Genetische Untersuchung der Vererbung des Blütendufts in Rosen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Monika Spiller

geboren am 22. Februar 1979 in Neustadt am Rübenberge

2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Debener

Korreferentin: Prof. Dr. Traud Winkelmann

Tag der Promotion: 28. September 2009

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vererbung von flüchtigen sekundären Pflanzenstoffen, die Teil des Rosendufts sind, untersucht. Es wurde gezeigt, dass diese Substanzen in einer diploiden Rosenpopulation nach Mendelschen Gesetzen vererbt werden.

Als Untersuchungspopulation diente hierbei die unter Yan et al. (2005a) beschriebene Kreuzungsnachkommenschaft 94/1 und deren Eltern. Von dieser Population wurden 88 Pflanzen in einer kontrollierten Umgebung gehalten und jeder Genotyp wenigstens dreimal beprobt. Über eine Flüssigextraktion wurden aus den Petalen dieser Pflanzen die polaren Substanzen gelöst und über eine GC-MS Analyse identifiziert und quantifiziert. Nach der gaschromatografischen Analyse konnten 14 Haupt- und Nebenduftkomponenten wenigstens über die Berechnung von Kovats' Indices identifiziert werden. Sechs Hauptduftkomponenten wurden durch Ko-Elution mit Standardsubstanzen und den Vergleich der Massenspektren verifiziert. Die Vererbungsmuster dieser sechs Substanzen wiesen auf eine genetische Kontrolle der Loci für die Produktion dieser Duftkomponenten hin. Diese sechs Inhaltsstoffe waren: Nerol, Nerylacetat, Geranylacetat, Geraniol, β-Citronellol und 2-Phenylethanol. Für all diese Substanzen konnten auf der genetischen Kopplungskarte lokalisiert werden. Für das Vorkommen von Nerol und Nerylacetat in den Duftextrakten konnten Einzelloci identifiziert werden. Die Produktion von Geranylacetat wird durch wenigstens zwei Loci kontrolliert, die Produktion von Alkoholacetaten jedoch mindestens durch fünf unterschiedliche Loci. Geraniol, β-Citronellol und 2-Phenylethanol zeigten quantitative Aufspaltung. Durch Kruskal-Wallis Analyse und *Interval Mapping* konnten sechs QTL für vier Duftkomponenten identifiziert werden. Gleichzeitig wurden molekulare Marker für acht bereits bekannte Gene der Rosenduftbiosynthese und 10 ESTs mit Ähnlichkeiten zu Duftbiosynthesegenen entwickelt und auf genetischen Kopplungskarten für die Populationen 94/1 und 97/7 (Linde et al., 2006) lokalisiert. Zusätzlich wurde die Expression bekannter Strukturgene und der Kandidaten-ESTs in Petalen verschiedener Genotypen der Population 94/1 und der Elterngenotypen untersucht und mit Duftprofilen und Kartierungsdaten korreliert. Dadurch war es möglich, die zusätzlichen Acyltransferasefunktionen zu lokalisieren. Über sequenzbasierte Marker wie EST- und SSR-Marker konnten die genetischen Karten der zwei Kartierungspopulationen mit der genetischen Karte von Oyant et al. (2008) zu verknüpfen. Zusammen mit den neu identifizierten Loci für die Produktion der verschiedenen Duftsubstanzen kann diese Arbeit als Basis zur Lokalisierung wichtiger zierpflanzenbaulicher Eigenschaften auf einer allgemein gültigen Rosenkonsensuskarte dienen.

Schlagwörter: Rose, Blütenduft, QTL, Konsensuskarte

Abstract

In the present work the inheritance of secondary metabolites which are part of the rose scent is investigated. It was shown that in a segregating diploid rose population the different volatile substances are inherited according to Mendelian Laws.

Plants were grown in a controlled environment. Samples of each genotype were taken at least three times. From petals of 88 plants of the mapping population 94/1 (Yan et al., 2005a) and the parental genotypes the composition of the scent extracts were analysed via GC-MS.

After separation on a GC-MS system 14 different substances could be identified by calculating Kovats' Indices. Six major volatiles could be verified by comparison of mass spectra.

The inheritance patterns of these six substances lead one to a genetic control. These six substances were: nerol, neryl acetate, geranyl acetate, geraniol, β-citronellol and 2-phenyl ethanol. All of these substances could be located genetically.

The presence of nerol and neryl acetate in the scent extracts could be identified as single loci. The inheritance of geranyl acetate is controlled by at least two loci. The production of alcohol acetates is controlled by at least five independent loci. In contrast geraniol, β-citronellol and 2-phenyl ethanol showed a quantitative inheritance pattern. By using Kruskal-Wallis and interval mapping technique six QTLs for four scent compounds could be detected.

At the same time genetic markers for eight already known structural genes of scent biosynthesis in roses and ten scent candidate ESTs were developed. These markers could be placed on the genetic maps of rose population 94/1 and population 97/7 (Linde et al., 2006).

Additionally expression analyses of scent structural genes and candidate ESTs were performed and the data compared to scent profiles and mapping data. By this it was possible to locate the new acyltransferase functions on the genetic map of population 94/1.

Using Candidate-EST and SSR-Markers it was possible to link our two rose mapping populations and furthermore these maps to the linkage map of Oyant et al. (2008). Together with the identified scent loci this will serve as a basis to locate floricultural important traits on a unified rose consensus map.

(Key words: Rose, floral scent, QTL, Consensus map)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Abstract 2

Abkürzungsverzeichnis 7

1. Einleitung 8

1.1 Pflanzenduft 8

1.2 Rosen 12

1.3 Bekannte Strukturgene der Rosenduftbiosynthese 16

1.4 QTL-Kartierung 21

1.5 Ziele der Arbeit 23

2. Material und Methoden 24

2.1 Material 24

2.1.1 Pflanzenmaterial 24

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 25

2.1.3 Reagenzien 25

2.1.4 Geräte, Medien und Puffer: 26

2.1.5 Oligonukleotide 26

2.1.6 Bakterienstämme 26

2.1.7 Plasmide 26

2.2 Methoden 27

2.2.1 Gewinnung von Duftextrakten 27

2.2.2 Gaschromatographie/Massenspektrometrie 27

2.2.3 Subtraktive Hybridisierung 28

2.2.4 Funktionale Analyse eines Alkoholacetyltransferase-Kandidaten 30

2.2.4.1 Phylogenetischer Baum 31

2.2.4.2 3‘-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 31

2.2.4.3 5‘-RACE 31

2.2.4.4 Klonierung der Volllängensequenz in pET 101/D-TOPO 32

2.2.4.5 Expression der Volllängensequenz 33
2.2.4.6 Analyse der heterologen Expression in E. coli 34
2.2.4.7 Substratspezifitätstest 35
2.2.5 Expressionsanalyse von Strukturgen- und Kandidatengen-sequenzen 36
2.2.6 Kartierung 37
2.2.6.1 DNA-Extraktion und Quantifizierung 37
2.2.6.2 Standard-PCR 38
2.2.6.3 Standard-Agarosegel 39
2.2.6.4 SSR-PCR 39
2.2.6.5 SSR-PCR mit M13-tail 40
2.2.6.6 SSR Multiplex-PCR 41
2.2.6.7 Denaturierendes Polyacrylamidgel (Standard SSR-Gel) 41
2.2.6.8 CAPS-Marker 42
2.2.6.9 SSCP-Marker 42
2.2.6.10 Verifizierung von PCR-Produkten 43
2.2.6.11 Segregationsanalyse 45
2.2.6.12 Auswertung der Gaschromatogramme 46
2.2.6.13 Berechnung der genetischen Kopplungskarten 46
2.2.7 QTL-Kartierung 47
2.2.8 Darstellung der genetischen Karten 48
2.2.9 Darstellung der Grafiken 48
3. Ergebnisse 49
3.1 Duftanalysen 49
3.1.1 Relative Gehalte der verschiedenen Duftsubstanzen 50
3.1.2 Vererbung der Duftsubstanzen 53
3.1.3 Korrelationsanalysen 56
3.2 Suppressive Subtraktive Hybridisierung 58
3.2.1 Durchführung der SSH 58

3.2.2 454-Sequenzierung 60
3.2.3 Bezeichnung der Contigs 62
3. 3 Markeranalyse und Kartierung 62
3.3.1 Marker für bereits bekannte Rosenduftbiosynthesegene 62
3.3.2 SSH EST-Marker 63
3.3.3 Vergleich der integrierten Karten der Populationen 94/1 und 97/7 64
3.4 QTL-Kartierung 71
3.5 Expressionsanalysen 82
3.5.1 Expressionsmuster in verschiedenen Pflanzenorganen 83
3.5.2 Genotypspezifische Expression 84
3.6 Klonierung einer putativen Acyltransferase 87
3.6.1 Sequenzanalysen 88
3.6.2 Analyse der Genfunktion durch heterologe Expression in *E. coli* 90
3.6.3 Substratspezifitätstest 93
4. Diskussion 95
4.1 Duftprofile 95
4.2 Kartierung 96
4.3 Vererbung der Duftsubstanzen 98
4.3.1 Geraniol 100
4.3.2 Nerol 101
4.3.3 β-Citronellol 102
4.3.4 Weitere Terpene 103
4.3.5 2-Phenylethanol 103
4.3.6 Die Acetate 104
4.4 Strukturgene der Rosenduftbiosynthese 112
4.4.1 Orcinol O-Methyltransferasen (RhOOMTs) 112
4.4.2 Phloroglucinol-O-Methyltransferase (POMT) 113
4.4.3 Eugenol-O-Methyltransferase (RcOMT1) 113

4.4.4 Kaffesäure O-Methyltransferasen (RcOMT2 und RcOMT3) 113
4.4.5 GermacrenD-Synthase (GDS) 114
4.4.6 Schlussfolgerungen aus der Kartierung der Strukturgene 115
4.5 ESTs mit Duftbiosynthesegen-Ähnlichkeit 115
4.5.1 *Carotenoid Cleavage* Dioxygenase (CCD) 116
4.5.2 Methyltransferasen 116
4.5.3 β-Glucosidase 117
4.6 Suppressive Subtraktive Hybridisierung 117
5. Schlussfolgerungen/ Ausblick 119
6. Anhang 122
6.1 Medien 122
6.2 Puffer und Lösungen 122
6.3 Hersteller 125
6.4 Geräte 126
6.5 PCR-Primer 127
6.6 Zusätzliches Material 130
6.6.1 Ergebnisse der Subtraktiven Hybridisierung 130
6.6.2 Kartierung 133
6.6.3 Ergebnisse der Sequenzierung von RhAAT1 135
6.6.4 Abbildung des 5'-RACE Alignments 138
6.6.5 Signifikanzschwellen für die QTL-Regionen bei *Interval Mapping* 138
6.7 Abbildungsverzeichnis 140
6.8 Tabellenverzeichnis 142
7. Literatur 144
Veröffentlichungen 153
Erklärung zur Dissertation 154
Lebenslauf 155
Danksagung 156

Abkürzungsverzeichnis

AADC	L-Phenylalanindecarboxylase
AAT	Alkoholacyltransferase
AFLP	*Amplified Fragment Length Polymorphism*
APS	Ammoniumpersulfat
BEAT	Benzylalkoholacetyltransferase
BLAST	*Basic local alignment search tool*
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*
CCD	*Carotenoid cleavage* Dioxygenase
cDNA	*complementary* DNA
CTAB	Cetyltrimethylammonium-Bromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EOMT	Eugenol-O-Methyltransferase
EST	Exprimierter Sequenzabschnitt
FB	*Freezing Broth* Medium
g	Gramm
GA	Geranylacetat
GDS	GermacrenD-Synthase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactosid
IRD	*Infra Red Dye*
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
_L	ähnlich (-like)
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LG	Kopplungsgruppe
LOD	*Likelihood of the Odds*
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
MT	Methyltransferase
OD	Optische Dichte
OOMT	Orcinol-o-Methyltransferase
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	2-Phenylacetaldehydreduktase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	2-Phenylethanol
PMSF	Phenylmethansulfonylflourid
POMT	Phloroglucinol-O-Methyltransferase
QTL	Quantitative Trait Loci
qRT	*quantitative real time* PCR
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCAR	*Sequence Characterized Amplified Region*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
SSCP	*Single Strand Conformation Polymorphism*
SSH	Supressive Subtraktive Hybridisierung
SSR	*Simple Sequence Repeat*
STS	*Sequence Tagged Site*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TPS	Terpensynthase
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol
U	Unit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galactosid

1. Einleitung

1.1 Pflanzenduft

Duft ist ein komplexes Merkmal. Darauf weisen schon die ersten Untersuchungen zur Duftbiosynthese aus dem Jahre 1969 von Banthorpe et al. hin, die allein für die Biosynthese von zwei Duftkomponenten fünf verschiedene Produktionswege vorschlugen und die Existenz von acht verschiedenen Enzymen, die diese Biosyntheseschritte katalysieren sollen. Die ersten molekularbiologischen Untersuchungen zum Duft fanden 1994 (Pichersky et al., 1994) statt. In einer kalifornischen Wildblume namens *Clarkia breweri* wurden die Sequenzen für Gene isoliert, die Duftbiosyntheseschritte ausführen. Schon damals stellte sich heraus, dass die Produktion von Duftsubstanzen und die Regulierung der Produktion von vielen verschiedenen Faktoren abhängig sind. Darunter sind zum Beispiel das Alter und der Entwicklungszustand der Pflanze (Dudareva, 2005; Oka et al., 1999), die Tageszeit (Helsper et al., 1998), die Transkription und Translation von Genen und ihren Transkriptionsfaktoren, die unmittelbar durch die ersten drei Gründe bedingt werden.

Die Biosynthese und Emission von Duftkomponenten dient zur interspezifischen Kommunikation der Pflanzen mit ihrer Umwelt (Pichersky, 2004; Pichersky et al., 2006; Pichersky and Gershenzon, 2002). Durch die Produktion und Abgabe von Duftkomponenten werden z. B. Bestäuber oder Feinde von Schadinsekten angelockt. Duft beeinflusst zudem die menschliche Wahrnehmung von der Pflanze und verführt uns zum Kauf. Daher ist Duft ein wichtiges Merkmal in der Züchtung von Zierpflanzen.

Die meisten Duftkomponenten lassen sich einer der drei folgenden Stoffklassen zuordnen: Terpenoide, Phenylpropanoide und Fettsäurederivate (Dudareva and Pichersky, 2000).

1. Terpenoide

Terpenoide kommen in der Natur hauptsächlich als Kohlenwasserstoffe, als Alkohole und deren Glykoside, als Ether, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren und Ester vor.

Terpene sind aus Isopreneinheiten zusammengesetzte Substanzen des primären und sekundären Stoffwechsels. Es gibt in Pflanzen über 40.000 beschriebene Terpenoide, die aus dem Isoprengrundgerüst synthetisiert werden (Aharoni et al., 2005). Sie bestehen aus zwei Isopreneinheiten, die über Kopf-Schwanz- oder Schwanz-Schwanzverknüpfungen miteinander verbunden sind. Die Biosynthese der Isoprenoide erfolgt über zwei Wege: entweder über den Mevalonsäureweg (MVA) im Cytosol oder dem MVA unabhängigen Methylerithriol-Phosphat (MEP)-Weg in Plastiden. Es findet je nach Alter der Zelle ein Austausch der Substrate IPP

(Isopentenyldiphosphat) und DMAPP (Dimethylallyldiphosphat) zwischen Plastiden und Cytosol statt (siehe Abbildung 1.1).

Der erste Schritt in der Biosynthese von Terpenoiden besteht in der Kondensation von wenigstens einem Molekül Isopren (IPP) und einem Molekül Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu einem Monoterpen. Die weitere Biosynthese wird von drei Prenyltransferasen katalysiert, die durch die Bindung einer weiteren Isopreneinheit an das Vorläufermolekül Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) herstellen (Siehe Abbildung 1.1). Aus den primären IPP_n-DMAPP Kondensaten entstehen durch Terpensynthasen und –cyclasen Monoterpene, Diterpene, Sesquiterpene usw.. Tri- und Tetraterpene werden über Kondensation von GPP an FPP gebildet.

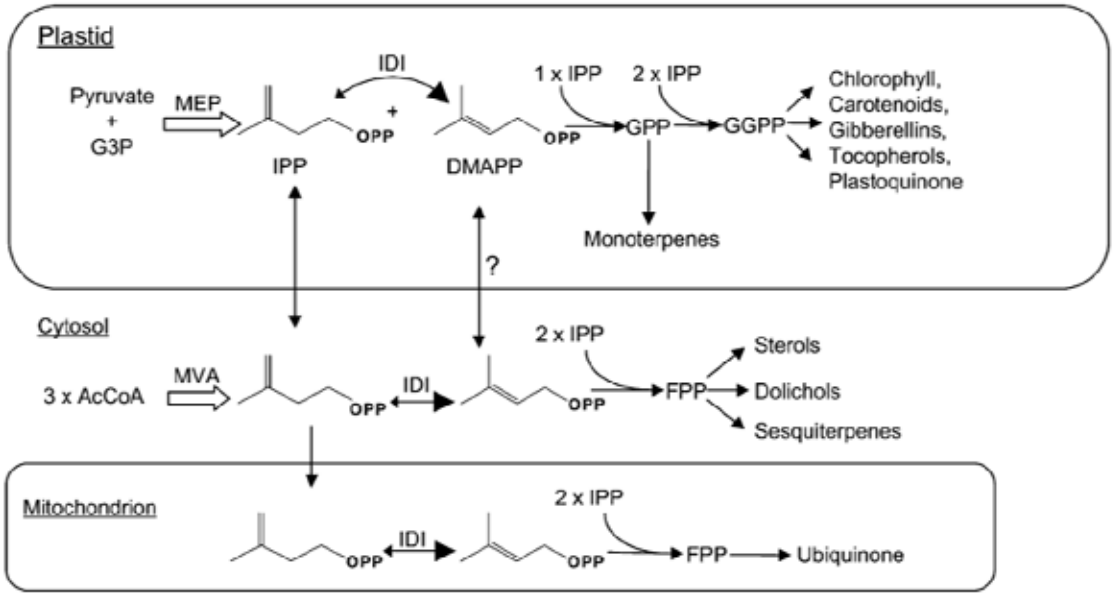


Abbildung 1. 1: Überblick über die Terpenbiosynthese in Kompartimenten nach Phillips et al. (2008). Angegeben sind die für die Isoprenbiosynthese notwendigen Substanzen. IPP Isopren, DMAPP Dimethylallyldiphosphat, AcCoA Acetyl Coenzym A, FPP Farnesyldiphosphat, GPP Geranyldiphosphat, GGPP Geranylgeranyldiphosphat, G3P Glyceraldehyd 3-Phosphat, MEP Methylerythritol Phosphat Weg, MVA Mevalonsäureweg, OPP Diphosphatrest. Die Blockpfeile bezeichnen mehrere Schritte, die asymmetrischen Pfeile indizieren das erwartete Gleichgewicht zwischen der reversiblen IPP Isomerase (IPI) Reaktion.

Die Bezeichnung der Terpenoide wird über die Anzahl der Isopreneinheiten festgelegt. Monoterpenoide, z.B. Geraniol, enthalten zwei Isopreneinheiten (C10), Sesquiterpenoide, z.B. GermacrenD, enthalten drei Isopreneinheiten (C15). Carotenoide sind Tetraterpenoide mit 40 C-Atomen und acht Isopreneinheiten. Apocarotenoide, darunter die für den Rosenduft charakteristischen Substanzen β-Ionon und β-Damaszenon, sind Tetraterpene, die aus der enzymatischen Spaltung von Carotenoiden hervorgehen.

Terpensynthasen bilden phylogenetisch gesehen zwei Gruppen. Monoterpen-, Sesquiterpen- und Diterpensynthasen bzw. Triterpen- und Tetraterpensynthasen können je einer Gruppe zugeordnet werden (Bohlmann and Keeling, 2008). Diese zwei Enzymgruppen unterscheiden

sich stark in ihrer Struktur. Terpensynthasen sind bereits von verschiedenen Pflanzenarten isoliert und funktionell beschrieben worden (für eine Zusammenfassung siehe Tholl et al. (2006)). Darunter befinden sich Terpensynthasen mit strikter Produktion nur eines Endprodukts sowie Enzyme, die viele Produkte herstellen können, wie zum Beispiel γ-Humulensynthase, die über 52 verschiedene Produkte bilden kann (Christianson, 2008). Reaktionsprodukte dieser Enzyme können dann weiter über Oxidierung, Dehydrogenierung, Acetylierung oder andere Reaktionen verändert werden. Dadurch werden die Eigenschaften der Substanzen, unter anderem ihr Dampfdruck, verändert, so dass die Substanzen flüchtiger werden.

2. Phenylpropanoide:

Phenylpropanoide sind Substanzen, die über verschiedene phenolische Zwischenschritte aus L-Phenylalanin gebildet werden (Abbildung 1.2).
Wichtige Phenylpropanoide sind u. a. 2-Phenylethanol, Benzylalkohol und ihre Derivate. Benzylalkohol wird über *trans*-Zimtsäure, 3-Hydroxy-3-phenylpropionsäure und Benzaldehyd mit Hilfe von verschiedenen Enzymen, deren Identität noch nicht geklärt ist, gebildet (siehe Abbildung 1.2). Boatright et al. (2004) konnten durch radioaktive Markierung die einzelnen Biosyntheseschritte in Petunienblüten aufklären.
Man kennt bereits Enzyme aus verschiedenen Pflanzenarten, die die unterschiedlichsten Reaktionen in der Phenylpropanoidbiosynthese ausführen. So gibt es hier Acetyltransferasen (Dudareva et al., 1998), Benzoyltransferasen (D'Auria et al., 2002), Cinnamoyltransferasen (Comino et al., 2007) und O-Methyltransferasen (Negre et al., 2002).

3. Fettsäurederivate:

Die meisten pflanzeneigenen Aromastoffe stammen aus dem Abbau von Fettsäuren und werden durch α-Oxidation, β-Oxidation oder den Lipoxygenaseweg gebildet (Schwab et al., 2002). Gesättigte und ungesättigte Abbauprodukte von Fettsäuren bestimmen zum Beispiel den charakteristisch „grünen“ Duft von frisch gemähtem Gras. Auch diese primären Abbauprodukte der Fettsäuren können durch weitere Enzyme derivatisiert werden. Zum Beispiel wird *Cis*-3-Hexenol in *Arabidopsis* bei Verwundung der Blätter durch eine Acyltransferase in *Cis*-3-Hexenylacetat umgewandelt (D'Auria et al., 2007a). Ein weiteres Endprodukt dieser Stoffwechselwege ist Jasmonsäure. Hierbei handelt es sich um ein bedeutendes Phytohormon und Hauptbestandteil des Duftes von Jasmin und Gardenien.

Durch sukzessive β-Oxidation von Fettsäuren wird Acetyl-Coenzym A freigesetzt, welches zur Bildung von Acetaten benötigt wird. Außerdem dient es als Ausgangsstoff der Isoprenbiosynthese.

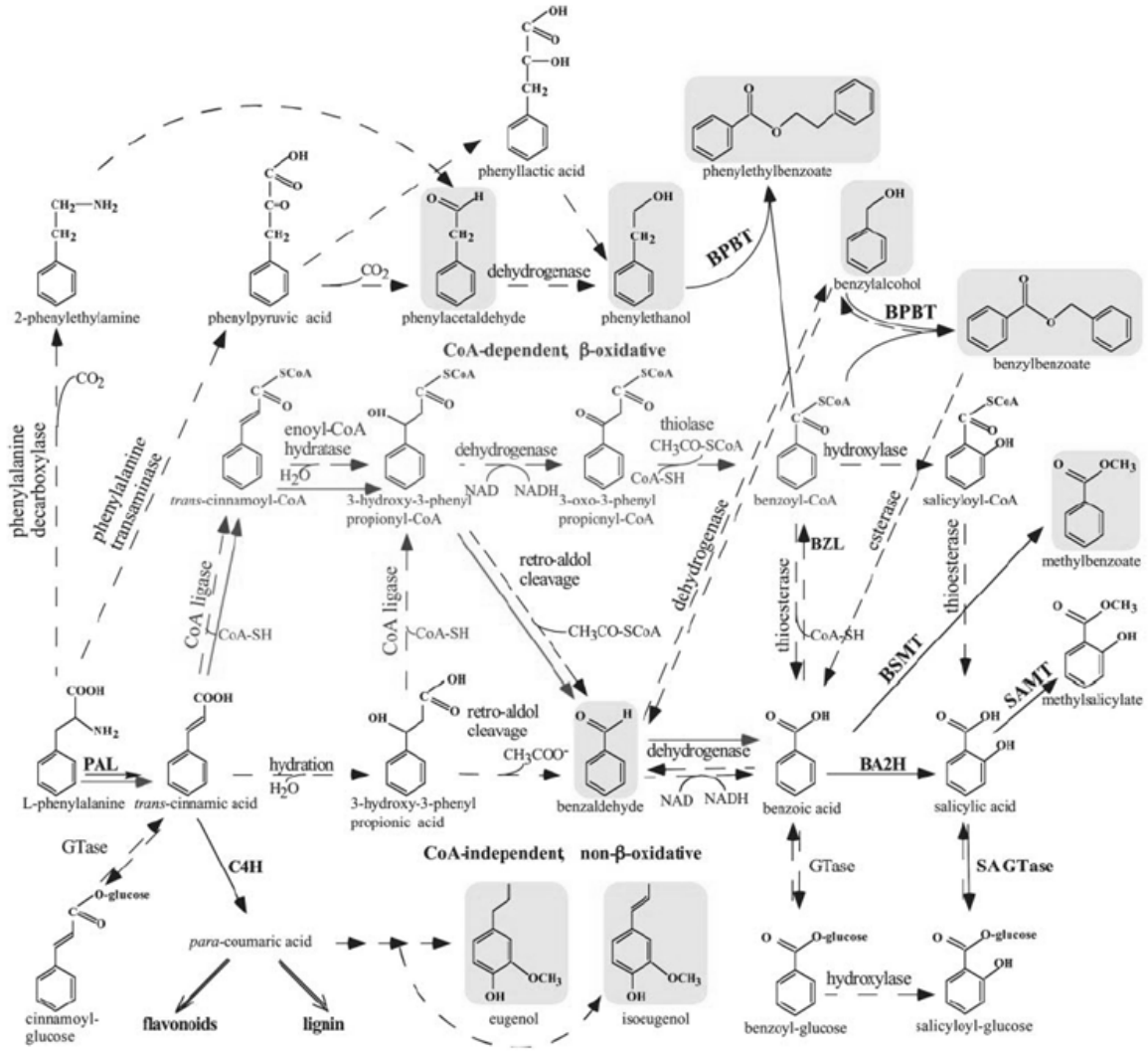


Abbildung 1.2: Ausschnitt aus der Phenylpropanoid-Biosynthese aus Boatright et al. (2004) wie in Petunien aufgeklärt. Ausgehend von L-Phenylalanin werden über Zwischenschritte, die Veränderung der Nebenketten zur Folge haben, die flüchtigen Endprodukte gebildet. PAL – Phenylalaninammoniumlyase, C4H - , Ba2H - , SAGTase – Salicylsäure-Glycosyltransferase, GTase – Glycosyltransferase, SAMT – Salicylsäuremethyltransferase, BSMT – Benzoesäuremethyltransferase, BZL - , BPBT – Benzylalkoholbezoyltransferase

1.2 Rosen

„Beauty without virtue is like a rose without scent“

Englisches Sprichwort

Die meisten modernen Schnittrosensorten duften nicht. Und dies, obwohl die Rose als solche nicht nur über ihre Schönheit und Eleganz, die samtenen Blütenblätter, die leuchtende Farbe, wahrgenommen wird, sondern auch über die Nase. In vielen Dichtungen wird die Rose seit Jahrhunderten besonders ihres Duftes wegen beschrieben (Gang, 2005) .

Rosen sind die wirtschaftlich wichtigsten Schnittblumen weltweit. Von Januar bis November 2008 wurden 1 Milliarde Schnittrosen mit einem Wert von 214,2 Millionen Euro nach Deutschland importiert. Hauptexporteure nach Deutschland sind die Niederlande mit 706 Millionen Stück (Statistisches Bundesamt, www.destatis.de, 2008). Der Anteil der Rosen am Gesamtumsatz der Schnittblumen betrug im Jahr 2007 37 % (siehe Abbildung 1.3). Dies entspricht einem Wert von ca. 1,17 Milliarden Euro (www.zmp.de). Von 1997 bis 2007 wird die weltweite Produktion an Rosen insgesamt auf durchschnittlich mehr als 24 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt (Heinrichs, 2008). Mit einem Gesamtwert von 784 Millionen Euro stellten Schnittrosen 2008 den größten Anteil an den auf den Auktionen gehandelten Blumen (http://www.flora.nl).

Abbildung 1. 3: Die beliebtesten Schnittblumen, Umsatzanteile in Deutschland im Jahr 2007, Quelle: www.zmp.de

Alle Rosen werden taxonomisch in die Gattung *Rosa* Unterfamilie *Rosoideae* eingeteilt, welcher unter anderem auch Erdbeere, Himbeere und Potentilla angehören. Obstarten wie Apfel, Kirsche und Birne sind neben Rosen wirtschaftlich äußerst bedeutsame Vertreter der

Rosaceae. Die Rose kann auch als Modellorganismus zur Erforschung der Genomorganisation dieser Pflanzenfamilie dienen. Mit ihrem relativ kleinen Genom (zwischen 380 und 670Mbp/ 1C, (Rajapakse et al., 2001; Yokoya et al., 2000)) und ihrer genetischen Vielfalt an Arten, Formen und Sekundärmetaboliten kann die Rose zur Klärung grundlegender Fragen der Stoffwechselwege und deren Vererbung genutzt werden (Debener and Linde, 2009).

Trotz der relativ kleinen Genomgröße bestehen in der Verwendung von Rosen als genetisches Modell mehrere Probleme:

A) Es ist kaum möglich, aufgrund der starken Inzuchtdepression in Rosen, wie bei Mais, Tomate oder *Arabidopsis* rekombinante Inzuchtlinien (RILs) herzustellen.

B) Rosen haben im Vergleich zu anderen Modellpflanzen eine lange Generationszeit.

C) Die Durchführung von Knock-Out und Komplementationsstudien wird durch relativ schlechte Transformierbarkeit von Rosen erschwert (Korban, 2007).

Die Rose an sich wurde jahrhundertelang züchterisch bearbeitet (Gudin, 2000) . Die Genetik der wichtigsten Eigenschaften, insbesondere die Genetik des Rosendufts, blieb jedoch bislang größtenteils unbekannt. Das aktuelle Zuchtziel besteht in der Entwicklung von krankheitsresistenten Rosensorten für die Garten- und Grünanlagenbepflanzung. Bei Schnittrosen hingegen besteht großes Interesse der Züchter für die Eigenschaften Haltbarkeit und Duft, sowie den Zusammenhang zwischen beiden (Rosen Tantau, W. Kordes‘ Söhne, Noak Rosen, persönliche Mitteilung). Die meisten Kulturrosensorten sind tetraploid, was eine Erforschung der Genetik erschwert.

Populationen diploider Rosen wurden in der Vergangenheit erfolgreich bei der Untersuchung der Vererbung anderer phänotypischer Merkmale verwendet, z.B. Debener (1999). Durch den für Rosen relativ einfachen genetischen Hintergrund war es möglich, auf die Gen- oder Allelkonfigurationen zu schließen und Genwirkungen festzustellen. Es konnte bereits eine monogen dominante Vererbung der Blütenfarbe und der Blütenfüllung gefunden werden. Auch der monogen rezessive Charakter der remontierenden[1] Rosen wurde auf diese Weise geklärt (De Vries and Dubios, 1984). Es wurden verschiedene Gene der Biosynthese von Duftkomponenten in Rosen identifiziert (s. 1.3), jedoch der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Gene und der Vererbung von Duftkomponenten wurde bislang nicht erforscht. Es scheint eine negative Kopplung zwischen der Haltbarkeit und Struktur der Petalen sowie deren Duftemission zu existieren (Chaanin, 2003). Obwohl bereits in der klassischen Züchtung von Rosensorten, speziell von Schnittrosen, Kreuzungen von duftenden mit lang haltbaren Genotypen durchgeführt wurden, konnte kein genetischer Zusammenhang aufgeklärt werden (Rosen Tantau, W. Kordes‘ Söhne, persönliche Mitteilung).

[1] Mehrmals im Jahr blühend

Die Organe der stärksten Duftbiosynthese und –emission in Pflanzen sind die Petalen (Vainstein et al., 2001). In Rosenpetalen hängen der Gehalt und die Emission von Duftkomponenten stark vom Entwicklungsstadium der Blüte ab (Picone et al., 2004). Die Petalepidermiszellen, sowohl der oberen als auch der unteren Epidermis, produzieren, speichern und emittieren die Duftsubstanzen (Bergougnoux et al., 2007). Je nach Alter der Blüte und Tageszeit werden unterschiedliche Duftsubstanzen produziert und abgegeben. Dies unterliegt einer circadianen Rhythmik (Helsper et al., 1998). Duftproduktion und -emission sind in den späteren Blütestadien, zur Vollreife von Antheren und Griffel, am stärksten (Guterman et al., 2002). Die Entwicklung der Rosenblüten kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Für eine vergleichende Analyse der vorhandenen Duftsubstanzen und der Gene, die für die Synthese dieser Substanzen verantwortlich sind, ist es notwendig, die Analysen alle zum gleichen Zeitpunkt der Blütenentwicklung durchzuführen. Die meisten Studien, die sich in den letzten Jahren mit der Analyse von Duftkomponenten in Rosen beschäftigt haben, wählten dabei nach Oka et al. (1999) die Stadien 4 und 5, in welchen die stärkste Duftemission stattfindet (Abbildung 1.4).

Nicht alle Rosengenotypen lassen sich in ihrer Blütenentwicklung klar in solche Stadien einteilen. Nur in tetraploiden, gefüllt blühenden Genotypen erfolgt die Blütenentwicklung in langsamen Schritten. Bei ungefüllt blühenden Wildarten beträgt die Zeit vom Aufblühen bis zur Seneszenz oft nur wenige Stunden (Debener, pers. Mitteilung).

Bislang wurden über 500 verschiedenen Substanzen im Rosenduft identifiziert (Knudsen et al., 2006). In der Regel handelt es sich um Terpenoide, Phenylpropanoide und Fettsäurederivate, unter denen sich auch Substanzen mit extrem niedriger Geruchsschwelle befinden (Flament et al., 1993). Die Gene, die für die Enzyme der Produktion dieser Substanzen kodieren, sind für die Aromaindustrie von sehr großem Interesse, da die synthetische Herstellung sehr teuer ist. Gewinnung dieser Substanzen aus natürlichen Ressourcen ist ebenfalls teuer und erfordert eine große Menge Ausgangsmaterial.

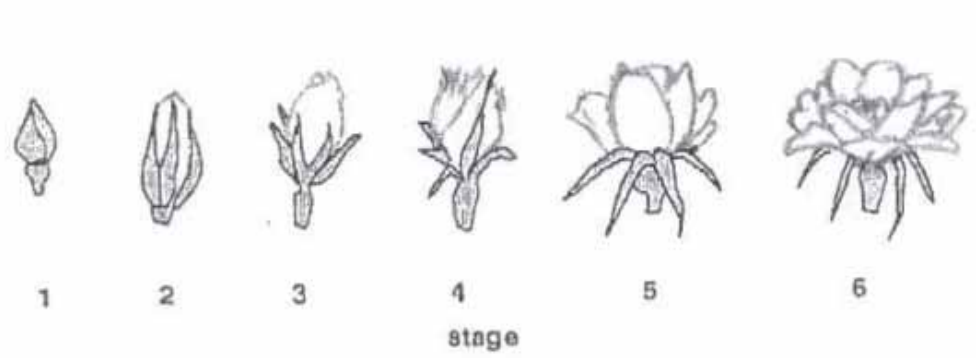


Abbildung 1. 4: Blütestadien der Entwicklung von Rosenblüten, 1 grüne Knospe ohne Farbe, 2 Sepalen brechen auf, Farbe sichtbar, 3 Knospe geschlossen aber vollständig Farbe zeigend abends, 4 Blüte öffnet sich morgens bis mittags, 5 Blüte öffnet sich weiter von mittags bis abends, 6 vollständig geöffnete Blüte (aus: Oka et al. (1999))

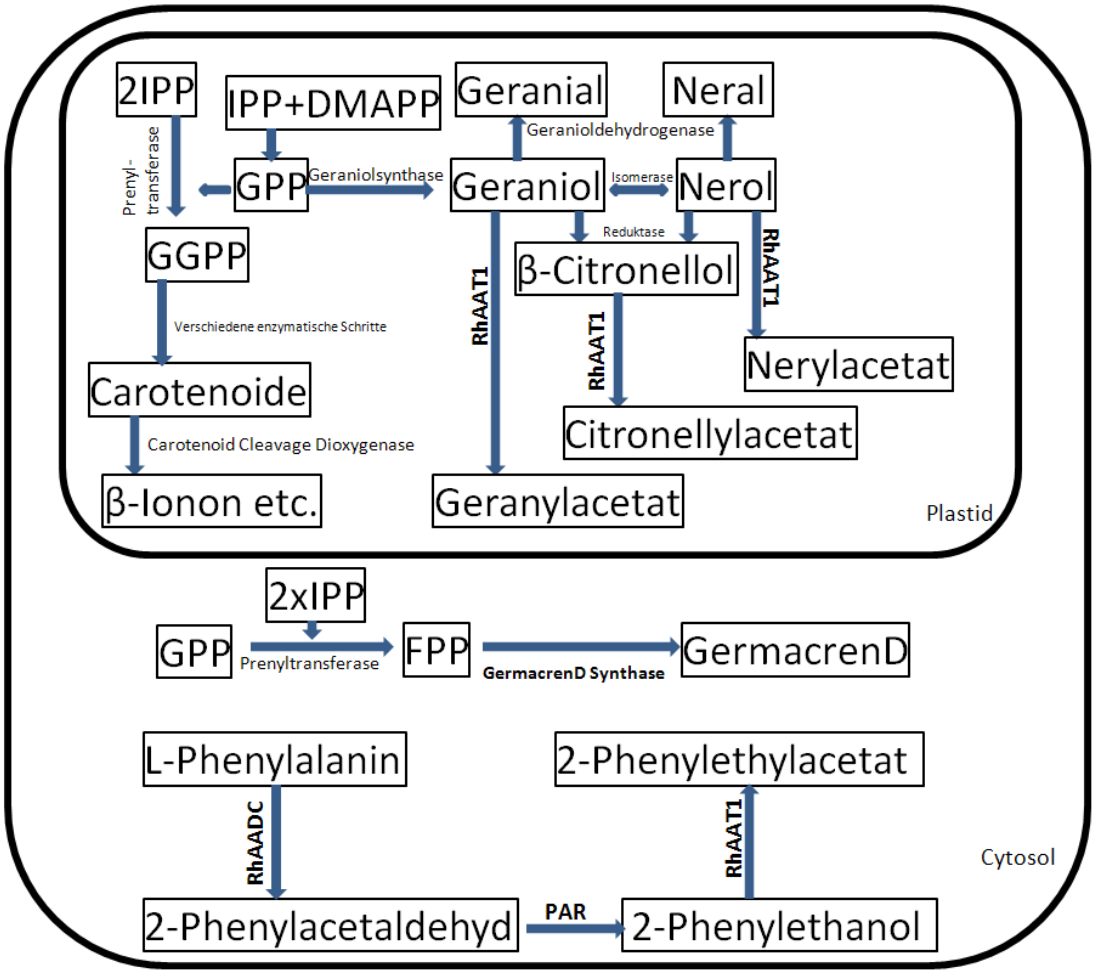


Abbildung 1. 5: Biosyntheseschritte in der Produktion der Komponenten des Rosendufts in Epidermiszellen der Petalen. Nicht gezeigt sind hier die enzymatischen Schritte die zu den methylierten Phenylpropenen führen (s.u.) und die Glycosylierungsreaktionen. RhAAT1 - R. Hybr. Alkoholacetyltransferase1, RhAADC - Phenylalanin Decarboxylase, PAR - Phenylacetaldehyd Reduktase, IPP – Isopentenyldiphosphat, DMAPP – Dimethylallyldiphosphat, GPP – Geranyldiphosphat, GGPP – Geranylgeranyldiphosphat, FPP – Farnesyldiphosphat

Die terpenoiden Bestandteile des Rosendufts sind Terpenole und ihre Ester, Aldehyde und Ketone (Knudsen et al., 2006). In der Rosenduftbiosynthese wurde bislang noch kein für die Monoterpensynthese verantwortliches Enzym charakterisiert. Wichtige Substanzen aus der Phenylpropanoidbiosynthese sind 2-Phenylethanol, Benzylalkohol, Phenylethylacetat und verschiedene Phenylpropene (s.u.). Substanzen wie 1,3,5-Trimethoxybenzen und 3,5-Dimethoxytoluen sind wichtige Bestandteile des Duftes von asiatischen Rosenarten (Lavid et al., 2002; Scalliet et al., 2002; Wu et al., 2003; Wu et al., 2004). Phenylpropensynthasen, wie z.B. die (Iso)Eugenol- oder die Chavicolsynthasen in Basilikum (Koeduka et al., 2006; Louie et al., 2007; Vassao et al., 2006), die Substrate für die bekannten Rosen O-Methyltransferasen bereitstellen, wurden in Rosen noch nicht identifiziert. Die mögliche Biosynthese von Duftkomponenten in Rosenpetalen ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Bislang gibt es nur eine Studie, die sich mit der Vererbung von Rosenduft befasst. Cherri-Martin et al. (2007) haben über Flüssigextraktion der Petalen einer tetraploiden Rosennachkommenschaft versucht, Muster in der Vererbung der einzelnen Duftsubstanzen zu finden. Sie konnten einen Heritabilitätsindex ausrechnen, der zeigt, dass die Bestandteile der Elternduftprofile auf die Nachkommen vererbt werden.

