhängig voneinander stressbedingt veränderte Profile aufweisen. Besonders bei Wasserstress kann eine gleichzeitig erhöhte Primär- und Sekundärmetaboliten-Konzentration auch auf den verringerten Wassergehalt der Früchte zurückzuführen sein (Weber *et al.*, 2013). Auf nicht-molekularer Ebene konnte ein deutlicher Zusammenhang von Primär- und Sekundärmetabolismus nachgewiesen werden. In verschiedenen Stressszenarien auf Grund von Nährstoff- oder Wasserknappheit synthetisierten Pflanzen vermehrt Metabolite des Sekundärstoffwechsels. Gleichzeitig wurden für diese Pflanzen niedrigere Wachstumsraten oder geringere Erträge festgestellt. Die verfügbaren Kohlenstoffreserven werden also in diesem Fall vermehrt in den Sekundär- und weniger in den Primärstoffwechsel investiert (Weber *et al.*, 2013; Caretto *et al.*, 2015).

4.3 Fra a 1 innerhalb der GoodBerry-Kreuzungspopulation

Sowohl die beiden Elternsorten „Candongá“ und „Senga Sengana“, als auch die F1-Nachkommen zeichneten sich durch sehr ähnliche Fra a 1-Gehalte aus. Zwar ergaben sich rechnerisch einige signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, s. Abbildung 24) zwischen den Standorten oder einzelnen Genotypen, durch genauere Betrachtung der Einzelwerte erwiesen sich diese jedoch größtenteils als marginal (vgl. Abbildung 25). Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen somit mit Resultaten von Kurze *et al.* (2018a) überein. Die Autoren fanden ebenfalls lediglich geringe Unterschiede des Allergengehaltes in Früchten der *F. × ananassa*-Sorte „Asia“ auf Grund der Anbaujahre oder der Anbauart (konventionell oder ökologisch). Auch verschiedene Kultivare der Gattung *F. × ananassa* wiesen leicht unterschiedliche Fra a 1-Konzentrationen auf. Deutlich höhere Fra-Mengen wurden hingegen in Früchten decaploider *F. × vescana* und zwei hexaploiden *F. moschata*-Sorten nachgewiesen (Kurze *et al.*, 2018a). Mit den GoodBerry-Proben konnte bestätigt werden, dass innerhalb der Gattung *F. × ananassa* der Allergengehalt stabil und verhältnismäßig niedrig ist. Vor allem im Vergleich zu anderen Obstsorten, wie Pflaume (Picchi *et al.*, 2019) und Apfel (Romer *et al.*, 2020), oder Tomaten (Kurze *et al.*, 2018b) weisen *F. × ananassa*-Früchte sehr beständige Mengen der allergenen PR-10 Proteine auf. Auch für Kreuzungen innerhalb *F. × ananassa* enthielten die Nachkommen der GoodBerry-Population gleichbleibend geringe Konzentrationen der allergenen Proteine. Erst durch Kreuzungen mit wilden Sorten wie *F. × ananassa × F. vesca* oder *F. × ananassa × F. virginiana glauca* steigt der Fra-Gehalt merklich (Tulipani *et al.*, 2011; Kurze *et al.*, 2018a). Bei Züchtungsprogrammen mit wilden Erdbeer-Spezies, um zum Beispiel Resistenzen und Erträge (Hancock *et al.*, 2001) oder Aromaeigenschaften (Ulrich *et al.*, 2007) zu verbessern, sollten auch mögliche Auswirkungen auf den Allergengehalt berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass die mittels ELISA detektierten Fra a 1-Konzentrationen nicht direkt mit der Allergenität der einzelnen Sorten korrelieren. In Erdbeerfrüchten fanden sich acht verschiedene Isoformen des Fra a 1-Proteins, wobei die einzelnen Isoformen in unterschiedlichen Sorten in verschiedenen Konzentrationen exprimiert werden. Im Basophilenaktivierungstest riefen Fra a 1.02 und Fra a 1.03 die stärksten Signale hervor, Fra a 1.04 und Fra a 1.05 hingegen zeigten keinerlei Reaktion. Bei Allergikern können Früchte zweier Kultivare mit gleichem Allergengehalt somit verschieden starke Symptome auslösen (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016).

In der Pflanze dient Fra a 1 als PR-10 Protein der Abwehr gegen Pilzbefall (Besbes *et al.*, 2019b), kann aber auch durch abiotische Stressfaktoren vermehrt gebildet werden (Fernandes *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte bereits nachgewiesen werden, dass Fra-Proteine Komplexe mit verschiedenen Polyphenolen wie Catechin, Quercetin-Glucosid oder Myricetin bilden (Casañal *et al.*, 2013; Orozco-Navarrete *et al.*, 2020). Auch für Bet v 1, das homologe Birkenpollenallergen, ist Quercetin-Sophorosid als Ligand bekannt (Seutter von Loetzen *et al.*, 2014). Dies legt nahe, dass PR-10 Proteine neben Abwehrmechanismen *in vivo* auch in der Regulierung der Flavonoid-Biosynthese beteiligt sind. Über Herabregulierung der Expression verschiedener Fra-Isoformen in Erdbeerfrüchten

konnte der Zusammenhang der PR-Proteine mit der Flavonoid-Synthese belegt werden. Am stärksten betroffen waren dabei die Phenylpropanoide, sowie die Anthocyane und ihre Vorstufen, die Flavonole. Grund hierfür war eine gleichzeitige Herabregulierung zweier Enzyme aus der Flavonoidsynthese, CHS und PAL, in den Fra-herabregulierten Früchten (Muñoz *et al.*, 2010). Einen weiteren Hinweis auf diesen direkten Zusammenhang von Fra und Flavonoiden gab es bereits einige Jahre zuvor von Hjernø *et al.* (2006). Auch sie zeigten eine konvergente Herabregulierung der allergenen Proteine und verschiedener Proteine der Flavonoid-Biosynthese in weißen Erdbeerfrüchten im Vergleich zu Früchten einer roten Sorte (Hjernø *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung weiterer natürlicher weißer Erdbeerkultivare fanden Muñoz *et al.* (2010) ebenfalls niedrigere Expressionslevel für PAL und CHS im Vergleich zu den zugehörigen roten Früchten. Die allergenen Fra-Proteine hingegen lagen in den weißen Früchten in deutlich höheren Konzentrationen vor (Muñoz *et al.*, 2010). Umfassende Screenings roter und weißer Erdbeerfrüchte zeigten ebenfalls, dass weiße Früchte, und demnach niedrige Enzymexpression innerhalb des Flavonoid-Stoffwechsels, nicht immer mit niedrigen Fra-Konzentrationen einhergehen (Franz-Oberdorf *et al.*, 2017; Kurze *et al.*, 2018a). Auch in den GoodBerry-Proben konnte mittels Korrelationsanalyse ein Zusammenhang zwischen Fra a 1 und der Flavonoid-Synthese nachgewiesen werden (s. Abbildung 28 und Anhang 4). Dabei waren, wie auch durch die Herabregulierung der Fra-Proteine in den Experimenten von Muñoz *et al.* (2010), Metabolite der Anthocyane und Flavonole betroffen. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit ein leicht negativer Zusammenhang (R_{SP} zwischen -0,23 und -0,29). Eine erhöhte Fra-Konzentration korrelierte also mit niedrigeren Anthocyan- und Flavonol-Konzentrationen. Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis, dass Fra-Proteine möglicherweise eine Transport- oder Regulationsfunktion in der Biosynthese der Polyphenole einnehmen (Casañal *et al.*, 2013). In welchem Maße dies aber geschieht und von welchen Faktoren es abhängt, ob Enzyme des Flavonoid-Stoffwechsels und allergene Fra a 1-Proteine in gleichem Ausmaß exprimiert werden oder ob sie sich gegensätzlich verhalten, bleibt durch weitere Forschung zu klären.

4.4 Einfluss von Genotyp und Umwelt

Es ist weithin bekannt, dass die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite zwischen verschiedenen Genotypen variiert (Tulipani *et al.*, 2008; Aaby *et al.*, 2012; Ring *et al.*, 2013; Kårlund *et al.*, 2016; Urrutia *et al.*, 2016; Härtl *et al.*, 2017; Kurze *et al.*, 2018a). Daneben können auch äußere Einflüsse oder Stressfaktoren, wie zum Beispiel starke UV-Strahlung oder Pilzbefall die Synthese sekundärer Pflanzenstoffe anregen (Carbone *et al.*, 2009; Urrutia *et al.*, 2016; Palmieri *et al.*, 2017; Besbes *et al.*, 2019b). In dieser Arbeit wurden das Polyphenol-Profil und der Allergengehalt einer Kreuzungspopulation an fünf verschiedenen Standorten über zwei Jahre untersucht. Dabei stand unter anderem die Frage im Fokus, inwiefern neben dem genetischen Hintergrund die Umwelt einen Einfluss auf die Biosynthese der Polyphenole und die Expression der Fra-Protein-Familie hat und welcher dieser beiden Faktoren eine größere Rolle spielt. Gängige AMMI-Modelle (*Additive Main effects and Multiplicative Interaction*, Gauch (2006)) konnten auf Grund der nicht immer normalverteilten Datengrundlage nicht angewendet werden. Daher wurde der Einfluss von Genotyp G und Umwelt E für jeden Metaboliten zunächst wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben einzeln betrachtet. Als Annäherung wurden lineare Modelle angenommen. Durch die verschiedenen Steigungen und somit auch R^2 -Werte der hierdurch entstehenden Geraden konnten Rückschlüsse auf den Einfluss von G und E auf einzelne Metabolite gezogen werden (Malosetti *et al.*, 2013; Urrutia *et al.*, 2016). Der deutlichste Genotypeneinfluss konnte mit diesem Modell für Cya-Ma-Glc und Pel-Ma-Glc nachgewiesen werden (s. Abbildung 31). Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits in Kapitel 4.2.1.2 aufgezeigt. Der Vergleich mit den beiden malonylierten Flavonolen zeigte auch für Que-Ma-Glc einen Genotypeneffekt, der allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war als bei den Anthocyanen. Der Ka-Ma-Glc-Gehalt wurde zusätzlich durch die Umwelt beeinflusst. Dieses unterschiedliche Verhalten der Malonyl-Glucoside deutet erneut stark auf verschiedene Malonyl-Transferasen in der Synthese der Anthocyanidin- und Flavonol-Ma-Glc hin. Für alle weiteren Metabolite offenbarte sich kein vorherrschender Effekt. Vielmehr fand sich eine Mischung aus $G \times E$, wobei für die meisten Analyten keine der beiden Komponenten stark dominierte. Vorwiegend durch Umweltfaktoren beeinflusst zeigten sich alle weiteren Pel-Derivate, Procyanidine aus (Epi)Afz und (Epi)Cat und Zimtsäure-Glc-Es. Carbone *et al.* (2009) und Palmieri *et al.* (2017) berichteten, dass Anthocyane nur in einzelnen Genotypen variieren. Am stärksten von Schwankungen auf Grund äußerer Einflüsse sind Flavanole, Phenylpropanoide und Flavonole betroffen (Carbone *et al.*, 2009; Palmieri *et al.*, 2017). In den GoodBerry-Genotypen zeigten sich für die Gruppe der Flavonole ebenfalls starke E-Einflüsse. Gleichzeitig spielte hier jedoch der Genotyp eine große Rolle. Ähnlich verhielt sich *p*-Cu-Glc-Es/-Glc als Phenylpropanoid (vgl. Abbildung 31). Für diese Metabolite herrscht also eine starke $G \times E$ -Interaktion. Markergestützte Züchtung auf genetischer Ebene, wie zum Beispiel die Analyse sogenannter *Quantitative Trait Loci* (QTL) anhand genetischer Marker können innerhalb eines Standortes hilfreiche Aufschlüsse über die Vererbung einzelner Eigenschaften liefern (Hancock *et al.*, 2016; Urrutia *et al.*, 2016; Vallarino *et al.*, 2019). Neben hohen Kosten und hohem Zeitaufwand wurde in dieser Arbeit deutlich, dass auch die äußeren Umwelteinflüsse QTL-Analysen Grenzen setzen.

Ein Genotyp zeigte hier trotz identischer genetischer Ausstattung unter wechselnden Umweltbedingungen unterschiedliche Polyphenole-Profile. Auch für den Fall, dass geeignete Marker in gleichem Maße vererbt werden wie die phänotypischen Merkmale, ist der Umwelteinfluss auf die Ausbildung der meisten der untersuchten Sekundärmetabolite stark genug, um universal geltende genetische Marker hinfällig zu machen. Dies wurde im GoodBerry-Projekt auch bei der Suche nach standortübergreifenden Markern sichtbar. Innerhalb einzelner Standorte fanden sich zahlreiche Marker für Ertrag oder einzelne Qualitätsparameter. Universal gültige Marker für alle involvierten Länder existierten allerdings nur vereinzelt (projektinterne Daten, unveröffentlicht). Eine Ausnahme bildeten die Malonyl-Glucoside der Anthocyane, für welche der genetische Einfluss deutlich überwiegt, weshalb auch an unterschiedlichen Anbauorten alleine der Genotyp entscheidend ist für die Synthese der beiden Metaboliten. Ein Ansatz, diesem Problem beizukommen könnten Expressions-QTLs liefern, bei welchen anstatt auf Genebene auf Transkriptomebene gearbeitet wird (Barbey *et al.*, 2019; Whitaker *et al.*, 2020).

Die Unterschiede im Polyphenol-Profil einzelner Genotypen an verschiedenen Standorten sind darüber hinaus nicht immer gleich stark. Es gibt Sorten, die sensibler auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren. Andere zeichnen sich hingegen durch ein stabiles Verhalten unter verschiedenen Anbaubedingungen ab (Akhatou *et al.*, 2017; Palmieri *et al.*, 2017). Unter den F1-Genotypen des GoodBerry-Projekts befand sich eine Probe (H085), welche an allen Standorten relativ stabile Polyphenol-Mengen aufwies. Die zweitstabilste Probe war die Elternlinie „Senga Sengana“, am stärksten variierte H107. Der Einfluss der Umwelt auf diese drei Genotypen ist in Abbildung 39 detailliert dargestellt. Die rote Linie markiert die Grenze von $R^2 > 0,2$, unterhalb welcher der Einfluss als nicht signifikant eingestuft wurde. Für H085 lagen bis auf zwei Ausnahmen alle Werte unterhalb dieses Limits. Auch bei den zwei höheren Werten handelte es sich mit 0,22 und 0,23 um sehr schwache Umwelteinflüsse. „Senga Sengana“ hingegen zeigte bereits deutlich mehr Metabolite, welche auf Grund wechselnder äußerer Bedingungen variieren, bei H107 wurde fast die Hälfte der Analyten signifikant durch Standorteffekte geprägt. In Bezug auf die Stabilität des Polyphenol-Profiles eignet sich H085 somit sehr gut für den Anbau an verschiedenen Standorten oder unter wechselnden klimatischen Bedingungen.

Allerdings wies H085 im Vergleich zu anderen untersuchten Genotypen relativ niedrige Polyphenol-Konzentrationen auf. Eine Ausnahme bildeten die Phenylpropanoide, welche in sehr hohen Mengen vorhanden waren (s. Abbildung 18). Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in einem defekten oder nicht exprimierten Gen zu Beginn der Flavonoid-Synthese (vgl. Abbildung 8), aber auch ein defekter Transkriptionsfaktor könnte die Ursache für diese Beobachtungen sein. Dem Anschein nach wurde die verfügbare Kohlenstoff-Biomasse in H085 nahezu komplett in die Synthese der Phenylpropanoide geleitet (vgl. Abbildung 6). Die verschiedenen Umwelteinwirkungen der einzelnen Standorte konnten diesen Defekt nicht überwinden, was zu einem stabilen Polyphenolprofil dieses Genotyps führte. Höhere Gehalte an Polyphenolen beinhalteten zum Beispiel H072, H076 oder auch H107. Diese unterlagen wiederum stärkeren Standortschwankungen.

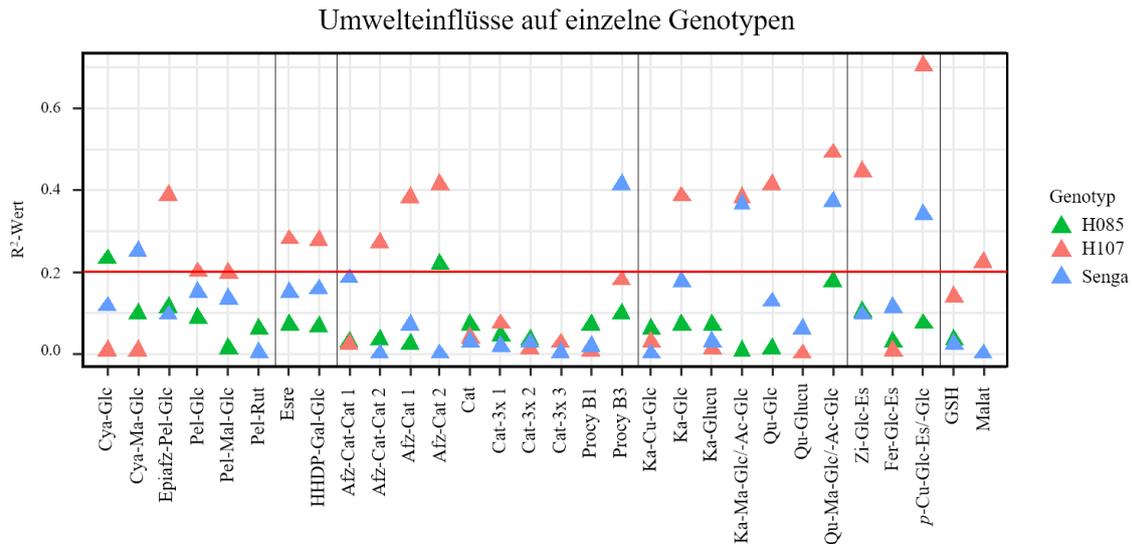


Abbildung 39: Einfluss der Umwelt auf einzelne Genotypen. Die Dreiecke symbolisieren den Einfluss der Umwelt auf die einzelnen Metabolite ausgewählter Genotypen. Alle R^2 -Werte $< 0,2$ (unterhalb der roten Linie) wurden als nicht signifikant eingestuft. Die vertikalen Linien dienen zur Unterteilung in die verschiedenen Unterklassen. Von links nach rechts: Anthocyane, Ellagsäurederivate, Flavanole, Flavonole, Phenylpropanoide, sonstige. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

Des Weiteren ist bekannt, dass neben den Polyphenolen auch weitere Parameter wie Säure- und Zuckergehalt oder Ertrag in einem Genotyp unterschiedlich stark durch Umweltfaktoren beeinflusst werden (Krüger *et al.*, 2012; Palmieri *et al.*, 2017). Im Gegensatz zum Polyphenol-Gehalt unterliegt auch H085 beim Ertrag den umweltgeschuldeten starken Schwankungen, welche für die gesamte Population zu sehen waren (vgl. Abbildung 17). In Spanien und Italien erzielte der Genotyp dabei immer noch sehr gute Erträge (400-700 g pro Pflanze), in Ciref, Inhort und Hansabred fiel die Ernte wesentlich niedriger aus (20-300 g). Auch innerhalb eines Standortes wurden Unterschiede sichtbar: In Spanien und Italien zählte H085 zu den Top-Kandidaten für hohe Erträge. In Frankreich belegte er das Mittelfeld der besten Genotypen, in Polen und Deutschland lieferte H085 nur unterdurchschnittliche Erträge (Projektpartner, unveröffentlichte Daten). Auch weitere Qualitätsmerkmale wie Zucker- und Säuregehalt variierten je nach Anbauort stark. Der Großteil der Population war von diesen standortbedingten Schwankungen betroffen, darunter erneut H085. Unter Berücksichtigung verschiedener Fruchtmerkmale, wie Polyphenole, aber auch Ertrag, Zucker- oder Säuregehalt müssen also Kompromisse gefunden werden. Je nachdem, welche Merkmale als wichtig erachtet werden, eignen sich unterschiedliche Genotypen für weitere Züchtung und den kommerziellen Anbau.