1.3 Bekannte Strukturgene der Rosenduftbiosynthese

Es wurden bereits neun Strukturgene für die Biosynthese von Blütenduft in Rosen charakterisiert. Dabei handelt es sich um Gene für Enzyme aus den oben beschriebenen Stoffwechselwegen. Enzyme der Endreaktionen oder Enzyme der letzten zwei bis drei Reaktionsschritte auf dem Weg zum Duftstoff konnten identifiziert werden. Bisher wurden keine Enzyme der Biosynthese der Ausgangssubstanzen in Rosen charakterisiert.

1. L-Phenylalanindecarboxylase (RhAADC) und Phenylacetaldehydreduktase (PAR)

Durch die Isolierung von zwei Enzymen konnten Sakai et al. (2007) die Biosynthese von 2-Phenylethanol in Rosenpetalen aufklären. Über verschiedene Funktionsstests der Enzyme mit radioaktiv markierten (Deuterium) Vorläuferstufen identifizierten Sakai et al. die Biosynthesewege und die verantwortlichen Enzyme. Das erste Enzym der 2-Phenylethanolsynthese ist eine L-Phenylalanindecarboxylase, die RhAADC (*Aromatic Aminoacid* Decarboxylase). RhAADC konvertiert L-Phenylalanin zu Phenylacetaldehyd, das im Anschluss durch PAR, die Phenylacetaldehyd Reduktase, zu 2-Phenylethanol reduziert wird. Dabei ist die letzte Reaktion auf die Anwesenheit von NAD(P)H als Reduktor angewiesen.

2. Alkoholacetyltransferasen

a. RhAAT1

Guterman et al. (2002) identifizierten in einer EST-Bank über BLAST die *Rosa* Hyb. Alcoholacetyltransferase 1. Sie synthetisierten Primer und untersuchten über einen Mikroarray die Regulierung dieser Sequenz. Über Expressionsanalysen wurde anschließend festgestellt, dass die untersuchte Sequenz ein für Duftbiosynthesestrukturgene typisches Expressionsmuster zeigt. Anschließend wurde die Funktion des Gens über eine Expression in *E. coli* und Substratspezifitätstests charakterisiert (Shalit et al., 2003). Sie überträgt Acylreste von Acyl-Coenzym A auf kurzkettige Alkohole, präferiert dabei Geraniol, β-Citronellol und Nerol. Später wurde eine Aktivität des in Petunien heterolog produzierten Enzyms mit 2-Phenylethanol festgestellt (Guterman et al., 2006).

b. BAHD-Acyltransferasen

Eine große Anzahl der Sekundärmetabolite von Pflanzen werden durch den Transfer von Acylresten auf nur wenige Ausgangsmoleküle erzeugt. Acyldonoren können dabei acetylierte Zucker, acetylierte Acyl-Carrier Proteine oder aktivierte Coenzym A-Thioester sein. Eine der Familien, die diese Reaktionen katalysieren, ist die der BAHD-Acyltransferasen (D'Auria, 2006). Das Enzym RhAAT1 (s. 1.3.2.a.) wird den BAHD-Acyltransferasen zugeordnet. Die Benennung dieser Superfamilie erfolgte nach der Entdeckung der ersten ihrer Mitglieder: BEAT, AHCT, HCBT und DAT (De Luca and St Pierre, 2000). Die Bildung von Acetaten durch Acyltransferasen ist ein wichtiger Faktor für die Ausprägung von Duft und Geschmack bei vielen Blüten und Früchten (Aharoni et al., 2000; Beekwilder et al., 2004). Das Aroma von Erdbeeren, Bananen oder Melonen (El-Sharkawy et al., 2005) wird hauptsächlich durch die Anwesenheit von Alkoholacetaten bestimmt. Der Duft von Blüten von *Clarkia breweri*, *Petunia* sp., *Stephanotis floribunda* und *Rosa* sp. wird durch Alkoholacetate mitbestimmt (Ben Zvi et al., 2008; Dudareva et al., 1998; Pott et al., 2002; Shalit et al., 2003). Ebenso werden aber auch viele andere Stoffwechselkomponenten, z.B. Anthocyane (D'Auria et al., 2007b) oder Substanzen der interspezifischen Kommunikation (Mercke et al., 2004), durch Acyltransferasen modifiziert oder gebildet. Die große Familie der BAHD-Acyltransferasen zeichnet sich durch eine geringe Sequenzähnlichkeit aus. Innerhalb der BAHDs bestehen nur 25-34 % Sequenzhomologie auf Aminosäureebene (Ma et al., 2005). Alle bislang identifizierten Mitglieder der BAHDs teilen jedoch das Aminosäuremotiv DFGWG (Asparaginsäure- Phenylalanin- Glycin- Tryptophan-Glycin), das sich nahe dem C-terminalen Ende der Enzyme befindet. Zusätzlich gibt es ein weiteres konserviertes Motiv in der Mitte der Aminosäuresequenzen, das HXXXDG Motiv

(Histidin- x- x- x- Asparaginsäure- Glycin), das für die Acyltransferaseaktivität verantwortlich scheint (D'Auria, 2006).

3. Orcinol O-Methyltransferasen (RhOOMT)

Die Orcinol O-Methyltransferasen (RhOOMTs) der Rose wurden von zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig identifiziert und charakterisiert (Lavid et al., 2002; Scalliet et al., 2002). Lavid et al. (2002) durchsuchten EST-Datenbanken (*expressed sequence tags*) von Petalen der Sorten ‚Golden Gate' und ‚Duftwolke', wobei die erstere Orcinoldimethylether als Hauptduftkomponente emittiert. Über Homologiesuchen mittels BLAST (*basic local alignment search tool*) wurden cDNAs identifiziert, die Ähnlichkeit zu bereits bekannten SAM (S-Adenosylmethionin)-abhängigen O-Methyltransferasen zeigten. Dabei wurden zwei Enzyme identifiziert und funktionell analysiert. *RhOOMT1* und *RhOOMT2* sind zu 97 % identisch in ihrer Nukleotidsequenz, jedoch in ihren Substratpräferenzen unterschiedlich. RhOOMT1 methyliert bevorzugt Orcinol und produziert so 3,5-Dimethoxytoluen. RhOOMT2 kann die gleiche Reaktion katalysieren, methyliert aber mit höherer Aktivität 3-Methoxy-5-Hydroxytoluen zu 1,3,5 Trimethoxytoluen. Postuliert wurde von Lavid et al. auch die Fähigkeit der RhOOMTs, 3,5-Dihydroxyanisol zu 3,5-Dimethoxyphenol und weiter zu 1,3,5-Trimethoxybenzen zu methylieren (siehe Abbildung 1.6). Diese Funktion wurde von Scalliet et al. (2002) ermittelt. Diese Arbeitsgruppe identifizierte gleichermaßen über eine Homologiesuche in EST-Banken cDNAs mit OMT-Motiven, klonierte diese und analysierte ihre Funktion. Scalliet et al. ermittelten zusätzlich *OOMT3* und *OOMT4*-Sequenzen aus cDNA der Sorte ‚Lady Hillingdon'. Diese Gene zeigten zudem hohe Nukleotidsequenzähnlichkeit zu den ersteren *OOMTs* (96 % und 97,4 %). Auch diese Gene wurden funktionell analysiert und zeigten die gleichen Substratpräferenzen wie RhOOMT1 und -2. Von Scalliet et al. wurde postuliert, dass die Enzymaktivität der OOMTs auf ursprünglich asiatische Rosenarten zurückzuführen ist. Durch die Stammbaumanalyse der *OOMT*-Sequenzen aus vielen weiteren Rosenarten und –sorten konnte auch die Evolution der OOMTs geklärt werden (Scalliet et al., 2008).

4. Phloroglucinol-O-Methyltransferase (POMT)

Die Phloroglucinol-O-Methyltransferase (POMT, Wu et al., 2004) katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese von 3,5-Dimethoxyphenol und 1,3,5-Trimethoxybenzen durch die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Phloroglucinol (siehe Abbildung 1.6). Dieses Enzym wurde im Petalenrohextrakt aus Rosen und anschließende Aufreinigung des aktiven Proteins identifiziert. Über einen Peptidaseverdau mit anschließender Proteinsequenzierung wurde die Aminosäuresequenz ermittelt. Es konnte

daraufhin eine cDNA-Volllängensequenz aus Petalen identifiziert werden. Durch Substratspezifitätstests an dem heterolog in *E. coli* exprimierten Enzym wurde eine Methylierungsaktivität der Hydroxylgruppe an der *meta*-Position von verschiedenen phenolischen Substanzen festgestellt. Phloroglucinol erwies sich als das bevorzugte Substrat.

5. Eugenol-O-Methyltransferase (RcOMT1 bzw. EOMT)

Wu et al. identifizierten über EST Sequenzvergleiche die Eugenol-O-Methyltransferase (Wu et al., 2003). Aus cDNA wurde die volle Sequenz ermittelt und in *E. coli* überexprimiert. Das rekombinante Protein zeigte in Substrattests die Fähigkeit zur Methylierung von Eugenol und Isoeugenol (Abbildung 1.7).

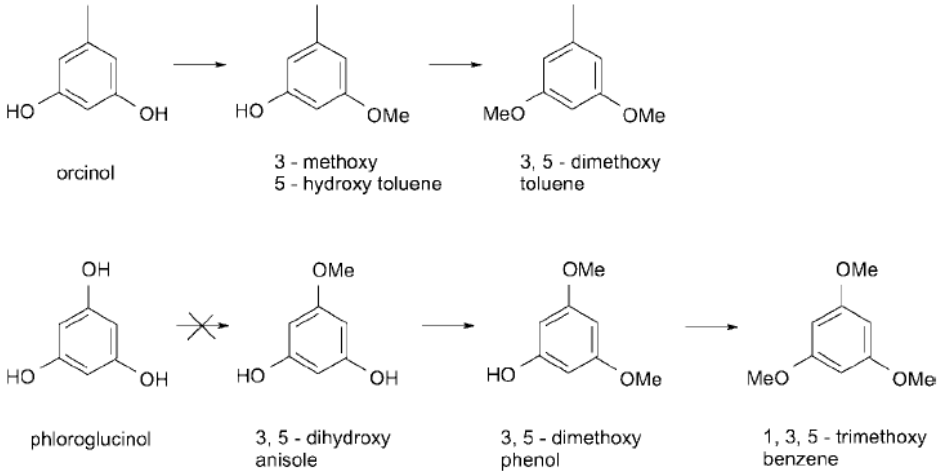


Abbildung 1. 6: Biosyntheseweg von Phloroglucinol zu 1,3,5-Trimethoxybenzen (aus Lavid et al. 2002). Die RhOOMTs sind in der Lage alle Methylierungen durchzuführen bis auf die Methylierung von Phloroglucinol. Diese Reaktion wird von der POMT katalysiert (Wu et al. 2004).

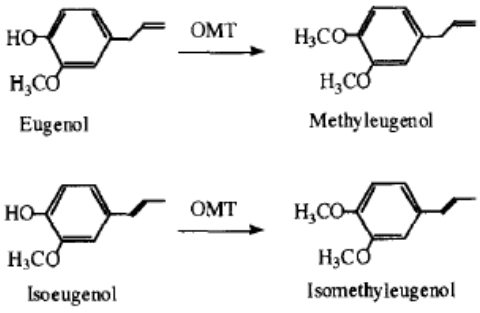


Abbildung 1. 7: Biosyntheseschritte, die von der RcOMT1 katalysiert werden (aus Wu et al. 2003).

6. Kaffeesäure-O-Methyltransferasen (RcOMT2 und RcOMT3)

Wu et al. (2003) isolierten aus *Rosa wichurana* var. *spontanea* gleichzeitig mit RcOMT1 zwei Enzyme, die Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Kaffeesäure-O-Methyltransferasen aufwiesen. Im Substratspezifitätstest zeigte sich, dass die RcOMT2 die höchste Aktivität gegenüber 3,5-Dihydroxyanisol aufwies, dem gleichen Substrat, dass auch die RhOOMTs -1, -2,

-3 und -4 methylieren können. Trotz der Substratübereinstimmung weist die RcOMT2 eher Sequenzähnlichkeit zu Kaffeesäure-O-Methyltransferasen auf als zu Orcinol-O-Methyltransferasen. Kaffeesäure-O-Methyltransferasen spielen eine Schlüsselrolle in der Ligninbiosynthese (Gowri et al., 1991; Inoue et al., 1998; Ye, 1997). Die RcOMT3 weist wie RcOMT2 Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Kaffeesäure-O-Methyltransferasen auf, hat im Substratspezifitätstest auch die höchste Aktivität bei Kaffeesäure und leichte Aktivität bei einigen *ortho*-Diphenolderivaten. Jedoch konnte die eigentliche Funktion der RcOMT3 bisher nicht geklärt werden (Wu et al., 2003).

7. GermacrenD-Synthase (GDS)

Guterman et al. (2002) haben über die molekulare und funktionelle Charakterisierung einer Sesquiterpensynthase aus Rosen berichtet. Die Identifizierung erfolgte aus einer EST-Bank durch Sequenzvergleiche, über eine funktionelle Analyse durch Expression und Überproduktion in *E. coli* mit anschließenden Substratpräferenztests. Das Enzym ist in der Lage, *in vitro* Farnesyldiphosphat zu GermacrenD umzuwandeln. Expressionsanalysen in Rosenblüten, die GermacrenD produzieren, zeigten eine Expression wie bei einem Duftbiosynthesegen erwartet.

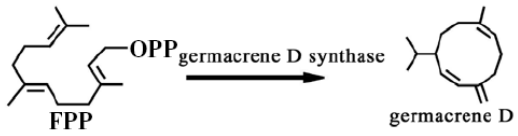


Abbildung 1. 8: Die GermacrenD-Synthase katalysiert die Zyklisierung von FPP (Farnesylpyrophosphat) zu GermacrenD (Xiang et al., 2007)

8. *Carotenoid Cleavage* Dioxygenase (CCD1)

Carotenoid Cleavage Dioxygenasen (CCDs) wurde in Rosen bislang noch nicht beschrieben. In Petunien (Simkin et al., 2004b), Tomaten (Simkin et al., 2004a), Melone (Ibdah et al., 2006) und *Arabidopsis* (Schwartz et al., 2001) katalysieren diese Enzyme durch die ungleiche Spaltung von Apocarotenoiden (z.B. β-Carotin) an den 9 und 10 bzw. 9‘ und 10‘ Positionen die Synthese von β-Ionon und β-Damaszenon. Die Struktur bzw. die Sequenz der CCDs ist über die Pflanzenarten konserviert; so war es möglich über Homologiesuchen in der EST-Bank von Guterman et al. (2002) die in dieser Arbeit untersuchte CCD-ähnliche Sequenz zu identifizieren.

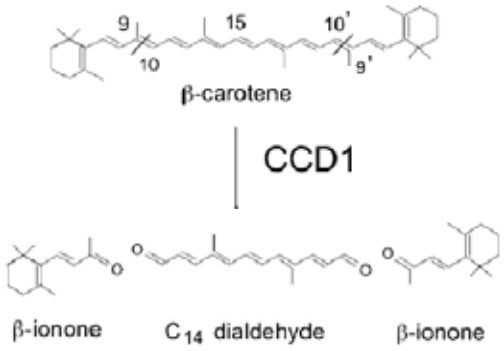


Abbildung 1. 9: Die CCD1 spaltet asymmetrisch die 9 und 10 bzw. die 9' und 10' Bindungen im Carotinrückgrat (Simkin et al. 2004b)

1.4 QTL-Kartierung

Die Vererbung der Ausprägung quantitativer Merkmale wird durch die Beteiligung mehrerer genetischer Loci beeinflusst und ist stark von Umwelteinflüssen abhängig. Das komplexe Zusammenspiel mehrerer Faktoren, sowohl regulatorischer Elemente als auch Strukturgene, bestimmt in einer spaltenden Nachkommenschaft die Ausprägung der phänotypischen Eigenschaften. Bei der Untersuchung quantitativer Eigenschaften eignen sich vor allem F2*3-Familien oder Rekombinante Inzuchtlinien. Diese besitzen aufgrund ihrer Kreuzungsgeschichte nur drei bzw. zwei Zustände eines Locus (homozygot für Elter A, heterozygot, homozygot für Elter B). Bei F2*3 Familien ist es möglich, additive oder dominante Geneffekte zu bestimmen. Ausschlaggebend bei der Genauigkeit der QTL-Bestimmung sind dabei Populationsgröße und die sichere lineare Anordnung der Marker auf der zugrunde liegenden genetischen Karte (Ferreira et al., 2006). Um eine allgemeingültige Aussage über die Eigenschaften treffen zu können, muss die Ausprägung der quantitativen Merkmale über mehrere Populationen und Umwelten stabil bleiben. Die Genauigkeit der Analysen kann durch vorherige Auswahl der Genotypen verstärkt werden (*Selective Genotyping*) (Van Ooijen, 2009).

In den meisten bislang durchgeführten Rosen-Kartierungsprojekten wurde mit Kreuzungspopulationen nach einem *Pseudo-Double-Test-Cross* gearbeitet. In diesem Fall muss von maximal vier verschiedenen Allelen an einem Locus ausgegangen werden. Dabei können die Allele eindeutig dem jeweiligen Elter zugeordnet werden. Der direkte Effekt eines QTL lässt sich hingegen über *Interval Mapping* (Lander and Botstein, 1989) nur schwer einschätzen. Hierbei sind direkt an QTL gekoppelte Marker nötig. Mit diesen Voraussetzungen konnten bereits in 10 Kartierungsprojekten in Rosen QTL für diverse Eigenschaften detektiert werden.

Linde et al. (2006), Zhang (2003) , Dugo et al. (2005), Xu et al. (2005; 2007) konnten in diploiden Rosen QTL für die Resistenz gegen Echten Mehltau in *Rosa multiflora* Nachkommen kartieren. Yan et al. (2005b) kartierten QTL für Wüchsigkeit in der gleichen Population, die in

der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen zur Duftvererbung genutzt wurde. Rajapakse et al. (2001) kartierten Genomregionen mit Einfluss auf die Ausprägung der Bestachelung. Auch für Blüteneigenschaften wie Blütengröße (Dugo et al., 2005; Lal et al., 1982; Shupert et al., 2007) und Petalenzahl (Oyant et al. 2008, Zhang et al. 2003, Debener et al. 2001) wurden bereits mehrfach QTL bestimmt.

In mehreren Studien mit verschiedenen Tomatenkreuzungslinien (Causse et al., 2002; Mathieu et al., 2009; Tieman et al., 2006) wurde der einfache genetische Hintergrund von Inzuchtlinien dazu genutzt, Regionen im Genom der Tomaten zu detektieren, die Einfluss auf die quantitative Ausprägung verschiedener Aromastoffe haben. Die Autoren nutzten Introgressionslinien (ILs) um die Variation auf den Genotypunterschied zurückzuführen. Mathieu et al. (2009) konnten in einer Population aus 89 ILs 30 QTL finden, die auf die Ausprägung der verschiedensten Aromastoffe Einfluss nahmen. Auch in Eukalyptus und Minze konnten Zusammenhänge zwischen der Monoterpenzusammensetzung des Öls und genomischen Regionen detektiert werden (Croteau and Gershenzon, 1994; Shepherd et al., 1999). In der Familie der *Rosaceae* wurden bislang Untersuchungen zur Vererbung von Aromabestandteilen nur in Apfel (Dunemann et al., 2009b) und in Erdbeere (Olbricht et al., 2008) durchgeführt. Dunemann et al. konnten die Vererbung von 27 Aromabestandteilen auf 50 QTL-Regionen zurückführen. Mit der Verlagerung der Untersuchung von Rosenduft in eine diploide Population können die Vererbungsregeln hinter den Spaltungsmustern klarer erkannt und Hypothesen zur Genetik aufgestellt werden.

Wird in einer diploiden Kreuzungsnachkommenschaft von maximal zwei Allelen oder Zuständen (maximal 4 unterschiedliche Allele insgesamt) an einem Locus ausgegangen, können einer tetraploiden Kreuzungsnachkommenschaft bereits 4 verschiedene Allele an einem Locus vorkommen. Bei einem Merkmal, dass nur von einem zusätzlichen Faktor beeinflusst wird, muss in einer tetraploiden Population schon mit 256 möglichen Zuständen oder Allelkonfigurationen gerechnet werden. In einer kleinen tetraploiden Nachkommenschaft wie im Fall von Cherri-Martin et al. (2007) war es zum Beispiel nicht möglich, Spaltungsverhältnisse von 5 zu 7 oder 7 zu 9 statistisch zu unterscheiden. Somit bleibt die sichere Allelzuordnung aus. In diploiden Populationen mit nur 100 Individuen ist es möglich, die auftretenden Spaltungsmuster (1 zu 1, 1 zu 2 zu 1, 3 zu 1) anhand eines χ^2-Tests klar voneinander zu unterscheiden.

Die vorliegend genutzte diploide Rosenpopulation ist genetisch durch eine hohe Markerdichte charakterisiert (Yan et al., 2005a). Die Karte entspricht mit ca. 500 cM Länge, sieben Kopplungsgruppen und einer Markerdichte von 0,3 bis 0,9 Marker/cM der bislang

umfangreichsten Abdeckung des Rosengenoms. Sie stellt eine gute Grundlage für eine erfolgreiche QTL-Kartierung dar.

1.5 Ziele der Arbeit

Durch die phänotypische Untersuchung der Duftextrakte von Nachkommen einer spaltenden Rosenpopulation sollen verschiedene Fragestellungen näher untersucht werden:

1. Wie werden Duftkomponenten in diploiden Rosen vererbt?
2. Können die einzelnen Duftfaktoren auf der genetischen Karte als distinkte Loci lokalisiert werden?
3. Korrelieren diese Loci mit Positionen von Strukturgenen der Duftbiosynthese?
4. Wird die Zusammensetzung der Duftprofile der diploiden Kartierungspopulation durch die Expression von Strukturgenen reguliert?
5. Können aus der Kombination von Expressions- und Spaltungsdaten Hypothesen zur Funktion einzelner Strukturgene aufgestellt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen gehören zur Sammlung der Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung des Instituts für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover.

Die Kartierung der genetischen Marker erfolgte auf Grundlage der genetischen Karten von Yan et al. (2005a) und Linde et al. (2006) in den Populationen 94/1 und 97/7. Beide Populationen sind diploid und aus einem *Rosa multiflora* Hintergrund hervorgegangen. Die genaue Abstammung der Populationen ist in Abbildung 2.1 und 2.2 dargestellt.

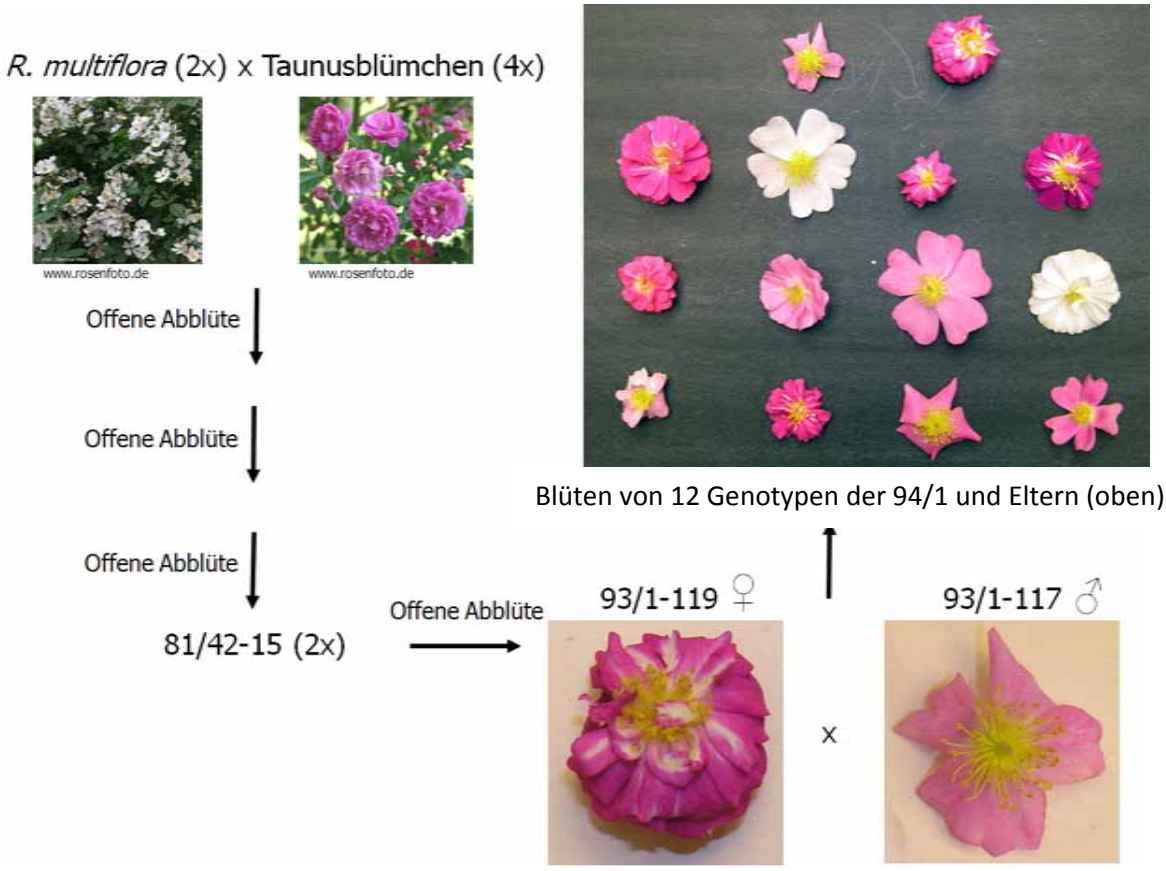


Abbildung 2. 1: Abstammungsübersicht 94/1, dargestellt sind für die Genotypen 93/1-119 und -117 repräsentative Blüten des Stadiums zu dem die Duftanalysen durchgeführt wurden: vollständig geöffnete Blüte, Petalen voll ausgefärbt, Antheren voll ausgereift

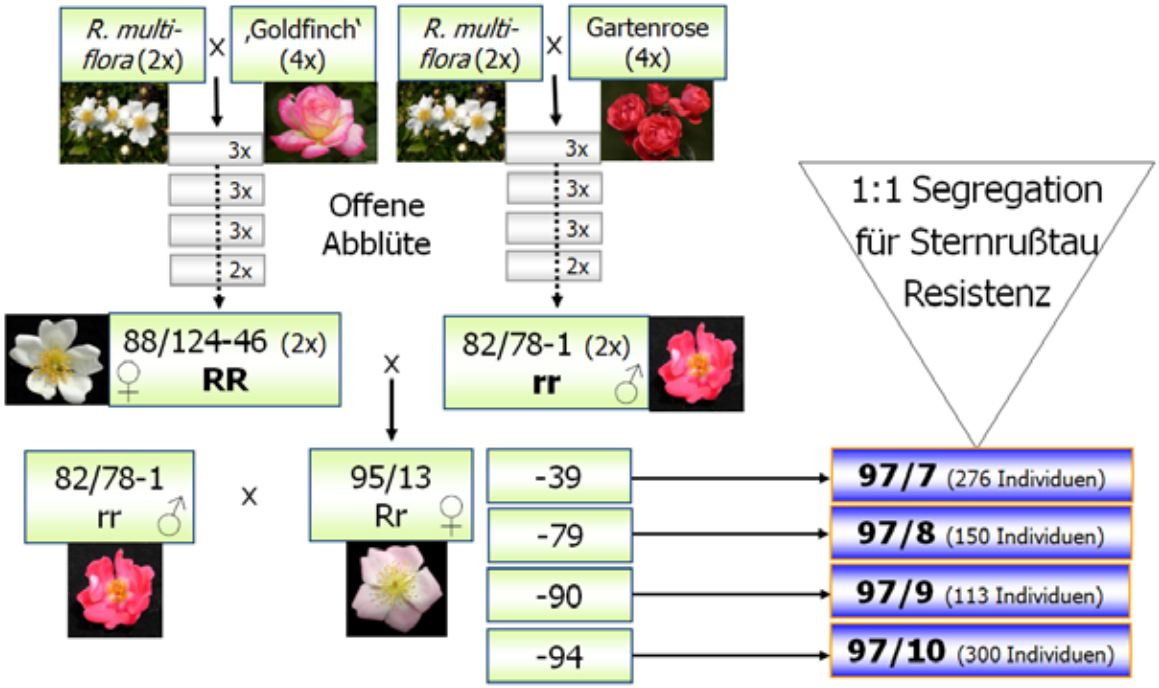


Abbildung 2. 2: Abstammungsübersicht 97/7 (Grafik freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Biber)

Die verwendeten Elternpflanzen der Populationen 94/1 und 97/7 stehen im Freiland in Töpfen und in Erde am Standort Herrenhäuser Straße 2, Hannover. Die Population 94/1 wird in zwei bis drei Klonen pro Genotyp in Töpfen in Torfkultursubstrat 1 im Gewächshaus in Herrenhausen kultiviert. Diese Klone wurden zur Gewinnung der Duftextrakte in einer Klimakammer kultiviert. Dabei wurden 2-3 Klone pro Genotyp mindestens eine Woche vor den ersten Probenahmen bei 16h Licht, 8h Dunkelheit, 22 °C gehalten. Die Blüten eines Genotyps wurden für die Extraktgewinnung zusammengefasst und somit Genotyp- und Positionsvarianz minimiert.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Plastikwaren von den Firmen Sarstedt, NerbePlus oder Eppendorf geliefert (Adressen s. Anhang). PCR 96-*well* Reaktionsplatten wurden von Applied Biosystems bezogen.

2.1.3 Reagenzien

Feinchemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich oder Merck bezogen. Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Fermentas, Roche Diagnostics oder Invitrogen hergestellt. DNTPs, Größen- und Längenstandards für Agarose Gelelektrophoresen wurden von Invitrogen hergestellt, Längenstandards für SSR Analysen auf 0,25 mm Polyacrylamidgelen im LI-COR® 4200 bzw. 4300 Doppellasersequenzsystem von LI-COR®. Als DNA Polymerasen wurden BIOTAQ™ von BIOLINE und PrimeSTAR® HS von TaKaRa verwendet. Die Firma

Applichem lieferte TEMED, Bradford Reagenz sowie GelSave. Primäre und Sekundäre Antikörper wurden von der Firma Rockland hergestellt und über Biomol.de bezogen.

2.1.4 Geräte, Medien und Puffer:

Siehe Anhang.

2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech synthetisiert. Zur Erstellung der Primersequenzen wurde das frei im Internet zugängliche Programm Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) verwendet. Dabei wurden die Standardoptionen des Programms genutzt und die Länge der PCR-Produkte maximiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 6.4 aufgelistet.

2.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 2. 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle	Verwendung
***E. coli* DH10B**	F^- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu) 7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ^-	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten
***E. coli* BLR (DE3)**	F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) D(srl-recA)306::Tn*10* (Tet^R)	Novagene	Expression von PCR-Produkten
***E. coli* BLR (DE3) plus EL/ES**	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) D(srl-recA)306::Tn*10* pLysS (Cam^R, Tet^R)	Novagene	Expression von PCR-Produkten
***E. coli* BL21 codon plus (DE3) RIL**	F- ompT hsdS (rB- mB-) dcm+ Tetr *E. coli* gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Novagene	Expression von PCR-Produkten
***E. coli* BL21 (DE3) plysS R/L**	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)	Novagene	Expression von PCR-Produkten

2.1.7 Plasmide

Tabelle 2. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide.

Vektor	Hersteller	Selektierbarer Marker	Verwendung
pGEM-T easy	Promega	*bla* (Ampicillinresistenz)	Klonierung von PCR-Produkten
pET101D/TOPO	Invitrogen	*bla* (Ampicillinresistenz)	Induzierbare Expression
pUC19	Fermentas	*bla* (Ampicillinresistenz)	Kontrollvektor

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Duftextrakten

Die Analyse der Duftstoffe in den Petalen der Kartierungspopulation 94/1 erfolgte durch Flüssigextraktion mit Hexan und 20 mg/l Kampfer als internem Standard. Die Beprobung erfolgte täglich um 12 Uhr. Die Pflanzen wurden vor der ersten Beprobung mindestens eine Woche in der Klimakammer akklimatisiert (siehe Pflanzenmaterial). Beprobt wurden Blüten des Stadiums 4 und 5 nach Picone et al. (2004) bzw. nach Oka et al. (1999): innere und äußere Petalen geöffnet, Antheren und Stamen sichtbar (siehe Abbildung 2.3.). Es konnte wie bei Picone et al. (2004) keine klare Trennung der Stadien 4 und 5 festgelegt werden. Je Gramm Petalen wurden 2 ml des Extraktionsmittels eingesetzt und 24 h bei -20 °C extrahiert. Der Extrakt wurde 24 h bei -20 °C mit $NaSO_4$ getrocknet und zur Analyse in GC-Röhrchen mit Septum (Agilent) überführt. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung der Extrakte bei -20 °C bzw. bei -80 °C (langfristig).

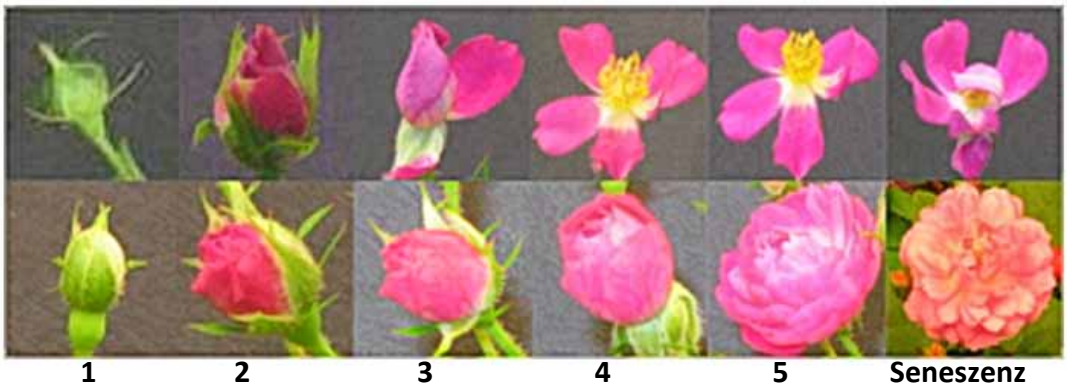


Abbildung 2. 3: Blütestadien der Population 94/1 für verschiedene Genotypen von links nach rechts nach Oka et al. (1999), wobei die Stadien 4 und 5 die Stadien der stärksten Duftemission sind und in der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung der Duftextrakte verwendet wurden. Sie sind charakterisiert durch vollreife Antheren und voll ausgefärbte Petalen. Die ungefüllten Genotypen zeigen keine klar erkennbaren Stadien 4 und 5. Seneszenz ist durch Verbräunen der Antheren und Verblassen der Petalen gekennzeichnet.

2.2.2 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die gaschromatographische Auftrennung der Duftextrakte erfolgte in einem HRGC (*High resolution gaschromatograph*) mit polarer Trennsäule mit KAS (Kaltaufgabesystem) und Flammenionisationsdetektor (FID) von Hewlett Packard (siehe Geräte). KAS-Parameter: splitless (0,5 min); 60 °C (0 min); 12 °C/s - 240 °C (3 min). KAS-Liner: Gerstel Glasverdampferrohr mit Verwirbelungseinstichen. Als Trennsäule diente eine Varian WCOT Fused Silica CP Wax 52CB, 30 m x 0,25 mm ID. Die Detektorparameter für die FID waren 250 °C, Gase: H_2: 40 ml/min, Luft: 450 ml/min, N_2: 45 ml/min.

Als Trägergas wurde H_2 mit einem Vordruck von 58,4 kPa, Fluss: 1,5 ml/min (konstant) verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte mit einer Hewlett Packard HP GC ChemStation, Version Rev. A.0504. Als Temperaturprogramm wurden 40 °C (3 min), 3 °C/min bis 200 °C, 10 °C/min bis 250 °C (10 min) gefahren.

Jeder Genotyp wurde drei bis sieben Mal beprobt. Dabei wurde je Analyse 1 µl der Duftextrakte eingespritzt. Die relativen Peakflächen aus der Analyse mit der HP ChemStation Software wurden in Excel exportiert und auf Kampfer normalisiert.

Die Duftextrakte der Elternpflanzen der 94/1 wurden zur Identifikation der enthaltenen Substanzen massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurde 1 µl des Duftextrakts in ein HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS) mit polarer Säule (Phenomenex ZB-Wax, 30 m x 0,32 mm ID) eingespritzt. Injektor cold on-column, 40 °C. Trägergas He, Vordruck: 50 kPa, Fluss: 1,8 ml/min. Temperaturen der Ionenquelle: 200 °C, Interface: 230 °C, Quadrupol: 100 °C. Ionisation erfolgte durch Elektronenstoßionisation mit 70 eV. Der detektierte Massenbereich war m/z 33-300.