Im Gegensatz zu den Polyphenolen offenbarte sich für den Fra a 1-Gehalt keinerlei Einfluss des Genotyps und nur ein sehr schwacher Einfluss der Umwelt (s. Abbildung 31). Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, ist dieses Resultat in Übereinstimmung mit Literaturergebnissen (Kurze *et al.*, 2018a). Für die Züchtung neuer Sorten innerhalb der Gattung *F. × ananassa* sind somit konstant niedrige Fra a 1-Konzentrationen für die F1-Generation zu erwarten. Allerdings korreliert der Fra-Gesamtgehalt, wie

auch PR-10 Proteine anderer Obstsorten, nicht immer mit der Verträglichkeit durch Allergiker. Für die Züchtung hypoallergener Erdbeeren sind zusätzliche Nachweise mittels Basophilenaktivierungstest oder eine Humanstudie unumgänglich (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016; Franz-Oberdorf *et al.*, 2017; Romer *et al.*, 2020)

Da das Verhalten der einzelnen Nachkommen bezüglich der einzelnen Parameter nach wie vor schwer vorherzusehen ist, bleiben Modellpopulationen und Feldversuche weiterhin unabdingbar. In den letzten Jahren konnte das Züchtungsprogramm der University of Florida dabei große Fortschritte machen. In Kombination aus genotypischer und phänotypischer Charakterisierung verschiedener Populationen mit zahlreichen Individuen und mit der Hilfe stetig weiterentwickelter *deep learning* Algorithmen schafften sie, bereits in frühen Selektionsstadien die Eigenschaften neuer Genotypen aus den Merkmalen der Elternlinien für weitere Kreuzungen treffend zu bestimmen. Vielversprechende Genotypen konnten dadurch ein Jahr früher als bisher üblich erfolgreich für neue Kreuzungen genutzt werden (Gezan *et al.*, 2017; Whitaker *et al.*, 2020; Zingaretti *et al.*, 2020). Allerdings arbeiteten sie in ihren Studien lediglich an einem Standort. Interessant wäre der Test ihrer Modelle an einer Population, die unter unterschiedlichen klimatischen Bedingungen und mit unterschiedlicher Anbaupraxis kultiviert wurde, wie die GoodBerry-Population. Auch Auswirkungen des Klimawandels in den nächsten Jahren stellen spannende Herausforderungen an ihre Modelle.

4.5 Auswirkungen der Überexpression von CAD in „Mieze Schindler“

Textur

Studien zeigten, dass weiche Erdbeerfrüchte ein höheres Expressionslevel der Zimtsäure-CoA-Reduktase CCR aufweisen, während in härteren Früchten vermehrt Zimtalkohol-Dehydrogenase CAD exprimiert wird (Salentjin *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2006). Durch die Überexpression von CAD sollte diese Beobachtung überprüft werden. Es wurde eine festere Textur der reifen Früchte auf Grund vermehrter Lignin-Bildung erwartet (vgl. Abbildung 7). Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Alle roten Früchte der transgenen Linien besaßen eine vergleichbare Konsistenz wie die Kontrolllinie „Mieze Schindler“ (s. Abbildung 33). Frühere Experimente der Überexpression oder Herabregulierung verschiedener Gene innerhalb der Lignin-Synthese zeigten, dass Peroxidasen möglicherweise eine größere Rolle in der Lignin-Biosynthese spielen als CCR und CAD. Früchte, in welchen mittels Agroinfiltration unter anderem CCR und CAD transient herab- und heraufreguliert wurden, besaßen stets eine festere Textur als die Kontrollfrüchte, unabhängig von Herabregulierung oder Überexpression. Die Verwundung der Früchte durch die Injektion der Bakterien verursachte stets eine starke Expression einer Peroxidase, welche einen größeren Effekt auf die Lignin-Biosynthese hatte als die injizierten Genkonstrukte (Ring *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2014).

Polyphenole

Die Entwicklung der Polyphenole in den Früchten über verschiedene Reifestadien folgte bereits bekannten Trends. Anthocyane und Vertreter der Phenylpropanoide wurden in den Früchten erst in späteren Entwicklungsgraden gebildet (vg. Abbildung 34). Flavanole, Flavonole und Ellagsäurederivate hingegen nahmen mit zunehmender Reife ab (Kosar *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2009; Hanhieva *et al.*, 2011; Aaby *et al.*, 2012). Auch die Identifizierung der Flavanole als Hauptkomponenten der Wurzeln und hohe Flavanol-, Flavonol- und Ellagsäure-Konzentrationen in den Blättern deckte sich mit Ergebnissen aus der Literatur (Hanhieva *et al.*, 2011; Kårlund *et al.*, 2017).

Da die Synthesen der Phenylpropanoide und der Flavonoide um *p*-Cumaroyl-CoA als Grundbaustein konkurrieren, wurde die Akkumulation der Phenylpropanoide und gleichzeitig die Abnahme der Flavonoide im Gewebe der transgenen Pflanzen erwartet. In transgenen Arabidopsis-Pflanzen konnte die Konkurrenz der beiden Stoffwechselwege schon nachgewiesen werden (Besseau *et al.*, 2007). Auch in Erdbeerfrüchten wurde der Zusammenhang nach Herabregulierung der Chalkon-Synthase am Anfang der Flavonoid-Synthese bestätigt. Es fanden sich niedrigere Flavonoid-Konzentrationen und gleichzeitig festere Früchte auf Grund eines höheren Ligninanteils (Ring *et al.*, 2013). In dieser Arbeit ergab der Vergleich der transgenen Linien mit der Kontrolle allerdings nur wenige signifikante Unterschiede (s. Abbildung 35). Die meisten Unterschiede ergaben sich in grünen Früchten und Blättern. In diesen Organen wird CAD von Natur aus wenig exprimiert, wodurch eine Überexpression hier die stärksten Effekte haben könnte. In roten und teilweise roten Früchten sowie

Wurzeln ist das Expressionslevel bereits sehr hoch, weshalb eine Überexpression in diesen Proben möglicherweise eine geringere Auswirkung zeigt (Salentjin *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2014). Herabregulierung und Überexpression von CAD in Erdbeerfrüchten *via* Agroinfiltration zeigte außerdem, dass die Bakterieninjektion mit Genkonstrukten zur Herabregulierung durchaus zu einem signifikant niedrigeren Expressionslevel von CAD in roten Früchten führte. Die Behandlung mit einem Genkonstrukt zur Überexpression zeigte jedoch keine Auswirkung (Yeh *et al.*, 2014). Den beobachteten Effekten auf Metaboliten-Niveau nach zu urteilen, hat auch in den hier verwendeten CAD-Pflanzen die Überexpression nur auf Gewebe mit niedrigen CAD-Levels, wie grünen Früchten oder Blättern, einen messbaren Effekt.

Neben Unterschieden zwischen den transgenen Linien und der Kontrolllinie fanden sich auch Differenzen zwischen den grünen Früchten von F62 bis F64. F62 und F63 besaßen zum Beispiel niedrigere Konzentrationen der Flavanole und Flavonole, während F64 größere Mengen als die Kontrolle aufwies (vgl. Abbildung 35). Die unterschiedlichen Polyphenol-Profile der einzelnen transgenen Linien resultieren vermutlich aus der Transformation. In drei unabhängigen Ansätzen wurden „Mieze Schindler“-Blätter zunächst nach Lunkenbein *et al.* (2006b) transformiert. Die daraus resultierenden Triebe wurden auf Nährmedium angezogen und anschließend jede der drei Linien einzeln vermehrt und im Gewächshaus angepflanzt. Dadurch kann es leicht zu Variationen zwischen den verschiedenen transgenen Linien kommen (Schwab *et al.*, 2011).

Flüchtige Naturstoffe

Nicht nur in der Bildung der Phenylpropanoide sind Alkohol-Dehydrogenasen wie CAD involviert. Auch zur Synthese flüchtiger Aromastoffe aus Fettsäuren sind sie essentiell (s. Abbildung 11; Schwab *et al.*, 2008). Durch Überexpression der Alkohol-Dehydrogenase ADH2 in Tomate konnten signifikant höhere Konzentrationen der beiden Alkohole Z-3-Hexanol und Z-3-Hexenol generiert werden (Speirs *et al.*, 1998). Aus Versuchen mit transgenen Erdbeerpflanzen ist außerdem bekannt, dass Methyl-Transferasen gleichzeitig im Phenylpropanoid-Stoffwechsel als auch in der Synthese der Aromastoffe wirken können (Lunkenbein *et al.*, 2006b). Somit könnte die Überexpression des CAD-Gens auch auf die Bildung der VOCs eine Auswirkung haben. Aus der Analyse der flüchtigen Metabolite in roten Früchten der CAD-Pflanzen resultierte die Identifizierung 31 verschiedener Substanzen, welche mit bekannten VOCs in Erdbeere aus der Literatur übereinstimmen (Schieberle und Hofmann, 1997; Olbricht *et al.*, 2011; Ulrich *et al.*, 2018). Bis auf zwei Ausnahmen (Benzaldehyd und Benzylalkohol) ergaben sich dabei jedoch keine signifikanten Differenzen zwischen der Kontrolllinie und der transgenen Linie F64 (vgl. Abbildung 36). Benzaldehyd und Benzylalkohol waren außerdem in höheren Konzentrationen in der Kontrolle vorhanden, was der Annahme einer verstärkten Alkohol-Produktion auf Grund der CAD-Überexpression widerspricht. Für alle weiteren Metabolite ergaben sich lediglich Tendenzen höherer Konzentrationen, die jedoch nicht signifikant waren.

Reaktion der Pflanzen auf Überexpression

Die Ergebnisse von Textur, Polyphenolgehalt und VOCs stimmen darin überein, dass sich in keiner der Analysen eindeutige Differenzen zwischen den transgenen Linien und der Kontrolle fanden. Da es sich beim Sekundärmetabolismus um einen sehr komplexen Stoffwechselweg handelt, in dem eine Vielzahl an Enzymen beteiligt ist, ist die gezielte Modifikation einzelner Unterzweige oftmals sehr schwierig. Wird in eine Syntheseroute eingegriffen, so lenken die Pflanzen den entsprechenden Stoffwechsel möglicherweise über alternative Wege um, um auch in transgenen Pflanzen ihre ursprüngliche Metaboliten-Zusammensetzung zu gewährleisten (Sweetlove *et al.*, 2017). Experimente mit Fra a 1.01E, welches mittels Strep-Tag II markiert und nach Agroinfiltration in *Fragaria*-Früchten unter Kontrolle des 35S Promotors exprimiert wurde, offenbarten denselben Effekt. Die transgenen Früchte reduzierten die endogene Fra a 1.01E Expression soweit, dass das Gesamtniveau an Fra a 1.01E und Fra a 1.01E-Strep II wieder vergleichbar mit dem der unveränderten Kontrollpflanzen war (Pröbstl, unveröffentlichte Daten). Das octoploide Genom der *F. × ananassa*-Sorten kommt hier als erschwerender Faktor hinzu. In Experimenten mit transgenen Erdbeerpflanzen zeigte außerdem die Herabregulierung des Methyl-Transferase-Gens deutlich stärkere Effekte als die Überexpression (Lunkenbein *et al.*, 2006b). Bezüglich des CAD-Gens erwies sich bereits die gezielte Überexpression in Früchten via Agroinfiltration als schwierig (Yeh *et al.*, 2014). Im Fall der transgenen CAD-Pflanzen kann sich die Überexpression auf verschiedene Pflanzenorgane auswirken. Eine Verstärkung der ohnehin schon hohen Expressionslevel in roten Früchten ist daher vermutlich nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß geschehen.