Nach Ablauf eines Standard-Aromaprogramms (Temperaturen 40 °C (3 min), 3 °C/min bis 200 °C, 10 °C/min bis 250 °C (10min)) wurden die Daten mit Xcalibur (Thermo), Version 1.19 aufgenommen und durch Abgleich der detektierten Massen mit der Wiley NBS54K (NIST), LMC Massenspektren Bibliothek die auftretenden Peaks identifiziert. Die den Peaks zugehörigen Kovats‘ Indices (Kovats, 1958) wurden bestimmt (Abbildung 2.4) und mit denen der Standardsubstanzen verglichen. Außerdem wurden die Retentionszeiten der Standardsubstanzen bestimmt.

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{log(t'_{r(unknown)}) - log(t'_{r(n)})}{log(t'_{r(N)}) - log(t'_{r(n)})} \right]$$

Abbildung 2. 4: Definition des Kovats‘ Index, N=# der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert, n=Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans, unknown= Analyt, t‘= relative Retentionszeit= Retentionszeit minus Totzeit (Totzeit = Retentionszeit eines nicht an die Säule bindenden Gases)

2.2.3 Subtraktive Hybridisierung

Um weitere DNA-Sequenzen zu finden, die mit der Duftbiosynthese in Rosenblütenblättern korreliert sind, wurde eine Subtraktive Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden aufgrund der Ergebnisse der GC Analysen der Duftextrakte zwei Gruppen von Pflanzen zusammengestellt. In den Petalen der ersten Gruppe ließ sich wiederholt die Substanz Geranylacetat (GA) in sehr hoher Menge, in der zweiten nicht bzw. in sehr geringer Menge nachweisen. Aus den Petalen der Pflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert, gepoolt und insgesamt

250 µg für die Aufreinigung der mRNA eingesetzt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Zur Isolierung der PolyA$^+$-RNA wurde das Oligotex® mRNA Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Um mRNAs zu identifizieren, die für den Unterschied im GA-Gehalt der gepoolten Pflanzen verantwortlich sind, wurden die einzelnen Pools mit dem PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit von Clontech gegeneinander hybridisiert. Dazu wurden zuerst 3 µg der jeweiligen polyA+ RNAs mit Hilfe der im PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit vorhandenen Reagenzien in Erststrang cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte eine Zweitstrangsynthese mit folgender Zusammensetzung in einem Endvolumen von 80 µl 2 h bei 16 °C.

- 10 µl Erststrang cDNA
- 48,4 µl Aqua bidest.
- 16 µl 5x Second strand Buffer
- 1,6 µl 10mM dNTP-Mix (0,2 nmol)
- 4 µl 20x Second Strand Enzyme Cocktail

Der Reaktionsansatz wurde mit 2 µl (6U) T4 DNA Polymerase versetzt und weitere 30 min bei 16 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 4 µl EDTA/Glykogen Mix gestoppt und eine Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion durchgeführt. Anschließend wurden nach Angabe des Herstellers ein *RsaI*-Verdau der Doppelstränge vorgenommen. Vom verdauten Ansatz wurden 5,5 µl als ‚Driver' cDNA beiseite gestellt. Mit dem restlichen Ansatz wurde, nach Test des Ansatzes auf erfolgreichen Verdau (siehe Protokoll PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit von Clontech), die Präparation der ‚Tester' cDNAs durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene Adapter an die durch den *RsaI*-Verdau definierten Enden der Fragmente ligiert. Anschließend wurde die Subtraktion in beide Richtungen durchgeführt.

Durch das Mischen der Pools entstehen Hybriden aus den komplementären Fragmenten, die in beiden Pools vorhanden sind. Die Fragmente, die bei der Ausprägung des selektiven Merkmals oder Zustands spezifisch sind, bleiben einzelsträngig. In der durchgeführten Subtraktion ‚hoher GA-Gehalt gegen niedriger GA-Gehalt' sollten die Fragmente einzelsträngig bleiben, die zur Erhöhung des GA-Gehalts benötigt wurden, bei der Subtraktion in Gegenrichtung die Fragmente, deren Expression herunter reguliert wurde. Die spezifischen Fragmente wurden durch zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen, mit für die Adaptersequenzen spezifischen Primern, von den Doppelsträngen getrennt und eine cDNA-Bank angelegt. Die subtrahierten cDNA-Fragmente wurden im Vektor pGEM T-easy in *E. coli* kloniert (siehe 2.2.6.10). Anschließend wurde nach Blau-Weiß Selektion je Bank 6x 384 Klone in FB-Medium (s. Anhang) gepickt, 24 h bei 37 °C kultiviert. Die cDNA Banken wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zusätzlich zu der oben genannten Klonierung der Sequenzen in *E. coli* wurde von der Firma Cogenics eine 454-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden im zweiten PCR-Schritt der Subtraktion Primer mit einem selektiven Adapter verwendet, so dass die resultierenden PCR-Produkte jeweils mit einer bekannten ‚forward' und ‚reverse' Sequenz versehen waren (Tabelle 2.3). Das PCR-Produkt wurde mit dem Kit MinElute (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, quantifiziert und im flüssigen Zustand an Cogenics versandt.

Tabelle 2. 3: Adaptersequenzen, die zur Unterscheidung der einzelnen Fragmentbanken in der 454-Sequenzierung dienten. Dabei identifizieren die Mplus und Mmin Adapter die Sequenzen aus der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Subtraktion

>MPlusFwd
GCCTCCCTCGCGCCATCAG**G**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
>MplusRev
GCCTTGCCAGCCCGCTCAG**G**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
>MminFwd
GCCTCCCTCGCGCCATCAG**T**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
>MminRev
GCCTTGCCAGCCCGCTCAG**T**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

Die erhaltenen EST-Sequenzen wurden mit Hilfe der Adaptersequenzen den verschiedenen Pools zugeordnet und assembliert. Das erste Assembly wurde durch Cogenics mit der Software MIRA (http://chevreux.org/projects_mira.html) durchgeführt. Dabei wurden zuerst alle aus der 454-Sequenzierung hervorgegangenen Fragmente assembliert und anschließend die resultierenden Contigs anhand ihrer Endsequenzen den einzelnen cDNA Banken zugeordnet. Ein weiteres Assembly wurde nach dem Sortieren der Rohdaten und der Zuordnung zu den einzelnen cDNA-Banken per Hand mit dem Programm DNASTAR (www.dnastar.com) durchgeführt. Dadurch wurden später, im Gegensatz zum Assembly mit MIRA, nur die Sequenzen miteinander assembliert, die in einer Bank enthalten waren.

2.2.4 Funktionale Analyse eines Alkoholacetyltransferase-Kandidaten

Ein Contig , der das vollständige konservierte Motiv der BAHD-Acyltransferasen trug, wurde für die Primerentwicklung für das anschließende 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) und 5'-RACE verwendet, nachdem die Expression des Fragments in allen bereits synthetisierten cDNAs aus Petalen der 94/1 nachgewiesen werden konnte.

2.2.4.1 Phylogenetischer Baum

Das Alignment der Proteinsequenzen (D'Auria, 2006) nach Stewart (2005) erfolgte mit ClustalX mit den voreingestellten Optionen. Anschließend wurde dieses Alignment in MEGA 4.0 verwendet, um ein *Neighbour-joining* Dendrogramm zu erstellen. Der Baum wurde mit 1000 Bootstrap Replikaten gerechnet, als Modell wurde ‚p-distance' und als Austauschwertung ‚pairwise deletion' gewählt.

2.2.4.2 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Das 3'Ende einer cDNA lässt sich durch die Verwendung eines genspezifischen Primers, der in bereits bekannter Sequenz bindet und die Verwendung eines Primers, der komplementär zum PolyA-Schwanz der mRNA plus einer spezifischen Base ist, während einer reversen Transkription amplifizieren. Diese Reaktion wurde mit dem cDNA-Synthese Kit von Applied Biosystems mit 500 ng Gesamt-RNA aus den Petalen des Genotyps 94/1-91 wie eine konventionelle cDNA-Synthese (siehe 2.2.5.2) durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde auf einem 1%igen Agarosegel (siehe 2.2.6.3) aufgetrennt, mit dem Kit MinElute (Qiagen) aufgereinigt, wie bei einer Standard-Klonierung A-getailt, ligiert und einkloniert (siehe 2.2.6.10). Anschließend erfolgte eine Insert-PCR zur Überprüfung der rekombinanten Klone und Isolierung der Plasmid-DNA aus positiven Klonen. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte durch die Firma MWG Biotech. Darauf folgte im Programm BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) ein Sequenzalignment mit dem Original-EST.

2.2.4.3 5'-RACE

Um das 5'-Ende des interessierenden Kandidaten zu erhalten, wurde ein 5'-RACE mit dem FirstChoice® RLM-RACE Kit der Firma Ambion nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden mit Hilfe zweier Enzyme, der CIP (*Calf intestine alkaline phoshatase*) und der TAP (*Tobacco acid pyrophosphatase*) in zwei aufeinander folgenden Schritten zuerst alle freien 5'-Phosphatgruppen bei unvollständigen mRNAs, t- und rRNAs abgespalten. Komplette mRNAs werden durch ihr 5'-*Cap* vor der Phosphatabspaltung geschützt. Anschließend wird durch die TAP das 5'-*Cap* abgespalten, und an das resultierende Monophosphat mit Hilfe von T4-Ligase ein RNA-Adapter angehängt. Danach wird eine Erststrang cDNA-Synthese mit Zufallsprimern durchgeführt. Die Adaptersequenz und zwei weitere genspezifische Primer, die ca. 100 und 200 bp in bereits bekannter Sequenz binden, werden anschließend in einer ‚nested' PCR verwendet. Zur Amplifikation wurde die *proof reading* Polymerase PrimeSTAR™ genutzt.

Zuerst wurden dazu 10 µg der extrahierten Gesamt-RNA (siehe 2.2.5.1) in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10x CIP Puffer, 2 µl CIP und nukleasefreiem Wasser 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die CIP mit 15 µl Ammoniumacetatlösung gestoppt und eine Aufreinigung des Ansatzes, zuerst mit Phenol-Chloroform, danach mit Chloroform nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde nun 10 min auf Eis mit Isopropanol gefällt, mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 11 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Von der CIP-behandelten RNA wurden 5 µl mit 1 µl 10xTAP Puffer, 2 µl TAP und 2 µl nukleasefreiem Wasser gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ligation des Adapters erfolgte anschließend mit 2 µl der CIP und TAP behandelten RNA, 1 µl 5'-RACE Adapter, 1 µl 10x RNA Ligase Puffer, 2 µl T4-RNA-Ligase (2,5 U/µl) und 4 µl nukleasefreiem Wasser für 1 h bei 37 °C. Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte danach bei 45 °C für 1 h in folgendem Mix:

1x Erststrang-cDNA Mix

- 8 µl nukleasefreies Wasser
- 2 µl ligierte RNA
- 4 µl 2,5 mM dNTPs (5 nmol)
- 2 µl Random Primer (5 µM)
- 2 µl 10x RT Puffer
- 1 µl RNAse Inhibitor
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase

Das resultierende Fragment wurde auf 1% Agarose aufgetrennt (siehe 2.2.6.3), ausgeschnitten und aufgereinigt, A-getailt und wie in 2.2.6.10 beschrieben, kloniert. Die Sequenzierung erfolgte durch MWG Biotech. Aus der resultierenden Sequenz wurde ein ORF (*open reading frame*- offener Leserahmen) ermittelt und Primer abgeleitet, durch die die gesamte kodierende Sequenz amplifiziert wurde.

2.2.4.4 Klonierung der Volllängensequenz in pET 101/D-TOPO

Zur heterologen Expression des AAT-Kandidaten wurde die vollständige kodierende Sequenz in den Vektor pET101D/TOPO der Firma Invitrogen (Sequenz siehe Abbildung 6.2) kloniert. Dieser Vektor enthält eine T7-Promotorregion, durch die die Expression des Inserts gesteuert werden kann. Der Vektor enthält zusätzlich die Sequenz eines N-terminalen 6x *His-Tag*, über den die spätere Aufreinigung erfolgen kann. Nach der Ligation der kodierenden, mit Hilfe der PrimeSTAR™ *proof reading* Polymerase amplifizierten, Sequenz in den Vektor wurde *E. coli* DH10B mit dem Ligationsansatz transformiert (2.2.6.10) und die Identität sowie Orientierung des Inserts durch Sequenzierung festgestellt.

2.2.4.5 Expression der Volllängensequenz

Zur Expression des Volllängenklons des AAT-Kandidaten wurden die *E. coli* Stämme BLR (DE3), BLR (DE3) plus EL/ES und BL21 (DE3) codon plus RIL ausgewählt. BLR (DE3) codiert für eine T7-Polymerase, die durch die Zugabe von IPTG induzierbar ist. Die Polymerase bindet an der T7-Promotor Region auf pET101/D TOPO. Dadurch wird die Expression des Inserts gezielt steuerbar. BLR (DE3) plus EL/ES sollte benutzt werden, wenn die *Codon usage* von der bei *E. coli* abweicht. BL21 (DE3) besitzt zusätzlich noch ein weiteres Plasmid für weitere *t*RNAs, die für in *E. coli* seltene Codons codieren.

Die Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen *E. coli* BLR (DE3), BLR (DE3) plus EL/ES und BL21 (DE3) codon plus RIL erfolgte nach Sambrook and Russell (2002) mit einer Einzelkolonie in 5ml LB-Medium +Tetracyclin (5 mg/l).

Die Transformation der BLR (DE3), BLR (DE3) plus EL/ES und BL21 (DE3) codon plus RIL Zellen erfolgte in 100 µl der kompetenten Zellen mit 2 µl der nach 2.2.4.4 hergestellten und aufgereinigten pDNA, 20 min Inkubation auf Eis, 30 s Hitzeschock bei 42 °C, anschließender sofortiger Überführung auf Eis. Nach zwei Minuten wurde 1 ml SOC Medium dazugegeben und 1 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde in 100 µl, 200 µl und 300 µl Aliquots auf LB Medium plus Ampicillin (50 mg/l) Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und eine Einzelkolonie zur Expressionsanalyse herangezogen.

Die Einzelkolonie wurde in 5 ml LB Flüssigmedium plus Ampicillin (50 mg/l) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Aus der Übernachtkultur wurden 500 µl in 10 ml LB Flüssigmedium plus Ampicillin (50 mg/l) überführt und bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,4 herangezogen. Danach wurde die Kultur in zweimal 5 ml geteilt und die eine Hälfte mit 0,5 M IPTG induziert. Von beiden Kulturen wurden daraufhin je 500 µl abgenommen, pelletiert und bei -20 °C eingefroren. Diese Zellpellets dienten als Nullpunktkontrolle der Expression. Die restlichen Kulturen wurden bei 30 °C geschüttelt und nach 2, 4 und 16 h je 500 µl abgenommen, pelletiert und eingefroren.

Von den Kulturen der rekombinanten Zellen BLR (DE3), BLR (DE3) plus EL/ES und BL21 (DE3) codon plus RIL wurden Glycerin Stocks angelegt. Dazu wurden 850 µl der Kultur mit 150 µl sterilem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerin-Stocks sind bei -80 °C mehrere Jahre haltbar.

2.2.4.6 Analyse der heterologen Expression in E. coli

Die Zellpellets der zu den unter 2.2.4.5 genannten Zeitpunkten genommen Proben wurden zur Gewinnung der löslichen und unlöslichen Proteine in 100 µl Lysispuffer (s. Anhang) aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden die Zellen dreimal je 30 s mit Ultraschall (30 kHz, 100 W) behandelt, um die Zellwände aufzubrechen. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000 Upm und 4 °C 5 min abzentrifugiert und der Überstand in gleichem Volumen 1x SDS Ladepuffer aufgenommen. Die Zellpellets wurden in 100 µl 2x SDS Ladepuffer suspendiert. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 100°C denaturiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (1976) bestimmt. 10 µl der Proben aus dem Überstand und 5 µl der Proben aus den Pellets wurden auf einem 12%igen Polyacryamidgel für ca. 4 h mit 1x Laufpuffer mit SDS aufgetrennt, die aufgetrennten Proteine geblottet und über einen Antikörper, der an den mit exprimierten N-terminalen 6x *His-Tag* bindet, mittels Immunfärbung, bzw. über einen $IRDye_{700}$ markierten sekundären Antikörper auf dem Odyssey® Infrared Imaging System von LI-COR® sichtbar gemacht.

Dazu wurde das Proteingel zwischen 3 Lagen in Laufpuffer ohne SDS (s. Anhang) getränkten Whatman Papiers in ein Elektroblotgerät (BioRad) blasenfrei gelegt und bei 0,77 A, 20 V 45 min lang auf eine in reinem Methanol equillibrierte PVDF Membran (Invitrogen) geblottet. Nach dem Blocken der Membran (Blockinglösung s. Anhang) mindestens 1 h bis über Nacht wurde die Membran 1x kurz und 1x 5 min in PBS (s. Anhang) gewaschen. Anschließend wurde der 1:2000 in Blockinglösung verdünnte Antikörper (Rockland, Rabbit Anti-His) dazugegeben und 2 h auf einem Transversalschüttler bei RT inkubiert. Danach wurde 1x kurz und 1x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend der Anti-Antikörper-AP 1:2000 (Rockland, Anti-Rabbit-AP) in Blockinglösung verdünnt auf die Membran gegeben. Es wurde erneut 1 h inkubiert, anschließend 1x kurz und 1x 5 min in PBS gewaschen. Daraufhin wurde das frisch angesetzte Substrat (10 ml Substratpuffer mit 0,1% BCIP (10 mg/ml) plus 0,3% NBT (30 mg/ml)) auf die Membran gegeben. Die Membran wurde ca. 5 min in Substratpuffer inkubiert (bis die Banden gut sichtbar waren) und anschließend in $Aqua_{bidest}$ gewaschen. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Whatman Papieren getrocknet und dokumentiert.

Nachweis mit Odyssey® Infrared Imaging System von LI-COR®:

Für den Nachweis des rekombinanten Proteins mit Hilfe des Infrarot Scanners von LI-COR® wurden Gellauf und Blot wie bereits beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Membran (BioTrace, 0,45 µm, PALL) in 1x PBS 5 min gewaschen. Danach wurde die Membran 1 h bei RT mit Odyssey® Blocking Buffer geblockt (0,4 ml Puffer/cm^2 Membran). Der primäre Anti-*His-Tag* Antikörper wurde 1:5000 verdünnt und die Membran 1 h vorsichtig auf dem Wankeltisch inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und 4x 5 min bei RT

in 1x PBS + 0,1% Tween-20 gewaschen. Der Infrarot markierte sekundäre Antikörper ($IRDye_{700}$, Rockland) wurde 1:15000 in Odyssey® Blocking Puffer mit 0,1% Tween-20 und 0,1% SDS (10%ig) verdünnt und die Membran unter Lichtausschluss 60 min bei RT leicht geschüttelt. Danach konnte die Fluoreszenz auf dem Odyssey® Scanner im 700er Kanal bei einer Intensität von 6, einer Scantiefe von 0 mm und 169 µm Auflösung detektiert werden.

Als Größenstandard zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde für den Immunostain ungefärbter PageRuler™ Protein Ladder und für die Detektion über das Odyssey® System der blau vorgefärbte PageRuler™ Protein Ladder von Fermentas verwendet.

Das geblottete Gel wurde zur Visualisierung der Proteine mit Silber gefärbt. Dazu wurde das Gel nach dem Blot für >1 h in Fixierer bei RT auf einem Transversalschüttler inkubiert. Danach wurde 3x 20 min in 50 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Gel exakt 1min in Na-thiosulfatlösung (s. Anhang) gelegt und 3x 20 s mit Aqua bidest. gewaschen. Die Färbung mit Silbernitratlösung (s. Anhang) erfolgte 20 min bei RT auf einem Transversalschüttler. Nach der Färbung wurde erneut 3x 20 s mit $Aqua_{bidest}$ gewaschen und mit Entwickler bis zum Sichtbarwerden der Banden bei RT inkubiert. Danach wurde 2x 2 min mit $Aqua_{bidest}$ gewaschen und 10 min mit Stopplösung die Reaktion beendet. Das Gel wurde in $Aqua_{bidest}$ bis zur Dokumentation aufbewahrt.

Alternativ wurde das Gel mit der Färbelösung Page Blue™ von Fermentas gefärbt. Dies geschah durch 3x 10 min Waschen in $Aqua_{bidest}$, 6o min Inkubation in 20 ml Page Blue™ Protein Staining Solution (Fermentas) unter leichtem Schwenken und anschließender Entfärbung für 5 min in $Aqua_{bidest}$. Danach konnte das Gel auf einem Leuchttisch fotografiert werden.

2.2.4.7 Substratspezifitätstest

Die Herstellung rekombinanten Proteins erfolgte in einer 50 ml Kultur des unter 2.2.4.6 ermittelten Bakterienstamms und der ermittelten Parameter.

Die Lyse der Zellen erfolgte im Anschluss an die Kultur unter nicht denaturierenden Bedingungen. Dazu wurden Bakterienpellets aus 1,5 ml Kultursuspension in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 µg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß für 15 min auf Eis. Nach der Lyse der Zellen wurden die Zelltrümmer pelletiert und die Überstände in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem 5x Bradfordreagenz der Firma Roche und 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg BSA (Biozym) als Standardprotein bei UV_{595nm} bestimmt. Dazu wurden die Proben 1 zu 100 in Lysispuffer verdünnt. Die Verdünnung der Standards erfolgte in Lysispuffer.

Für die Substratspezifitätstests wurde der Proteinextrakt 1 zu 10 in Assaypuffer verdünnt und mit 10 mM Substrat und 0,2 mM Kosubstrat 8 h bei 30 °C inkubiert. Abschließend wurde durch

1 ml Hexan mit 20 mg/l Kampfer extrahiert und über Nacht mit Na_2SO_4 bei -20 °C getrocknet. Anschließend wurden die Extrakte bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.
Es wurde 1 µl der Extrakte in der GC-MS Analyse verwendet und die Identität der Peaks durch Vergleiche der Retentionszeiten mit denen reiner Standardsubstanzen, die Berechnung der Kovats‘ Indices und dem Vergleich der Massenspektren mit der Datenbank (Wiley NBS54K (NIST), LMC) festgestellt.

2.2.5 Expressionsanalyse von Strukturgen- und Kandidatengen-sequenzen

2.2.5.1 RNA-Extraktion und Quantifizierung

Alle für die Extraktion von RNA eingesetzten Plastikwaren und Reaktionsgefäße, sowie die bei der Gelelektrophorese verwendeten Reagenzien wurden vor Benutzung einer DEPC Behandlung (nach Sambrook and Russel, (2001)) unterzogen. Tische, Handschuhe, Pipetten Gelelektrophoresekammern, Gelträger und -kämme wurden mit RNAse Zap (Ambion) behandelt. Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe erfolgte mit dem Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit von Invitek laut Angaben des Herstellers mit folgenden Modifikationen:

- Extraktion aus Blättern, Sepalen und Wurzeln aus 30 mg frischem Pflanzengewebe
- Extraktion aus Petalen und Antheren aus 100 mg frischem Pflanzengewebe
- Aufschluss des Gewebes unter flüssigem Stickstoff in einer Schwingmühle bei einer Frequenz von 20 Schwingungen/ s und 3 min.
- Inkubation mit Lysispuffer RP 30 min bei RT und gelegentlichem Vortexen.

Die nach der Gesamt-RNA-Extraktion in der Probe verbliebene restliche genomische DNA wurde mit dem Kit DNA-Free® von Ambion verdaut. Im Anschluss wurden 5 µl des Überstands auf einem, mit RNAse freien Reagenzien angesetzten, 1%igen Agarosegel (siehe 2.2.8.3) aufgetrennt und die Qualität der RNA festgestellt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte im Photometer in einer 1 zu 30-Verdünnung bei 260 und 280 nm.

2.2.5.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems unter Einsatz von 500 ng Gesamt-RNA nach Anweisung des Herstellers. Dabei wurden nur mit DEPC behandelte Materialien verwendet und wie bei der RNA-Extraktion RNAse-frei gearbeitet.

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde mit 1 µl einer 1 zu 10 Verdünnung der cDNA eine Kontroll-PCR mit Primern für das konstitutiv exprimierte β-Aktin Gen (Primersequenzen s. Anhang, 58 °C Anlagerung, 1 min Elongation) der Rose durchgeführt. Die Bindungsstellen dieses Primerpaares flankieren in genomischer Sequenz ein Intron, so ist es mit Hilfe des Größenvergleichs des PCR-Produktes aus cDNA und aus genomischer DNA möglich, DNA-Kontaminationen in cDNA-Proben zu erkennen. Das PCR-Produkt der cDNA ist ca. 400 bp lang, während das Produkt, welches bei der Amplifikation von genomischer DNA entsteht, 100 bp länger ist. DNA Kontaminationen können am Auftreten von Doppelbanden in den Aktin-PCR-Produkten erkannt werden. Beim Auftreten solcher Kontaminationen wurde mit der Gesamt-RNA ein weiterer DNAseI-Verdau (DNA-Free® von Ambion) durchgeführt und die cDNA-Synthese wiederholt.

Für die exakte Bestimmung der cDNA-Konzentration wurde 1 µl des cDNA Reaktionsansatzes direkt auf die Hellma TrayCell Küvette des Safas Photometers pipettiert und beim Faktor 1 zu 50 der Gehalt an ssDNA gemessen.

Anschließend wurden die cDNA-Reaktionsansätze zur Untersuchung der Expression für Standard-PCRs auf 50 ng/ µl verdünnt.

2.2.5.3 Expressionsanalysen

Für die qualitative Unterscheidung der Expression von verschiedenen Strukturgenen der Duftbiosynthese und für verschiedene ESTs aus der während dieser Arbeit erstellten SSH-Bank wurde eine Standard-PCR (siehe 2.2.6.2) mit 50 ng cDNA als Template und den entsprechenden Primern durchgeführt. Dabei wurde im Temperaturprogramm der PCR die Denaturierungsphase auf 10 s verkürzt, um die cDNA vor Abbau zu schützen.

2.2.6 Kartierung

2.2.6.1 DNA-Extraktion und Quantifizierung

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten DNA Proben wurden mit den Kits DNeasy Plant Mini von Qiagen und Macherey & Nagel DNA Plant Mini mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

DNeasy Plant Mini:

Es wurden 50 mg frisches junges Blattmaterial eingewogen und im Dunkeln 2 Tage gelagert, um die im Material enthaltenen Kohlenhydrate abzubauen. Danach wurde das Material mit zwei Stahlkugeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einer Schwingmühle 3 min bei

einer Frequenz von 30 Schwingungen/ s aufgeschlossen. Anschließend wurde nach Herstellerangaben gearbeitet mit einer zusätzlichen Chloroform-Extraktion nach Puffer AP2.

DNA Plant Mini (Macherey & Nagel):
Es wurden ca. 50 mg frisch geerntetes Material von möglichst jungen Blättern eingewogen und über Nacht bei 37 °C im Dunkeln auf Silikagel getrocknet. Das Material wurde entweder bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C eingefroren, zur Extraktion aufgetaut oder gleich mit zwei Stahlkügelchen in der Schwingmühle bei 30 Schwingungen/ s 3 min aufgeschlossen. Nach Zugabe des Lysispuffers wurde 30 min inkubiert, 5 min abzentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.
Für einzelne Versuche, bzw. für Maxipräparationen wurde die DNA-Extraktion nach Kobayashi et al. (Kobayashi, 1998) durchgeführt. Hierbei wurde 1 g frisches, mit flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinertes Pflanzenmaterial eingesetzt. Zur Quantifizierung von DNA wurde 1 µl DNA-Lösung mit 9 µl 1xTE Puffer versetzt und zusammen mit einer Standardreihe (20, 40, 60, 80, 100 ng) λ-DNA (Invitrogen) auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Intensität der Banden wurde anschließend mit dem Programm GelProAnalyzer (Media Cybernetics) densitometrisch analysiert und mit Hilfe der Standardreihe die DNA-Konzentration bestimmt.

2.2.6.2 Standard-PCR

Zur Amplifikation von PCR-Produkten wurde zuerst mit den Primerpaaren eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimale Anlagerungstemperatur zu ermitteln. Dazu wurde in einem Standardansatz 50 ng genomische DNA als Template verwendet und ein Gradient von plus/minus 5 °C um die theoretisch errechnete Anlagerungstemperatur (X °C) durchgeführt. Für alle PCR Reaktionen wurde steriles bidestilliertes Wasser eingesetzt.
1x 25 µl Standard-PCR Ansatz:

- 16,8 µl $Aqua_{bidest}$
- 2,5 µl 10x Williams-Puffer (s. Anhang)
- 2,5 µl 2 mM dNTPs
- 1 µl ‘forward’ Primer (0,2 µM)
- 1 µl ‘reverse’ Primer (0,2 µM)
- 0,2 µl Biotaq *Taq*-Polymerase (2U)
- 1 µl gDNA (50ng)

Das Standard-PCR Temperaturprogramm bestand aus:

1x	95 °C 5 min	Denaturierung
30x	95 °C 45 s	Denaturierung
	X °C 45 s	Anlagerung
	72 °C 1 min/kb	Elongation

1x 72 °C 10 min Finale Elongation

Anschließend wurde der PCR Ansatz mit 10x Ladepuffer (je nach erwarteter Größe des Produktes Orange G oder Bromphenolblau (s. Anhang)) versetzt und auf ein Standard-Agarosegel (2.2.6.3) aufgetragen.

Um PCR-Produkte auf dem Odyssey® Infrared Imaging System sichtbar zu machen, wurde ähnlich dem M13-SSR Protokoll (s. 2.2.6.5) ein modifiziertes PCR Protokoll nach Schuelke (2000) verwendet.

1x 25 µl M13 PCR Ansatz

- 3 µl $Aqua_{bidest}$.
- 4 µl 10x Williams-Puffer
- 2,5 µl 2 mM dNTPs (0,2 mM)
- 0,5 µl Bioron *Taq*-Polymerase (5 U)
- 2 µl tailed Forward(Reverse) Primer (0,4 µmol)
- 2 µl $M13_{uni}$700(oder 800)-Primer (1 µM)
- 10 µl Reverse(Forward) Primer (2 µM)
- 1 µl DNA (10 ng)

Dabei bestand das PCR Programm aus den gleichen Temperaturschritten wie die Standard-PCR, nur wurden im Anschluss an die normalen Zyklen noch 12 Zyklen mit 52 °C Anlagerungstemperatur gefahren, um den markierten M13 Oligonukleotiden ein Anlagern zu ermöglichen.

2.2.6.3 Standard-Agarosegel

Die Analyse von PCR-Produkten von ca. 50 bp bis 3000 bp Länge wurde auf 1,5 % Agarosegelen (PegGold Universal Agarose von Peqlab) in 1x TAE (s. Anhang) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 6 bis 9 V/cm für 15 bis 45 min je nach Fragmentgröße. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht (312 nm) dokumentiert.

2.2.6.4 SSR-PCR

Ein Reaktionsansatz (10 µl) bestand aus:

- 4 µl Aqua bidest.
- 0,9 µl 10xBioline Puffer
- 0,8 µl 2 mM dNTPs (0,15 µM)
- 0,2 µl 50 mM $MgCl_2$ (1 µM)
- 1 µl ‚forward' Primer (0,2 µM)
- 1 µl ‚reverse' Primer (0,2 µM)
- 0,1 µl Biotaq (1 U)
- 10 ng gDNA

Entweder der ‚forward' oder der ‚reverse' Primer war mit einer Infrarot Markierung versehen, die nach Anregung Licht der Wellenlängen 700 nm oder 800 nm emittiert und somit das PCR-

Produkt auf dem zur Detektion verwendeten LI-COR® Doppellaser-Sequenzsystem 4200 bzw. 4300 sichtbar gemacht werden konnte.

Das SSR-PCR Temperaturprogramm:

1x	95 °C 5 min	Denaturierung
20x	95 °C 45 s	Denaturierung
	X °C 45 s	Anlagerung
	72 °C 1 min	Elongation
1x	72 °C 10 min	Finale Elongation

Nach der PCR wurde zu den Reaktionsansätzen 50-100 µl AFLP Ladepuffer (s. Anhang) dazu gegeben und 0,2 bis 1 µl des Gemisches auf ein denaturierendes 6 % Polyacrylamidgel (s. Anhang) mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetragen.

2.2.6.5 SSR-PCR mit M13-tail

Die in dieser Arbeit neu in die genetischen Karten der Populationen 94/1 und 97/7 gebrachten SSR-Marker aus Oyant et al. (2008) wurden mit M13-tail Strategie untersucht (Schuelke, 2000). Dazu wurde ein Primer am 5‘-Ende mit der komplementären Sequenz von Standard $M13_{uni}$ oder $M13_{rev}$ (s. Anhang) versehen und zum PCR Ansatz 2,5 pmol fluoreszenzmarkierter $M13_{uni}$ oder $M13_{rev}$ Primer gegeben. Im PCR Zyklus wurde zuerst 20 Zyklen eine Anlagerungstemperatur spezifisch für den jeweiligen SSR-Primer eingestellt, danach 7 Zyklen die Anlagerungstemperatur für M13 Primer (52 °C).

1x SSR-M13 PCR Ansatz:

- 5,96 µl Aqua bidest.
- 3,2 µl 10x Williams-Puffer
- 0,6 µl 2 mM dNTPs (0,125 µM)
- 0,12 µl Biotaq (1,2 U)
- 0,12 µl M13-tail ‚forward’/ ‚reverse’ (0,24 µM)
- 0,6 µl ‚reverse’/ ‚forward’ (1,2 µM)
- 0,4 µl $M13_{uni\ 700}$/$M13_{rev\ 800}$ (0,8 µM)
- 1 µl gDNA (10 ng)

SSR-M13 PCR Programm:

1x	95 °C 5 min	Denaturierung
20x	95 °C 30 s	Denaturierung
	X °C 30 s	SSR-Primer spezifische Anlagerungstemperatur
	72 °C 1 min/kb	Elongation
7x	95 °C 30 s	Denaturierung
	52 °C 30 s	Anlagerung M13-Primer
	72 °C 1 min/kb	Elongation
1x	72 °C 10 min	Finale Elongation

Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze 1 zu 4 bis 1 zu 10 mit AFLP-Ladepuffer (s. Anhang) versetzt und 0,2-1 µl auf ein Standard-SSR-Gel (2.2.6.7) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im LI-COR® Doppellaser-Sequenzsystem 4200 bzw. 4300.

2.2.6.6 SSR Multiplex-PCR

Für multiple PCR-Reaktionen wurde der Multiplex-PCR Mastermix von Qiagen verwendet. Dadurch war es möglich, bis zu fünf Primerpaarkombinationen in einer PCR Reaktion zu testen. Es wurde ein Primermix aus allen zu testenden Primerpaaren hergestellt, in welchem die Endkonzentration jedes Primerpaares 5 µM betrug.

1x Multiplex-PCR Ansatz:

- 5 µl 2x Qiagen Mastermix
- 1 µl Primermix (2,5 µM/Oligonukleotid)
- 3 µl Aqua bidest.
- 1 µl gDNA (10 ng/ µl)

Multiplex-PCR Programm:

1x	95 °C 15 min	‚Hotstart' (Denaturierung von Polymerase-Antikörper Komplex)
25x	94 °C 30 s	Denaturierung
	X °C 30 s	Anlagerung
	68 °C 1 min/kb	Elongation
1x	68 °C 10 min	Finale Elongation

Die PCR-Produkte wurden 1 zu 5 mit AFLP-Ladepuffer verdünnt und auf einem Standard-SSR-Gel (2.2.6.7) aufgetrennt.

Zusätzlich wurden auch Multiplex-PCRs mit M13 getailten Primern durchgeführt (max. 4 Primerpaare, max. ein IRD markierter M13-Primer). Dafür wurden dem Primermix 5 µM des IRD markierten Primers hinzugefügt und im PCR-Programm nach der spezifischen Amplifikation des SSR-Fragments noch weitere acht Zyklen mit 52 °C als Anlagerungsschritt für den M13-Primer angefügt.

2.2.6.7 Denaturierendes Polyacrylamidgel (Standard SSR-Gel)

Für die Auftrennung von SSR-Fragmenten auf dem LI-COR® 4200 oder 4300 Doppellaser Sequenziersystem wurden 6 % Polyacrylamidgele mit Harnstoff genutzt. Die Komponenten für ein 18 cm Polyacrylamidgel (0,25 mm) waren 12 ml Ultra Pure SequaGel® XR und 6 ml Ultra Pure SequaGel Complete® Buffer Reagent (National Diagnostics) plus 200 µl 10 % APS. Nach dem Auspolymerisieren (mindestens 2 h bis über Nacht) wurde das Gel beladen und die Fragmente im LI-COR® 4200 oder 4300 DNA-Sequenzsystem (1500 V, 35 mA, 40 W und 40 °C) aufgetrennt. Nach 15 min Vorlaufzeit, in der das Gel gleichmäßig aufgeheizt und equilibriert

wurde, konnten die Reaktionsansätze aufgetragen werden. Nach ca. 30 bis 45 min wurden die SSR Banden sichtbar und das Gel konnte erneut beladen werden.

2.2.6.8 CAPS-Marker

Für einen Teil der bereits bekannten Duftbiosynthesestrukturgene und für einen Teil der in dieser Arbeit sequenzierten ESTs konnten CAPS-Marker (‚Cleaved amplified polymorphic sequence') entwickelt werden. Die Sequenzen wurden dafür mit Hilfe des im Internet frei zugänglichen Programms *Restriction Mapper* V3 (www.restrictionmapper.org) auf Restriktionsschnittstellen untersucht. Die DNA der Elterngenotypen der Populationen 94/1 und 97/7 wurden zunächst einem Test auf Polymorphie unterzogen. Dabei wurde eine PCR mit den jeweiligen Primern in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Als Template dienten je 100 ng DNA. Nach der PCR wurden 5 µl des PCR-Produkts auf ein 1 % Agarosegel (siehe 2.2.8.3.) aufgetragen. So wurde der Erfolg der PCR überprüft. Der Rest des PCR-Produktes wurde in 10 µl Aliquots aufgeteilt und mit je 0,5 µl (5 U) von vier verschiedenen, in der Sequenz theoretisch schneidenden, Restriktionsenzymen (REs) versetzt. Da der in der PCR verwendete Williams-Puffer kein Natriumchlorid enthält, musste bei einigen der REs 0,05 bis 0,1 µM NaCl zugegeben werden. Der Restriktionsansatz wurde dann 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das verdaute PCR-Produkt auf 2,5-3 % Agarose (SeaKem® Agarose, Biozym) bei 3-6 V/cm aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

2.2.6.9 SSCP-Marker

Mit Hilfe der SSCP Technik (‚Single strand conformational polymorphism', (Orita, 1998) lassen sich in DNA-Fragmenten Einzelbasenaustausche nachweisen. Durch Konformations-unterschiede in der DNA bilden sich bei Denaturierung und darauf folgender Renaturierung unterschiedliche Einzelstrangsekundärstrukturen aus, die in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel unterschiedlich schnell durch die Matrix wandern und durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden können. Dabei wird nicht nur nach Größe der Fragmente aufgetrennt, sondern auch nach Konformation.

Zur Durchführung einer SSCP-Analyse wurde mit den interessierenden Primern eine Standard-PCR durchgeführt. War das erwartete PCR-Produkt länger als 500 bp, wurde anschließend ein Restriktionsverdau vorgenommen. Dabei wurden zuerst 5 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosekontrollgel aufgetragen, um den Erfolg der PCR zu testen. Danach wurde zu den restlichen 20 µl des PCR-Produktes bei Bedarf 0,05 bis 0,1 µM NaCl und 1 µl Restriktionsenzym (10U) gegeben, 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C verdaut. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz mit 2x SSCP-Ladepuffer (s. Anhang) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz sofort auf Eis überführt und 5 min inkubiert. Von dem renaturierten PCR-Produkt bzw. verdauten und renaturierten PCR-Produkt mit Ladepuffer wurden 5 µl auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (6 %, MDE-Gellösung) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C und 6 V/cm gefahren. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel auf der hinteren Glasplatte gefärbt, daher wurden die vordere Glasplatte des Satzes mit GelSave^{TM} (Applichem) und die hintere mit Bindesilan (s. Anhang) behandelt. Dies gewährleistete beim späteren Ablösen der Glasplatten zur Färbung des Gels, dass das Gel auf der hinteren Platte haften blieb und sich die vordere Glasplatte einwandfrei ablösen ließ. Nachdem die Xylenxyanol-Front des Ladepuffers aus dem Gel ausgelaufen war, wurde die vordere Glasplatte entfernt und das Gel auf der hinteren Glasplatte solange in Fixierlösung (7,5 % v/v Essigsäure) geschwenkt, bis die Bromphenolblau-Front entfärbt war. Die Fixierlösung wurde aufgefangen, um später als Stopplösung zu dienen. Danach wurde das Gel zweimal 5 min in $Aqua_{dest}$ gewaschen und anschließend exakt 45 min in Silberfärbelösung (s. Anhang) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel einmal kurz mit $Aqua_{dest}$ gespült und anschließend ca. 3 min in der Hälfte der Entwicklungslösung (s. Anhang) inkubiert, bis sich die Gelränder bräunlich verfärbten. Dann wurde die erste Hälfte der Entwicklungslösung verworfen und die zweite Hälfte auf das Gel gegeben. Unter leichtem Schwenken wurde das Gel danach solange inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren. Anschließend wurde die Reaktion mit der Fixierlösung gestoppt, in $Aqua_{dest}$ gewaschen, getrocknet und dokumentiert.

2.2.6.10 Verifizierung von PCR-Produkten

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten PCR-Produkte der bereits bekannten Strukturgene der Rosenduftbiosynthese wurden mit Hilfe der Klonierung in *E. coli* und der Sequenzierung der Inserts verifiziert.

Um Sequenzierungsfehler auszuschließen bzw. zu verringern, wurde die PCR zur Verifizierung der PCR-Produkte mit einer *proof reading* Polymerase durchgeführt.

2.2.6.10.1 Proof reading PCR

Alle *proof reading* Reaktionen wurden mit der PrimeSTAR® Polymerase der Firma TaKaRa nach den Angaben des Herstellers und der Verwendung der jeweils Primerpaar spezifischen Anlagerungstemperatur durchgeführt. Die Anlagerungszeit betrug dabei 10 s mit einer Elongationszeit von 1 min pro kb der erwarteten Produktlänge.

2.2.6.10.2 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung/ A-tailing

Im Anschluss an die *proof reading* PCR wurde die Auftrennung des PCR-Produktes auf Agarose (s. 2.2.8.3) und die Aufreinigung des Fragments aus dem Gel mit dem Min Elute Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

1 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurde 1:10 mit 1xTE Puffer versetzt und mit 1 µl Orange Loading Dye (s. Anhang) auf einem 1 % Agarosegel zusammen mit 5, 10, 15 und 20 ng eines λ-Standards aufgetrennt. Anschließend wurde die Bandenintensität mit dem Programm GelproAnalyzer (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) verglichen und so die Konzentration bestimmt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit 1 µl Williams-Puffer (10x), 5 U Taq-Polymerase und 1 µM dATP versetzt und 20 min bei 72 °C inkubiert. Dies gewährleistete den benötigten A-Überhang an den Enden des Fragments, der für eine erfolgreiche Klonierung in den Vektor pGEM-T easy notwendig ist.

2.2.6.10.3 Klonierung von proof reading PCR-Produkten in pGEM-T easy

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Vektor pGEM-T easy und dem dazugehörigen Kit der Firma Promega nach Angaben des Herstellers mit einem halben Reaktionsansatz. Bei der Ligation wurde ein Vektor zu Insert Verhältnis von 2:1 gewählt.

Der Ansatz wurde mindestens 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1 µl 10 mg/ µl Hefe tRNA gemischt und mit 10 Volumen $EtOH_{abs}$ und 1/10 Volumen 3 M NaAc bei -20 °C 1 h lang gefällt, zentrifugiert (14.000 Upm, 4°C) und anschließend zweimal mit 100 µl 70 % EtOH gewaschen. Der Ansatz wurde anschließend in 10 µl $Aqua_{dest}$ gelöst und direkt für die Transformation verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Die Präparation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen, sowie die Transformation dieser Zellen mit pGEM-T easy erfolgte wie in Sambrook & Russel (2001) vorgegeben.

2.2.6.10.4 Insert PCR zur Überprüfung des Transformationserfolges

Die rekombinanten Bakterien wurden in 200 µl FB-Medium (s. Anhang) plus Ampicillin (50 mg/l) gepickt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Insert PCR entweder mit M13-Primern, die im Vektor binden, oder mit den für das Insert spezifischen Primern durchgeführt. Dabei wurden als Template mit einem sterilen Zahnstocher oder mit einem 96er Replikationsstempel Bakterien aus den Kulturen in den PCR Ansatz übertragen.

1x Insert PCR Ansatz:

- 13,7 µl Aqua bidest.
- 2 µl 10x Williams-Puffer
- 2 µl 2 mM dNTPs (200 µM)
- 1 µl ‚forward' Primer (0,2 µM)
- 1 µl ‚reverse' Primer (0,2 µM)
- 0,3 µl Firepol *Taq* Polymerase (1,5 U)

Insert PCR Programm:

1x	95 °C 5 min	Denaturierung
30x	94 °C 45 s	Denaturierung
	X °C 45 s	Anlagerung
	72 °C 1 min/kb Insert	Elongation
1x	72 °C 10 min	Finale Elongation

Das PCR-Produkt wurde mit 10x Ladepuffer (OrangeG oder Bromphenolblau s. Anhang) versetzt und auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.6.10.5 Isolierung von Plasmid DNA und Sequenzierung der Inserts

Zur Verifizierung der PCR-Produkte wurden die Plasmid-DNAs zur Sequenzierung eingeschickt, die in der Insert-PCR eine Bande in der erwarteten Länge aufwies. Dazu wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des Plasmid Mini Spin Kits von Macherey & Nagel isoliert. Es wurden 5 ml LB-Medium plus Ampicillin (50 mg/l) mit dem interessierenden Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Isolierung der pDNA erfolgte nach Angabe des Kit-Herstellers.
Die Sequenzierung der Klone erfolgte durch MWG Biotech.

2.2.6.11 Segregationsanalyse

Die Analyse der genetischen Marker erfolgte nach den für diploide Populationen möglichen Spaltungsmustern. Dabei wurden Bandenmuster als dominant ausgewertet, wenn eine klare Zuordnung des Allelzustands aufgrund der Bandenmuster nicht möglich, die Spaltung des Markers aber signifikant im χ^2-Test war.
<abxaa> für heterozygot im weiblichen Elter; 1 zu 1 Spaltung
<aaxab> für heterozygot im Pollendonor; 1 zu 1 Spaltung
<abxab> für heterozygot in beiden Eltern; 3 zu 1 Spaltung
Bandenmuster, die eine klare Zuordnung des Allels zu den einzelnen Eltern ermöglichten wurden kodominant ausgewertet. Durch die Herkunft der Populationen (Kreuzung von

Halbgeschwistern nach einer freien Abblüte des Elters) konnten maximal vier verschiedene Allele eines Locus vorhanden sein.

<abxab> für heterozygot mit zwei Allelen; 1 zu 2 zu 1 Spaltung

<abxac> für heterozygot mit drei Allelen; 1 zu 1 zu1 zu 1 Spaltung

<aaxbc> für heterozygot mit drei Allelen; 1 zu 1 Spaltung

<abxcd> für heterozygot mit vier Allelen; 1 zu 1 zu1 zu 1 Spaltung

Das Auftreten von sogenannten Null-Allelen wurde berücksichtigt. Wenn bei der Durchführung des χ^2-Tests für einen kodominanten Marker die Teststatistik den kritischen Wert überstieg, wurde das Nullallel benannt und in die kodominante Auswertung miteinbezogen.

2.2.6.12 Auswertung der Gaschromatogramme

Die Detektionsschwelle des Systems wurde auf 0,01 mg/l festgelegt. Daraufhin wurden die Merkmale „Vorkommen von Geranylacetat, Nerylacetat und Nerol“ dominant ausgewertet. Wenn der absolute detektierte Gehalt der Substanz über 0,01 mg/l lag, wurde das „Vorkommen“ der Substanz positiv gewertet. Unter einem Gehalt von 0,01 mg/l negativ. Es erfolgte eine Kodierung der Merkmale in „ab“ für Substanz vorhanden und „aa“ für Substanz nicht vorhanden. Die Merkmale „Geraniolgehalt“, „β-Citronellolgehalt“, „2-Phenylethanolgehalt" und „Nerylacetatgehalt“ wurden mit ihrem absoluten Gehalt, bzw. nach einer log-Transformation (s. 2.2.7) quantitativ ausgewertet.

2.2.6.13 Berechnung der genetischen Kopplungskarten

Für die Berechnung der genetischen Kopplungskarten wurde JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) verwendet. Dabei wurden zur Erstellung der Gruppierungen nur Marker herangezogen, für die bei über 80 % der Individuen in den jeweiligen Kartierungspopulationen Spaltungsdaten vorhanden waren. Es wurde dabei für jede der untersuchten Populationen zuerst eine für die jeweiligen Eltern unabhängige Karte erstellt. Für die Gruppierung der Marker wurde ein Signifikanzniveau zwischen LOD 6 und 14 gewählt. Die Kopplungsgruppen wurden anschließend mit Hilfe der Kartierungsfunktion von Kosambi (Kosambi, 1944) erstellt. Die in der Funktion verwendete Methode ist die Regressionskartierung (Stam, 1993). Dabei wurden für die Berechnung der Karten eine Rekombinationsfrequenz von 0,3, *Jump* = 5 und ein LOD von 2 gewählt. Es wurden zur Erstellung der integrierten Karten der jeweiligen Eltern der 94/1 und 97/7 die genetischen Karten nach der dritten Runde in JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) verwendet. Die Regressionskartierung ist eine Prozedur, bei der nacheinander einzeln alle Marker einmal hinsichtlich ihrer besten Position (‚goodness-of-fit‘) auf der genetischen Karte

platziert werden. Wenn alle Marker einmal betrachtet wurden, ist die sogenannte „Erste Runde“ beendet. Wenn an der besten Position des Markers der ‚goodness-of-fit‘ zu stark abnimmt (*jump* > 5) oder wenn es aufgrund dieses Locus zu negativen Distanzen kommen würde, wird der Locus wieder von der Karte entfernt. In der „zweiten Runde“ wird die Berechnung wiederholt, und es kann aufgrund der größeren Anzahl paarweiser Daten zur weiteren Platzierung von vorher von der Karte entfernten Markern kommen. Wenn nach der zweiten Runde noch nicht alle Marker platziert wurden, ist es möglich optional eine „dritte Runde“ zu rechnen. In dieser werden alle Loci, die vorher von der Karte entfernt wurden, unabhängig von ihrer Abnahme der ‚goodness-of-fit‘ und eventuellen, sich darstellenden negativen Distanzen auf der Karte untergebracht. Dabei ist die Intention der dritten Runde, eine generelle Idee darüber zu bekommen, wo sich die weniger gut gekoppelten Marker auf der genetischen Karte befinden würden. Man erreicht durch dieses Verfahren keine abgesicherte Reihenfolge der Marker. Aufgrund dessen wurde für die QTL-Kartierung die am meisten abgesicherte Version der genetischen Karten aus der ersten Kartierungsrunde der Eltern der 94/1 genutzt. Bei der Konstruktion der Karten wurden Marker, die die Berechnung der Kopplungsphasen störten, aus der Kartierung ausgeschlossen.

Die Identifizierung der Kopplungsgruppen erfolgte über SSR- und morphologische Marker nach Yan et al. (2005a). Unter Zuhilfenahme dieser Ankermarker wurde für die untersuchten Populationen eine Konsensuskarte erstellt. Für die Integration der Karten wurde die Anordnung der Marker auf den genetischen Karten nach der dritten Runde gewählt, um die Positionierung von allen gewählten Ankermarkern über die Populationen hinweg zu gewährleisten.

2.2.7 QTL-Kartierung

Für die Berechnung von chromosomalen Regionen, die auf die quantitative Ausprägung eines Merkmals einen Einfluss haben, wurde das Programm MapQTL 6 (Van Ooijen, 2009) verwendet. Mit den normalisierten, absoluten und gemittelten Gehalten der Duftstoffe und Prüfung der Werte auf Normalverteilung in WinStat mit dem Kolmogorov-Smirnov Test eine QTL Berechnung durchgeführt. Für nicht normalverteilte Daten wurde mit der Boxcox Funktion in WinStat eine Y=ln(0) Transformation durchgeführt (Yang et al., 2006). Anschließend wurden die transformierten Daten noch einmal auf Normalverteilung getestet. Die normalverteilten Daten wurden zusammen mit den Karten der ersten Runde aus JoinMap 4 und den Genotypdaten, die der Berechnung der genetischen Karten zugrunde lagen, in MapQTL 6 eingegeben. Zuerst wurde dabei eine Berechnung des LOD Schwellenwertes zur Bestimmung des Signifikanzlevels durchgeführt. Dabei wurde der in MapQTL 6 zur Verfügung stehende

Permutationstest nach Churchill und Doerge (1994) mit 1000 Permutationen genutzt. Es wurden im *Interval Mapping* nur Intervalle als QTL gewertet, die wenigstens über dem chromosomweiten geschätzten Schwellenwert lagen. Als Signifikanzniveau wurde der genomweite Schwellenwert eingesetzt. Anschließend wurde mit MapQTL 6 ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Dabei wurde eine Bonferoni-Adjustierung des chromosomalen Signifikanzlevels vorgenommen, also ein $\alpha \leq 0{,}05/7$ angewendet. Das Quantil aus der χ^2-Verteilung wurde in [R] berechnet ([qchisq(1-(α=0,05/7), df]). Bei dominant ausgewerteten Loci (df=1) liegt der Wert bei K≥7,24. Bei kodominant ausgewerteten Markern, also mit drei spaltenden Allelen (df=2) bei K≥9,88 und bei vier unterschiedlichen Allelen an einem Locus (df=3) bei K≥12,07. Es folgte eine Intervallkartierung (Lander and Botstein, 1989) in MapQTL 6, bei dem beide in der Software zur Verfügung stehende Algorithmen getestet wurden.

Der Einfluss von chromosomalen Regionen auf die quantitative Ausprägung des Gehalts von Duftstoffen wurde nur dann als signifikant erklärt, wenn in dem Intervall die Signifikanzschwelle aus den vorher durchgeführten Permutationstest überschritten wurde und in dem betrachteten Intervall Marker lagen, die nach Bonferoni-Adjustierung des K-Werts für Kruskal-Wallis signifikante Werte zeigten. Dabei wurden als Haupt-QTL die Regionen bezeichnet, in denen die LOD-Kurve die genomweite Signifikanzschwelle aus dem Permutationstest überschritt, als Neben-QTL die Bereiche in denen die LOD-Kurve nur chromosomweite Signifikanz zeigte. Der jeweilige Einfluss der QTL auf die Ausprägung des Merkmals kann nur für die Marker geschätzt werden, die sich im Bereich der signifikanten QTL-Region befinden. Dabei wurde ein Mittelwertsvergleich der quantitativen Werte im jeweiligen Punkt der Karte durchgeführt.

2.2.8 Darstellung der genetischen Karten

Die grafische Darstellung der genetischen Karten erfolgte mit der Software MapChart Version 2.2 (http://www.biometris.wur.nl/UK/Software/MapChart/). Dabei wurden der besseren Übersicht halber Loci, an denen zwei oder mehrere Marker lagen, nur durch einen der Marker abgebildet und bei der Darstellung der integrierten Karte AFLP-Marker ausgeblendet.

2.2.9 Darstellung der Grafiken

Die Darstellung der Grafiken erfolgte soweit nicht anders angegeben mit dem Grafik Paket der Statistik Software [R] (R Development Core Team, 2008) .

3. Ergebnisse

3.1 Duftanalysen

Die Duftanalysen erfolgten für die Elternpflanzen 93/1-117 und -119, sowie für 88 der 99 Individuen der Population 94/1. Die Genotypen 94/1-13, -34, -40, -42, -44, -48, -61, -65, -80, -81 waren nicht mehr vorhanden. Der Genotyp 94/1-103 bildete während der gesamten Beprobungszeit nur sporadisch Blüten, deren Gewicht zur Beprobung nicht ausreichte. Für jeden Genotyp wurden drei bis sieben unabhängige Proben analysiert.

Tabelle 3. 1 Substanzen die in den Duftextrakten aus den Petalen der Elterngenotypen 93/1-117, -119 und der Population 94/1 nachgewiesen werden konnten.

Substanz	Stoffklasse	Duft (nach www. flavornet.org)	Identifizierung	Konzentration (mg/l)
***trans*-3-Hexenol**	Fettsäurederivat	Moos	GC-MS, Kovats' Index	0 bis 0,3
***cis*-3-Hexenol**	Fettsäurederivat	Grün	GC-MS, Standard RT	0 bis 0,4
Neral	Terpenoid	Citrus	Kovats' Index	0 bis 0,4
Nerylacetat	Terpenolester	Citrus	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0 bis 1
Geranylacetat	Terpenolester	fruchtig	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0 bis 10
β-Citronellol	Terpenol	Rose	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0,12 bis 23
Nerol	Terpenol	Süß	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0 bis 2,2
α-Ionon	Keton	Veilchen	Kovats' Index	0 bis 1,2
β-Damaszenon	Keton	Apfel	Kovats' Index	0 bis 0,05
2-Phenylethylacetat	Phenylpropanoid-ester	Rose, Honig, Tabak	Kovats' Index	0 bis 1,1
β-Ionon	Keton	Rose	Kovats' Index	0 bis 1
Geraniol	Terpenol	Rose, Geranium	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0,09 bis 33
Benzylalkohol	Phenylpropanoid	Süß, blumig	Kovats' Index	0 bis 0,81
Nonadecan	Fettsäurederivat	Alkan	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	3,5 bis 57
2-Phenylethanol	Phenylpropanoid	Honig, Rose, Flieder	GC-MS, Standard RT, Kovats' Index	0 bis 56
Weitere nicht differenzierbare langkettige Alkane	Fettsäurederivate		Über GC-MS nicht unterscheidbar	

Von den erhaltenen Duftextrakten wurde 1 µl zur Analyse verwendet. Zusätzlich wurden die Duftextrakte der Eltern zur Identifizierung der flüchtigen Stoffe massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse der Duftextrakte der Nachkommen erfolgte im Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor. Eine Substanz wurde als im Duftextrakt aus den Petalen als vorhanden bezeichnet, wenn der Mittelwert über alle Wiederholungen der Messungen größer als Null war. Die Detektionsschwelle war 0,01 mg/l. Es konnten die in Tabelle 3.1 aufgeführten Substanzen in den Duftextrakten der Population 94/1 nachgewiesen werden.

Neun der in der GC-FID vorkommenden Peaks (Nerylacetat, Geranylacetat, Nerol, β-Citronellol, Geraniol und 2-Phenylethanol) konnten mittels GC-MS und über den Vergleich der Massenspektren, sowie durch Koelution mit Standardsubstanzen und Berechnung der Kovats‘ Indices identifiziert werden. Es erschienen in den Chromatogrammen der Nachkommen jedoch auch Peaks, die nicht in den über GC-MS analysierten Extrakten der Eltern vorkamen. Zur Identifikation dieser Peaks wurde anhand einer Alkanreihe der Kovats‘ Index der Peaks bestimmt. Durch Vergleich des Index mit der Liste der Indices auf www.flavornet.org wurden die Substanzen vorläufig identifiziert. Die Substanzen (siehe Tabelle 3.1) gehören zu den klassischen Bestandteilen des Rosendufts Geraniol, Nerol, β- Citronellol, Phenylethanol, sowie β-Ionon und β-Damaszenon (Flament et al., 1993).

3.1.1 Relative Gehalte der verschiedenen Duftsubstanzen

Die Duftextrakte aus den Petalen der Elterngenotypen unterschieden sich deutlich in der Zusammensetzung. Insgesamt wurde die Beprobung der Elterngenotypen je sieben Mal wiederholt. Sechs der neun über GC-MS identifizierten Bestandteile konnten wiederholbar nachgewiesen werden.

In jeder dieser Messungen war 2-Phenylethanol (Peak bei 34,57 min, Abbildung 3.1) im Extrakt des Genotyps 93/1-119 nicht vorhanden, im Extrakt aus Genotyp 93/1-117 hatte es großen Anteil der relativen Peakfläche. Auch Geranylacetat (Peak bei 29,44 min, Abbildung 3.1) wurde nur im Extrakt aus Genotyp 93/1-117 nachgewiesen, in den Messungen der Extrakte aus Genotyp 93/1-119 fehlte der Peak für diese Substanz. In den Extrakten aus den Petalen des Genotyps 93/1-119 konnte β-Citronellol (Peak bei 29,87 min Abbildung 3.1) nachgewiesen werden, in den Extrakten aus Petalen des Genotyps 93/1-117 jedoch nicht. In Abbildung 3.2 werden die relativen Anteile der Hauptbestandteile der Duftextrakte dargestellt. Hier sind die eben beschriebenen Unterschiede deutlich zu erkennen.

Da sich die Elterngenotypen in der Zusammensetzung des Dufts so deutlich unterschieden, wurde überprüft, ob sich diese Unterschiede als spaltende Merkmale in der Nachkommenschaft abbilden.

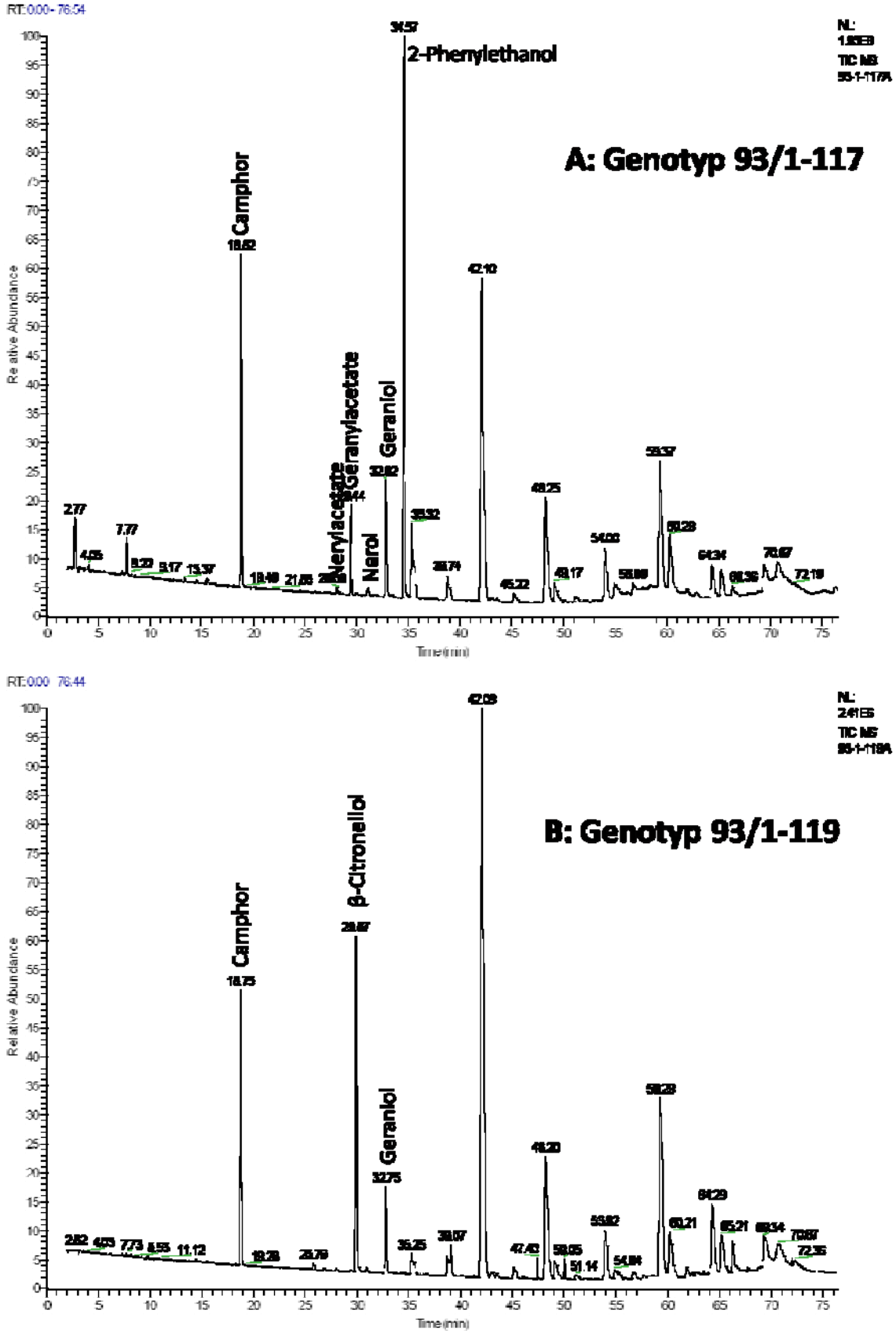


Abbildung 3. 1: Chromatogramme aus GC-MS Analysen exemplarisch von zwei Proben aus Genotyp 93/1-117 (A) und Genotyp 93/1-119 (B), den Eltern der Population 94/1.

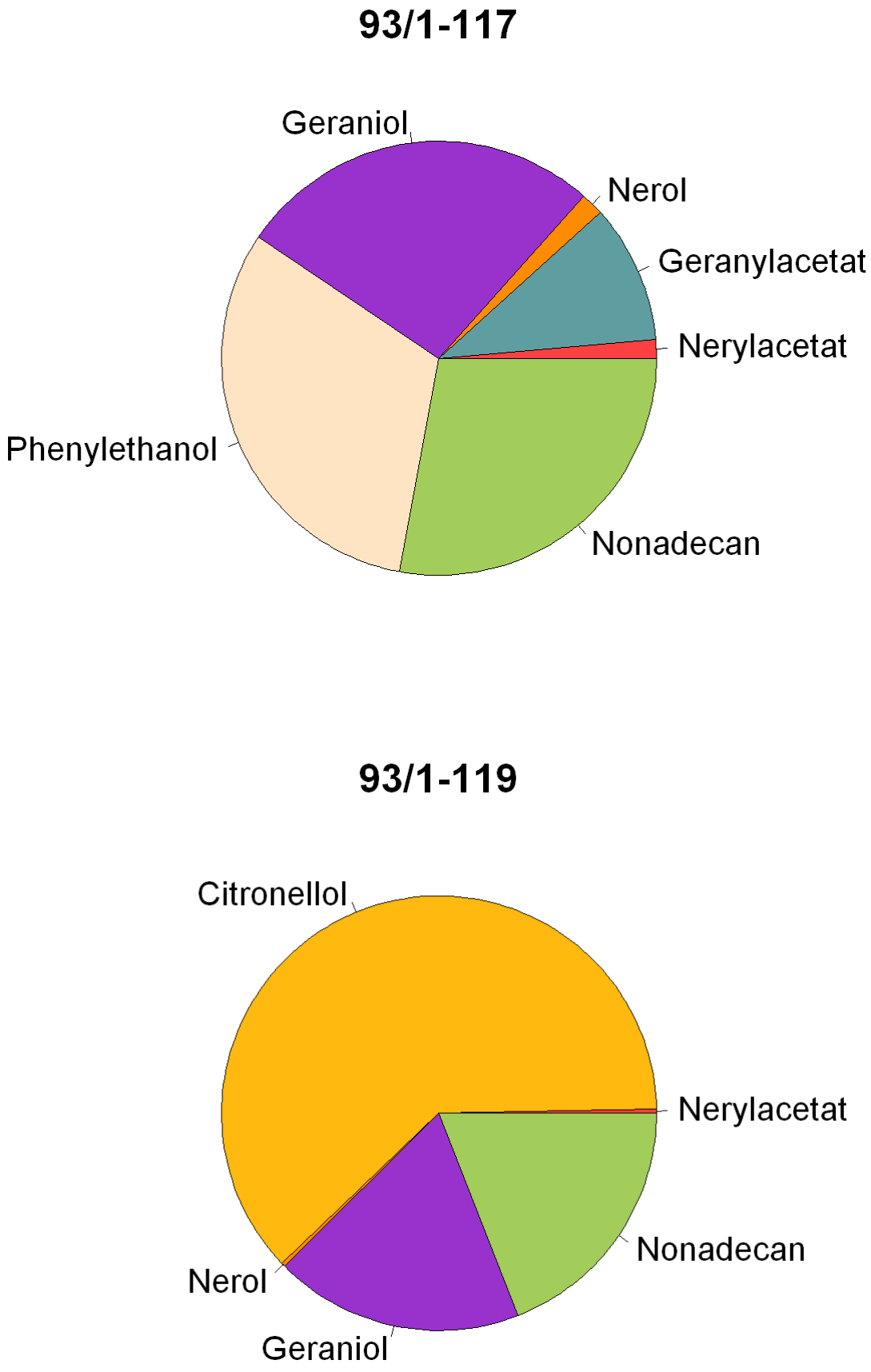


Abbildung 3. 2: Relative Anteile der Gehalte der verschiedenen identifizierten Duftstoffe in den Extrakten aus den Petalen der Elternpflanzen der Population 94/1. In den Extrakten aus Genotyp 93/1-117 war kein β-Citronellol nachzuweisen. In den Extrakten aus den Petalen der 93/1-119 konnte kein Geranylacetat und kein 2-Phenylethanol nachgewiesen werden.

3.1.2 Vererbung der Duftsubstanzen

Die einzelnen Genotypen der Nachkommenschaft 94/1 unterschieden sich deutlich im Vorkommen und in der Menge der Duftsubstanzen. In der Abbildung 3.3 sind die Häufigkeitsverteilungen für die Substanzen, die über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen der reinen Standards und der Berechnung der Kovats‘ Indices zugeordnet werden konnten, dargestellt.

Alle Stoffe, die in den Eltern der Population identifiziert werden konnten, sind auch in den Extrakten der Nachkommen nachgewiesen worden. Zusätzlich wurden sechs Stoffe identifiziert, die in den Extrakten der Eltern der Population 94/1 nicht nachgewiesen werden konnten. Dies sind Neral (A), α-Ionon (F), β-Damaszenon(G), Phenylethylacetat(H), β-Ionon(I) und Benzylalkohol(K). Diese Substanzen hatten eine durchschnittliche Konzentration von unter 1 mg/l.

Bei der Betrachtung der Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Duftsubstanzen (Abbildung 3.3) wird deutlich, dass es Substanzen gab, die nur in einer geringen Zahl der Nachkommen nachweisbar waren; z.B. β-Damaszenon (G) oder β-Ionon (I), die nur in ca. 30 Nachkommen gefunden wurden. B-Citronellol (D), Geraniol (J) und 2-Phenylethanol (L) konnten jedoch in allen Duftextrakten annähernd normalverteilt nachgewiesen werden. Die absoluten Gehalte der sicher identifizierten Duftsubstanzen wurden über die Messungen der Einzelextrakte errechnet, gemittelt und mit Hilfe von Boxplots grafisch dargestellt (siehe Abbildung 3.4). Zusätzlich wird bei dieser Darstellung die Verteilungsform der Duftsubstanzen in der Nachkommenschaft noch einmal deutlich.

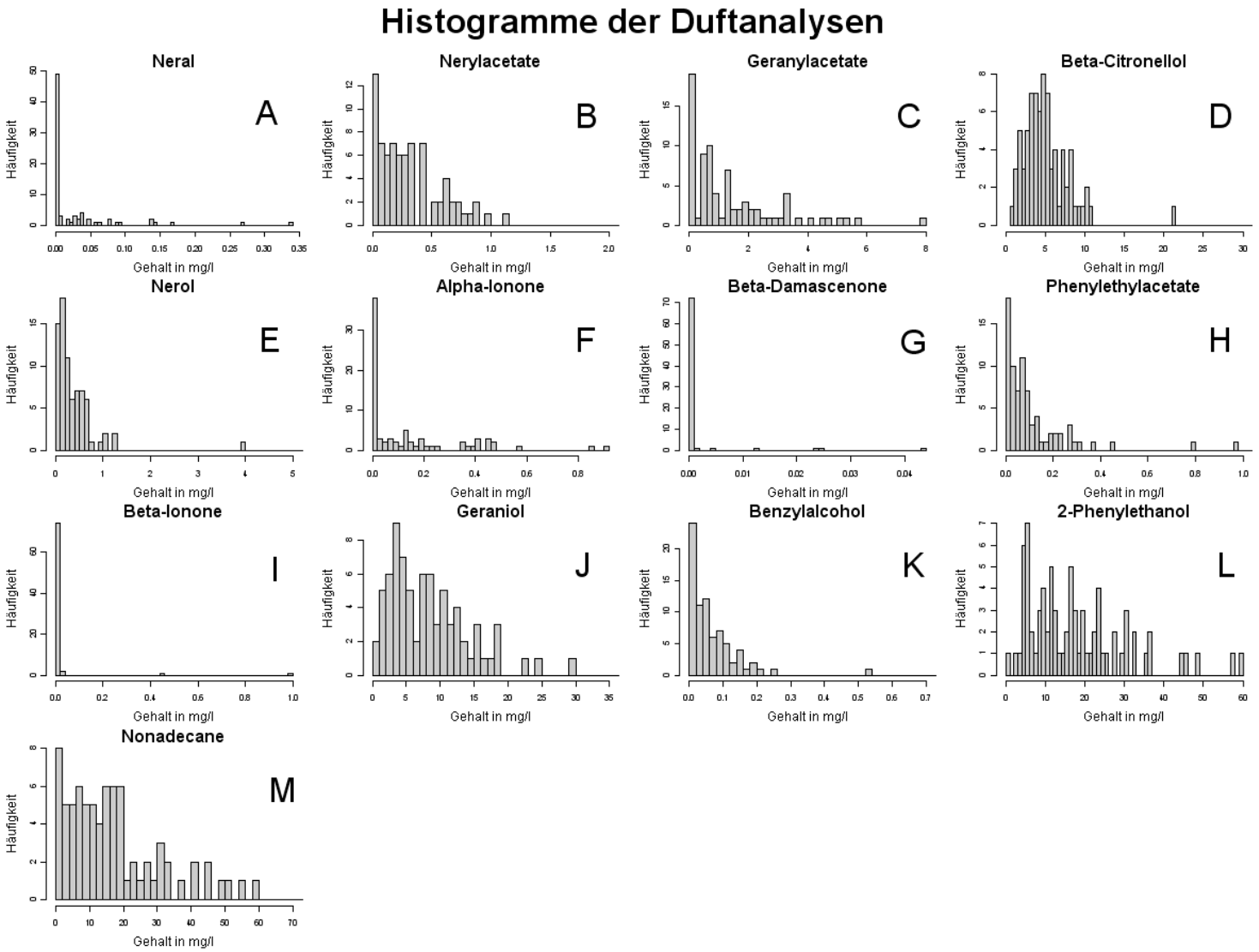


Abbildung 3. 3: Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Duftsubstanzen (A bis M) in den Extrakten aus Petalen der Population 94/1, geordnet nach Retentionszeit, die Verteilungsform weist bei Nerol, Nerylacetat und Geranylacetat auf eine mono- oder oligogene Vererbung hin. Bei Geraniol, β-Citronellol und 2-Phenylethanol auf eine quantitative Vererbung

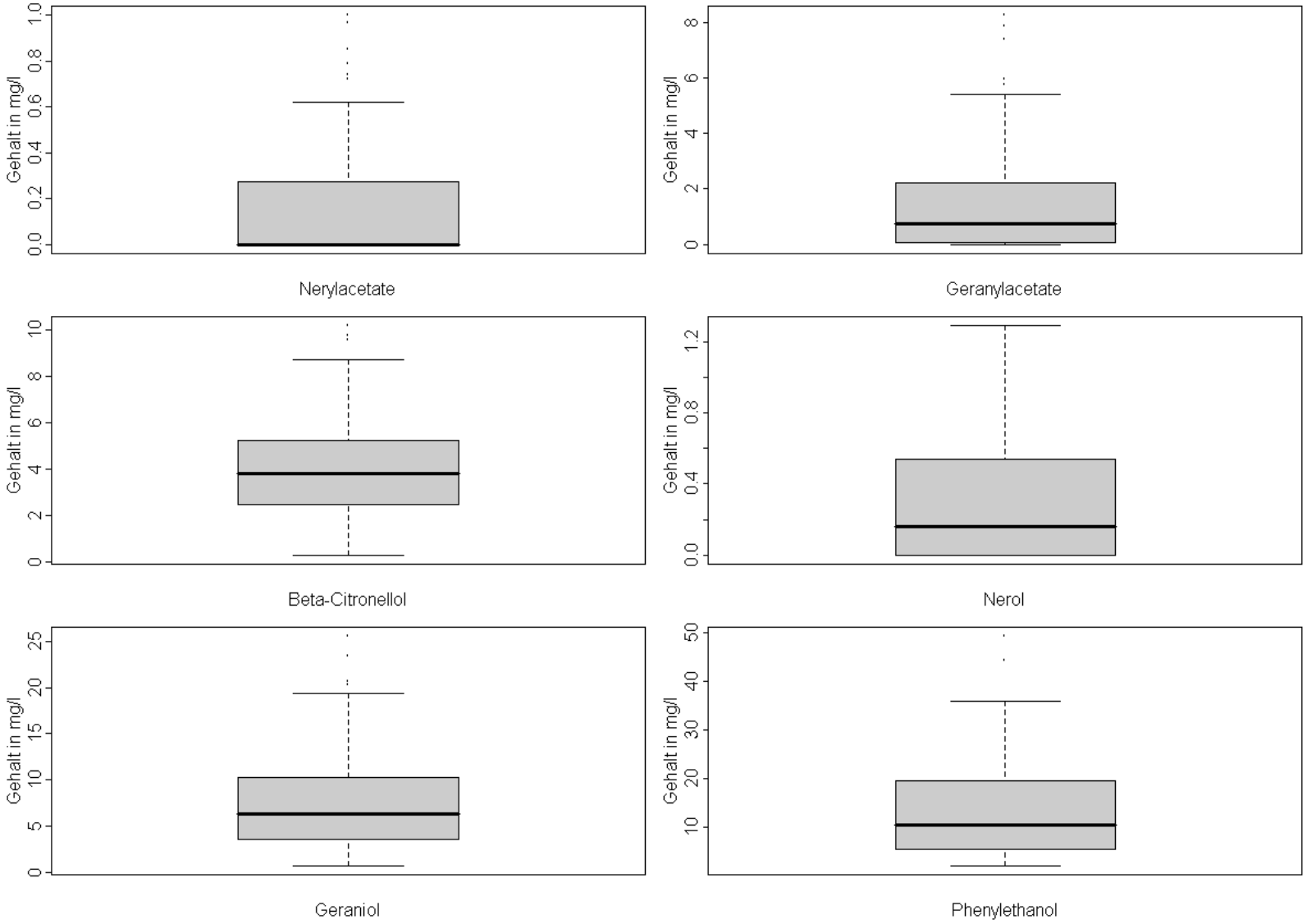


Abbildung 3. 4: Boxplots der gemittelten absoluten Duftstoffgehalte über die Extrakte aus Petalen der Population 94/1 für die sechs Hauptduftkomponenten

Die Spaltungsmuster von Nerylacetat, Geranylacetat und Nerol deuteten auf eine monogene oder oligogene Vererbung hin, daher wurde überprüft, ob die beobachteten mit den erwarteten Spaltungsmustern des Vorkommens der Substanzen übereinstimmen (Tabelle 3.2).