In Summe weisen bereits bekannte Ergebnisse der Literatur darauf hin, dass die gezielte Herabregulierung einzelner Gene gut funktioniert. Ebenfalls häufig in der Literatur beschrieben, aber auch in den CAD-Versuchen dieser Arbeit erneut deutlich geworden, gestaltet sich eine Überexpression und daraus resultierende Verstärkung gewünschter Eigenschaften, wie einen größeren Lignin-Gehalt oder eine höhere Akkumulation bestimmter Aromastoffe, weiterhin schwierig.

5 Fazit und Ausblick

Der Sekundärstoffwechsel in *Fragaria × ananassa* ist ein sehr komplexes, aber auch sensibles System. Die Synthese der Polyphenole hängt von vielen einzelnen Enzymen ab, welche durch den genetischen Hintergrund (G) der einzelnen Genotypen festgelegt sind. Aber auch äußere Faktoren (E) spielen eine wichtige Rolle. Daraus resultiert ein enges Zusammenspiel von $G \times E$, welches schwer vorherzusehen ist. Die bioinformatischen Auswertungen des Einflusses der beiden Komponenten G und E auf die Konzentrationen der verschiedenen Metabolite ergab für die beiden Anthocyane Pelargonidin-Malonyl-Glucosid und Cyanidin-Malonyl-Glucosid einen vorschherrschenden Effekt des Genotyps. Die beiden Flavonol-Pendants, Kaempferol- und Quercetin-Malonyl-Glucosid hingegen zeigten sich bereits stärker durch die Umwelt und weniger durch den genetischen Hintergrund beeinflusst. Auch für alle weiteren Polyphenole offenbarte sich weder G noch E als dominant. Dadurch gestaltet sich die Abschätzung des Verhaltens einzelner Genotypen für die Züchtung oder den Anbau unter wechselnden klimatischen Bedingungen weiterhin schwierig.

Einzelne Wege der Polyphenol-Biosynthese, wie die Polymerisierung der Flavanoole oder die Malonylierung der Anthocyane und Flavonoole, sind nach wie vor ungeklärt. Die Korrelationsanalysen in dieser Arbeit geben erste Hinweise auf mögliche involvierte Enzyme und deren Substratspektrum. Diese Annahmen sollten in Zukunft über Enzym-Assays und Versuche mit transgenen Pflanzen analog zur Charakterisierung verschiedenener Glucosyl-Transferasen (Griesser *et al.*, 2008a; Griesser *et al.*, 2008b) bestätigt werden. Darüber hinaus werden kombinierte Ansätze aus *Genomics*, *Transcriptomics* und *Metabolomics* immer populärer (Whitaker *et al.*, 2020). Sie können künftig vermehrt für die Aufklärung unbekannter Synthesewege, wie zum Beispiel die Glucuronidierung der Flavonoole, genutzt werden. Die Verknüpfung dieser Techniken mit klassischen Feldversuchen stellt wiederum eine gute Grundlage dar, die Beeinflussung dieses sensiblen Systems durch äußere Umweltfaktoren treffend zu beurteilen.

Im Gegensatz zu den Polyphenolen präsentierte sich der Fra a 1-Gehalt innerhalb der reinen *F. × ananassa*-Kreuzungspopulation als sehr stabiler Parameter. Da die Verträglichkeit der Früchte jedoch durch die unterschiedlichen Isoformen stark beeinflusst wird, sind zur Sicherheit der Verbraucher zusätzlich Basophilenaktivierungstests oder Humanstudien notwendig (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016; Franz-Oberdorf *et al.*, 2017; Romer *et al.*, 2020) Weitere Aufklärung der Fra-Proteine kann darüber hinaus eine *Proteomics*-Analyse mittels Massenspektrometrie liefern (Guarino und Sciarrillo, 2018).

6 Literatur

- Aaby K, Ekeberg D, Skrede G.** 2007. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4395–4406.
- Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G.** 2012. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry* **132**, 86–97.
- Ahammer L, Grutsch S, Kamenik AS, Liedl KR, Tollinger M.** 2017. Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 1606–1612.
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FWA et al.** 2004. Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species. *The Plant Cell* **16**, 3110–3131.
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ et al.** 2000. Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *The Plant Cell* **12**, 647–661.
- Akhatou I, Sayago A, González-Domínguez R, Fernández-Recamales Á.** 2017. Application of Targeted Metabolomics to Investigate Optimum Growing Conditions to Enhance Bioactive Content of Strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 9559–9567.
- Barbey C, Hogshead M, Schwartz AE et al.** 2019. The Genetics of Differential Gene Expression Related to Fruit Traits in Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Frontiers in Genetics* **10**, 1317.
- Bassil NV, Davis TM, Zhang H et al.** 2015. Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria × ananassa*. *BMC genomics* **16**, 155.
- Basu A, Wilkinson M, Penugonda K, Simmons B, Betts NM, Lyons TJ.** 2009. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal* **8**, 43.
- Battino M, Beekwilder J, Denoyes-Rothan B, Laimer M, McDougall GJ, Mezzetti B.** 2009. Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews* **67 Suppl 1**, 145-50.
- Beauvoit B, Belouah I, Bertin N et al.** 2018. Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. *Annals of Botany* **122**, 1–21.
- Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A.** 2004. Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana. *Plant Physiology*, 1865–1878.
- Besbes F, Franz-Oberdorf K, Schwab W.** 2019a. Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra 1 proteins. *Journal of Plant Physiology* **233**, 1–11.

- Besbes F, Habegger R, Schwab W.** 2019b. Induction of *PR-10* genes and metabolites in strawberry plants in response to *Verticillium dahliae* infection. *BMC Plant Biology* **19**, 128.
- Besseau S, Hofmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M.** 2007. Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell* **19**, 148–162.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M.** 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 519–546.
- Bradford MM.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 248–254.
- Bravo L.** 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317–333.
- Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M.** 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 3540–3555.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft.** 2019. *Pro-Kopf-Verbrauch von Obst nach Arten (2017/2018 vorläufig)*. <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/obst-gemuese-zitrusfruechte-schalen-und-trockenobst/>. 21.11.2019.
- Burton-Freeman B, Linares A, Hyson D, Kappagoda T.** 2010. Strawberry Modulates LDL Oxidation and Postprandial Lipemia in Response to High-Fat Meal in Overweight Hyperlipidemic Men and Women. *Journal of the American College of Nutrition* **29**, 46–54.
- Carbone F, Mourgues F, Biasioli F et al.** 2006. Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes. *Molecular Breeding* **18**, 127–142.
- Carbone F, Preuss A, De Vos, Ric C H et al.** 2009. Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment* **32**, 1117–1131.
- Caretto S, Linsalata V, Colella G, Mita G, Lattanzio V.** 2015. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 26378–26394.
- Casañal A, Zander U, Muñoz C et al.** 2013. The Strawberry Pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a Proteins Control Flavonoid Biosynthesis by Binding to Metabolic Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 35322–35332.
- Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM.** 2010. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in *Camarosa* strawberry. *Food Chemistry* **123**, 574–582.
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J.** 2018. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* **5**, 87.

- Cruz-Rus E, Amaya I, Sánchez-Sevilla JF, Botella MA, Valpuesta V.** 2011. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4191–4201.
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E et al.** 2012. The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4275–4290.
- Dai J, Mumper RJ.** 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313–7352.
- Darrow GM.** 1966. *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*, 1. Auflage: The New England Institute for Medical Research.
- Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union.** 2011: *VO (EU) Nr. 1169/2011*.
- DFHV Deutscher Fruchthandelsverband e.V.** 2019. *Jahresbericht 2019*.
- Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB.** 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **165**, 9–28.
- Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L et al.** 1995. Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms: Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **95**, 962–969.
- European Commission.** 2019. *FRUMATIS (Fruit Reproductive Material Information System)*. https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases_en. 19.11.2019.
- Fait A, Hanhieva K, Beleggia R et al.** 2008. Reconfiguration of the Achene and Receptacle Metabolic Networks during Strawberry Fruit Development. *Plant Physiology* **148**, 730–750.
- Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M.** 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS journal* **280**, 1169–1199.
- Fischer TC, Mirbeth B, Rentsch J et al.** 2014. Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *The New Phytologist* **201**, 440–451.
- Folta KM, Davis TM.** 2006. Strawberry Genes and Genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 399–415.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2020. *Production of Strawberries*. Suchbegriffe: Item "Strawberry"; Country "Select all"; Elements "Production Quantity"; Years "2018", "2017". <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. 05.05.2020.
- Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K et al.** 2016. Fra a 1.02 Is the Most Potent Isoform of the Bet v 1-like Allergen in Strawberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 3688–3696.
- Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K et al.** 2017. White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Research International* **100**, 748–756.

- Fulcrand H, Cheynier V, Oszmianski J, Moutounet M.** 1997. An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry* **46**, 223–227.
- Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P.** 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* **10**, 542–549.
- Garming H, Dirksmeyer W, Bork L.** 2018. Entwicklungen des Obstbaus in Deutschland von 2005 bis 2017: Obstarten, Anbauregionen, Betriebsstrukturen und Handel. *Thünen Working Paper 100*.
- Gauch HG.** 2006. Statistical Analysis of Yield Trials y AMMI and GGE. *Crop Science* **46**, 1488–1500.
- Gezan SA, Osorio LF, Verma S, Whitaker VM.** 2017. An experimental validation of genomic selection in octoploid strawberry. *Horticulture Research* **4**, 16070.
- Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M.** 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**, 9–19.
- Gil-Ariza DJ, Amaya I, López-Aranda JM, Sánchez-Sevilla JF, Ángel Botella M, Valpuesta V.** 2009. Impact of Plant Breeding on the Genetic Diversity of Cultivated Strawberry as Revealed by Expressed Sequence Tag-derived Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **134**, 337–347.
- Griesser M, Hoffmann T, Bellido ML et al.** 2008a. Redirection of Flavonoid Biosynthesis through the Down-Regulation of an Anthocyanidin Glucosyltransferase in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiology* **146**, 1528–1539.
- Griesser M, Vitzthum F, Fink B et al.** 2008b. Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2611–2625.
- Grotewold E.** 2008. *The Science of Flavonoids*, 1. Auflage: Springer Science + Business Media.
- Guarino C, Sciarrillo R.** 2018. The identification of allergen proteins in two different varieties of strawberry by two different approaches: Proteomic and western blotting method. *Annals of Agricultural Sciences* **63**, 181–189.
- Han X, Shen, Tao, Lou, Hongxiang.** 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* **8**, 950–988.
- Hancock JF, Callow PW, Dale A et al.** 2001. From the Andes to the Rockies: Native Strawberry Collection and Utilization. *HortScience* **36**, 221–225.
- Hancock JF, Luby JJ.** 1993. Genetic Resources at Our Doorstep: The Wild Strawberries: Attempts are under way to expand the cultivar's genetic background. *BioScience*, 141–147.
- Hancock JF, Sooriyapathirana SS, Bassil NV et al.** 2016. Public Availability of a Genotyped Segregating Population May Foster Marker Assisted Breeding (MAB) and Quantitative Trait Loci (QTL) Discovery: An Example Using Strawberry. *Frontiers in Plant Science* **7**, 619.
- Hanhieva K, Kärenlampi SO, Aharoni A.** 2011. Recent Advances in Strawberry Metabolomics. *Genes, Genomes and Genomics*, 65–75.