Tabelle 3. 2: Segregrationsmuster der Hauptduftkomponenten, Nachweisgrenze des Systems bei 0,01 mg/l

Substanz	Aufspaltung	Hypothese	χ^2	p-Wert*	Vorkommen in den Eltern (mg/l)	
					93/1-117	93/1-119
Nerylacetat	47 zu 41	3 zu 1	21,88	≤0,0001	+	+
Geranylacetat	68 zu 20	1 zu 1	26,18	≤0,0001	+	-
β-Citronellol	88 zu 0	quantitativ	-	-	-	+
Nerol	56 zu 32	3 zu 1	3,02	0,15	+	+
Geraniol	88 zu 0	quantitativ	-	-	+	+
2-Phenylethanol	88 zu 0	quantitativ	-	-	+	-

*p-Werte berechnet mit http://statpages.org/pdfs.html

Rein qualitativ betrachtet spaltete das Vorkommen von Nerylacetat in den Duftextrakten der einzelnen Genotypen im Verhältnis 1 zu 1, sollte phänotypisch als Einzellocus aber im Verhältnis 3 zu 1 vererbt werden. Der Peak für Geranylacetat zeigte ein Vererbungsmuster von 3 zu 1, sollte jedoch, wenn man einen Einzellocus voraussetzen würde, in der Hälfte der Duftextrakte der Nachkommen zu finden sein. Der Peak für Nerol sollte als Einzellocus <abxab> vererbt werden, zeigte auch eine 3 zu 1 Spaltung, doch nur zu einem geringen Signifikanzniveau. Die Merkmale „Vorkommen von β-Citronellol und 2-Phenylethanol“ zeigten, obwohl sie jeweils nur in einem Elter nachzuweisen waren (siehe Abbildung 3.2 und 3.3), eine quantitative Aufspaltung.

Die Gehalte der Einzelsubstanzen über die Messungen zeigten starke Varianzen sowohl über die gesamten Messungen (siehe Tabelle 3.3) als auch über die Messungen der Einzelpflanzen.

Tabelle 3. 3: Gemittelte Gehalte der Duftsubstanzen, dargestellt in mg/l, Standardabweichungen in Klammern

Duftsubstanz	Gehalt 93/1-117	Gehalt 93/1-119	Mittel 94/1
Nerylacetat	0,67 (0,47)	0,1 (0,24)	0,16 (0,13)
Geranylacetat	5,09 (1,78)	0	1,58 (0,64)
β-Citronellol	0	20,25 (12,83)	4,15 (1,52)
Nerol	0,83 (0,14)	0,1 (0,23)	0,35 (0,25)
Geraniol	13,4 (4,01)	6,05 (2,81)	7,47 (2,92)
2-Phenylethanol	13,77 (3,46)	0	13,86 (3,82)

3.1.3 Korrelationsanalysen

Um Korrelationen zwischen der Menge der einzelnen Duftstoffe zueinander aufzudecken, wurde eine Rang-Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Dabei wurden die Mittelwerte der absoluten Gehalte über die Wiederholungen der Extraktmessungen

untersucht. Es wurden positive und negative Korrelationen gefunden, die eine hohe Signifikanz aufwiesen (siehe Abbildung 3.5).

Die stärksten signifikanten Zusammenhänge fanden sich zwischen Geraniol und Nerylacetat mit einem rho von: 0,52 und einem p-Wert von ≤0,0001. Der stärkste signifikant negative Zusammenhang bestand zwischen Geranylacetat und β-Citronellol (-0,24 und p=0.011).

Signifikant negative Zusammenhänge wurden für folgende Paare festgestellt:

Wenn mehr 2-Phenylethanol nachgewiesen werden konnte war der Gehalt an Geraniol geringer (-0,21, p=0,0025). Extrakte in denen mehr Nerylacetat gefunden wurde enthielten weniger 2-Phenylethanol (-0,26, p=0,005).

Signifikant positive Zusammenhänge wurden für folgende Paare gefunden: Bei einem höheren Gehalt von Nerylacetat, wurde auch mehr Nerol gefunden (0,25, p=0,009). Sofern mehr Geranylacetat gefunden wurde, wurde auch eine höhere Konzentration Geraniol gefunden(0,32, p=0,0012). Sofern die Konzentration von β-Citronellol höher war, wurde auch eine höhere Konzentration Nerol gefunden (0,27, p=0,0065).

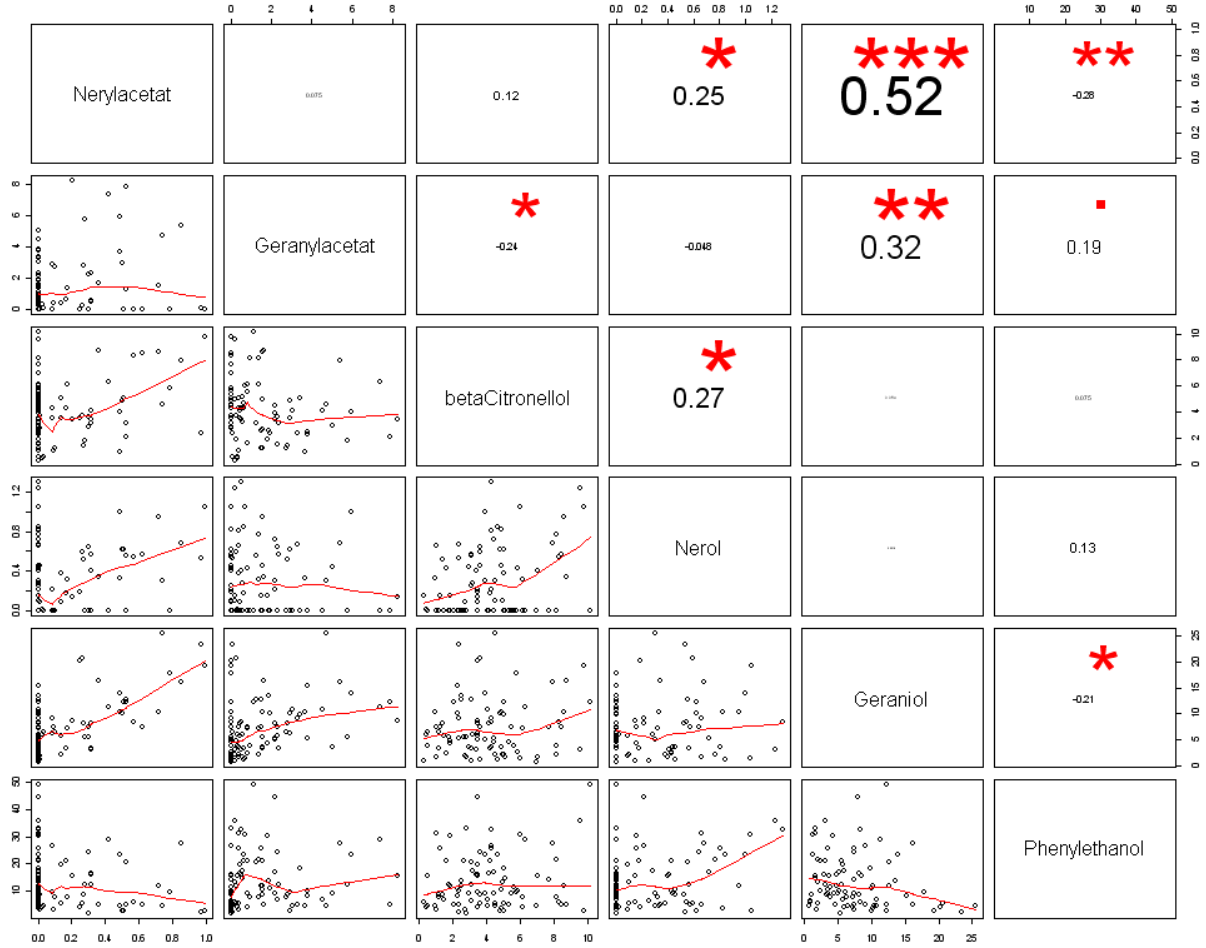


Abbildung 3. 5: Darstellung der Korrelationen zwischen den absoluten Gehalten der Duftsubstanzen in den Extrakten. Oberer Teil Korrelationen nach Spearman, Sternchen indizieren die Signifikanz, *** p≤0,0001, ** p≤0,005, * p≤0,05. Unterer Teil: Streudiagramme der absoluten Gehalte der Duftsubstanzen mit eingezeichneter Anpassungslinie

3.2 Suppressive Subtraktive Hybridisierung

Um für die nachfolgende Markeranalyse neue Kandidatensequenzen zu erhalten, wurde eine Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) durchgeführt. Dabei werden zunächst zwei cDNA „Pools“ miteinander hybridisiert. Die „Pools“ unterscheiden sich um die Fragmente des interessierenden selektiven Merkmals oder Zustands. In dieser Arbeit war dies der Geranylacetat-Gehalt der Duftextrakte.

Bei der Auswertung der Chromatogramme wurde zuerst eine zu hohe Detektionsschwelle gewählt. So wurden RNAs von Pflanzen verwendet, deren Duftextrakten sich nicht 100 % im GA-Gehalt unterschieden (siehe Abbildung 3.6).

Nach einer Korrektur des Schwellenwertes in der Auswertungssoftware und anschließender Neuintegration der Peaks aller Chromatogramme wurde festgestellt, dass 50 % der Duftextrakte der Pflanzenauswahl im Pool ‚Kein-Geranylacetat‘ sehr wohl Geranylacetat enthielten. Daher wurde also die SSH mit den Pools ‚Viel Geranylacetat‘ gegen ‚Wenig Geranylacetat‘, bzw. ‚Wenig Geranylacetat‘ gegen ‚Viel Geranylacetat‘ durchgeführt Die beiden Gruppen unterschieden sich im Geranylacetatgehalt um durchschnittlich 2,7 mg/l. Der Mittelwert der Gruppe ‚viel Geranylacetat‘ war 2,8 und der der Gruppe ‚wenig Geranylacetat‘ 0,1 mg/l, mit Standardabweichungen von 2,3 und 0,17 mg/l. Wobei der Mittelwert über die gesamte Nachkommenschaft für Geranylacetat bei 1,5 mg/l mit einer mittleren Standardabweichung von 1,9 mg/l lag.

3.2.1 Durchführung der SSH

Das Ergebnis der ‚nested‘ PCR, bei der die Primer weiter innen in den Adaptern binden, um die differentiell exprimierten Fragmente noch weiter anzureichern, ist in Abbildung 3. 7 gezeigt. Es wurden in allen Subtraktionsreaktionen PCR-Produkte gebildet. Die Größe dieser Produkte und die Verteilung entsprechen dem erwarteten Muster. Die Tatsache, dass in der PCR Reaktion GA+ diskrete Banden zu sehen sind, deutet auf ein erhöhtes Vorkommen von Transkripten dieser Größe hin. Als Positivkontrolle diente die im Kit vorhandene mit HaeIII vorverdaute und subtrahierte ϕX174-DNA an deren Fragmente die gleichen Adapter ligiert wurden wie an die Fragmente in den cDNA-Pools.

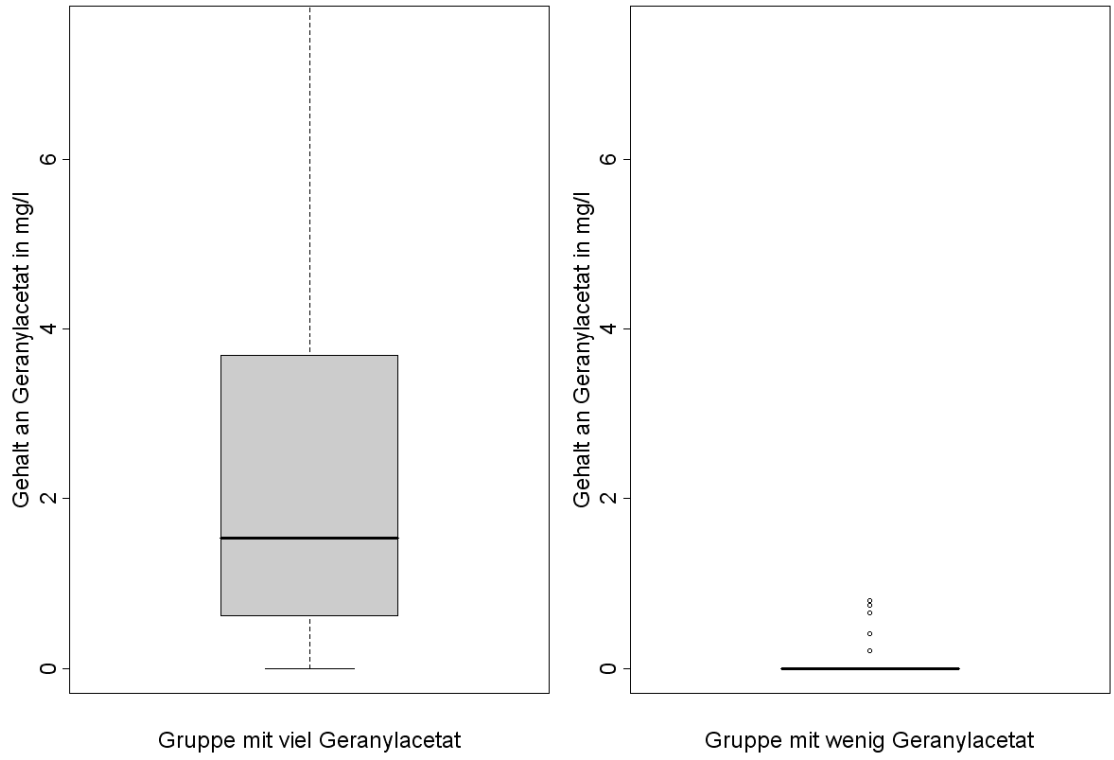


Abbildung 3. 6: Boxplots der Mittelwerte der Geranylacetatgehalte in den Duftextrakten der zwei Pflanzengruppen, die in die Subtraktive Hybridisierung eingegangen sind.

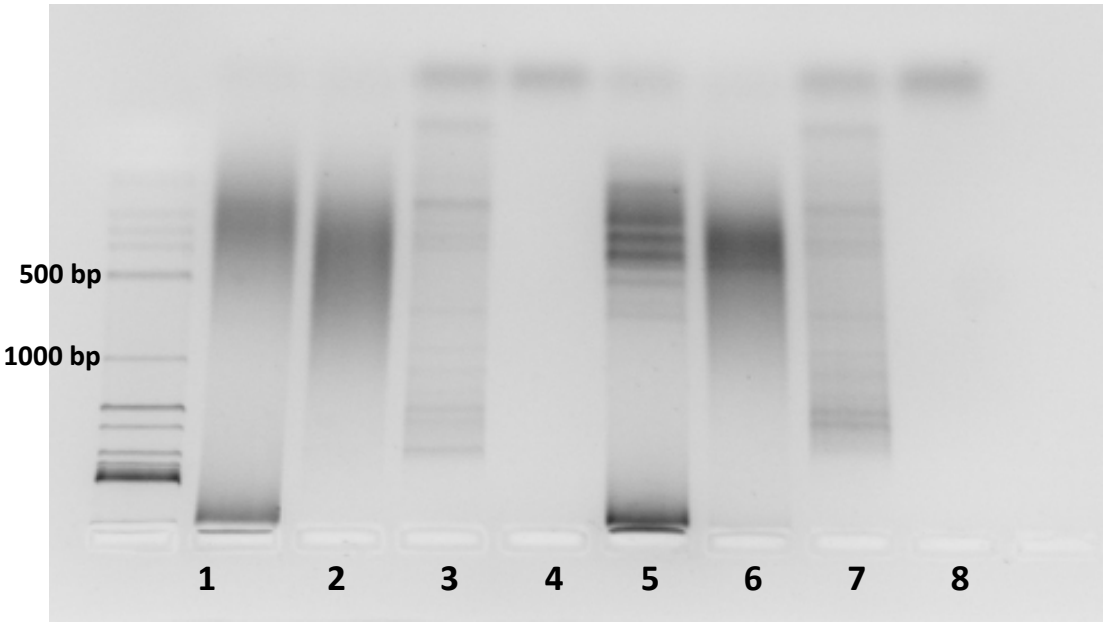


Abbildung 3. 7: Agarosegel der PCR-Produkte der Subtraktiven Hybridisierung nach der zweiten PCR (mit Primern die in den Adaptern binden). Probenreihenfolge von links nach rechts: 1 kb Marker, 1 bis 2 Subtraktionsreaktionen von D. Terefe, 3 Positivkontrolle, 4 H_2O, 5 'viel GA', 6 'wenig GA', 7 Positivkontrolle, 8 H_2O

3.2.2 454-Sequenzierung

Aus der 454-Sequenzierung der cDNA-Banken aller 4 Subtraktionen (D. Terefe und die in dieser Arbeit beschriebenen) resultierten insgesamt ca. 205.000 Sequenzen. Diese hatten eine Durchschnittslänge von 216 bp (siehe Abbildung 3.8).

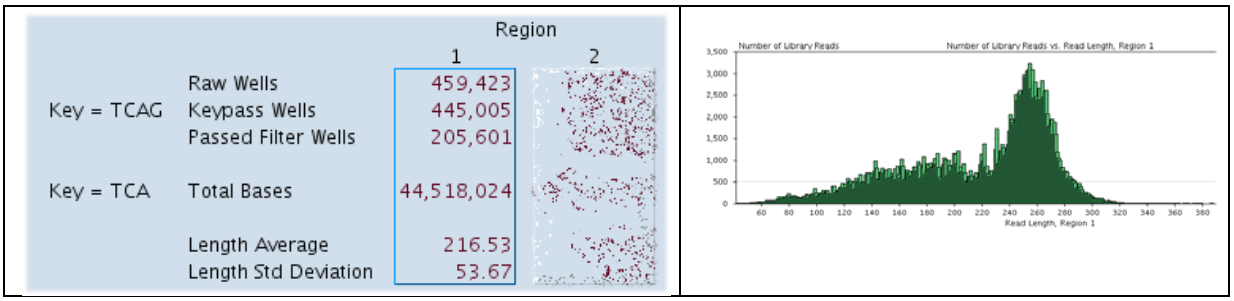


Abbildung 3. 8: Schlüsselcharakteristika des 454 Laufs der vier cDNA Banken (FLX-Report Cogenics)

Die Firma Cogenics führte im Auftrag ein Assembly der Sequenzen durch. Es wurde die Software MIRA (http://chevreux.org/projects_MIRA.html) verwendet. Für das Assembly wurden nach Qualitätskontrolle ca. 101.000 Sequenzen genutzt. Dabei konnten der Bank Geranylacetat plus („viel“ Geranylacetat) 11459 Sequenzen und der Bank Geranylacetat minus („wenig“ Geranylacetat) 83.105 Sequenzen zugeordnet werden.

Es wurden nach dem Assembly nur 11 Singletons, also Contigs die in den Banken nur einmal auftraten, gefunden. Die meisten Contigs wurden aus wenigen Sequenzen zusammengesetzt. Es wurde ein sehr starker Test auf Gleichheit verwendet, so dass zwei bis drei Austausche pro Sequenz schon zu Vereinzelung der Contigs führten. Der Contig c779 wurde 1736mal gezählt und war somit der Contig, der in den Banken am häufigsten auftrat. Der längste Contig, Contig Mira_c65 wurde 508mal gezählt und war 887 Basen lang. Die Contigs hatten eine Durchschnittslänge von ca. 250bp. Dies ist methodisch durch den RsaI Verdau der cDNA für die SSH zu erklären. Der „viel“-Geranylacetat-cDNA Bank konnten 95 Sequenzen des MIRA Assemblys zugeordnet werden. Die „wenig“-Geranylacetat-cDNA-Bank bestand nach dem Assembly durch MIRA aus 3259 Contigs. Eine exemplarische Auflistung der am häufigsten exprimierten Contigs ist im Anhang Tabelle 6.6 aufgeführt. Da das Assembly der Firma Cogenics mit dem Programm MIRA durchgeführt wurde, bevor die Sequenzen den cDNA Banken zugeordnet wurde und erst anschließend die Trennung der Contigs in die einzelnen Banken anhand der Adaptersequenzen erfolgte, war die Zuordnung der Contigs zu den Banken nicht exakt. Daher wurde ein erneutes Assembly mit dem Programm SeqMan™ (www.dnastar.com) durchgeführt. Die eingestellten Parameter waren dabei: 98 % Identität auf mindestens 20 Basen Länge. Die 454-Sequenzen wurden anhand der ersten Base nach der Adaptersequenz in BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) sortiert und anschließend ins Assembly eingegeben. Dabei konnten ähnlich wie bei dem MIRA Assembly für

die „viel“-Geranylacetat-cDNA Bank nur sehr wenig (ca. 100) Contigs generiert werden und für die „wenig“-Geranylacetat-cDNA-Bank ca. 3200. Anschließend wurde noch eine Subtraktion der beiden Banken gegeneinander mit Hilfe von BioEdit durchgeführt, um sicher zu stellen, dass in den Banken nur jeweils Sequenzen vorhanden sind, die in der anderen Bank nicht vorkommen. In der „viel“-Geranylacetat-Bank verblieben 76 Contigs. In der „wenig“-Geranylacetat-Bank verblieben 2998 Contigs.

Zur Überprüfung des Assemblys der Firma Cogenics und die Auswertung der Statistik über die MIRA Contigs wurde eine Homologiesuche durchgeführt. Diese zeigte, dass das Cogenics Assembly nicht erfolgreich war. Die PCR mit Primerpaaren für cDNA-Bank spezifische Contigs konnten nicht zwischen den cDNA Banken der Subtraktiven Hybridisierung unterscheiden. Es wurden Contigs (z.B. MIRA_c5783, *MuT/Nudix Hydrolase*, siehe Tabelle 6.6) als allein in einer Bank vorhanden angegeben. Bei einem BLAST mit diesen Sequenzen gegen die gesamte MIRA EST-Datenbank im SAMS (‚Sequence Analysis and Managment System‘ der Universität Bielefeld) wurden sehr viele Sequenzen gefunden, die in mehreren Contigs vorkommen und auch in mehreren der Subtraktiven Banken. Anhand der mitgelieferten Statistik konnte nicht festgestellt werden, welche Sequenzen bzw. Contigs für die einzelnen Banken spezifisch sind. Die am häufigsten gefundene Ähnlichkeit bestand zwischen einer Nudix Hydrolase aus *Arabidopsis thaliana* (gi|15221521|ref|NP_177044.1), die in allen EST-Banken (auch den cDNAs aus den mit Sternrußtau inokulierten bzw. nicht inokulierten Blättern) in vielen Contigs detektiert werden konnte. Am zweithäufigsten wurde in den cDNAs aus den Blütenblättern eine β-Glucosidase detektiert. Sie wurde 1821mal in der Subtraktiven Bank aus den cDNAs der Pflanzen mit sehr wenig Geranylacetat in ihren Duftextrakten und 122mal in der Bank aus den cDNAs der Pflanzen mit relativ viel Geranylacetat gefunden. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Emission von Duftsubstanzen, wie z.B. Phenylethanol (Sakai et al., 2008). Es wurden eine Vielzahl von Contigs identifiziert, die Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren (wie z.B. zu ODORANT1, einem Myb-Transkriptionsfaktor aus Petunie, (Verdonk et al., 2005)) zeigen. Unter anderem zeigten die Contigs MIRA_c1177, 2310 und 3324 eine signifikante Ähnlichkeit (75 %) zu Myb-Protein 305 aus Tabak, das erwiesenen Einfluss auf die Transkription von Genen in der Phenylpropanoid Biosynthese hat (Sablowski et al., 1994). Es wurden in den Subtraktiven Banken aus den Blütenblättern zudem eine Reihe von Sequenzen identifiziert, die einen bereits bewiesenen Einfluss auf die Synthese von Duftstoffen haben. Es konnten Contigs identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu den bekannten O-Methyltransferasen und eine Reihe ESTs, die Ähnlichkeiten zu Acetyltransferasen aufwiesen. Dabei wurde kein Contig gefunden, das Homologie zu der einzigen, bis jetzt aus Rosen bekannten Alkoholacetyltransferase RhAAT1 zeigte.

3.2.3 Bezeichnung der Contigs

Im Weiteren werden die ESTs aus den SSH-Banken anhand ihrer Zugehörigkeit zu einer cDNA Bank bezeichnet.

- G_ stammt nach *in silico* Subtraktion des DNAStar Assemblys aus dem „viel Geranylacetat“ Pool
- T_ stammt nach *in silico* Subtraktion der DNAStar Assemblys aus dem „wenig Geranylacetat“ Pool
- c stammt aus dem MIRA Assembly, zu finden in der SAMS Datenbank unter der vollen Bezeichnung „MIRA_c“.

Eine Liste der Primersequenzen und Ähnlichkeiten der untersuchten Contigs zu bereits bekannten Sequenzen in den NCBI Datenbanken befindet sich im Anhang in Tabelle 6.4.

3. 3 Markeranalyse und Kartierung

Die bereits vorhandenen genetischen Kopplungskarten der Populationen 94/1 (Yan et al., 2005) und 97/7 (Linde et al., 2006) wurden durch die vorliegende Arbeit erweitert und Ankermarker in beiden Populationen positioniert, die zur Identifizierung der Kopplungsgruppen über Populationen und Arbeitsgruppen hinweg dienen können.

Dabei wurden in der Population 94/1 insgesamt 78 sequenzbasierte Marker und in der Population 97/7 57 sequenzbasierte Marker neu integriert bzw. die Analyse für fehlende Genotypen vervollständigt (Tabelle 6.7). In den Populationen wurden verschiedene Strukturgen- und EST-Marker lokalisiert. Über 21 SSR-Ankermarker konnten so insgesamt acht Strukturgene der Duftbiosynthese in Rosen und zehn SSH EST-Marker kartiert werden (siehe Tabelle 3.3 und 3.4).

3.3.1 Marker für bereits bekannte Rosenduftbiosynthesegene

Durch die Arbeiten von Shalit et al. (2003), Wu et al. (2003 und 2004), Lavid et al. (2002), Guterman et al. (2002) und Simkin et al. (2004) wurden bereits Schlüsselenzyme für die Biosynthese von Duftkomponenten identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnten genetische Marker für diese Enzyme entwickelt und in die genetischen Karten der Populationen 94/1 und 97/7 integriert werden (siehe Tabelle 3.4). Es wurde durch Klonierung und Sequenzierung aller als Marker verwendeten PCR-Produkte aus mindestens einem der beiden Elterngenotypen der Population 94/1 verifiziert.

Für *RcOMT3* (Wu et al., 2003) konnten mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Primerpaares zwei Genorte, jeweils im unteren Bereich der Kopplungsgruppen 2 und 4 von beiden Populationen, identifiziert wurden (Abbildung 3. 10 und 3.11). Mit Hilfe des für die *RcOMT3* spezifischen Primerpaares werden zwei Marker amplifiziert, die in beiden Populationen

unabhängig voneinander spalteten. Die GermacrenD-Synthase (Guterman et al., 2002) ist in der Population 97/7 in einem Locus vorhanden, in der Population 94/1 spalten zwei Marker auf, die jeweils von einem Elter weitergegeben auf der gleichen Kopplungsgruppe detektiert wurden (siehe Abbildung 3.11). Sie zeigen in der integrierten Karte einen Abstand von 10 cM. Für *RhAAT1* (Shalit et al., 2003) konnten mit Hilfe von Primerpaaren, die in verschiedenen Bereichen der publizierten Gesamtsequenz binden, mindestens zwei Kopien (siehe Abbildung 3.10), anhand von Sequenzierungen aus beiden Elterngenotypen (siehe Anhang Abbildung 6.4) acht verschiedene Versionen dieses Gens identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Deletionen im Intron und Einzeldeletionen in den das Intron umschließenden Bereichen. Für zwei der putativen Kopien der *RhAAT1* konnten SCAR-Marker entwickelt werden. Es gibt insgesamt 3 Rekombinanten unter 99 untersuchten Genotypen, die Pflanzen 94/1-29, -75 und -93. Diese Pflanzen wurden durch SSR-Analyse als wahre Rekombinante verifiziert.

Tabelle 3. 4: In der vorliegenden Arbeit kartierte Duftbiosynthesestrukturgene, A Kopplungsgruppe für 93/1-117, B Kopplungsgruppe für 93/1-119

Genbezeichnung	Markertyp	Markername	Population	Kopplungsgruppe
Rh-AlkoholAcyl-transferase1 (*RhAAT1*)	SCAR	RhAAT1-Intron, RhAAT1codingseq	94/1, 97/7	A2, B2
GermacrenD-Synthase (*GDS*)	SSCP	GDS-1, GDS-2	94/1, 97/7	A5, B5
Orcinol-o-Methyltransferase (*OOMT1* und -2)	CAPS	RhOOMT1 und -2	94/1	A2
Eugenol-o-Methyltransferase (*RcOMT1*)	SSCP	EOMT	97/7	A4, B4
Kaffeesäure-o-methyltransferase3 (*RcOMT3*)	SCAR, SSCP	RcOMT3-265 und -280	94/1, 97/7	B2 , B4
Phloroglucinol-o-Methyl-Transferase (*POMT*)	CAPS	POMT_MboI	97/7	A6

3.3.2 SSH EST-Marker

Aus der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SSH-Bank wurden Sequenzen identifiziert, die in BLAST Homologiesuchen Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Genen der Duftbiosynthese sowohl aus Rosen als auch aus anderen Pflanzen zeigten (siehe Tabelle 6. 9). Zusätzlich wurden ESTs untersucht, die Ähnlichkeiten zu Blütenmorphologie- und Blütenfarbgebungsgenen zeigten. Für diese ESTs wurden Primer entwickelt und PCR-Reaktionen optimiert. Die PCR-Fragmente wurden durch CAPS- oder SSCP-Analysen auf Polymorphismen untersucht und beim Auftreten von solchen in den jeweiligen Nachkommenschaften angewendet.

Eine Liste aller ESTs aus der SSH-Bank, die Polymorphismen aufwiesen, wird im Anhang Tabelle 6.8 (Primersequenzen unter 6.4) aufgeführt. Es wurden insgesamt 47 ESTs untersucht. Bei 19 ESTs konnten Polymorphismen zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen detektiert werden. Davon waren neun Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen und 10 Einzelstrangkonformationsunterschiede. Von diesen konnten in der Population 94/1 sechs und in der Population 97/7 vier kartiert werden (siehe Tabelle 3.5). In der 94/1 kartieren die SSH EST-Marker auf den Kopplungsgruppen 1, 2, 4 und 5. In der 97/7 auf den Kopplungsgruppen 2, 4, 5 und 6.

Tabelle 3. 5: In dieser Arbeit kartierte ESTs mit Sequenzähnlichkeiten zu Duftbiosynthesegenen

Markername	Sequenzähnlichkeit zu	Population	Kopplungsgruppe
CCD1_RsaI	Carotenoid cleavage dioxy-genase(β-ionone Synthase)	In 94/1	LG1
G_189	gi|109633769|N-methyltransferase	in 97/7	LG2
MIRA_c125	Terpensynthase (Diterpene)	in 94/1	LG5
T_1410	(+c1877)Farnesyltransferase	in 94/1	LG4
T_1161	(+T_4901+T_999+T_3209) gi|149941641|*Rosaxdamascena* aromatic L-amino acid decarboxylase	in 97/7	LG5
T_178	gi|20155398 Acetyl CoA: benzylalcohol acetyltransferase; BEAT [*Clarkia breweri*]	in 94/1	LG2
T_1994	Linalool Synthase [Mentha aquatica]	in 94/1	LG1
T_249	Keine Ähnlichkeit	in 94/1	LG4
c3299	Phenylacetaldehydreduktase	in 94/1	LG1
T_45	Alcohol acyltransferase [Fragaria x ananassa]-like	in 97/7	LG4
T_81	Benzylalkoholacetyltransferase	in 97/7	LG6

3.3.3 Vergleich der integrierten Karten der Populationen 94/1 und 97/7

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Marker wurden zusammen mit den vervollständigten Daten für die SSR-Marker zuerst getrennt für jeweils beide Eltern beider Populationen in JoinMap 4 verrechnet. Dabei wurde zur Bestimmung der Kopplungsgruppen (LG) das Kriterium des Independence LOD gewählt. In der Population 94/1 war dabei der kleinste LOD 7 und in der 97/7 der kleinste LOD 4 jeweils bei LG3. Anschließend wurde diese Karten über die „Join“ Funktion von JoinMap 4 je Population integriert (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3. 6: Vergleich der Merkmale der integrierten Karten 94/1 und 97/7

	94/1	97/7	Vergleich
Gesamtmarkerzahl	609	505	23 Marker auf beiden Karten
Gesamtmarkerzahl kartiert	445	385	21 Marker auf beiden Karten
Gesamtlänge	465 cM	628 cM	99 Individuen in 94/1, ca. 170 genotypisierte Individuen in 97/7
Markerdichte	1 Marker/cM	0,8 Marker/cM	
# SSR-Marker (auch Multilocusmarker)	45	50	
# Sequenzbasierte Marker (Scar, CAPS, SSCP, in 97/7 NBS und RGA Marker)	55	140	
# AFLP-Marker	339	191	
Phänotypische Marker	Blütenfarbe, Blütenfüllung, Duftsubstanzen	Sternrußtauresistenz, Mehltauresistenz (quantitativ), Blütenfüllung, weiße Streifen, Stacheln (nicht auf der Karte)	

Die Gesamtlänge der genetischen Karte der 94/1 beträgt 465 cM, während die Karte der 97/7 628 cM umfasst. Die Länge der einzelnen Kopplungsgruppen variiert zwischen 44 cM bei 97/7 LG5 und 97/7 LG4 mit 123 cM. Die größte Lücke zwischen den Markern besteht auf LG3 der Population 94/1 mit 27 cM zwischen zwei Markern die aus Selbstinkompatibilitätsmarkern von *Prunus* entwickelt wurden (Dissertation M. Bretzke). Es sind auf allen Kopplungsgruppen beider Populationen Ankermarker positioniert, die beide Karten miteinander verknüpfen (siehe Abbildung 3.9 bis 3.12, angezeigt durch unterstrichenen Namen und verbindende Linie). Diese Ankermarker sind SSR- und EST-Marker mit stabilen Kartenpositionen durch hohe Individuenzahlen. Die Kopplungsgruppen 5 und 6 werden jeweils von zwei Markern verknüpft, die Kopplungsgruppen 1 durch drei Marker, die Gruppen 2, 4 und 7 durch je vier Marker und die Kopplungsgruppen 3 durch fünf Marker. Dabei stimmte die Reihenfolge der Ankermarker in beiden Populationen überein. Es wurden einige wenige Ausnahmen gefunden, die aber dadurch erklärt werden können, dass die SSR-Marker mehrere Loci amplifizieren (z. B.: RMS035), bzw. dass in Regionen mit vielen eng gekoppelten Markern in der Population 94/1 zu wenig Individuen vorhanden sind, um eine exakte Anordnung der Marker auf den genetischen Karten zu gewährleisten. Die Strukturgenmarker (Tabelle 3.4) sind auf den Chromosomen beider Populationen verteilt (Grün). SSH EST-Marker (Tabelle 3.6) wurden in beiden Populationen auf allen Kopplungsgruppen lokalisiert (Blau). Es konnten die Merkmale „Vorkommen von Nerol und Nerylacetat“ direkt als Einzelloci in die Karte der Population 94/1 integriert werden (Rot). „Nerol“ kartiert auf LG3 mit 7 cM Abstand zum Blütenfüllungslocus.

„Nerylacetat“ ist auf der LG4 lokalisiert, auf der sich auch zwei weitere ESTs und ein Strukturgenlocus befinden. Das Merkmal „Vorkommen von Geranylacetat“ befindet sich auf LG2, auf der zwei Marker für das mögliche Strukturgen der Biosynthese von Geranylacetat (*RhAAT1*) bei 26,9 und 27,4 cM lokalisiert sind.

Die Kopplungsgruppen 1 der Populationen 94/1 und 97/7 (Abbildung 3.9) werden über die in beiden Populationen kartierten SSRs, die an die Sternrußtauresistenz gekoppelt sind (Biber et al., eingereicht), verknüpft. Diese beiden SSRs, RMS015 und 155SSR, sind jeweils am unteren Ende der Kopplungsgruppen lokalisiert. Auf der LG1 der Population 94/1 konnten drei mögliche Duftbiosynthese-relevante ESTs kartiert werden: die *Carotenoid Cleavage* Dioxygenase*,* T_1994 (Terpensynthase-ähnlich) und c3299 (Phenylacetaldehydreduktase. Auf den integrierten Kopplungsgruppen 2 (Abbildung 3.10) der Populationen 94/1 und 97/7 kartieren mehrere Strukturgene der Duftbiosynthese. Es befinden sich sowohl mindestens zwei Kopien der *Rosa* Hybr. Alkoholacetyltransferase (Shalit et al., 2004) als auch zwei O-Methyltransferasen auf diesen Kopplungsgruppen (*OOMT1* und *RcOMT3*, Lavid et al., 2002, Wu et al., 2003). Auf diesen Kopplungsgruppen konnten zusätzlich zwei SSH EST-Marker kartiert werden, eine N-Methyltransferase- (G_189) und eine Benzoyl-Alkoholacyltransferase (T_178)-ähnliche Sequenz. Die Kopplungsgruppen werden über die in beiden Populationen kartierenden SCAR-Marker für die *RhAAT1* und *RcOMT3* verknüpft. Außerdem befinden sich dort in beiden Populationen die SSR-Marker Rh48, Rh80 und RMS035. Auf der LG2 der Population 97/7 konnte ebenfalls ein CAPS-Marker für eine Flavanon-3-Hydroxylase platziert werden (Zamir, unveröffentlicht). Auf den Kopplungsgruppen 3 der Populationen 94/1 und 97/7 befinden sich Marker für die Blütenfüllung (*DoubleFlowers,* Blfo), für die Selbstinkompatibilität (TE3 und -4, Dissertation M. Bretzke) und der Einzellocus für das „Vorhandensein von Nerol“ in den Duftextrakten. Die Kopplungsgruppen können sowohl über den *DoubleFlowers*-Locus als auch über die oben genannten SSR-Marker verknüpft werden. Die SSRs Rh50 und Rh58 wurden bereits von Yan et al. (2005) in der Population 94/1 lokalisiert. Zusätzlich zu diesen SSRs kartieren Rw12J12 und Rw11E5, zwei SSR-Marker aus Oyant et al. (2008), auf dieser Kopplungsgruppe. Die Kopplungsgruppen 4 der Populationen 94/1 und 97/7 (Abbildung 3.11) werden über vier Marker miteinander verknüpft. Dies sind zwei SSR-Marker aus Oyant et al. (2008), H2F12 und Rw55E12, sowie Rh78 aus Yan et al. (2005) und ein in dieser Arbeit entwickelter SCAR-Marker für eine O-Methyltransferase (*RcOMT3*). Es konnte dort der Locus für das „Vorhandensein von Nerylacetat“ in den Duftextrakten aus der Petalen der Population 94/1 kartiert werden und zusätzlich drei SSH EST-Marker für Duftbiosynthesegen-ähnliche Sequenzen: eine Terpensynthase (T_1410), T_249 und eine Alkoholacyltransferase-ähnliche Sequenz (T_45). Die Kopplungsgruppen 5 der Populationen 94/1 und 97/7 werden

über den SSCP-Marker für die GermacrenD-Synthase (Lavid et al., 2002) verknüpft. Durch die in der Population 94/1 auf der LG4 kartierenden Rh* SSR-Marker und RMS* SSR-Marker können diese Kopplungsgruppen stärker miteinander verbunden werden. In der Population 97/7 wurden SSR-Marker, die auf dieser Kopplungsgruppe den unteren Bereich abdecken, noch nicht untersucht. Dort befinden sich zusätzlich SSH EST-Marker für ein Terpensynthase-Homolog (Mira_c125) und eine weitere L-Phenylalanindecarboxylase-ähnliche Sequenz (T_1161). Die integrierten Kopplungsgruppen 6 der Populationen 94/1 und 97/7 (Abbildung 3.12) werden durch die SSR-Marker Cl2980 und RMS108 verknüpft. Auf der LG6 der Population 97/7 befindet sich der CAPS-Marker für die Phloroglucinol-O-Methyltransferase POMT_MboI (Wu et al., 2003). Die integrierten Kopplungsgruppen 7 der beiden Populationen werden durch vier SSR-Marker miteinander verknüpft (Rh72, RH73, RMS003, H10D03). H10D03 verknüpft die Kopplungsgruppen zusätzlich mit der Karte aus Oyant et al. (2008). Insgesamt können die integrierten Karten über 21 Marker miteinander verbunden werden. Die Verbindung zu der genetischen Karte von Oyant et al. (2008) stellen 13 Marker her, die die Zuordnung von fünf der sieben Kopplungsgruppen möglich machen (siehe Tabelle 4.1).