- Hanhineva K, Soininen P, Anttonen MJ et al.** 2009. NMR and UPLC-qTOF-MS/MS Characterisation of Novel Phenylethanol Derivatives of Phenylpropanoid Glucosides from the Leaves of Strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Jonsok). *Phytochemical Analysis* **20**, 353–364.
- Harborne JB, Williams CA.** 2000. Advance in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504.
- Härtl K, Denton A, Franz-Oberdorf K et al.** 2017. Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes. *Scientific Reports* **7**, 45113.
- Haugeneder A, Trinkl J, Härtl K, Hoffmann T, Allwood JW, Schwab W.** 2018. Answering biological questions by analysis of the strawberry metabolome. *Metabolomics* **14**, 145.
- Hernández-Jiménez A, Gil-Muñoz R, Ruiz-García Y, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A, Gómez-Plaza E.** 2013. Evaluating the Polyphenol Profile in Three Segregating Grape (*Vitis vinifera* L.) Populations. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2013**, 572896.
- Hjernø K, Alm R, Canbäck B et al.** 2006. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* **6**, 1574–1587.
- Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W.** 2006. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal* **48**, 818–826.
- Hoffmann T, Kurtzer R, Skowranek K et al.** 2011. Metabolic engineering in strawberry fruit uncovers a dormant biosynthetic pathway. *Metabolic Engineering* **13**, 527–531.
- Hoffmann-Sommergruber K.** 2000. Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins: What Do They Have in Common? *International Articles of Allergy and Immunology* **122**, 155–166.
- Ichijima K.** 1926. Cytological and Genetic Studies on *Fragaria*. *Genetics* **11**, 590–620.
- Jiang X, Liu Y, Wu Y et al.** 2015. Analysis of accumulation patterns and preliminary study on the condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Scientific Reports* **5**, 8742.
- Johnson AL, Govindarajulu R, Ashman T-L.** 2014. Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of variation in breeding system, ploidy and species age. *Botanical Journal of the Linnean Society* **176**, 99–114.
- Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M.** 2010. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ Identification of Phenolic Compounds in Cultivated Strawberries from Macedonia. *Macedonia Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **29**, 181–194.
- Kårlund A, Hanhineva K, Lehtonen M, McDougall GJ, Stewart D, Karjalainen RO.** 2017. Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**, 2182–2190.

- Kårlund A, Moor U, McDougall G, Lehtonen M, Karjalainen RO, Hanhineva K.** 2016. Metabolic profiling discriminates between strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars grown in Finland or Estonia. *Food Research International* **89**, 647–653.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM.** 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* **61**, 1361779.
- Kosar M, Kafkas E, Paydas S, Baser KHC.** 2004. Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1586–1589.
- Krüger E, Josuttis M, Nestby R, Toldam-Andersen TB, Carlen C, Mezzetti B.** 2012. Influence of growing conditions at different latitudes of Europe on strawberry growth performance, yield and quality. *Journal of Berry Research* **2**, 143–157.
- Kurze E, Kock V, Lo Scalzo R, Olbricht K, Schwab W.** 2018a. Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content. *Nutrients* **10**, 857.
- Kurze E, Lo Scalzo R, Campanelli G, Schwab W.** 2018b. Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola l 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. *POoS one* **13**, 1-18.
- Lerceteau-Köhler E, Guérin G, Laigret F, Denoyes-Rothan B.** 2003. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 619–628.
- Liston A, Cronn R, Ashman T-L.** 2014. *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany* **101**, 1686–1699.
- Liu C, Wang X, Shulaev V, Dixon RA.** 2016. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins. *Nature Plants* **2**, 16182.
- Lunkenbein S, Bellido M, Aharoni A et al.** 2006a. Cinnamate Metabolism in Ripening Fruit. Characterization of a UDP-Glucose:Cinnamate Glucosyltransferase from Strawberry. *Plant Physiology* **140**, 1047–1058.
- Lunkenbein S, Salentijn EMJ, Coiner HA, Boone MJ, Krens FA, Schwab W.** 2006b. Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2445–2453.
- Malosetti M, Ribaut J-M, van Eeuwijk FA.** 2013. The statistical analysis of multi-environment data: modeling genotype-by-environment interaction and its genetic basis. *Frontiers in Physiology* **4**, 44.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C.** 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 230–242.
- Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F.** 2015. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International* **2015**, 905215.
- Mathey MM, Mookerjee S, Mahoney LL et al.** 2017. Genotype by environment interactions and combining ability for strawberry families grown in diverse environments. *Euphytica* **213**, 112.

- Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F et al.** 2014. *MYB10* plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria x ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* **65**, 401–417.
- Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A et al.** 2013. Alteration of the Content of Primary and Secondary Metabolites in Strawberry Fruit by *Colletotrichum nymphaeae* Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 5987–5995.
- Muñoz C, Hoffmann T, Escobar NM et al.** 2010. The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3**, 113–124.
- Muñoz C, Sanchez-Sevilla JF, Botella MA, Hoffmann T, Schwab W, Valpuesta V.** 2011. Polyphenol Composition in the Ripe Fruits of *Fragaria* Species and Transcriptional Analyses of Key Genes in the Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 12598–12604.
- Murphy K, Weaver C.** 2018. *Janeway Immunologie*, 9. Auflage: Springer Spektrum.
- Niemetz R, Gross GG.** 2005. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**, 2001–2011.
- Noguchi A, Horikawa M, Fukui Y et al.** 2009. Local Differentiation of Sugar Donor Specificity of Flavonoid Glycosyltransferase in Lamiales. *The Plant Cell* **5**, 1556–1572.
- Olbricht K, Grafe C, Weiss K, Ulrich D.** 2007. Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. *Plant Breeding* **127**, 87-97.
- Olbricht K, Ulrich D, Weiss K, Grafe C.** 2011. Variation in the Amounts of Selected Volatiles in a Model Population of *Fragaria × ananassa* Duch. As Influenced by Harvest Year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 944–952.
- Olsson ME, Andersson CS, Oredsson S, Berglund RH, Gustavsson K-E.** 2006. Antioxidant Levels and Inhibition of Cancer Cell Proliferation in Vitro by Extracts from Organically and Conventionally Cultivated Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1248–1255.
- Ono E, Homma Y, Horikawa M et al.** 2010. Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines (*Vitis vinifera*). *The Plant Cell* **22**, 2856–2871.
- Orozco-Navarrete B, Kaczmarek Z, Dupeux F et al.** 2020. Structural Bases for the Allergenicity of Fra a 1.02 in Strawberry Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **XXX**, XXX-XXX.
- Osmani SA, Bak S, Imerty A, Olsen CE, Lindberg Moller B.** 2008. Catalytic Key Amino Acids and UDP-Sugar Donor Specificity of a Plant Glucuronosyltransferase, UGT94B1: Molecular Modeling Substantiated by Site-Specific Mutagenesis and Biochemical Analyses. *Plant Physiology* **148**, 1295–1308.
- Palmieri L, Masuero D, Martinatti P, Baratto G, Martens S, Vrhovsek U.** 2017. Genotype-by-environment effect on bioactive compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**, 4180–4189.