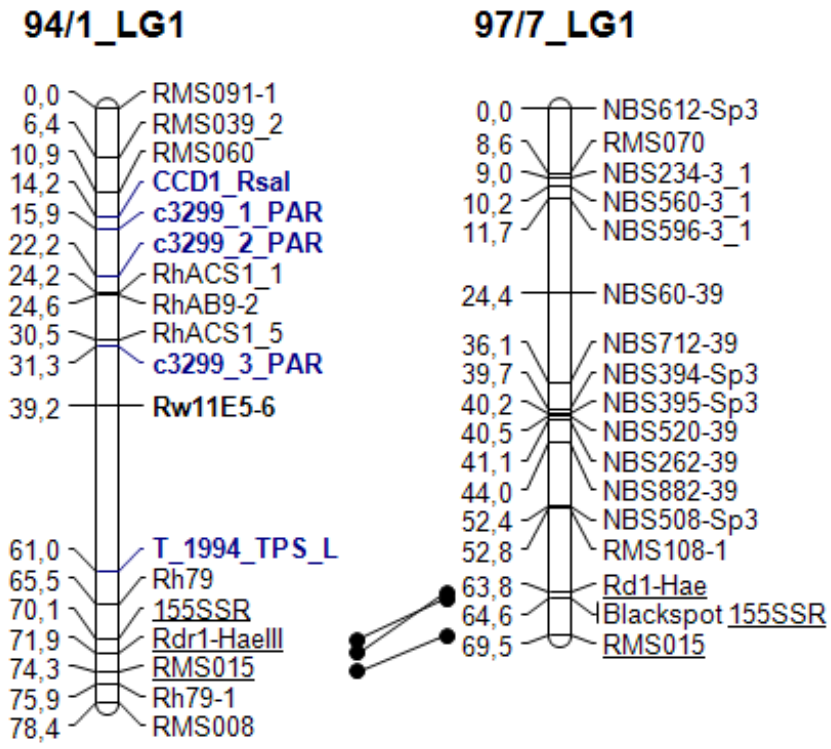


Abbildung 3. 9: Homologe Kopplungsgruppen 1 der Populationen 94/1 und 97/7, blau eingezeichnet sind EST-Marker mit Duftbiosynthesegen-ähnlichen Sequenzen, Ankermarker sind unterstrichen und zwischen den Populationen verbunden

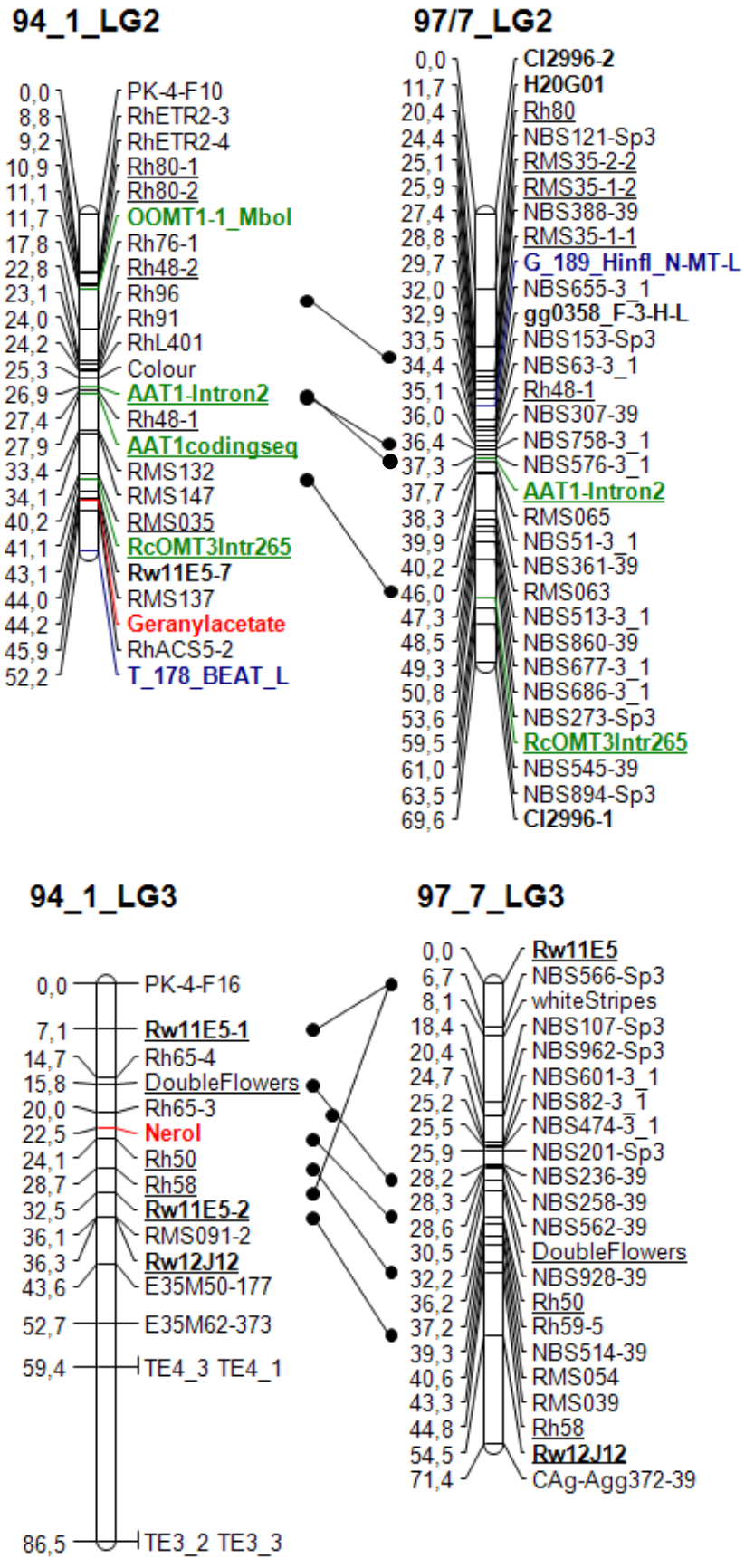


Abbildung 3. 10: Homologe Kopplungsgruppen 2 und 3 der Populationen 94/1 und 97/7, Ankermarker unterstrichen und zwischen den Populationen verbunden, grün Duftstrukturgenmarker, blau SSH-EST-Marker, rot Geranylacetat, bzw. Nerol als Einzelloci.

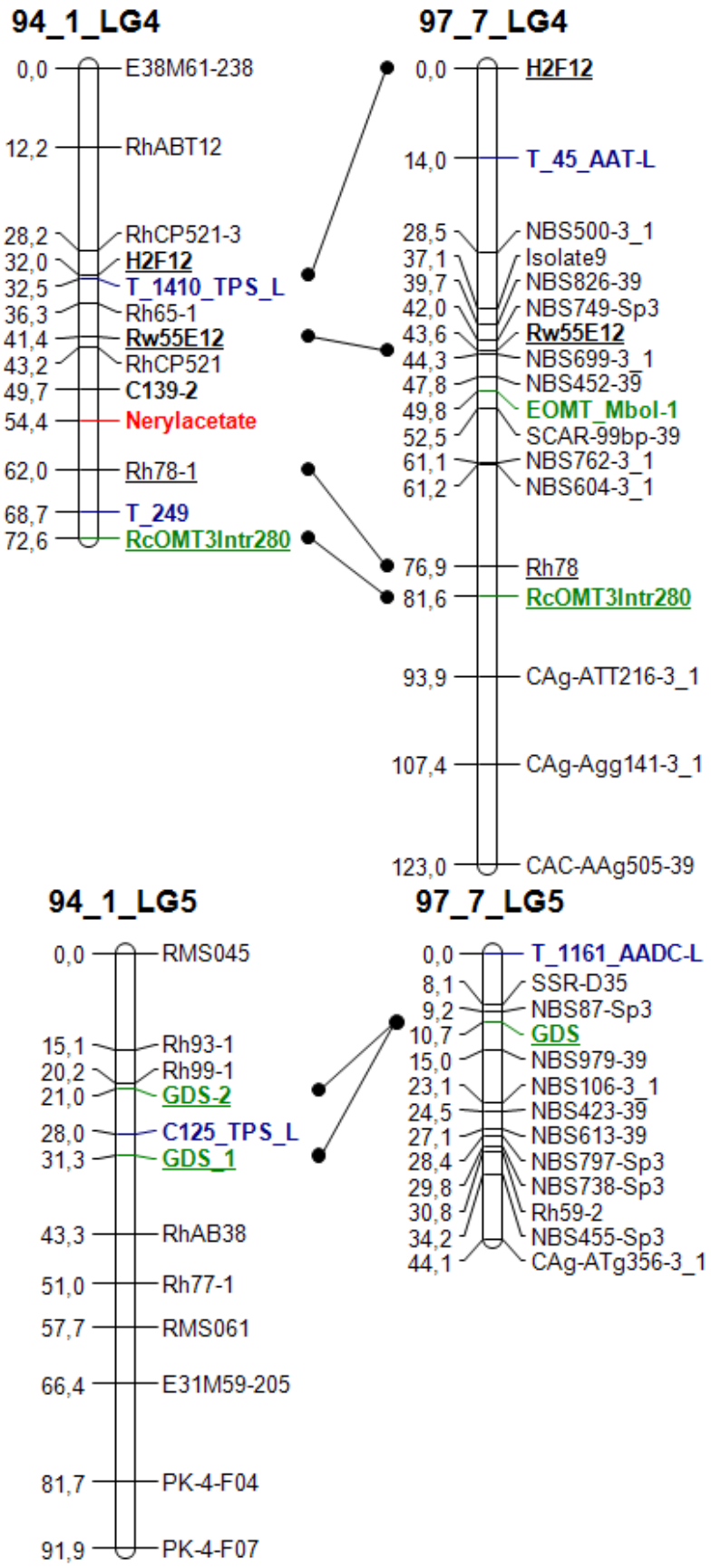


Abbildung 3. 11: Homologe Kopplungsgruppen 4 und 5 der Populationen 94/1 und 97/7, Ankermarker unterstrichen und zwischen den Populationen verbunden, grün Duftstrukturgenmarker, blau SSH-EST-Marker, rot Einzellocus für das Vorhandensein Nerylacetat.

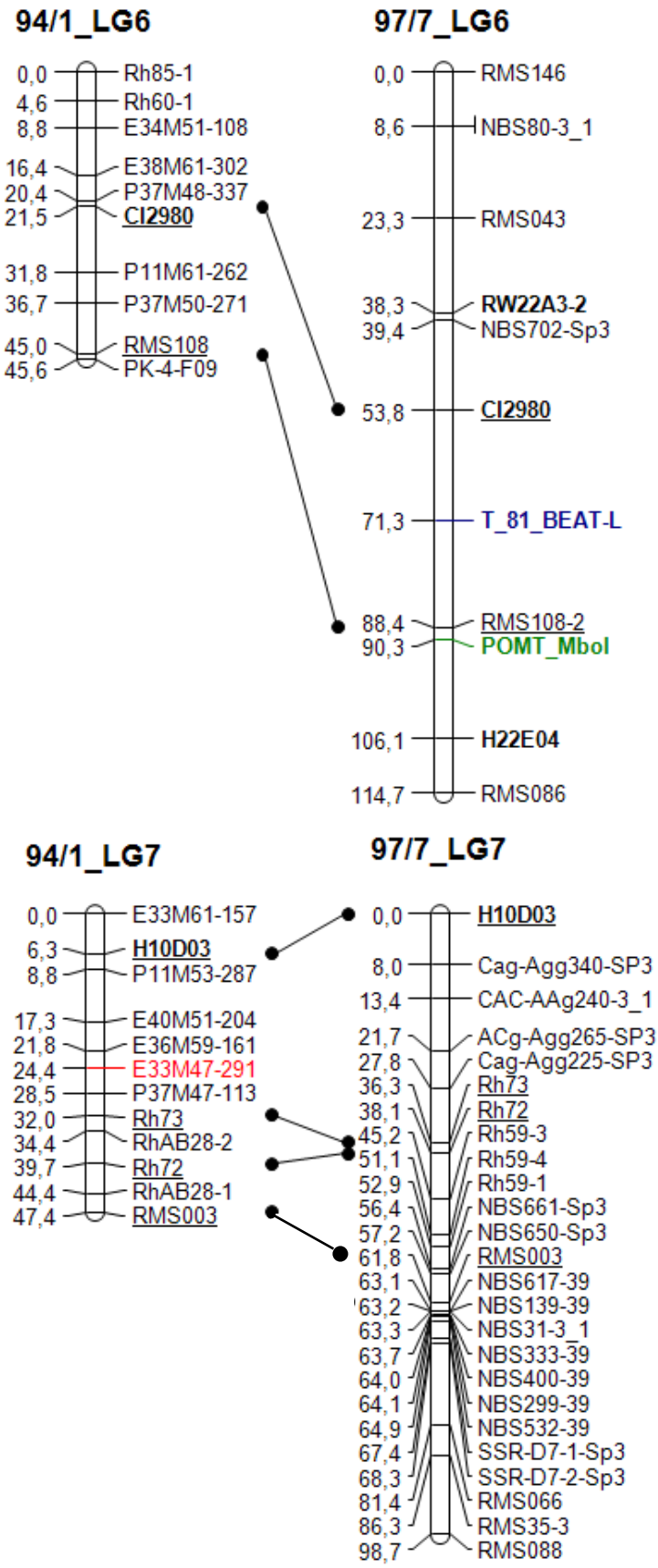


Abbildung 3. 12: Homologe Kopplungsgruppen 6 und 7 der Populationen 94/1 und 97/7, Ankermarker unterstrichen und zwischen den Populationen verbunden, grün Duftstrukturgenmarker, blau SSH-EST-Marker. In Rot ist der zweite Geranylacetat Locus eingezeichnet (siehe Diskussion).

3.4 QTL-Kartierung

Für die Bestimmung von QTL wird eine Normalverteilung der Daten vorausgesetzt. Es wurde daher zuerst ein Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov in WinStat durchgeführt. Dazu wurden die Mittelwerte der absoluten Gehalte der Duftsubstanzen verwendet.

Tabelle 3. 7: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung der Mittelwerte aus der Duftextraktanalyse, N Anzahl gültige Fälle, D Teststatistik, P Fehlerwahrscheinlichkeit

Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variable			
	N	**D**	**P**
MWNerylacetat	88	0.30	0.00
MWGeranylacetat	88	0.21	0.00
MWCitronellol	88	0.1	0.37
MWNerol	88	0.28	0.00
MWGeraniol	88	0.12	0.15
MWPhenylethanol	88	0.14	0.05
MWNodecan	88	0.14	0.06

Für die Mittelwerte von β-Citronellol, Geraniol, 2-Phenylethanol und Nonadecan ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine andere Verteilungsform als die Gauß-Verteilung vorliegt, sehr gering (siehe Tabelle 3.7). Für Nerylacetat, Geranylacetat und Nerol muss eine andere Verteilungsform als die Gaußverteilung angenommen werden. Für Nerylacetat, Geranylacetat und Nerol wurde daher nach Yang et al. (2006) mit WinStat eine Boxcox Transformation mit ln(Y)=0 durchgeführt und anschließend auf Normalverteilung getestet (Tabelle 3.8).

Tabelle 3. 8: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mit den log-transformierten Mittelwerten der nicht normalverteilten Daten (siehe Tabelle 3.7), N Anzahl gültige Fälle, D Teststatistik, P Fehlerwahrscheinlichkeit

Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variable			
	N	**D**	**P**
logNerylacetat	41	0.18	0.14
logGeranylacetat	68	0.13	0.22
logNerol	56	0.16	0.12

Nach der Transformation konnte für die Werte für die log=ln(Nerylacetat), ln(Geranylacetat) und ln(Nerol) eine Normalverteilung nicht mehr abgelehnt werden. Diese Werte konnten somit ebenfalls in die QTL-Analyse einfließen. Mit den Mittelwerten für β-Citronellol, Geraniol und 2-Phenylethanol, sowie den transformierten Daten für Nerylacetat, Geranylacetat und Nerol wurde in MapQTL 6 eine QTL-Kartierung durchgeführt.

Eine Methode, um die Signifikanzschwelle für QTL Intervalle festzulegen, besteht in dem in MapQTL 6 zur Verfügung stehenden Permutationstest nach Churchill und Doerge (1994). Dieser Test wurde in der vorliegenden Arbeit mit 1000 Permutationen genutzt. Es wurde

sowohl chromosomweit als auch genomweit die Signifikanzschwelle für das 95 % Konfidenzintervall des LODs für alle Merkmale und für alle Kopplungsgruppen bestimmt (siehe Tabelle 6. 9 bis 6.14).

Anschließend wurde eine nicht parametrische Bestimmung des Einflusses der Marker mit einem Kruskal-Wallis Test über alle Marker durchgeführt. In der Abbildung der QTL (Abbildung 3.13 bis 3.19) wurden nach Kruskal-Wallis signifikante Marker (siehe Material und Methoden) mit einem Sternchen (*) markiert. Zusätzlich zeigte noch eine Reihe weiterer Marker, die nicht in der ersten Runde in JoinMap auf der genetischen Karte platziert werden konnten, einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt an verschiedenen Duftstoffen (siehe Tabelle 3. 9).

Die unkartierten Marker zeigten Zugehörigkeit zu Regionen bzw. Chromosomen die auch in der QTL-Berechnung Einfluss zeigen (siehe nächster Abschnitt). Alle Marker, die nach Kruskal-Wallis einen signifikanten Einfluss auf die quantitative Ausprägung des Merkmals Geranylacetat zeigten, kartieren auf LG2; auf dieser war zwar durch *Interval Mapping* kein QTL detektierbar, jedoch ein putatives Strukturgen (RhAAT1) und der Peak für Geranylacetat (siehe Diskussion).

Tabelle 3. 9: Unkartierte signifikante Marker nach Kruskal-Wallis berechnet

Marker	Duftsubstanz	Kopplungsgruppe (LG) in 3. JoinMap Runde	QTL für die Substanz auf dieser KG vorhanden?
Geranylacetat	β-Citronellol	LG2	Ja
RMS061	Phenylethanol	LG5	Ja
MIRA_c125	Phenylethanol	LG5	Ja
GDS-2	Phenylethanol	LG5	Ja
P11M57-128	Phenylethanol	LG5	Ja
T_1410_AluI_TPS-L	Nerylacetat	LG4	Ja
P37M51-174	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
P37M51-229	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
E40M51-094	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
PK-4-F21	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
P17M61-176	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
E32M48-320	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
E43M55-091	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
Rh76-1	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort
E33M62-171	Geranylacetat	LG2	Nein, aber RhAAT1 kartiert dort

Ergänzend wurde in MapQTL 6 ein *Interval Mapping* durchgeführt (Lander and Botstein, 1989). Hierbei wurde der Einfluss der Intervalle zwischen den Markern auf den Gehalt an verschiedenen Duftstoffen sowohl mit Regression als auch mit dem ‚Mixture Model' (Van Ooijen, 2009) bestimmt. Beide Algorithmen brachten sehr ähnliche Ergebnisse. Im Folgenden wird nur auf die Ergebnisse der Berechnung von QTL mit dem ‚Mixture Model' eingegangen. Es wurden insgesamt sieben QTL für vier Duftsubstanzen identifiziert, wobei nur

fünf dieser Regionen durch signifikante Ergebnisse aus beiden Methoden abgesichert sind (siehe Tabelle 3.10). Die Region auf LGA3 für Geraniol wurde nur durch Interval Mapping detektiert, die Region auf B1 für β-Citronellol nur durch Kruskal-Wallis. Die Region auf B1 wurde daher als nicht signifikant gewertet.

Tabelle 3. 10: Zusammenfassung über die in der Population 94/1 detektierten QTL; *Nicht durch signifikante Marker nach Kruskal-Wallis unterstützt. ** QTL für β-Citronellol auf Kopplungsgruppe 1 nur durch signifikante Einzelmarker

QTL	Kopplungsgruppe	LOD score	Signifikanzlevel	2 LOD Konfidenzintervall (cM)
Geraniol	A1, B1	4,84; 5,6	Genomweit	42 bis 69; 43 bis 84
Geraniol*	A3	4,4	Chromosomweit	0 bis 3
2-Phenylethanol	A2, B2	4; 3,8	Chromosomweit	21 bis 55; 10 bis 31
2-Phenylethanol	A5, B5	10,04; 6,55	Genomweit	36 bis 44; 10 bis 33
Nerylacetat	A4, B4	7,62; 5,57	Genomweit	39 bis 50; 51 bis 75
(β-Citronellol**	B1	p ≤ 0,0005		42 bis 72)
β-Citronellol	A7, B7	3,22; 3,28	Chromosomweit	45 bis 59; 43 bis 58

In den Abbildungen 3. 13 bis 3.19 sind die einzelnen QTL-Regionen auf den Elternkarten der untersuchten Population 94/1 dargestellt. Als signifikante QTL wurden die Regionen bezeichnet, in denen sich Marker befanden, die nach Bonferoni-Adjustierung des K-Werts (α≤0,05/7) nach Kruskal-Wallis signifikanten Einfluss auf den Gehalt des Duftstoffs zeigten und die Intervalle beinhalteten, deren LOD Werte über dem chromosomalen LOD Signifikanzniveau lagen (gestrichelte Linie in den Graphen der LOD-Kurven, in den Abbildungen rechts neben den Kopplungsgruppen). Als Haupt-QTL wurden Bereiche bezeichnet, die die genomweite Signifikanzschwelle überschritten (durchgezogene Linie in den Graphen).

Für das Merkmal „Geraniolgehalt“ befindet sich der Haupt-QTL auf LG1 im unteren Abschnitt (Abbildung 3.13) mit dem höchsten Peak bei 60 cM und LOD 4,84 (A) und 72 cM und LOD 5,6 (B). Dabei zeigten die Marker den stärksten Einfluss auf den Geraniolgehalt, die in der Population 97/7 an das Merkmal Sternrußtauresistenz gekoppelt sind (RMS015 und 155SSR). Die LOD-Kurve verläuft auf beiden Kopplungsgruppen mit zwei Maxima. Ein Neben-QTL, der für *Interval Mapping* genomweite Signifikanzwerte zeigt, jedoch nicht mit Kruskal-Wallis signifikanten Markern gekoppelt ist, befindet sich auf LGA3 (Abbildung 3.16) bei 0 cM mit LOD 4,41.

Für das Merkmal „β-Citronellolgehalt“ befindet sich ein QTL auf LG7 (Abbildung 3.19). Dieser QTL überschreitet die chromosomale Signifikanzschwelle von LOD 3 nur sehr knapp (LOD 3,22 bei 53 cM). Auf der LGB1 befinden sich im unteren Bereich zwischen 42 und 72 cM eine Reihe von signifikanten Einzelmarkern für den „β-Citronellol und Geraniol-Gehalt“ (Abbildung 3.13).

Für das Merkmal „2-Phenylethanolgehalt“ konnten ein Haupt- und ein Neben-QTL detektiert werden (Abbildungen 3.14 und 3.17). Der Haupt-QTL liegt auf LG5 mit den höchsten Peaks bei 42,8 cM (A) und 26 cM (B). Er ist sowohl nicht-parametrisch als auch für *Interval Mapping* mit LOD 10 (A) und LOD 6,55 (B) weit über den Signifikanzschwellen und stellt somit den Hauptlocus für die Bildung von 2-Phenylethanol dar. Er korreliert mit einem der bereits kartierten ESTs für *Aromatic Amino Acid* Decarboxylasen (EST_T_1161), die nachweislich für die Biosynthese von 2-Phenylethanol zuständig sind (Sakai et al., 2007). Der Neben-QTL befindet sich auf der LG2 bei 49 (A, LOD 4) und 26 cM (B, LOD 3,88) in unmittelbarer Nachbarschaft zu Loci zur Produktion von Alkoholacetaten und Kruskal-Wallis signifikanten Markern mit Einfluss auf den Geranylacetatgehalt. Dieser QTL erreicht nur knapp die genomweite Signifikanzschwelle für LODs im *Interval Mapping*. Er wird jedoch durch viele Kruskal-Wallis signifikante Marker (auf B2) gestützt.

Für das Merkmal „Nerylacetatgehalt“ konnte der Hauptlocus aus der dominanten Auswertung auf LG4 durch das QTL Mapping verifiziert werden (Abbildung 3.16). Der Einzellocus wird bereits in der ersten Kartierungsrunde in JoinMap 4 am unteren Ende von LG4 platziert. Direkt neben diesem Locus bei 46,5 cM befindet sich ein Marker (PK-4-F18, Yan et al., 2005) mit sehr starkem Einfluss auf den Nerylacetatgehalt nach Kruskal-Wallis. Über das *Interval Mapping* wird in diesem Bereich in beiden Eltern eine QTL-Region detektiert, die ihre stärkste Ausprägung bei eben diesem Marker hat.

Für die Merkmale „Geranylacetat- und Nerolgehalt“ wurden durch *Interval Mapping* keine signifikanten QTL detektiert. Es wurden durch das nicht parametrische Verfahren mehrere Marker, die einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt an beiden Stoffen ausüben, identifiziert. Für „Geranylacetatgehalt“ befinden sich diese auf LGA2 mit Signifikanzniveaus < 0,005 und für „Nerolgehalt“ mit Signifikanzniveaus < 0,005 auf LGA1. Der Einzellocus für Nerol wird bereits nach der ersten Kartierungsrunde auf LG3 platziert, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die quantitative Ausprägung dieses Merkmals.

Auf den Kopplungsgruppen 6 der beiden Elterngenotypen der Population 94/1 konnte kein signifikanter QTL detektiert werden. Es konnten auf LG6 ebenfalls weder Duftbiosynthese Strukturgenmarker noch ESTs für Duftbiosynthesegen-ähnliche Sequenzen kartiert werden.

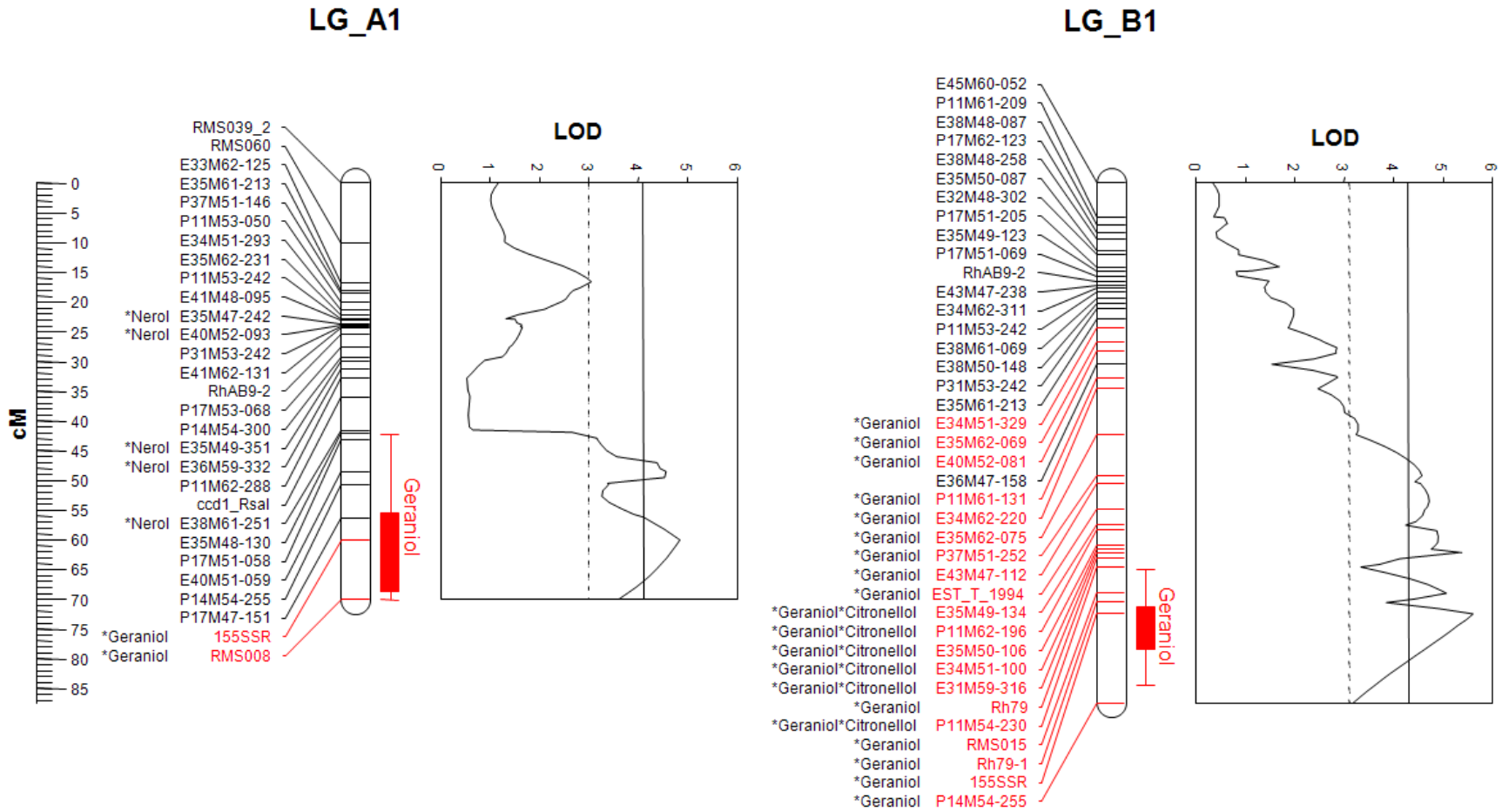


Abbildung 3. 13: Kopplungsgruppen 1 von 93/1-117 (A1) und von 93/1-119 (B1), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*.

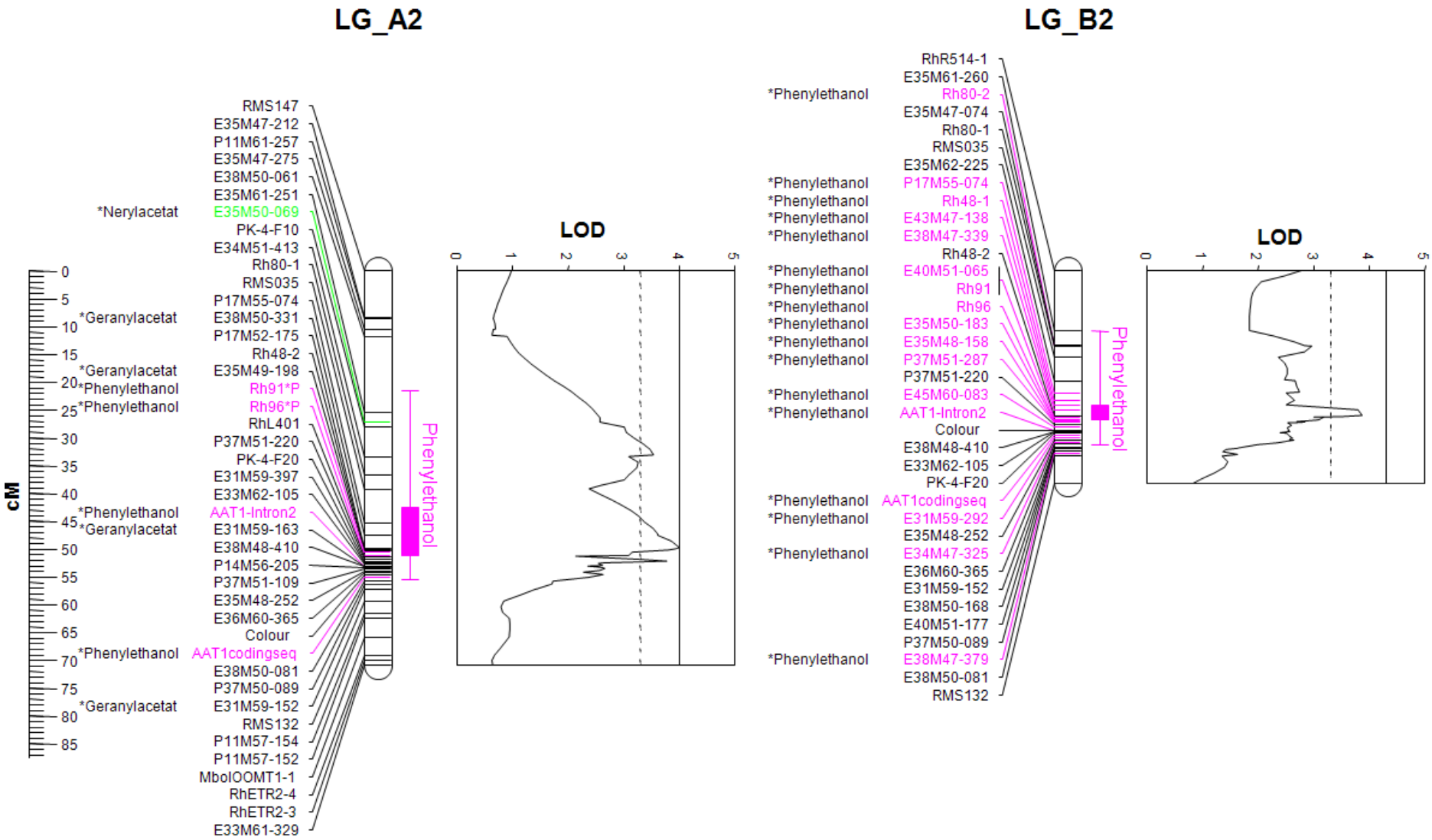


Abbildung 3. 14: Kopplungsgruppen 2 von 93/1-117 (A2) und von 93/1-119 (B2), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*

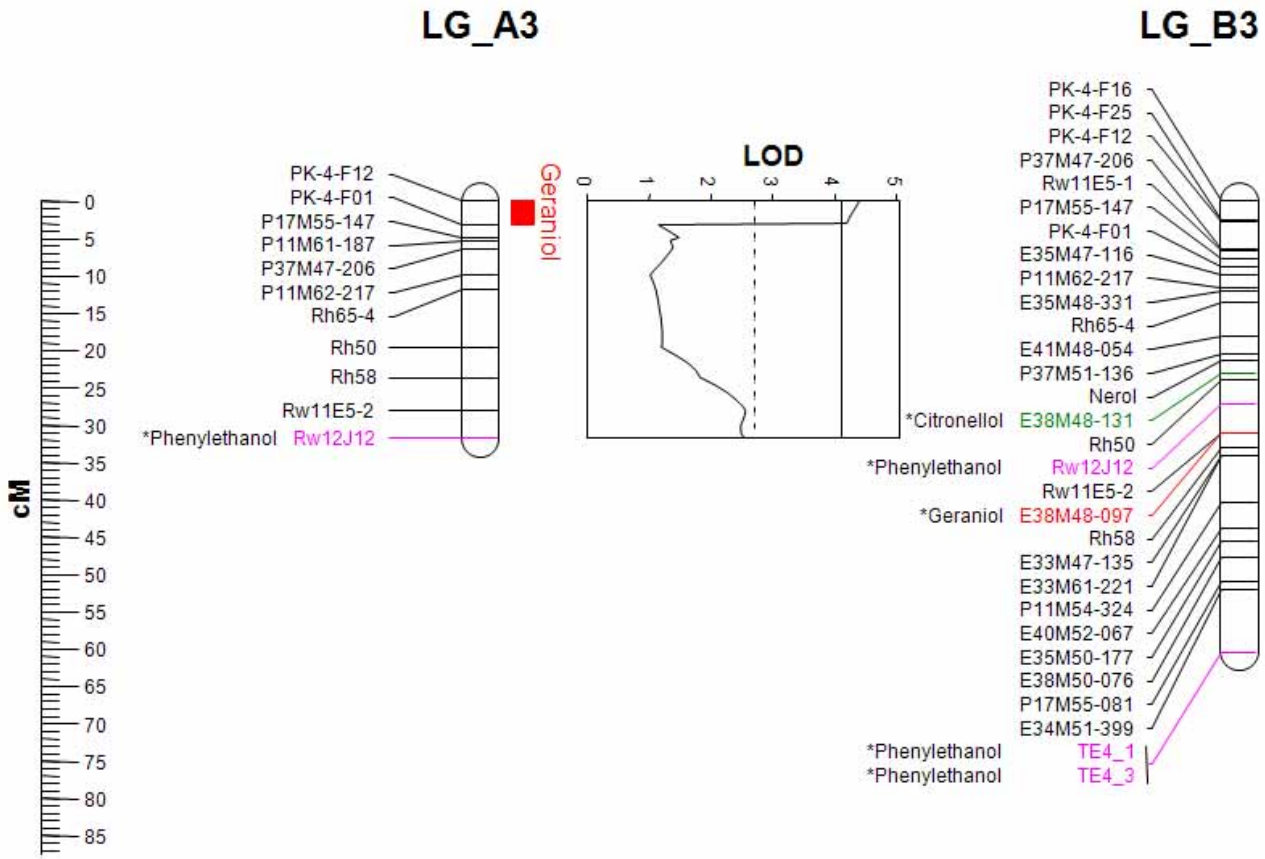


Abbildung 3. 15: Kopplungsgruppen 3 von 93/1-117 (A3) und von 93/1-119 (B3), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*,

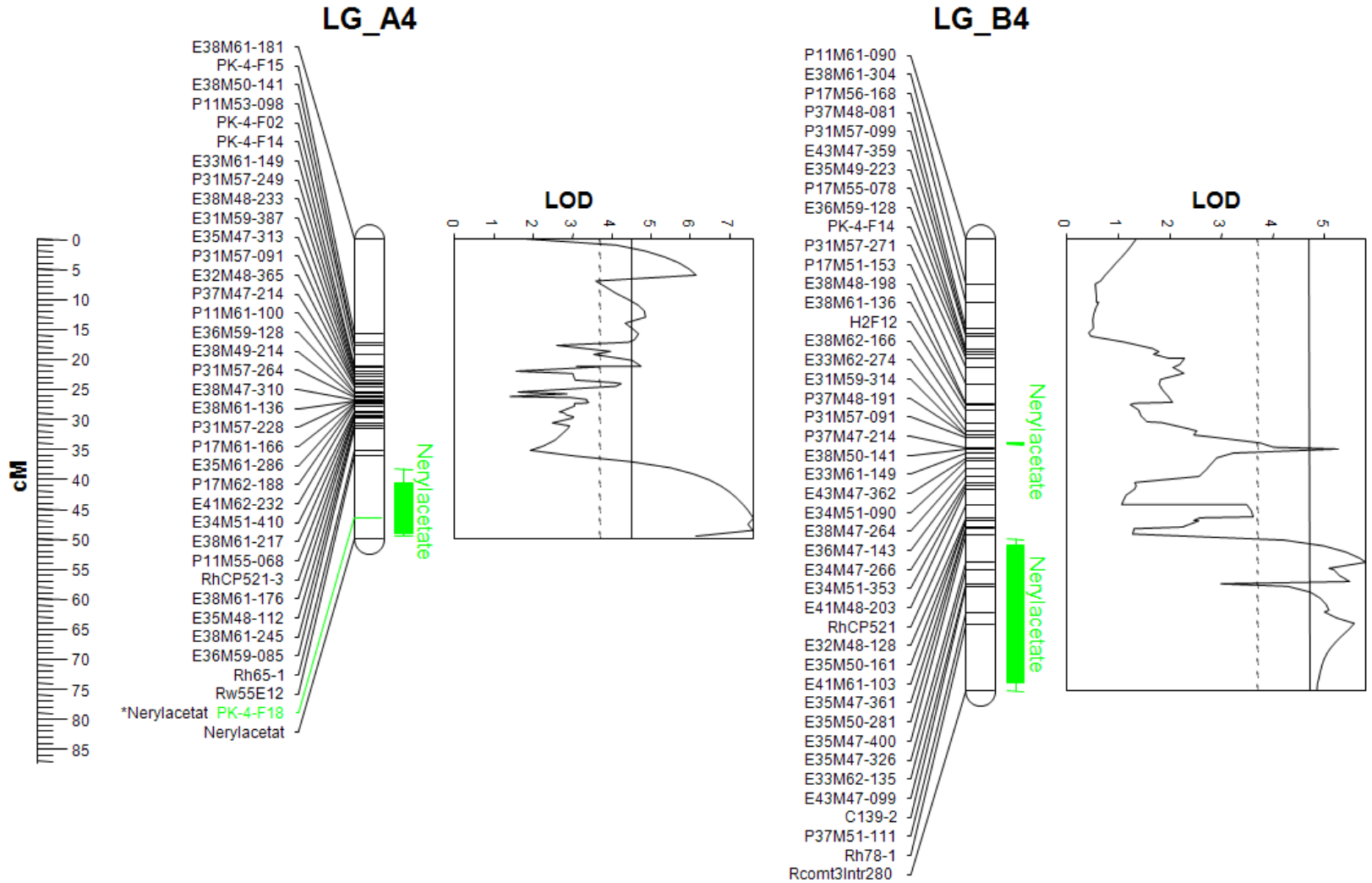


Abbildung 3. 16: Kopplungsgruppen 4 von 93/1-117 (A4) und von 93/1-119 (B4), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*,

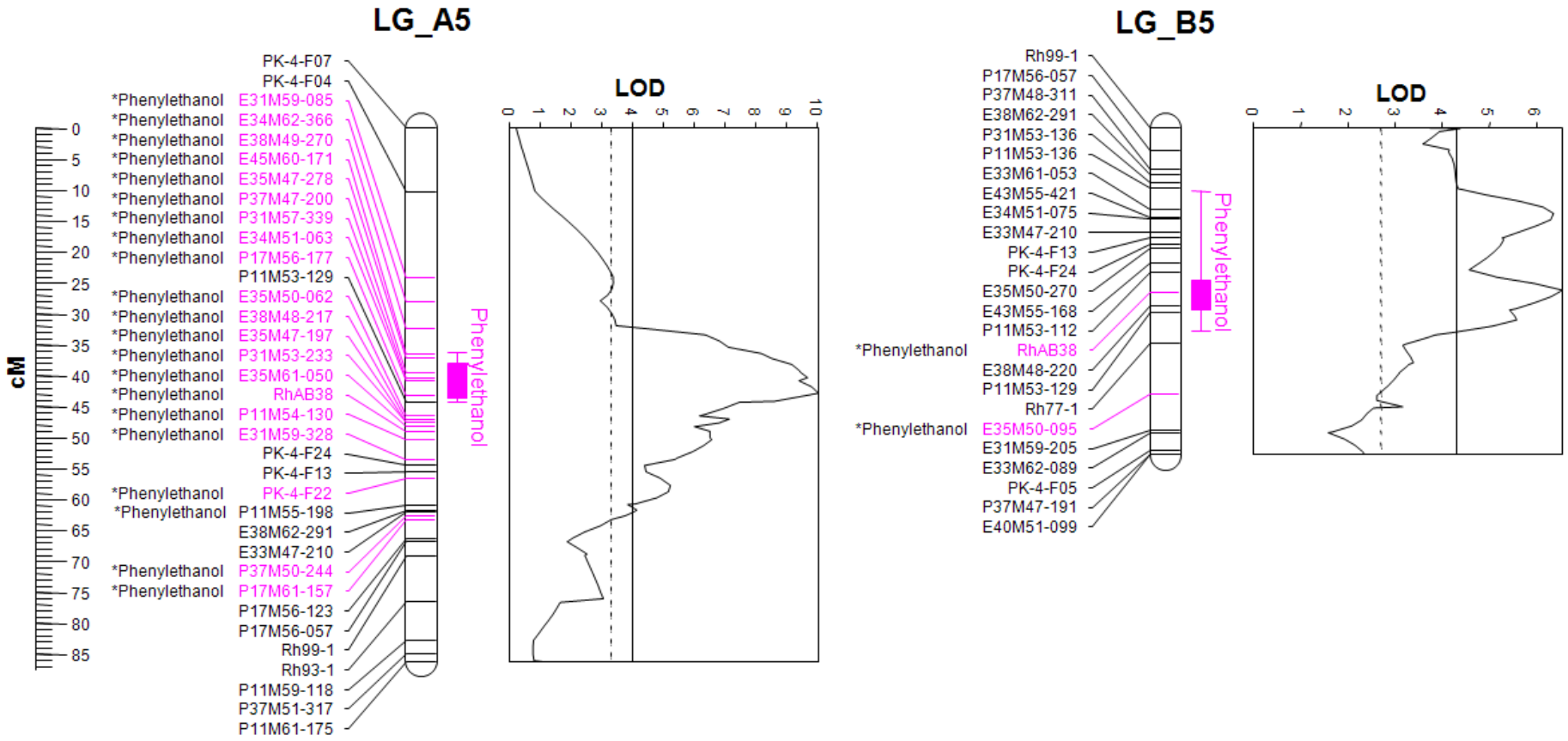


Abbildung 3. 17: Kopplungsgruppen 5 von 93/1-117 (A5) und von 93/1-119 (B5), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*

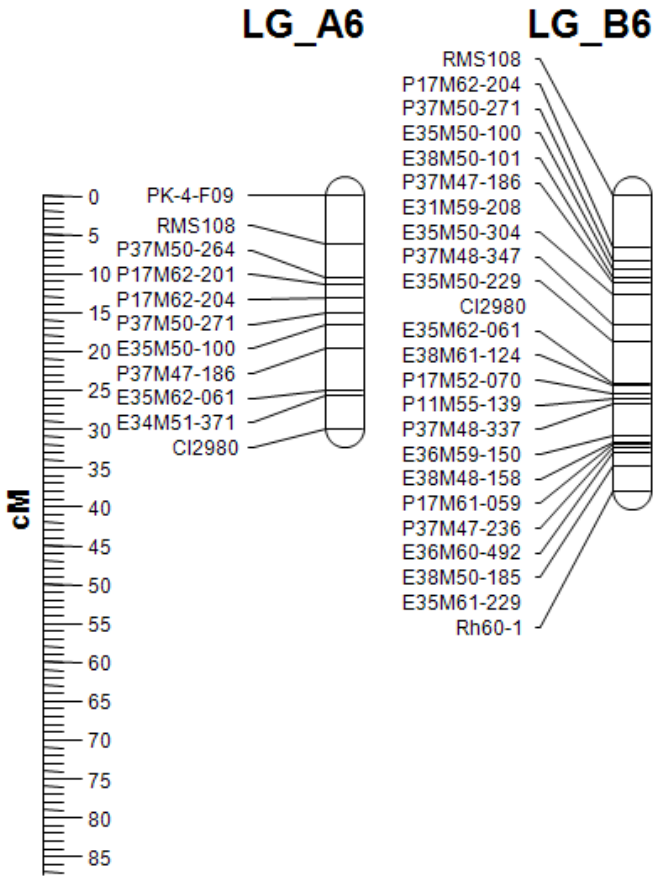


Abbildung 3. 18: Kopplungsgruppen 6 von 93/1-117 (A6) und von 93/1-119 (B6), keine signifikanten QTL

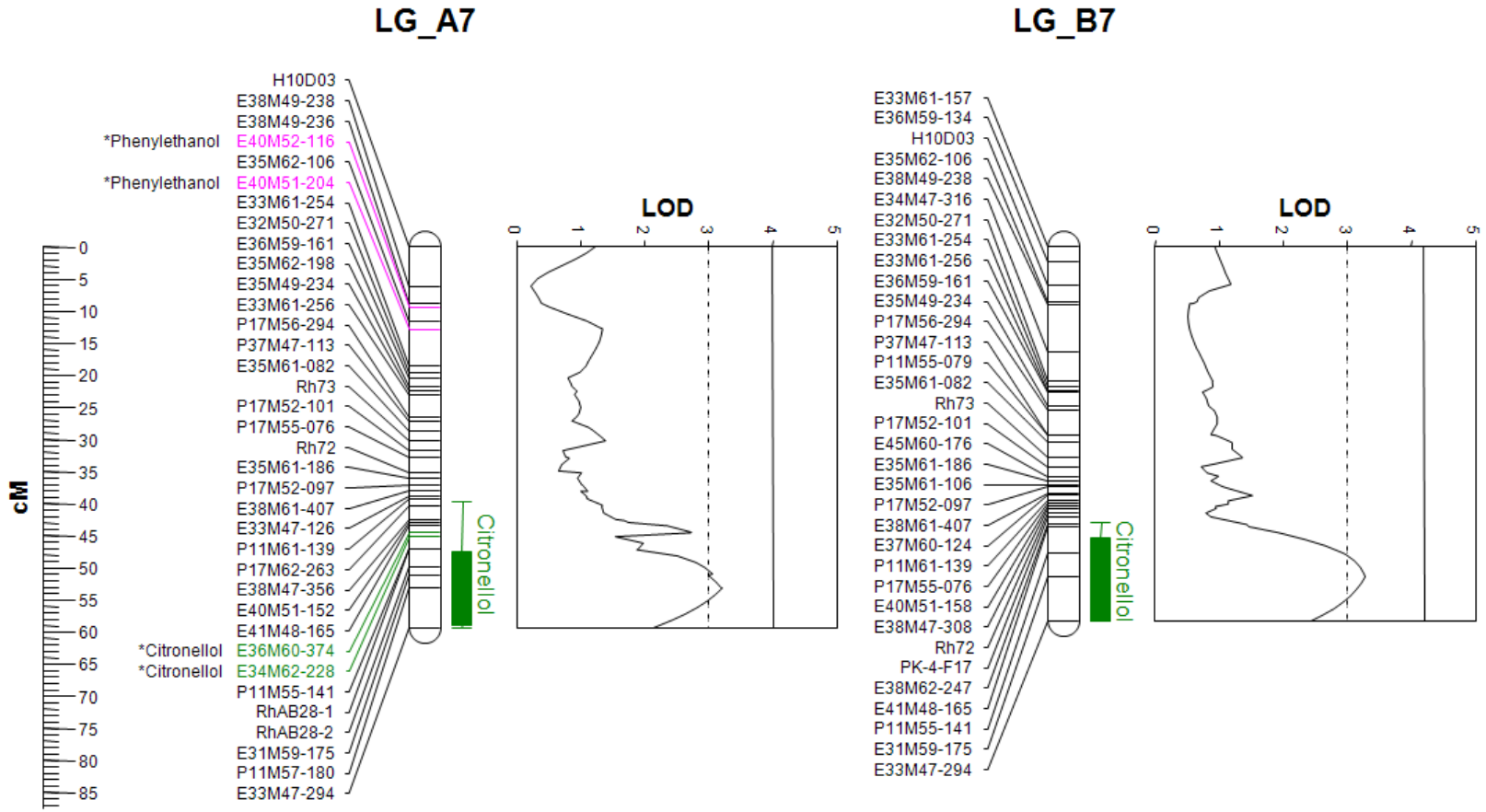


Abbildung 3. 19: Kopplungsgruppen 7 von 93/1-117 (A7) und von 93/1-119 (B7), Kruskal-Wallis signifikante Marker für Duftstoffe (*<Duftstoff>) und QTL-Regionen nach *Interval Mapping*

Der jeweilige Einfluss der QTL auf die Ausprägung des Merkmals kann nur für die Marker geschätzt werden (Tabelle 3.11). Es wird nur der Einfluss der Marker auf die Ausprägung des Merkmals in diesem einen jeweils betrachteten Punkt angegeben.

Tabelle 3. 11: Geschätzter Einfluss der QTL auf die phänotypische Ausprägung der Duftsubstanzen

Kopplungsgruppe	QTL	LOD	Marker	% Einfluss auf den Phänotyp
A1, B1	Geraniol	5,6	155SSR RMS015 T_1994	23 %
B1	β-Citronellol	nur durch Marker signifikant	E35M49-134 155SSR	20 %
A2, B2	2-Phenylethanol	4	P17M52-175 PK-4-F20 Rh48-2	28%
A3	Geraniol	4,4	PK-4-F12	54 % nur durch Intervall
A4, B4	Nerylacetat	7,6	PK-4-F18	68 %
A5, B5	2-Phenylethanol	10	E38M49-270 P17M56-177 RhAB38	60%
A7, B7	β-Citronellol	3,2	E36M60-374 E34M62-228	15 % 8 %

3.5 Expressionsanalysen

Aus Petalen der Genotypen 93/1-117 und -119 und 35 Nachkommen der Population 94/1 wurden Gesamt-RNA extrahiert und Erst-Strang-cDNA synthetisiert. Es wurden Expressionsanalysen für die vor Beginn der vorliegenden Arbeit bereits bekannten Gene für Enzyme der Rosenduftbiosynthese (siehe nächster Punkt) durchgeführt. Zusätzlich wurden Sequenzen aus der SSH-Bank, die Ähnlichkeiten zu Genen der Duftbiosynthese aus anderen Pflanzen zeigen, auf ihre Expressionsprofile hin untersucht. Abschließend wurde noch einmal von 16 Pflanzen, die verschiedene Duftprofile zeigten (siehe Tabelle 3.13 und 3.14), RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Zur Untersuchung der Expression in verschiedenen Geweben aus Blättern, Sepalen, Petalen, Antheren und Pistill wurde aus der RNA aus den unterschiedlichen Organen von verschiedenen Genotypen cDNA synthetisiert, anschließend gepoolt, um ein möglichst allgemeines Bild der Expressionsprofile zu erhalten und um auf diese Weise festzustellen, ob sich die Expression der gewählten Sequenzen auf die Blüten beschränkt. Jede PCR wurde mindestens zweimal wiederholt. Bei Ausbleiben eines PCR-Produktes wurde dies zunächst als PCR Ausfall gewertet und erst nach dreimaliger Wiederholung des Experiments aus einem Fehlen des PCR-Produktes auf ein fehlendes RNA-Template geschlossen.

3.5.1 Expressionsmuster in verschiedenen Pflanzenorganen

Eine Expression der Strukturgene GermacrenD-Synthase und *POMT* und des ESTs c_125 konnte im gewebespezifischen Vergleich nicht nachgewiesen werden. Transkripte der ESTs T_1994, T_45, T_249 und T_81 wurden in allen Geweben nachgewiesen. *RcOMT3* wurde nur in Blättern exprimiert. G_189 und T_1410 in Blätter und in Petalen, T_189 ebenfalls in Stamen. *CCD1* und T_1161 nur in Petalen. Expression in Petalen und Antheren wurde für *OOMT1* und -2 und T_178 festgestellt. Transkripte von *EOMT*, c430 (*AATX*) und gg358 in Petalen, Antheren und Stamen. Transkripte für *RcOMT2* konnten in Blättern, Sepalen, Petalen und Antheren detektiert werden (Tabelle 3.12).

Tabelle 3. 12: Expressionsmuster der untersuchten Duftbiosynthesestrukturgene und ESTs aus der SSH-Bank in verschiedenen Organen

Gen/EST	Expression in Blättern	Sepalen	Petalen	Antheren	Pistill
RhAAT1cds	-	-	+	+	+
RhAAT1Intron	-	-	+	+	-
RhAAT1Intron2	-	-	+	-	-
RhAAT1complete mRNA sequence	-	-	+	-	-
OOMT1+2	-	-	+	+	-
EOMT(RcOMT1)	-	-	+	+	+
POMT	-	-	-	-	-
GDS	-	-	-	-	-
RcOMT2	+	+	+	+	-
RcOMT3	+	-	-	-	-
CCD1	-	-	+	-	-
c430(AATX)	-	+	+	+	+
T_178 BEAT-L	-	-	+	+	-
gg_358 F3H-L	-	-	+	+	+
G_189 N-MT-L	+	-	+	-	+
T_1161 AADC-L	-	-	+	-	-
T_1994 TPS-L	+	+	+	+	+
T_45 AAT-L	+	+	+	+	+
T_249	+	+	+	+	+
Estc_125 TPS-L	-	-	-	-	-
T_81 BEAT-L	+	+	+	+	+
T_1410 FT-L	+	-	+	-	-

3.5.2 Genotypspezifische Expression

Tabelle 3. 13: Genotypspezifische Expression von verschiedenen ESTs aus der SSH-Bank und untersuchten Duftbiosynthesestrukturgenen in Petalen, T_546, T_81, T_1306, T_78, T_3043, G_185, T_178, T_2724 und EOMT(RcOMT1) wurden in allen untersuchten cDNAs exprimiert

EST	Ähnlichkeit zu	Genotypen ohne Expression	Duftprofile
G_101	Valencene Synthase	93/1-117, 94/1-19, 23, 66	Keine Gemeinsamkeit
G_43	Transferase Familie	Verschiedene Transkripte, kein Transkript in 94/1-7, 35, 58, 63, 66, 75	Alle enthalten 2-phenylethylacetat, aber kein weiteres gemeinsames Profil
T_45	Alkohol Acyl Transferase	94/1-6	Enthält kein Nerylacetat u kein Nerol
T_546	Acetyl CoA-Benzoyltransferase	-	-
T_1161	Aromatic Aminoaciddecarboxylase	93/1-119	Enthält kein 2-Phenylethanol
T_1994	Terpensynthase	94/1-51	-
T_81	BEAT	-	-
T_1306	Triterpensynthase	-	-
T_249	Keine Ähnlichkeit	93/1-117, 119, 94/1-68	Keine Gemeinsamkeit
T_78	N-hydroxycinnamoyl/ Benzoyltransferase	-	-
T_3043	SAMT Familie	-	-
G_14	O-Methyltransferase	-	Kein Substrat vorhanden
G_185	FaAAT verwandt	-	-
G_189	N-Methyltransferase	93/1-117, 94/1-4, 19, 22, 23, 29, 51, 63, 66, 93 und unterschiedliche Transkripte	Kein Substrat vorhanden
T_178	BEAT	-	-
T_2724	Terpensynthase	-	-
T_1410	Farnesyltransferase	93/1-117, 119, 94/1-4, 19, 22, 29, 30, 31, 32, 43, 47, 51, 57, 58, 63, 66, 68	Alle enthalten kein β-Damaszenon und sehr wenig Nerylacetat
G_100	Keine Ähnlichkeit	94/1-51	-
OOMT1	Orcinol O-Methyltransferase	93/1-117, 119, 94/1-4, 21, 55, 56, 57, 63, 68, 79, 82, 89, 91	Kein Substrat vorhanden
OOMT2	Orcinol O-Methyltransferase	93/1-117, 119, 94/1-4, 16, 21, 55, 56, 57, 68, 79, 82, 89, 91	Kein Substrat vorhanden
RcOMT2 und 3	Kaffesäure O-Methyltransferasen	Nicht exprimiert	Kein Substrat vorhanden
POMT	Phloroglucinol-o-Methyltransferase	Alle bis auf **94/1-91**	Kein Substrat vorhanden
EOMT	Eugenol-O-Methyltransferase	-	Kein Substrat vorhanden
CCD1	Carotenoid Cleavage Dioxy-genase	93/1-117, 119, 21, 56, 57, 79, 89, 91	In zu geringen Mengen nachgewiesen
GDS	GermacrenD-Synthase	Nicht exprimiert	-

Es wurde eine Untersuchung der Expression der in den Karten platzierten ESTs aus der SSH-Bank und der Strukturgene in cDNA aus den Petalen von verschiedenen Genotypen durchgeführt. Dabei wurden im ersten Teil die Genotypen verwendet, die für die Subtraktive Hybridisierung verwendet worden waren. Es konnten verschiedene ESTs gefunden werden, die unterschiedlich exprimiert wurden (siehe Tabelle 3.13). Aus der Expression der ESTs konnte nur im Fall der T_1161 ein direkter Zusammenhang mit den Duftprofilen hergestellt werden. Im Elter 93/1-119 wird dieser EST nicht exprimiert und es konnte auch kein 2-Phenylethanol im Duftextrakt dieser Pflanze nachgewiesen werden. Die ESTs G_43, G_189 und T_1410 zeigten die größten Unterschiede im Expressionsmuster. Schon in der relativ geringen Anzahl von Nachkommen, aus deren Petalen cDNAs untersucht wurden, zeigten bis zu 15 Genotypen keine Expression. Die Duftbiosynthesestrukturgene *GDS*, *RcOMT2* und -3 wurden nicht exprimiert. Die *POMT* wurde nur in Petalen des Genotyps 94/1-91 exprimiert. Die *OOMT1* und -2 wurden in den Petalen der Eltern nicht exprimiert, in den Petalen aus Genotyp 94/1-4, 21, 55, 56, 57, 68, 79, 82, 89, 91 ebenfalls nicht exprimiert, die *OOMT1* zusätzlich nicht in Genotyp 63, die *OOMT2* zusätzlich nicht in Genotyp 16. Genotypen, die die *OOMTs* exprimierten, waren 94/1- 16 (*OOMT1*), 17, 47 und 63 (*OOMT2*). *EOMT* wurde in allen untersuchten cDNAs aus Petalen exprimiert.

Im zweiten Teilversuch wurde cDNA aus Petalen von Pflanzen synthetisiert, die sich durch besondere Duftprofile auswiesen (siehe Tabelle 3. 14). Es wurden Pflanzen ausgesucht, deren Duftprofile sich durch eine unterschiedliche Acetatzusammensetzung kennzeichneten. Daraufhin wurde die Expression der *RhAAT1* untersucht. Dabei wurden vier verschiedene Primerpaare verwendet, die an unterschiedlichen Stellen in der kodierenden Sequenz der RhAAT1 binden (s. Anhang). Ziel war es, durch den Vergleich der Expressions- mit den Duftprofilen der einzelnen Genotypen die für die RhAAT1 typische Acetylierungsreaktion zu finden. Postuliert wurde u. a. von Shalit et al. (2003), dass die RhAAT1 Geraniol als Hauptsubstrat verwendet, Citronellol und Nerol als Nebenaktivität auch acetyliert werden können. Guterman et al. (2006) konnten zeigten, dass RhAAT1 in transgenen Petunien in der Lage ist, auch 2-Phenylethanol zu acetylieren.

Durch die Untersuchungen wurde gezeigt, dass in den cDNAs aus den Petalen der Genotypen 93/1-117 sowie 119 nur Transkripte vorkamen, an die die Primerkombination RhAAT1-Intron binden konnte. Diese Primer umschließen dicht an den Intron/Exon Grenzen in der kodierenden Sequenz der *RhAAT1* das Intron (s. Anhang).

Tabelle 3. 14: Expressionsmuster für die untersuchten Primerkombinationen der RhAAT1; alle Extrakte aus den Nachkommen enthalten Geraniol, β-Citronellol, Nerol und 2-Phenylethanol

Genotyp	Duftprofil		RhAAT1 Expressionsmuster in Petalen			
	Nicht enthalten	Enthalten	RhAAT1 cds	RhAAT1 Intron	RhAAT1 Intron2	RhAAT1 complete mRNA
93/1-117	Kein β-Citronellol	Geranylacetat, Nerylacetat , Nerol, 2-Phenylethanol	-	+	-	-
93/1-119	Kein 2-Phenylethanol, kein Geranylacetat	Nerylacetat, Nerol, β-Citronellol	-	+	-	-
94/1-4	Kein Nerylacetat, kein Geranylacetat, kein Nerol, kein Phenylethylacetat		+	+	+	+
94/1-16	Kein Nerol und kein Nerylacetat	Geranylacetat, 2-Phenylethylacetat	+	+	+	+
94/1-17	Kein Nerol	Nerylacetat, Geranylacetat, 2-Phenylethylacetate	+	+	+	+
94/1-21	**Alle Acetate und Nerol enthalten**		-	-	-	-
94/1-47	Kein Nerylacetat	Geranylacetat, Nerol, 2-Phenylethylacetate	+	+	+	+
94/1-55	Kein Nerylacetat	Geranylacetat, Nerol, 2-Phenylethylacetate	+	+	+	+
94/1-56	Kein Geranylacetat	Nerylacetat, Nerol, 2-Phenylethylacetate	-	-	-	-
94/1-57	Kein Nerylacetat und kein Geranylacetat	2-Phenylethylacetate, Nerol	-	-	-	-
94/1-63	Kein Nerol	Nerylacetat, Geranylacetat, 2-Phenylethylacetate	+	+	+	+
94/1-68	Kein Nerylacetat	Geranylacetat, 2-Phenylethylacetate, Nerol	+	+	+	+
94/1-79	Kein 2-Phenylethylacetat	Geranylacetat, Nerylacetat, Nerol	-	-	-	-
94/1-82	Alle Acetate und Nerol enthalten, aber nur sehr wenig		+	+	+	+
94/1-89	Kein Nerylacetat, kein Geranylacetat, kein Nerol, kein 2-Phenylethylacetat		-	-	-	-
94/1-91	**Alle Acetate und Nerol enthalten**		-	-	-	-

In Tabelle 3.14 werden die unterschiedlichen Expressionsmuster der *RhAAT1* wiedergegeben. Anhand der verschiedenen Primerpaare, die alle an unterschiedlichen Stellen in der *RhAAT1* Sequenz binden, wurde untersucht, ob es sich bei den *RhAAT1* Transkripten um unterschiedliche Gene handelt. Mit Hilfe der verschiedenen Duftprofile der einzelnen Genotypen der Population 94/1 konnte festgestellt werden, dass mindestens zwei verschiedene Alkoholacetyltransferase Aktivitäten zu verzeichnen sind. Eine kann auf die Expression der *RhAAT* zurück geführt werden.

In allen Fällen sind alle benötigten Substrate in den Duftextrakten nachweisbar.

Es gibt Genotypen, in deren Petalen keine *RhAAT1* Expression nachzuweisen ist, obwohl in den Duftextrakten dieser Genotypen **alle** Acetate nachzuweisen waren (94/1-21 und -91).

In den Petalen der Genotypen 94/1-47, -55, -68 wird RhAAT1 exprimiert, trotzdem kann in den Duftextrakten kein Nerylacetat nachgewiesen werden, obwohl Nerol als Substrat vorhanden wäre. Geraniol und 2-Phenylethanol jedoch werden acetyliert.

In den Duftextrakten des Genotyps 94/1-4 sind **keine** Acetate nachweisbar, obwohl *RhAAT1* exprimiert wird.

3.6 Klonierung einer putativen Acyltransferase

In der SSH-Bank bzw. den aus der 454-Sequenzierung resultierenden EST-Contigs wurde durch Translation des in allen Acyltransferasen konservierten Aminosäuremotivs DFGWG (D'Auria, 2006) in alle möglichen Nukleotidabfolgen ein EST gefunden, das das vollständige DFGWG Motiv trägt. Dieser EST wird in beiden bei der Subtraktion zugrunde gelegten Pools exprimiert gefunden, obwohl er unter der Nummer T_2221 im „wenig Geranylacetat" Pool der 454 Sequenzen identifiziert wurde. Seine Expression ist also nicht für den Unterschied im Geranylacetatgehalt verantwortlich. Die untersuchte Sequenz ist unter SAMS *Rosa multiflora* Projekt MIRA_c430 zu finden. Mit 3'- und 5'-RACE wurden PCR-Fragmente aus dem 3' und 5' Bereich der entsprechenden RNA erhalten, kloniert und sequenziert. Dadurch wurde eine vollständige kodierende Sequenz des Contigs ermittelt. Bei der Sequenzierung des 3' Endes wurden zwei verschiedene poly-Adenylierungstellen gefunden, die sich um 33bp vor dem polyA unterschieden. Bei der Sequenzierung der 5'-RACE Produkte wurden drei unterschiedliche Versionen einer Sequenz gefunden (s. Anhang). Die Basenunterschiede zeigten sich ab Base 190 der assemblierten Gesamt-kodierenden Sequenz als heterogener Bereich. Ab Base 319 stimmten die Sequenzen wieder überein. Alle erhaltenen 5'-RACE Produkte zeigen im BLASTx von NCBI eine sehr starke Ähnlichkeit zu einer putativen Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase (gi|14334526| gb|AAK59460.1|) aus *Arabidopsis thaliana*.

3.6.1 Sequenzanalysen

Aus den Sequenzen die durch 3‘ und 5‘ RACE identifiziert wurden und der Sequenz des Originalcontigs wurde ein Assembly gebildet, nachfolgend mit *AATX* bezeichnet. Aus dieser Sequenz wurde mit Hilfe der Programme Expasy/Translate (www.expasy.org) und FGENESH (www.softberry.org) offene Leserahmen (ORF) gesucht. Der Längste ohne unterbrechendes Stop-Codon und das DFGWG-Motiv tragende ORF wurde anschließend als kodierende Sequenz gewählt. Dieser ORF hat eine Länge von insgesamt 1905 Nukleotiden und kodiert für ein Protein von 434 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht dieses Proteins wurde durch das Kalkulationswerkzeug von Encor Biotechnology (http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm) mit 47,35 kDa berechnet. Die Aminosäureabfolge codiert laut NCBI CCD (suche nach konservierten Bereichen in einer Aminosäuresequenz, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) ab Aminosäure 15 bis 434 für ein Protein aus der Transferase Superfamilie pfam02458 (siehe Alignment in Abbildung 3.20). Diese Familie besteht aus einer Anzahl von Transferaseenzymen. Sie schließen sowohl die N-hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferasen z.B. aus Tabak oder Paprika, als auch die Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (DAT) ein. Dabei trägt der neue ORF neben dem für alle Acyltransferasen charakteristischen Motiv DFGWG auch das zweite etwas weniger konservierte Acyltransferase Motiv HXXXD, das wahrscheinlich für die Substratbindung verantwortlich ist (D'Auria, 2006).

Über BLASTp mit der Aminosäuresequenz oder BLASTx mit der putativen konsensus *AATX*-mRNA wird die putative Taxadien-5-alpha-ol O-Acetyltransferase (gi|223550250|gb|EEF51737.1|) aus *Ricinus communis* mit 76 % Ähnlichkeit als ähnlichstes Protein angegeben. Diese Aminosäuresequenz wurde bis heute noch nicht in ihrer Funktionalität getestet (siehe Abbildung 3.20).

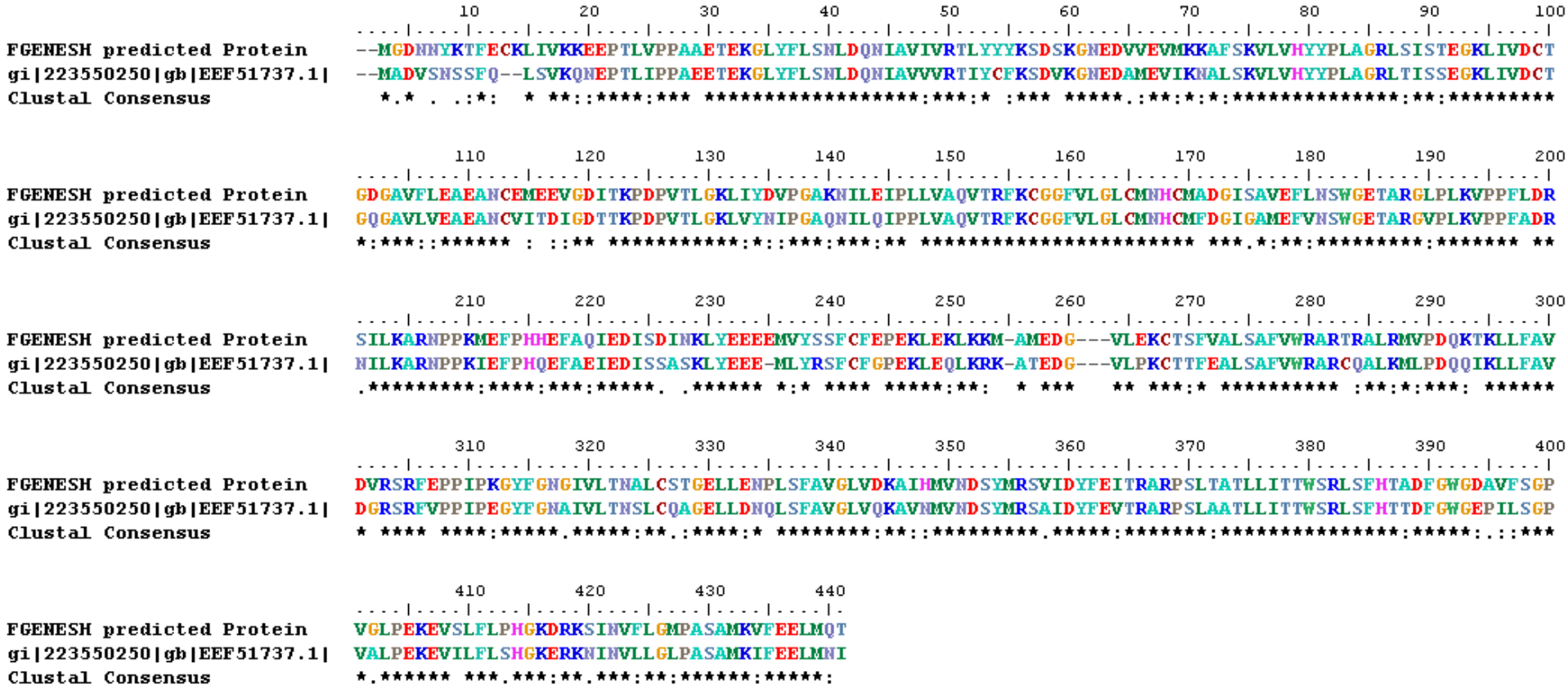


Abbildung 3. 20: Alignment der Aminosäuresequenzen der AATX und der putativen Taxadien-5-alpha-ol O-Acetyltransferase aus *Ricinus communis.* Die beiden Sequenzen zeigen 77 % Ähnlichkeit zueinander. Sie tragen beiden das für Acyltransferasen stark konservierte Motiv DFGWG bei Aminosäure 389 und das zweite für Acyltransferasen charakteristische Motiv HXXXD bei Aminosäure 168, dabei trägt die putative Taxadien-5alpha-ol Acetyltransferase anstelle des Alanin an der vierten Position ein Phenylalanin.

Anhand der Sequenzähnlichkeiten der Transferase-Superfamilie zu der AATX Aminosäuresequenz zugeordnet wird, ist es möglich Rückschlüsse auf die Substratspezifitäten zu ziehen. Die einzelnen Acyltransferasen bilden je nach Substratspezifität Cluster in einem *Neighbour-joining* Baum (D'Auria, 2006).

Um eine Vorabschätzung der Substrate und Kosubstrate der neuen AAT-Sequenz durchzuführen, wurden daher die Aminosäuresequenzen der bislang bekannten und in ihrer Funktionalität bewiesenen Acyltransferasen als Vergleichssequenzen für die Verwandtschaftsanalyse genutzt. Diese Sequenzen nach D'Auria (2006, aktualisiert) wurden mit der Aminosäuresequenz der AATX in ClustalX ein Alignment durchgeführt. Anschließend wurde über die Phylogeny Funktion in MEGA 4 ein *Neighbour-joining* Baum mit 1000 Bootstrap Wiederholungen gerechnet (siehe Abbildung 3.21).

Die BAHD-Acyltransferasen können anhand des Baums in fünf Gruppen eingeteilt werden. Die neue AATX Sequenz fällt dabei in die Gruppe der Enzyme der Aromabiosynthese. Diese Enzyme nutzen sowohl Benzoyl-, Cinnamoyl- und Acetyl-Coenzym A als Kosubstrate und in der Regel kurzkettige Alkohole als Substrate.

3.6.2 Analyse der Genfunktion durch heterologe Expression in *E. coli*

Die vollständige Protein kodierende Sequenz vom Start bis zum Stop Codon wurde über eine PCR aus Petalen-cDNA erhalten. Die Primersequenzen wurden laut Protokoll für den Vektor pET101/D TOPO erstellt. Das PCR-Produkt wurde in pGEM T-easy ligiert und in *E. coli* DH10B transformiert. Nachdem durch eine Resequenzierung die Sequenz verifiziert wurde, wurde das Plasmid aufgereinigt und über eine Chemotransformation in den Expressionsstamm *E. coli* BLR DE3 überführt.

Anschließend wurde laut Protokoll der Firma Invitrogen für den Vektor pET101/D-TOPO eine Pilotexpressionsstudie durchgeführt.

Nach 0 h, 2 h, 4 h und 16 h wurden von jeder Kultur 500 µl abgenommen, pelletiert und bei -20 °C eingefroren. Die Zellpellets wurden nach Vorgabe des Protokolls lysiert und Proteinproben aus den Zelltrümmern und dem Überstand der Zellen gewonnen. Die Gesamtproteinmenge in den Proben wurde nach Bradford (1974) mit dem Proteinassay Reagenz der Firma Biorad ermittelt. Als Standardreihe diente dabei BSA in 2, 4, 6, 8, und 10 µg Konzentrationen. Die Gesamtproteinmengen in den Proben konnten auf ca. 600 ng/ml interpoliert werden.