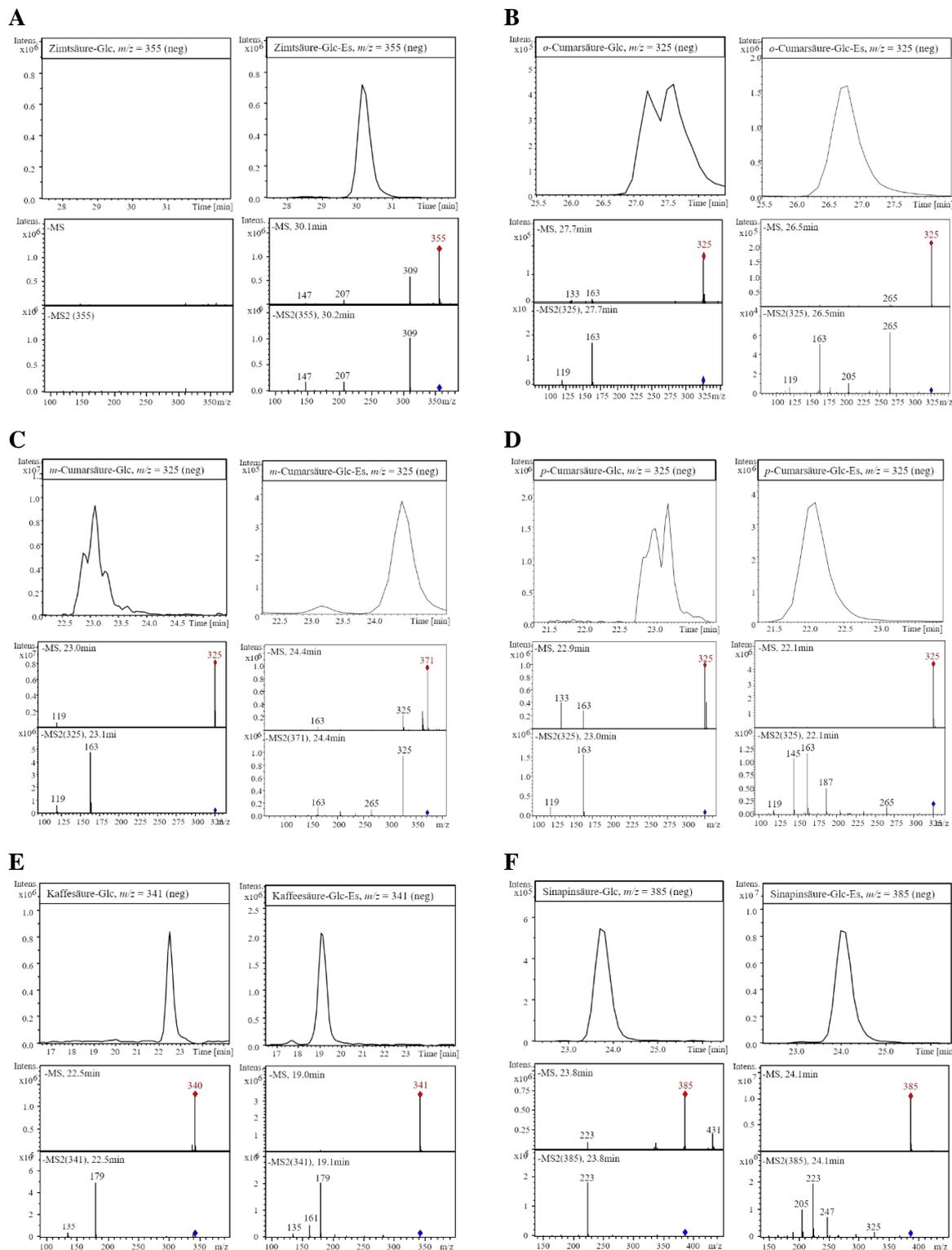
- Paquette M, Medina Larqué AS, Weisnagel SJ et al.** 2017. Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *The British Journal of Nutrition* **117**, 519–531.
- Patras MA, Jaiswal R, McDougall GJ, Kuhnert N.** 2018. Profiling and Quantification of Regioisomeric Caffeoyl Glucoses in Berry Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 1096–1104.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Santos-Buelga C.** 2012. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**, 1822–1825.
- Picchi V, Lo Scalzo R, Kurze E, Fibiani M, Vangdal E, Schwab W.** 2019. Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1 allergen content in plums. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **70**, 688–700.
- Pillet J, Yu H-W, Chambers AH, Whitaker VM, Folta KM.** 2015. Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4455–4467.
- Pott DM, Osorio S, Vallarino JG.** 2019. From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. *Frontiers in Plant Science* **10**, 835.
- Pourcel L, Routaboul J-M, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I.** 2005. *TRANSPARENT TESTA10* Encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat. *The Plant Cell* **17**, 2966–2980.
- Ring J.** 2005. *Allergy in Practice*, 1. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Ring L, Yeh S-Y, Hücherig S et al.** 2013. Metabolic Interaction between Anthocyanin and Lignin Biosynthesis is Associated with Peroxidase FaPRX27 in Strawberry Fruit. *Plant Physiology* **163**, 43–60.
- Rink L, Kruse A, Haase H.** 2015. *Immunologie für Einsteiger*, 2. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum.
- Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidet LPR, Bertin N.** 2014. Water shortage and quality of fleshy fruits -making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4097–4117.
- Romer E, Chebib S, Bergmann K-C et al.** 2020. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Scientific Reports* **10**, 9144.
- Rousserie P, Rabot A, Geny-Denis L.** 2019. From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 1325–1343.
- Salentjin EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA.** 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* **118**, 571–578.

- Sargent DJ, Rys A, Nier S, Simpson DW, Tobutt KR.** 2007. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 373–384.
- Schieberle P, Hofmann T.** 1997. Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 227–232.
- Schulenburg K, Feller A, Hoffmann T, Schecker JH, Martens S, Schwab W.** 2016. Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry. *Journal of Experimental Botany* **67**, 2299–2308.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E.** 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* **54**, 712–732.
- Schwab W, Hoffmann T, Kalinowski G, Preuss A.** 2011. Functional Genomics in Strawberry Fruit through RNAi-mediated Silencing. *Genes, Genomes and Genomics* **5**.
- Schwinn K, Miosic S, Davies K et al.** 2014. The B-ring hydroxylation pattern of anthocyanins can be determined through activity of the flavonoid 3'-hydroxylase on leucoanthocyanidins. *Planta* **240**, 1003–1010.
- Seeram NP, Lee R, Scheuller HS, Heber D.** 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* **97**, 1–11.
- Senser F, Scherz H, Kirchhoff E.** 2004. *Lebensmitteltabelle für die Praxis: Der kleine Souci · Fachmann · Kraut*, 3. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Seutter von Loetzen C, Hoffmann T, Hartl MJ et al.** 2014. Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: Identification of the physiological ligand. *The Biochemical Journal* **457**, 379–390.
- Sicherer SH, Sampson HA.** 2010. Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 116–125.
- Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS et al.** 2014. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* **2014**, 543195.
- Song C, Hong X, Zhao S et al.** 2016. Glucosylation of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, the Key Strawberry Flavor Compound in Strawberry Fruit. *Plant Physiology* **171**, 139–151.
- Song C, Le Gu, Liu J et al.** 2015. Functional Characterization and Substrate Promiscuity of UGT71 Glycosyltransferases from Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plant & Cell Physiology* **56**, 2478–2493.
- Speirs J, Lee E, Holt K et al.** 1998. Genetic Manipulation of Alcohol Dehydrogenase Levels in Ripening Tomato Fruit Affects the Balance of Some Flavor Aldehydes and Alcohols. *Plant Physiology* **117**, 1047–1058.

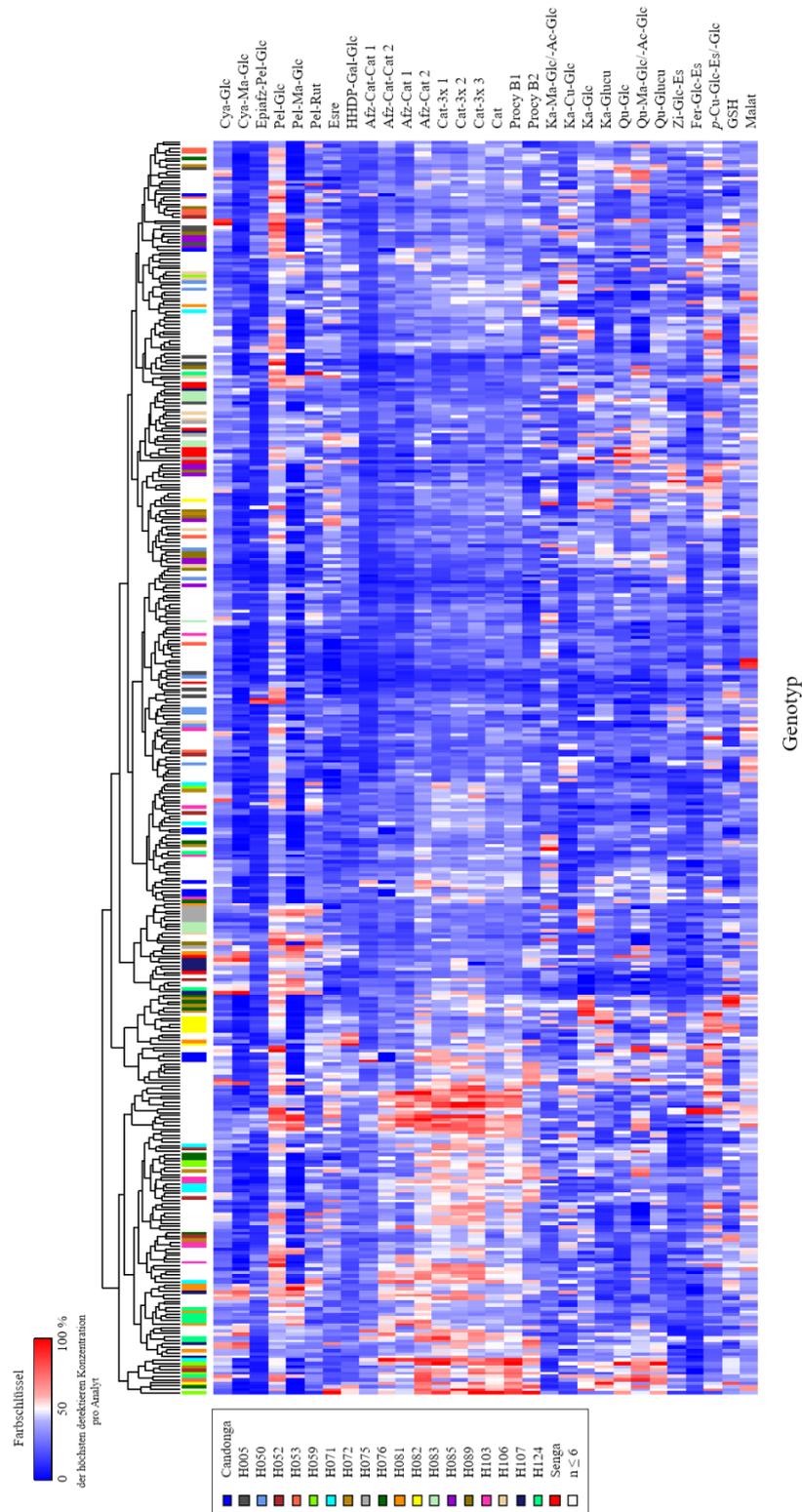
- Stewart D, McDougall GJ, Sungurtas J, Verrall S, Graham J, Martinussen I.** 2007. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**, 645–651.
- Sweetlove LJ, Nielsen J, Fernie AR.** 2017. Engineering central metabolism - a grand challenge for plant biologists. *The Plant Journal* **90**, 749–763.
- Thill J, Miosic S, Gotame TP et al.** 2013. Differential expression of flavonoid 3'-hydroxylase during fruit development establishes the different B-ring hydroxylation patterns of flavonoids in *Fragaria* × *ananassa* and *Fragaria vesca*. *Plant Physiology and Biochemistry* **72**, 72–78.
- Tulipani S, Marzban G, Herndl A, Laimer M, Mezzetti B, Battino M.** 2011. Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chemistry* **124**, 906–913.
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F et al.** 2008. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 696–704.
- Ulrich D, Hoberg E, Rapp A, Kecke S.** 1997. Analysis of strawberry flavour - discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 218–223.
- Ulrich D, Kecke S, Olbricht K.** 2018. What Do We Know about the Chemistry of Strawberry Aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 3291–3301.
- Ulrich D, Komes D, Olbricht K, Hoberg E.** 2007. Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**, 1185–1196.
- Urrutia M, Bonet J, Arús P, Monfort A.** 2015. A near-isogenic line (NIL) collection in diploid strawberry and its use in the genetic analysis of morphologic, phenotypic and nutritional characters. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **128**, 1261–1275.
- Urrutia M, Schwab W, Hoffmann T, Monfort A.** 2016. Genetic dissection of the (poly)phenol profile of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) fruits using a NIL collection. *Plant Science* **242**, 151–168.
- Vallarino JG, Pott DM, Cruz-Rus E et al.** 2019. Identification of quantitative trait loci and candidate genes for primary metabolite content in strawberry fruit. *Horticulture Research* **6**, 4.
- Vassilopoulou EV, Zuidmeer L, Akkerdaas J et al.** 2007. Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for *in vivo* and *in vitro* testing and diagnosis. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**, 360–366.
- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N.** 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal* **2**, 1214–1234.
- Viscupicová J, Ondrejovic M, Sturdik E.** 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* **47**, 151–162.

- Wang P, Liu Y, Zhang L et al.** 2020. Functional demonstration of plant flavonoid carbocations proposed to be involved in the biosynthesis of proanthocyanidins. *The Plant journal for cell and molecular biology* **101**, 18–36.
- Weber N, Schmitzer V, Jakopic J et al.** 2013. Influence of *Colletotrichum simmondsii* R. G. Shives & Y. P. Tan infection on selected primary and secondary metabolites in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit and runners. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 281–290.
- Whitaker VM.** 2011. Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research* **1**, 115–127.
- Whitaker VM, Knapp SJ, Hardigan MA et al.** 2020. A roadmap for research in octoploid strawberry. *Horticulture Research* **7**, 33.
- Withopf B, Richling E, Roscher R, Schwab W, Peter Schreier.** 1997. Sensitive and Selective Screening for 6'-O-Malonylated Glucoconjugates in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 907–911.
- Yeh S-Y, Huang F-C, Hoffmann T, Mayershofer M, Schwab W.** 2014. FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in Plant Science* **5**, 518.
- Yue T, Xie K-B, Tan Z et al.** 2018. Enzymatic synthesis of glucuronidated metabolites of two neurological active agents using plant glucuronosyltransferases. *Journal of Asian Natural Products Research* **20**, 605–614.
- Zingaretti LM, Gezan SA, Ferrão LFV et al.** 2020. Exploring Deep Learning for Complex Trait Genomic Prediction in Polyploid Outcrossing Species. *Frontiers in Plant Science* **11**, 25.

7 Anhang



Anhang 1: Fragmentierungsmuster aller synthetisierten Phenylpropanoid-Referenzen. A: Zimtsäure, B: *o*-Cumarsäure, C: *m*-Cumarsäure, D: *p*-Cumarsäure, E: Kaffeesäure, F: Sinapinsäure. Zimtsäure-Glucosid kann auf Grund der fehlenden Alkohol-OH-Gruppe des Edukts nicht synthetisiert werden.



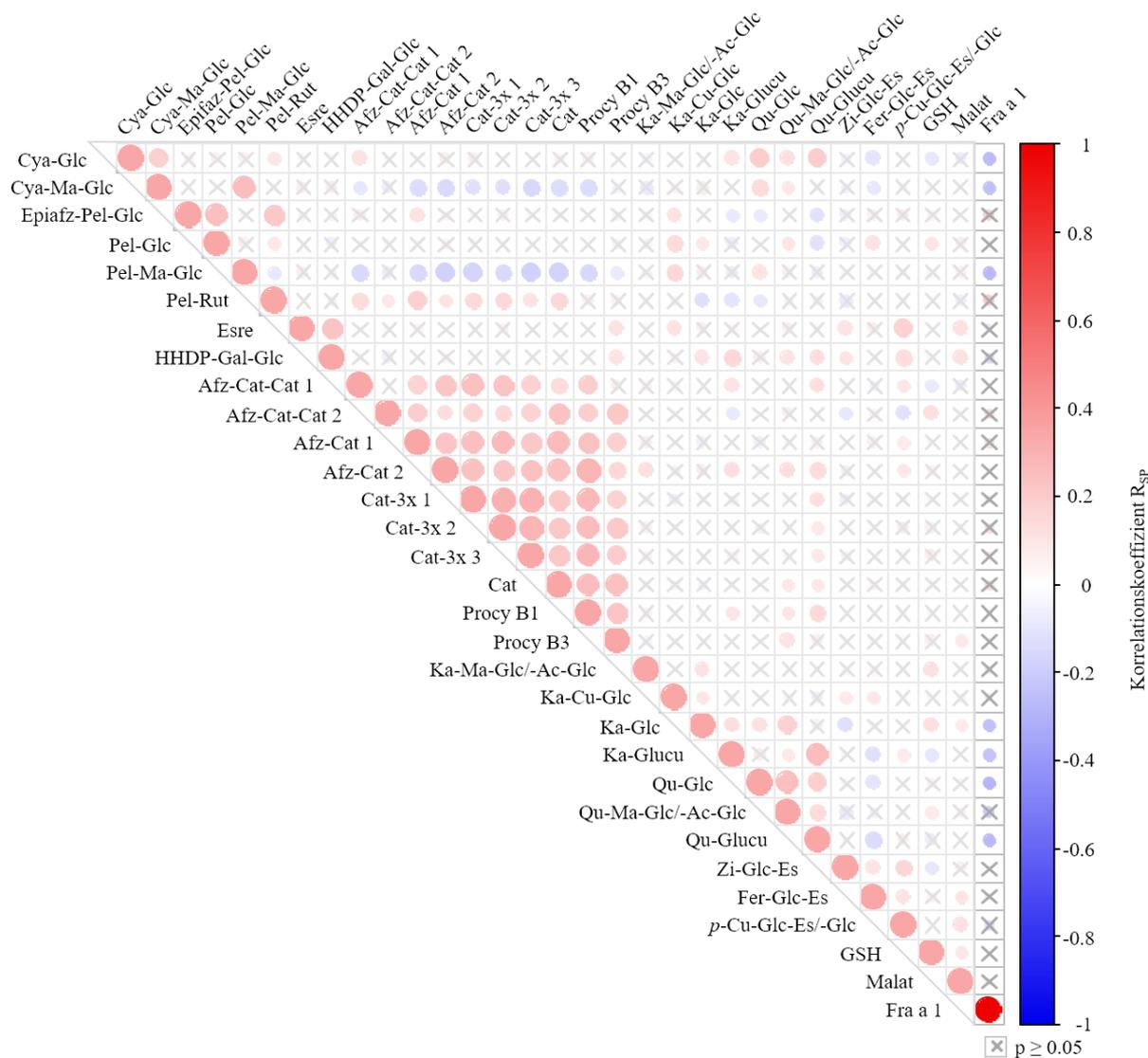
Anhang 2: Polyphenolprofil der Kreuzungspopulation aus 'Senga Sengana' und 'Candonga' im Erntejahr 2017 und 2018. Jeder Genotyp der in den Erntejahren 2017 und 2018 mit jeweils 3 Replikaten getestet wurde wird durch eine eigene Farbe angegeben, unabhängig vom jeweiligen Standort. Jede Spalte stellt den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten eines Genotyps dar. Die Konzentrationen der einzelnen Metabolite sind als Prozentanteil der höchsten gemessenen Konzentration pro Analyt im gesamten Datenset dargestellt und reichen von 0 % (blau) bis 100 % (rot). Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.. Alle Genotypen mit $n \leq 6$, die nur in einem der beiden Erntejahren analysiert wurden, sind in Weiß dargestellt.

Anhang 3: Konzentrationsspannen der Polyphenole und des Fra a 1-Gehalts innerhalb der GoodBerry-Population über zwei Erntejahre 2017 und 2018.

Klasse	Metabolit	c _{Min} [ppm IS equ]	c _{Max} [ppm IS equ]
A	Cyanidin-Glucosid	52.7	784.7
A	Cyanidin-Malonyl-Glucosid	n.d.	165.0
A	Epiafzelechin-Pelargonidin-Glucosid	2.4	127.0
A	Pelargonidin-Glucosid	718.3	3490.4
A	Pelargonidin-Malonyl-Glucosid	n.d.	1825.1
A	Pelargonidin-Rutinosid	88.0	1124.7
ES	Ellagsäure	n.d.	86.2
ES	HHDP-Galloyl-Glucosid	20.2	300.9
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 1	1.4	50.0
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin 2	3.6	55.5
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 1	0.6	33.0
Flava	(Epi)Afzelechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 2	n.d.	46.4
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 1	3.2	62.2
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 2	6.1	90.4
Flava	(Epi)Catechin-(Epi)Catechin-(Epi)Catechin 3	n.d.	62.5
Flava	Catechin	15.1	147.8
Flava	Procyanidin B1	21.9	277.8
Flava	Procyanidin B3	9.1	480.2
Flavo	Kaempferol-Malonyl/-Acetyl-Glucosid	6.1	186.2
Flavo	Kaempferol-Cumaryl-Glucosid	2.9	133.0
Flavo	Kaempferol-Glucosid	0.0	96.0
Flavo	Kaempferol-Glucuronid	4.6	139.3
Flavo	Quercetin-Malonyl/-Acetyl-Glucosid	n.d.	50.8
Flavo	Quercetin-Glucosid	n.d.	54.4
Flavo	Quercetin-Glucuronid	23.9	602.8
P	Ferulasäure-Glucose-Ester	n.d.	42.2
P	<i>p</i> -Cumarsäure-Glucose-Ester/-Glucosid	63.1	661.8
P	Zimtsäure-Glucose-Ester	5.1	252.5
s	Glutathion	0.2	305.0

Klasse	Metabolit	c _{Min} [ppm IS equ]	c _{Max} [ppm IS equ]
s	Äpfelsäure	52.7	784.7
Fra	Fra a 1	0,6 [µg/g FW]	2,3 [µg/g FW]

n.d. = nicht detektiert



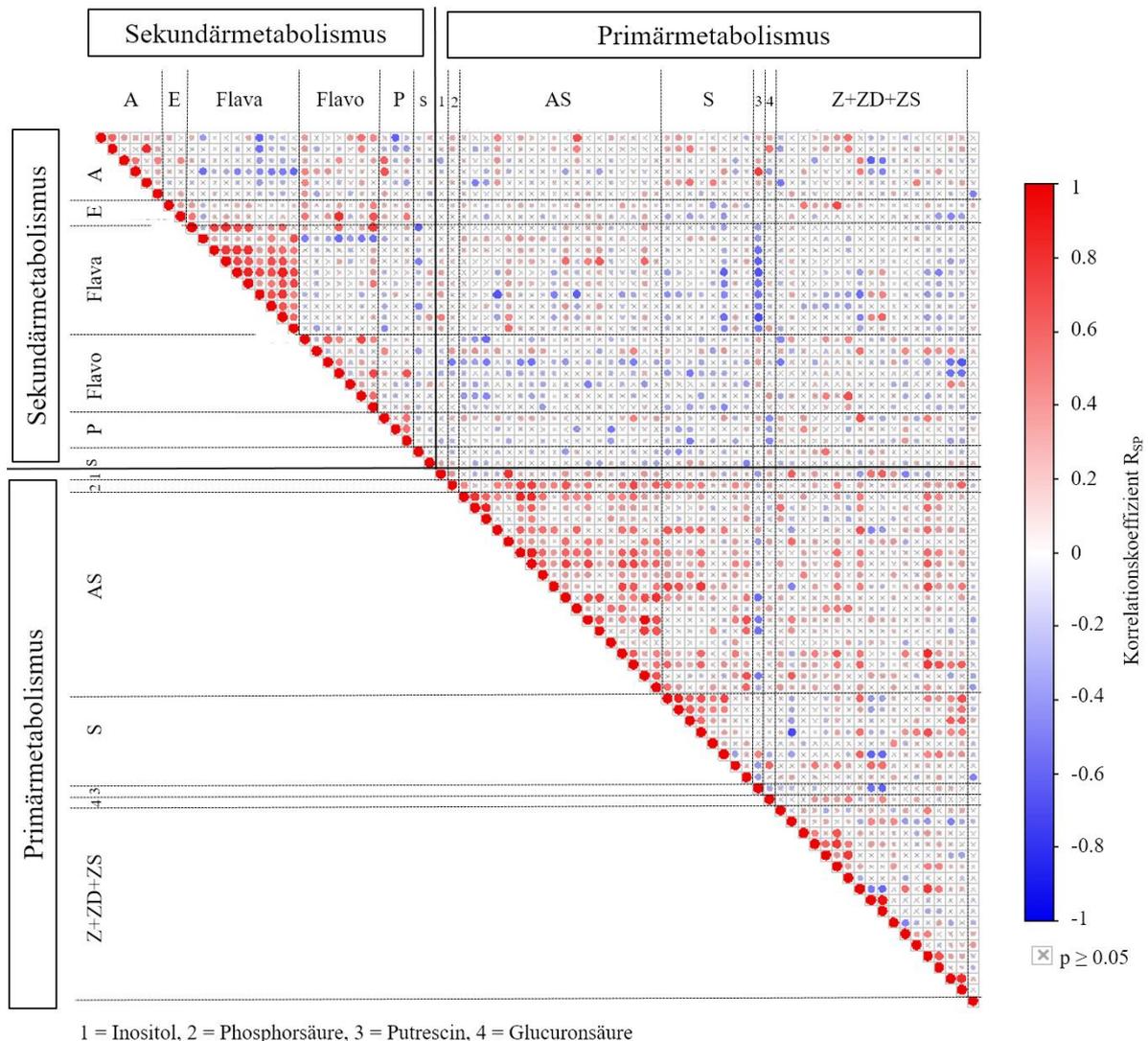
Anhang 4: Korrelationsanalyse der Polyphenol-Gehalte und der Fra a 1-Konzentration im Allergen-Subdatenset. Die Punkte stellen den Korrelationskoeffizienten R zwischen zwei Metaboliten dar, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin. Es handelt sich um ein Subdatenset da nicht von allen Genotypen der Fra a 1-Gehalt bestimmt wurde. Die Symbole der Korrelationen zwischen den Konzentrationen der Polyphenole wurden daher ausgegraut.

Anhang 5: Konzentrationsspannen der Primärmetabolite innerhalb der IFAPA-Proben der GoodBerry-Population im Erntejahr 2017.

Klasse	Metabolit	c _{Min} [IS equ]	c _{Max} [IS equ]
Aminosäure	Alanin	33.06	142.98
Carboxylsäure	Brenztraubensäure	0.13	0.53
Aminosäure	Valin	0.98	5.31
Aminosäure	Isoleucin	0.42	2.26
Aminosäure	Glycin	1.37	5.43
anorg. Säure	Phosphorsäure	28.82	47.95
Aminosäure	Prolin	0.63	11.77
Zuckersäure	Glycerinsäure	0.19	1.91
Aminosäure	Serin	4.50	23.51
Carboxylsäure	Bernsteinsäure	0.23	2.15
Aminosäure	Theronin	1.57	8.04
Carboxylsäure	Fumarsäure	0.55	1.83
Aminosäure	Homoserin	0.06	0.42
Zuckeralkohol	Erythritol	0.03	0.13
Carboxylsäure	Äpfelsäure	24.10	57.43
Aminosäure	γ -Aminobuttersäure	3.74	8.78
Aminosäure	Asparaginsäure	4.09	15.09
Zuckersäure	Threonsäure	0.29	2.05
Aminosäure	Methionin	0.27	5.80
Aminosäure	Glutamin	0.23	1.76
Zucker	Xylose	4.21	8.90
Amiosäurederivat	Pyroglutaminsäure	12.85	63.42
Aminosäure	Glutaminsäure	3.35	6.86
Zucker	Rhamnose	0.13	0.36
Polyamin	Putrescin	0.14	0.84
Zucker	Fucose	1.00	1.82
Carboxylsäure	α -Ketoglutarsäure	0.04	0.26
Aminosäure	Phenylalanin	0.10	0.63
Aminosäure	Asparagin	1.14	7.43
Carboxylsäure	Chinasäure	0.37	1.50
Zuckerderivat	1-O-Methyl- α -D-Glucose	2.37	9.27
Uronsäure	Glucuronsäure	0.08	1.58
org. Säure	Dehydroascorbinsäure	0.76	2.11
Alkohol	Inositol	3.82	21.23

Summary

Klasse	Metabolit	c_{Min} [IS equ]	c_{Max} [IS equ]
Aminosäure	Tyrosin	0.19	6.90
Zuckerderivat	Fructose-6-Phosphat	0.04	0.15
Zuckerderivat	Glucose-6-Phosphat	0.13	0.54
Aminosäure	Tryptophan	0.79	7.29
Zucker	D-Maltose	0.15	0.38
Zucker	Trehalose	0.08	1.07
Zucker	Isomaltose	0.00	0.29
Zuckerderivat	Galactinol	0.51	2.15
Zucker	Raffinose	0.70	4.97
Zucker	Kestose	0.00	2.14
Zucker	Maltotriose	0.79	5.75
Zucker	D-Fructose	4949.69	12245.00
Zucker	D-Glucose	18601.77	45171.00
org. Säure	Zitronensäure	4752.32	16076.13
Zucker	Saccharose	15140.93	41581.00



Anhang 6: Korrelationsanalyse der Konzentrationen von Primär- und Sekundärmetaboliten. Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten R_{SP} zwischen zwei Metaboliten, blau = entgegengesetzte Korrelation, rot = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Graue Kreuze bedeuten keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$). Abkürzungen der Untergruppen: A = Anthocyane, AS = Aminosäure, ES = Ellagsäurederivate, Flava = Flavanole, Flavo = Flavonole, P = Phenylpropanoide, S = organische Säuren, Z = Zucker, ZD = Zuckerderivate, ZS = Zuckersäuren.

Anhang 7: Konzentrationsspannen der Polyphenole in den CAD-Proben. Alle Konzentrationen sind in ppm IS equ. angegeben. Cat und Afz stehen jeweils für die Isomere (Epi)Catechin und (Epi)Afzelechin.

	rot		etwas rot		weiß, groß		weiß, klein		grün		Blätter		Wurzeln	
	CMin	CMax	CMin	CMax	CMin	CMax	CMin	CMax	CMin	CMax	CMin	CMax	CMin	CMax
EpiAfz-Pel-Glc	24.7	64.1	1.1	7.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Pel-Ma-Glc	762	1779	268	550	n.d.	22.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cya-Ma-Glc	200	354	103	345	56.3	296	8.8	61.0	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Pel-Glc	2355	3712	742	1828	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cya-Glc	585	915	223	621	139	528	19.4	103	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
HHDP-Gal-Glc	3.3	7.1	4.2	8.9	2.2	9.0	5.0	9.3	5.1	11.9	25.1	42.2	3.5	10.2
Esre	21.4	38.3	22.4	47.5	23.2	76.7	34.4	59.4	32.8	59.9	18.3	91.7	17.2	62.4
Procy B1	12.7	22.4	17.0	28.9	14.4	30.3	12.1	24.3	11.7	22.4	11.8	27.9	38.7	58.8
Procy B3	15.5	27.2	20.3	41.1	17.6	36.5	15.9	29.0	19.3	39.2	33.3	62.3	79.7	127.9
Cat	22.9	34.7	32.1	58.6	36.9	71.1	47.7	74.1	45.3	103	44.8	144	210	317
Afz-Cat 1	1.7	3.0	2.2	5.1	2.1	4.6	1.8	3.3	1.1	3.2	0.2	3.1	3.9	7.9
Afz-Cat 2	2.0	4.8	2.9	7.2	1.9	5.5	1.5	3.0	1.3	3.6	0.0	0.9	3.6	7.9
Qu-Glc	7.7	17.3	1.4	7.7	1.1	5.8	2.0	4.7	1.4	4.2	7.5	20.4	3.4	8.1
Ka-Glc	11.3	19.5	6.6	17.9	9.4	18.5	12.1	23.8	10.4	26.1	25.3	46.4	9.9	23.9
Ka-Glucu	9.5	16.0	7.5	17.2	8.7	18.3	11.2	24.6	29.7	71.6	38.7	83.1	n.d.	n.d.
Ka-Ma-Glc	6.9	12.2	3.1	12.4	4.2	10.4	3.9	8.2	2.3	5.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Qu-Glucu	17.1	31.8	9.0	36.9	7.7	36.0	8.5	16.8	0.8	28.1	93.8	198	n.d.	n.d.
Ka-Cu-Glc	1.2	3.6	1.5	4.9	3.8	7.8	4.0	6.7	3.9	10.8	4.8	9.6	n.d.	n.d.
Kaf-Glc-Es	3.5	7.4	4.1	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.2	3.0
Zi-Glc-Es	62.5	134	53.9	124	12.2	29.2	0.1	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fer-Glc-Es	n.d.	1.2	1.1	2.8	0.9	2.2	n.d.	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Cu-Glc-Es/-Glc	29.0	69.4	4.0	16.7	1.3	2.9	1.2	2.1	0.9	2.9	8.7	45.4	n.d.	n.d.
Malat	3.2	8.3	18.3	40.6	6.5	14.6	5.9	12.8	1.3	5.3	11.8	25.9	4.3	8.6
GSH	388	678	309	557	59.3	309	4.5	35.5	n.d.	n.d.	2.8	21.4	n.d.	0.6

n.d. = nicht detektiert

n.a. = nicht analysiert