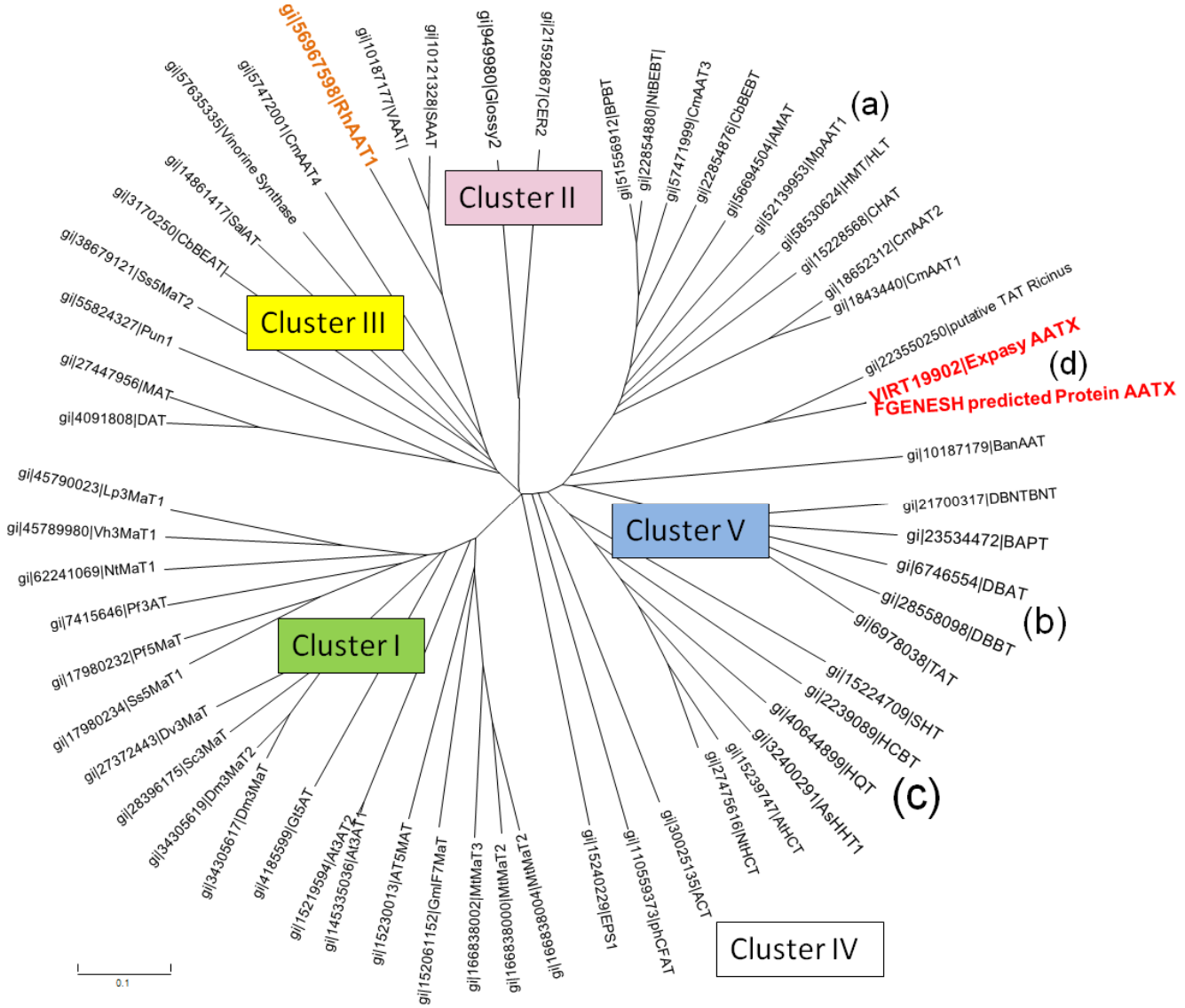


Abbildung 3. 21: Dendrogramm der BAHD Aminosäuresequenzen nach ClustalX Alignment und *Neighbour Joining*-Analyse mit MEGA 4 (1000 Bootstraps, ‚p-distance model', ‚pairwise deletion'). Cluster I: Malonyl-Coenzym A Acyltransferase, Cluster II: Enzyme der Sterolsynthese, Wachsbiosynthese, Cluster III Acetyl-Coenzym A Acyltransferasen, Cluster IV Acyltransferasen aus entfernten Stoffwechselwegen, Cluster V: Benzoyl-, Cinnamoyl- und Acetyl-Coenzym A Acyltransferasen, Untergruppen bezeichnet mit a, b, c und d (Erläuterung siehe Text)

Die Proteinproben wurden nach Angabe des Protokolls vorbereitet und auf einem 12 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, per Elektroblot auf eine Nitrozellulose Membran übertragen und anschließend über Immunfärbung sichtbar gemacht. Auf Abbildung 3.22 ist das Ergebnis der Immunfärbereaktion der Proben aus den BLR DE3 Zellen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine zusätzliche Bande bereits nach 2 h in der mit IPTG induzierten Probe sichtbar ist. Diese Bande entspricht einem Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von 45 kDa (48 kDa im direkten Vergleich mit dem Größenstandard minus 3 kDa für den *His-Tag*). Die Proteinproben aus den Zellpellets der BLR DE3 Zellen und der anderen getesteten *E. coli* Stämme lieferten ein ähnliches Ergebnis.

Es wurde für die weiteren Versuche der *E. coli* Stamm BLR DE3 gewählt, da dieser die besten Wachstumsraten zeigte (OD von 0,6 nach 2 h). Es wurde zur Induktion eine IPTG Konzentration von 0,5 M und eine Kulturzeit von 2 h nach Induktion der Expression bei 30 °C und 180 Upm gewählt.

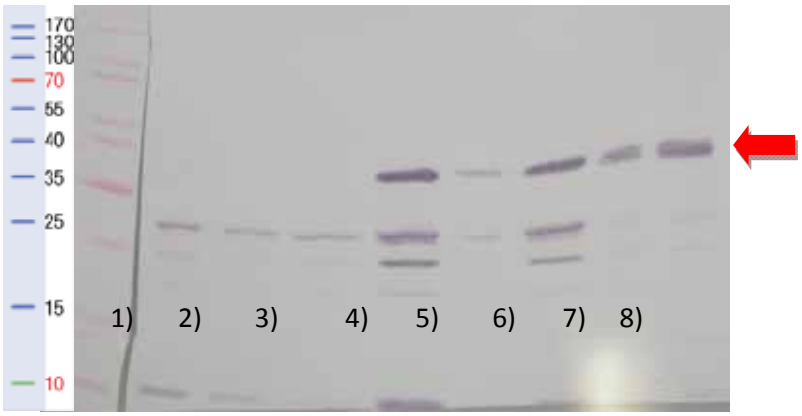


Abbildung 3. 22: Pilotexpression, Proteinanreicherung nach Induktion, Proben aus den Überständen nach Immunostain, 10 µl Probevolumen. Probenreihenfolge Proteinmarker von Fermentas, 1) Nicht induziert (0h), 2) induziert(0h), 3) nicht induziert(2h), 4) induziert(2h), 5) nicht induziert(4h), 6) induziert(4h), 7) nicht induziert(16h), 8) induziert(16h).

Zusätzlich wurde zur Kontrolle ein Gel mit der gleichen Probereihenfolge silbergefärbt. Die Bandenmuster unterschieden sich nicht zwischen den induzierten und nicht induzierten Proben.

Für die Herstellung ausreichender Menge an rekombinanten Protein für die Substratspezifitätstests wurden 50 ml BLR DE3 mit p101/D TOPO plus AATX Kultur induziert. Ein 5ml Aliquot nicht induzierter Kultur wurde als Negativkontrolle verwendet. Der Gesamtproteingehalt nach Bradford (1976) betrug erneut ca. 600 ng/ml. Zur Überprüfung der Anreicherung des rekombinanten Proteins wurden 5 µl der Proben auf einem 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend wie oben geblottet. Die Detektion erfolgte über einen 6x Anti-His Antikörper, an den ein zweiter, IRD_{700}-markierter Antikörper gebunden

war. Durch dieses Verfahren konnte das rekombinante Protein auf der Membran durch einen LI-COR® Odyssey Scanner sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 3.23).

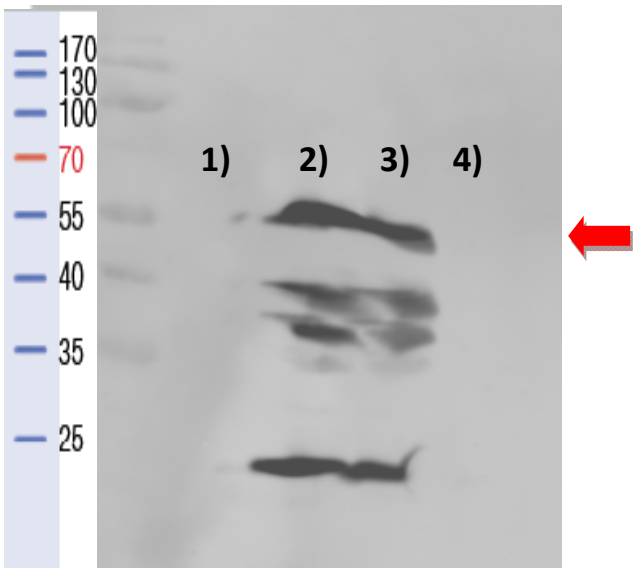


Abbildung 3. 23: Membran nach Inkubation mit Antikörpern. Von links nach rechts: ungefärbter PageRuler™ Protein Ladder (Fermentas) 5 µl, 1) 5 µl Proteinextrakt aus BLR DE3 transformiert mit pUC, 2) und 3) 5 µl Proteinextrakt aus BLR DE3 mit pET101/D TOPO mit AATX, 4) BLR DE3 ohne Plasmid.

Die oberste Bande (Pfeil) auf der Abbildung 3.23 entspricht der erwarteten Bande bei ca. 48 kDA. Die zusätzlich in den induzierten Proben vorhandenen Banden sind vermutlich durch Degeneration des rekombinanten Proteins entstanden. Zusätzlich wurde das Gel nach dem Blot mit PageBlue™ Protein Staining Solution von Fermentas Coomassie blau gefärbt (ohne Abbildung). Auch dort wird eine zusätzliche Bande des entsprechenden Molekulargewichts in den induzierten Proben deutlich.

3.6.3 Substratspezifitätstest

Nach Shalit et al. (2003) wurden mit dem rekombinanten Protein Substratspezifitätstests durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene kurzkettige Alkohole als Substrate und Acetyl-Coenzym A als Kosubstrat, wie unter 2.2. 4.7 beschrieben, getestet.

Durch Vergleich der Retentionszeit von Standardsubstanzen sollte eine Identifizierung des Umsetzungsproduktes, also des im Falle des Erfolgs produzierten Acetats ermöglicht werden. Mit der bis jetzt untersuchten Auswahl an Substraten konnte noch keine Aktivität nachgewiesen werden. In Tabelle 3.15 sind die bis jetzt untersuchten Substrate mit Produkten und Nachweisen aufgeführt. Diese Alkohole wurden von Shalit et al. (2003), von D'Auria et al. (2002 und 2007) und in Beekwilder et al. (2004) zur Analyse der Aktivität von putativen Acyltransferasen eingesetzt.

Tabelle 3. 15: Für Substratspezifitätstests verwendete Substrate (10mM), Kosubstrat war Coenzym A (0,2mM)

Substrat	Produkt	Referenz	Enzym
1-Butanol	1-Butylacetat	Shalit et al. (2003), Beekwilder et al. (2004)	
1-Hexanol	1-Hexylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002), Beekwilder et al. (2004)	
1-Octanol	1-Octylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002), Beekwilder et al. (2004)	
2-Phenylethanol	2-Phenylethylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002 und 2007), Beekwilder et al. (2004)	RhAAT1 in transgenen Petunien (Shalit et al. 2004)
Benzyl Alkohol	Benzylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002), Beekwilder et al. (2004)	BEBT (D'Auria, 2002)
β-Citronellol	Essigsäurecitronellylester	Shalit et al. (2003)	RhAAT1 (Shalit) 60 % Aktivität
Cis-3-Hexenol	Hexenylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002 und 2007)	CHAT (D'Auria, 2007)
Geraniol	Geranylacetat	Shalit et al. (2003), D'Auria et al. (2002 und 2007), Beekwilder et al. (2004)	RhAAT1 (Shalit) und SAAT (Beekwilder)
Isoamylalkohol	Isoamylacetat	Shalit et al. (2003), Beekwilder et al. (2004)	
Nerol	Nerylacetat	Shalit et al. (2003), Beekwilder et al. (2004)	RhAAT1 (Shalit) 15 % Aktivität

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Bestandteile des Blütendufts bei Rosen nach Mendelschen Gesetzen vererbt werden. In einer kontrollierten Umwelt lassen sich deutliche Unterschiede in den Duftprofilen einer spaltenden Nachkommenschaft und deren Eltern feststellen. Diese Unterschiede können nur auf die genetischen Unterschiede zurückzuführen sein. Mit Hilfe von molekularen Markern ist es möglich, auch in der praktischen Pflanzenzüchtung eine Selektion auf bestimmte Duftkomponenten durchzuführen. Für bekannte Strukturgene der Rosenduftbiosynthese wurden genetische Marker entwickelt. Die Lokalisierung dieser Gene und der neuen Loci für die Duftproduktion ermöglicht die Anwendung der markergestützte Selektion für diese Duftkomponenten.

4.1 Duftprofile

Der Blütenduft der Pflanzen ist aus vielen Komponenten zusammengesetzt (Dudareva und Pichersky, 2000). Die Duftprofile der in dieser Arbeit untersuchen Rosenpopulation wurden durch Phenylpropanoide, Terpenoide und Fettsäurederivate bestimmt.

Die Petalen der Eltern und Nachkommen der Population 94/1 enthalten Alkohole wie 2-Phenylethanol, Geraniol, Nerol und β-Citronellol. Auch enthalten die Petalen unterschiedliche Anteile an Acetaten der Monoterpenole und 2-Phenylethanol. Verschiedene andere, in sehr geringen Konzentrationen wirksame Duftsubstanzen wie die Fettsäurederivate β-Ionon und β-Damaszenon, konnten zusätzlich nachgewiesen werden. Die Analyse der Chromatogramme der Duftextrakte aus den Petalen der Elternpflanzen der Population 94/1 ergab signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Duftkomponenten, obwohl die beiden Genotypen Halbgeschwister sind. Während der Analyse der Nachkommenschaft wurden deutliche Unterschiede sowohl in der Zusammensetzung der Profile als auch in der Menge der enthaltenen Komponenten nachgewiesen. Alle Messungen wurden an Petalen im gleichen Stadium und unter gleichen Bedingungen mehrfach wiederholt durchgeführt. Die gemessenen Unterschiede müssen also auf die einzelnen Genotypunterschiede zurückzuführen sein. Auch konnten in der Analyse der Nachkommen Peaks detektiert werden, die nicht in den Extrakten der Eltern gefunden wurden. Durch die Kreuzung der Eltern kam es also zu Neukombination von Allelen oder durch additive Wirkung von Allelen zur Verstärkung von Enzymaktivitäten. Dies führt in den Nachkommen zur Produktion neuer Duftsubstanzen. Olbricht et al. (2008) fanden bei der Analyse einer spaltenden Modellpopulation von

Erdbeeren ein ähnliches heterogenes Vererbungsmuster der einzelnen Aromastoffe wie das der Duftsubstanzen in der vorliegenden Arbeit.

Die Identifizierung der Duftsubstanzen erfolgte für die Extrakte aus den Elterngenotypen über eine GC-MS Analyse. Für die Identifizierung der Peaks in der Hochdurchsatzanalyse wurden während der GC-Messungen die über GC-MS identifizierten Standardsubstanzen mit analysiert. Die Identifizierung der zusätzlichen Peaks wurde anhand einer Alkanreihe durch Berechnung der Kovats' Indices durchgeführt. Der Kovats' Index ist nur ein ungefährer Wert und kann die Substanzen nicht vollständig identifizieren. Es müssen weitere massenspektrometrische Analysen auch der Duftextrakte der Nachkommen erfolgen, um auch diese Substanzen eindeutig identifizieren zu können. Bino et al. (2004) fanden, dass durchschnittlich bis zu 70% der Peaks in einer GC-MS Analyse unidentifiziert bleiben. Insgesamt wurden 14 verschiedene Duftsubstanzen in den Extrakten ermittelt. Sechs dieser Substanzen wurden massenspektrometrisch eindeutig identifiziert und genetische Analysen zu ihrer Vererbung durchgeführt. Ein großer Anteil der Duftextrakte waren langkettige, unverzweigte Alkane (s. Tabelle 3.1). Durch den Extraktionsprozess werden alle polaren Stoffe aus den Petalen gelöst, auch zum Beispiel Wachse der Kutikula oder Fettsäuren. Auch Dunemann et al. (2009a/b) fanden in der Analyse der Aromakomponenten von Apfel mehr als 100 distinkte GC-Peaks, konnten jedoch nur 20 eindeutig identifizieren.

4.2 Kartierung

Die im Lauf dieser Arbeit berechneten Karten für die Populationen 94/1 und 97/7 stellen mit der großen Anzahl sequenzbasierter Marker ein verbessertes Werkzeug zur Untersuchung des Rosengenoms dar. Es konnten insgesamt 78 (94/1) und 57 (97/7) sequenzbasierte Marker in beiden Populationen vervollständigt, ausgewertet und kartiert werden. Die Genotypisierung erfolgte in der Population 94/1 für 99 Individuen und in der Population 97/7 für mehr als 170 Individuen. Die beiden diploiden Populationen konnten über 21 sequenzbasierte Marker miteinander verknüpft werden. Bis auf die Kopplungsgruppen 5 (nur ein verknüpfender Marker) konnten die Kopplungsgruppen sicher zugeordnet und auch durch die Verknüpfungen in ihrer Orientierung bestätigt werden. Die größte Lücke von ca. 27 cM auf den Karten befindet sich auf der LG3 der Population 94/1. Sie wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Selbstinkompatibilitätsfaktoren bedingt, die nur schwach durch die Verschiebung der Vererbung der einzelnen Allele miteinander koppeln. Die Lücke besteht zwischen zwei genetischen Markern für ESTs, die in der *Prunus* Referenzkarte 100 % mit dem SI Locus (Tamura et al., 2000) gekoppelt sind (Dissertation M. Bretzke).

Die hohe Dichte der Karten mit 1 Marker/cM (94/1) und 0,8 Marker/cM (97/7) eröffnet neue Möglichkeiten zur kartenbasierten Klonierung der Gene für die Blütenfüllung, die Blütenfarbe oder die Produktion der untersuchten Duftstoffe. Die Gesamtlänge der Karten bewegt sich, wie schon bei Debener und Mattiesch (1999), Yan et al. (2005), Linde et al. (2006) und Oyant et al. (2008), zwischen 400 und 650 cM. Die weiteren bislang konstruierten genetischen Karten für Rosen von Dugo et al. (2005), Crespel et al. (2002) und Rajapakse et al. (2001) zeigen Abweichungen. Dugo et al. (2005) berechneten ihre Karte mit nur 130 Markern. Die Karte von Crespel et al. wurde mit 91 Nachkommen und einer geringen Anzahl von 174 AFLP-Markern konstruiert, die Karte von Rajapakse et al. mit einer sehr geringen Anzahl von 52 Pflanzen einer tetraploiden Nachkommenschaft erstellt.

Durch die Lokalisierung von verschiedenen, bereits publizierten SSR-Markern in den Populationen 94/1 und 97/7 konnten die genetischen Karten dieser Populationen mit denen aus Oyant et al. (2008) verknüpft werden. Von den sieben homologen Kopplungsgruppen wurden fünf identifiziert und zugeordnet (siehe Tabelle 4.1). Dadurch wird es möglich, Merkmale, die auf dieser Karte lokalisiert sind, in den Populationen 97/7 und 94/1 indirekt zu nutzen.

In den Populationen 94/1 und 97/7 zeigte nur die Hälfte der untersuchten SSR-Marker aus Oyant et al. (2008) Polymorphismen. Die populationsübergreifende Nutzbarkeit von SSR-Markern liegt demnach hier bei 50 %. Zwischen den beiden *Rosa multiflora* Populationen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, war die Übertragbarkeit deutlich höher (ca. 80 %, Daten nicht gezeigt). Die Marker, die durch Oyant et al. (2008) entwickelt wurden, stammen aus einer anderen Art. Sie wurden aus einer Rosenknospen EST-Bank und einer genomischen Bank entwickelt, die aus *Rosa wichurana* bzw. *Rosa*-Hybriden entstanden sind.

Die verschiedenen genetischen Karten für Rosen, die in jeweiligen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Populationen und für unterschiedliche Ploidiestufen entwickelt wurden, können miteinander verknüpft und so eine allgemeingültige Rosen Konsensuskarte erstellt werden. Nach diesen Ergebnissen wird dazu eine große Anzahl sequenzbasierter Marker wie SSRs oder SCARs, die in allen Populationen gleichzeitig polymorph sind, benötigt.

Durch die Verknüpfung genetischer Karten von verschiedenen Populationen erhält man die indirekte Kopplung von zusätzlichen Markern an ein untersuchtes Merkmal. Man kann somit Nutzen aus Markern ziehen, die in der untersuchten Population entweder noch nicht eingebracht wurden oder nicht polymorph sind. Allerdings sind auf der Karte von Oyant et al. (2008), mit der die Karten der Populationen 94/1 und 97/7 verknüpft wurden, noch keine genetischen Einzelmarker für züchterisch relevante Merkmale kartiert, jedoch bestätigen die dort kartierten phänotypischen Loci die Lage der Genorte auf den Karten für die Populationen

94/1 und 97/7. Auf dieser Karte wurden ein QTL für Petalenanzahl und ein QTL für Blühzeitpunkt kartiert. Der QTL für Petalenanzahl wurde in der Population 94/1 auf der homologen Kopplungsgruppe lokalisiert (Debener et al., 2001). Eine allgemeingültige Konsensuskarte erleichtert die Sequenzierung des Rosengenoms. Klar lokalisierte genetische Marker helfen bei der Zuordnung der Sequenzabschnitte zu den einzelnen Kopplungsgruppen.

Tabelle 4. 1: Zuordnung der Kopplungsgruppen der Populationen 94/1 und 97/7 zu den Kopplungsgruppen der genetischen Karte von Oyant et al. (2008)

Kopplungsgruppe 94/1 und 97/7	Kopplungsgruppe bei Oyant et al. (2008)	Verknüpfende Marker	Besonderheiten auf der Kopplungsgruppe
Kopplungsgruppe 1	-	-	Rdr1, 155SSR, QTL für Geraniol
Kopplungsgruppe 2	Kopplungsgruppe 2, 6	Rw11E5, CL2996, H20G01	Blütenfarbe, *RhAAT1*
Kopplungsgruppe 3	Kopplungsgruppe 4	*Double flowers (Blfo)*, Rw12J12, Rh50, Rh58	SI-Locus, Nerol, QTL für Blütenfüllung und Blühzeitpunkt
Kopplungsgruppe 4	Kopplungsgruppe 3	Rw55E12, H2F12, C-139	QTL für Nerylacetat
Kopplungsgruppe 5	-	-	QTL für 2-Phenylethanol, Neben- QTL für Blütenfüllung
Kopplungsgruppe 6	Kopplungsgruppe 7	Cl2980, Rw22A3	-
Kopplungsgruppe 7	Kopplungsgruppe 5	H10D03	QTL für β-Citronellol

4.3 Vererbung der Duftsubstanzen

Die im Verlauf dieser Arbeit gefundenen QTL-Regionen sind die ersten beschriebenen QTL für einzelne Duftsubstanzen in Zierpflanzen. Stuurman et al. (2004) beschrieben erstmalig QTL für Duft in Petunien, nutzten dabei allerdings zur Evaluierung des Dufts die sensorischen Fähigkeiten von zwei Testpersonen. Dunemann et al. (2009a und b) beschrieben erstmals QTL-Regionen für Aromasubstanzen in *Rosaceae*. Sie detektierten in einer diploiden Apfelkreuzungsnachkommenschaft von 150 F_1 Pflanzen 50 QTL für 27 Aromakomponenten. Diese verteilen sich auf 12 der insgesamt 17 Kopplungsgruppen. Dunemann et al. konnten auch bereits erfolgreich die genetische Position von Kandidatengenen der Aromabiosynthese mit Positionen von QTL korrelieren (Dunemann et al., 2009a) . In Tomaten wurden bereits drei Studien zur quantitativen Vererbung von flüchtigen Substanzen durchgeführt (Causse et al. (2002), Tieman et al. (2006) und Mathieu et al. (2008)). In Rosen wurde bislang Bestachelung (Crespel et al., 2002), Resistenz gegen Echten Mehltau (Linde et al., 2006, Dugo et al. 2005), Blühzeitpunkt, Petalenanzahl, Blütengröße und Blattfläche als quantitative Merkmale kartiert

(Crespel et al., 2002; Dugo et al., 2005; Oyant et al., 2008). QTL für Petalenanzahl und Blühzeitpunkt befinden sich ebenso wie die meisten QTL für Mehltauresistenz auf der LG3 oder der homologen Kopplungsgruppe anderer Populationen. Ein zweiter Haupt-QTL für die Resistenz gegen Echten Mehltau befindet sich im oberen Bereich der LG4 (Linde et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die QTL-Kartierung mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt: durch den nicht-parametrischen Rangsummenvergleich über Kruskal-Wallis und durch die *Interval Mapping* Methode nach Lander und Botstein (1989). Es wurden keine fortgeschrittenen QTL-Detektionsmethoden wie *Multiple QTL Mapping* (MQM) oder *Composite Interval Mapping* (CIM), bei denen die Bestimmung von Kofaktoren notwendig ist, durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit war nicht die Detektion von vielen Neben-QTL das Ziel, sondern die generelle Identifizierung von genomischen Regionen mit Einfluss auf die Duftbiosynthese. Für eine solche Studie war die genutzte Rosenpopulation gut geeignet. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen QTL wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen (Klimakammer) detektiert. Bei einer kleinen Stichprobe und einer beschränkten Umwelt werden nur die stärksten Effekte nachgewiesen (Kearsey and Farquhar, 1998). Dies führt zu der Annahme, dass die Bereiche, die in dieser Population signifikant erscheinen, entweder Strukturgene enthalten oder stark regulatorischen Einfluss nehmen. In der untersuchten Rosenpopulation wurden Marker mit signifikantem Einfluss auf den Gehalt an Duftsubstanzen nachgewiesen. Um diese Hypothese zu stützen, sollten diese Marker in anderen Populationen und unter anderen Umweltbedingungen getestet werden. Die meisten der QTL-Regionen, die im Rahmen dieser Arbeit durch *Interval Mapping* detektiert werden konnten, werden auch durch den signifikanten Einfluss der Marker direkt gestützt. Die Intervall-Kartierung beruht auf den Frequenzen einer Anzahl von benachbarten Markern und einem von zwei Markern flankierten vermutlichen QTL. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit, dass ein QTL an dieser Stelle vorliegt, gegen die Wahrscheinlichkeit, dass kein QTL vorliegt, abgeschätzt und der daraus resultierende log Likelihood als LOD score Kurve an der Kopplungsgruppe abgetragen. Die wahrscheinlichste Position für einen QTL liegt dabei am höchsten Punkt dieser Kurve. Bei dieser Methode wird das Auftreten von doppelter chromosomaler Rekombination (‚*Double Crossing-Over'*) ignoriert. Es wird angenommen, dass die Marker so dicht aneinander gekoppelt sind, dass keine Interferenz auftritt. Daraus resultiert, dass das Vorkommen von gekoppelten QTL, die Interaktionen zwischen benachbarten QTL oder die Einflüsse von anderen QTL auf den aktuell betrachteten nicht deutlich werden. Dies kann sich in Überlagerung von zwei benachbarten QTL auswirken, in gegenseitiger Unterdrückung oder in Ausprägung von einem Zwischen-QTL („Ghost-QTL") der aus zwei dicht benachbarten QTL resultiert, deren Frequenzen sich überlagern und so eine intermediäre QTL-Position schaffen

(Kearsey, 1998) . Diese Effekte können auch während der Berechnung der QTL in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. An einigen Stellen scheint es dicht benachbarte QTL zu geben, die sich in einer zwei- oder mehrgipfligen LOD-Kurve zeigen. Diese Bereiche wurden als ein QTL gewertet (Abbildung 3.13 A und B, 3.14 A und B, 3.16 A und B, 3.17 B). Ebenfalls kann durch die geringe Individuenanzahl der betrachteten Kartierungspopulation die Anordnung der Marker in sehr dichten Regionen nicht abgesichert werden. Dies hat zur Folge, dass QTL-Regionen wie zum Beispiel der QTL für Nerylacetat auf LG4 keine stetige LOD-Kurve zeigen. Obwohl die in dieser Arbeit detektierten QTL in anderen Umwelten und in anderen Kartierungspopulationen abgesichert werden müssen, kann die genetische Information hinsichtlich der Kartenpositionen der QTL für weitere genetische Analysen und Züchtungsprogramme bereits genutzt werden. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Linde et al. (2006), Oyant et al. (2008), Shepherd et al. (1999) und Dunemann et al. (2009a und b) wurden in der vorliegenden Arbeit keine chromosomalen Regionen identifiziert, die Einfluss auf mehrere quantitative Merkmale zeigen. Die QTL-Regionen in der vorliegenden Arbeit waren auf fünf von sieben Kopplungsgruppen verteilt und zeigten, bis auf den QTL für Geraniol auf LG1, der viele auch für β-Citronellol signifikante Marker enthält, nur Einfluss auf jeweils eine Duftkomponente. Daher kann für die Ergebnisse dieser Arbeit nicht von pleiotropen Effekten von chromosomalen Regionen auf mehrere Substanzen gesprochen werden. Durch die Lokalisierung der QTL auf den genetischen Karten der Eltern der Population 94/1 werden die Zusammenhänge der Substanzen zueinander (aufgrund gemeinsamer Biosynthesewege) nicht deutlich. Die Lokalisierung der QTL deutet vielmehr auf Strukturbiosynthese-Loci oder stark regulatorische Elemente für die Einzelsubstanzen hin.

4.3.1 Geraniol

Geraniol wird quantitativ vererbt. Die Duftextrakte der Elterngenotypen enthielten beide Geraniol, die Duftextrakte aller Nachkommen ebenfalls. Der QTL für Geraniol auf LG1 (siehe Abbildung 3.13) zeichnet sich durch eine hohe Signifikanz und viele im Kruskal-Wallis Test signifikante Einzelmarker aus, die einen Einfluss auf die Ausprägung des Geraniolgehalts haben. Das „c“-Allel des in der Population 94/1 <abxcd> spaltenden Markers 155SSR ist z.B. einer 50 %igen Erhöhung des Geraniolgehalts zuzuordnen. Die Sequenz dieses Markers ist bekannt. Es handelt sich um einen SSR, der 100 % an die Sternrußtauresistenz gekoppelt ist (Biber et al. eingereicht). Dies hat augenscheinlich keinen Zusammenhang mit der Produktion von Geraniol. Die gesamte Region befindet sich auf einem DNA-Abschnitt, der bereits in einem Genotyp einer *Rosa multiflora* Hybride sequenziert wurde. In dieser Region befindet sich eine Anzahl von RGAs(RGA= Resistenzgenanalogon), deren genaue Funktion zurzeit geklärt wird (Debener, persönliche Mitteilung). Es konnte in dieser Region in der Population 94/1 bereits

ein EST mit Terpensynthaseähnlichkeit kartiert werden (T_1994 – Farnesyltransferase-ähnlich). Ebenfalls liegen in dieser Region auch Gene für Transkriptionsfaktoren. Diese stellen Kandidatengene für regulatorische Elemente in der Geraniolbiosynthese dar. Die LOD-Kurve dieses QTL verläuft mit zwei Maxima. Dies könnte bedeuten, dass an dieser Stelle im Genom sich zwei QTL-Regionen befinden, die sich gegenseitig beeinflussen. Aufgrund der geringen Individuenanzahl ist eine höhere Auflösung dieser Region in dieser Population nicht möglich. Jedoch geben die Signifikanz dieser Region in beiden Eltern und das Vorhandensein der signifikanten Einzelmarker deutliche Hinweise auf ein Strukturgen in dieser Region. Außerdem zeigt der Geraniolgehalt in den Duftextrakten signifikante Zusammenhänge mit dem Geranylacetatgehalt und mit dem Nerylacetatgehalt. Dies bestätigt das Biosynthesemodell. Das Schlüsselenzym zur Produktion von Geraniol ist eine Geraniolsynthase (Abbildung 4.1); ein solches Enzym wurde bislang in Rosen noch nicht identifiziert.

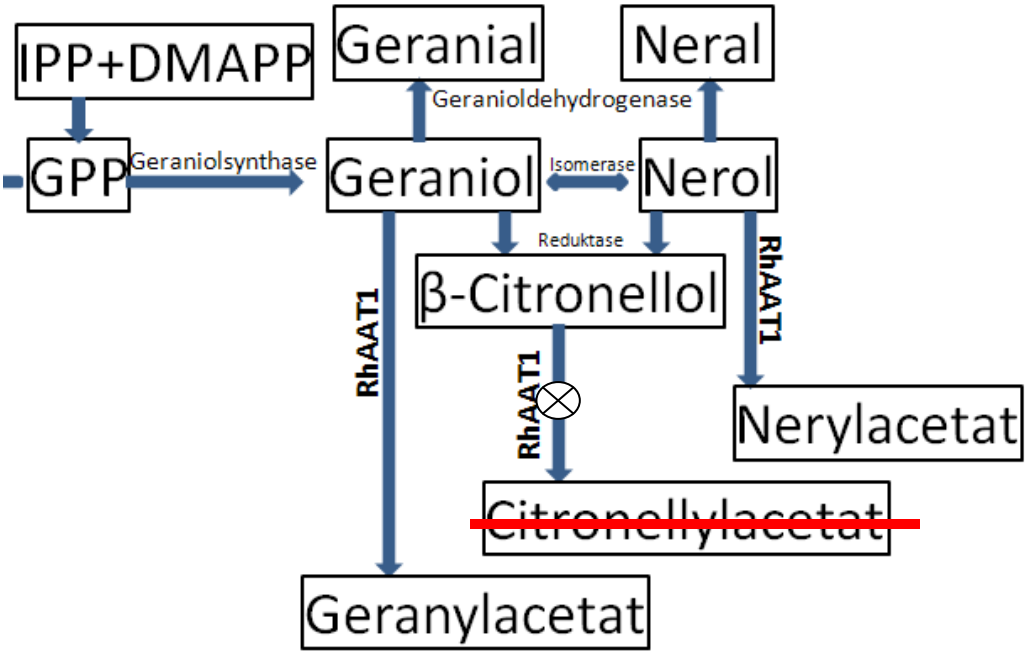


Abbildung 4. 1: Teil der Terpenoidsynthese, der zu den in den in dieser Arbeit untersuchten Genotypen gefundenen Terpenoiden führt. β-Citronellol wird nicht acetyliert. Geraniol und β-Citronellol wurden in ausnahmslos allen Duftextrakten nachgewiesen. Nerol spaltet monogen 3 zu 1, Nerylacetat und Geranylacetat werden durch mindestens zwei Faktoren reguliert.

4.3.2 Nerol

Das Merkmal „Vorkommen von Nerol in den Duftextrakten“ der Population 94/1 spaltete im Verhältnis 3 zu 1. Die Spaltung ist mit 56 zu 32 (Nerol in Duftextrakt vorhanden vs. Kein Nerol vorhanden) nur sehr knapp signifikant. Dies spiegelte sich in der Position des Hauptlocus für Nerol wieder. Er kartiert in unmittelbarer Nähe zu anderen Markern mit ähnlich gestörter Segregation wie *doubleflowers* (Blfo), Rh50 und Rh58 auf LG3 (Abbildung 3. 10 und 15). Die

Spaltung der gesamten Region wird durch die Anwesenheit von Selbstinkompatibilitätsfaktoren verschoben (Dissertation M. Bretzke).

Gene, die die Synthese von Nerol direkt katalysieren könnten, wären einerseits eine Geraniol Isomerase und andererseits eine Nerylpyrophoshatsynthase (Banthorpe et al., 1972). Enzyme, die diese Funktionen ausführen, wurden bislang weder in Rosen noch in anderen Pflanzen identifiziert. Wenn hinter der Bildung von mehr Nerol die Bereitstellung von mehr Geraniol, stehen würde, müsste ein stark positiver Zusammenhang in den Korrelationsanalysen zu finden sein. Es besteht zwar der starke positive Zusammenhang zwischen Geraniol und Nerylacetat sowie ein positiver Zusammenhang zwischen Nerol und Nerylacetat, aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen Geraniol und Nerol. Banthorpe et al. (1972) postulieren entweder die Existenz von Prenyltransferasen, die Geranylpyrophosphat oder Nerylpyrophosphat bilden können oder die Existenz einer Prenyltransferase, die beide Isomere bilden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die erste Hypothese. Die Bildung von Nerol war unabhängig von der Geraniolbildung.

4.3.3 β-Citronellol

Für β-Citronellol befindet sich ein signifikanter QTL auf LG7 der Population 94/1 (siehe Abbildung 3.19). Dieser QTL erklärt nur einen kleinen Teil der phänotypischen Varianz (15 %). Auf dieser Kopplungsgruppe wurde außer dem zweiten Faktor für Geranylacetat (s. 4.2.6.a)) kein weiteres Element der Duftbiosynthese detektiert. Ebenfalls fanden sich mehrere im nicht parametrischen Verfahren signifikante Marker für β-Citronellol im unteren Bereich von LG1 (siehe Abbildung 3.13), in dem auch der Haupt-QTL für Geraniol lokalisiert ist. Dieser Bereich hatte einen starken Einfluss auf die Ausprägung von Geraniol und β-Citronellol. Er erklärt 20 % der phänotypischen Variation des β-Citronellolgehalts an diesem Locus. β-Citronellol wird aus Geraniol gebildet. Entweder ist dort ein Schlüsselelement in der Regulation der Terpenbiosynthese lokalisiert oder zwei Enzyme zur Produktion von β-Citronellol, eine Geraniolsynthase und eine Geraniolreduktase. Oder es befindet dort ein Faktor der Regulierung der Bereitstellung eines allgemeinen Substrats (siehe Abbildung 4.1). Es könnte die Regulation der Produktion von GPP oder einer früheren Stufe der Biosynthese sein, beispielsweise die Aktion der IPI (Isoprenylisomerase, Phillips et al. 2008), die die Umwandlung von IPP zu DMAPP katalysiert (siehe Abbildung 4.1). Bereits Shepherd et al. (1999) fanden, dass QTL für verschiedene Terpene sich in einem Bereich des Eukalyptusgenoms häufen. Dies würde auch die Produktion von Nerol beeinflussen. Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Nerol- und dem β-Citronellolgehalt. Beide Substanzen werden aus Geraniol gebildet.

4.3.4 Weitere Terpene

In den ESTs aus der Subtraktiven Bank wurden vier Kandidatensequenzen mit Terpensynthaseähnlichkeit detektiert, von denen drei (Mira_c125, T_1410 und T_1994) bereits kartiert werden konnten. Diese zeigen jedoch keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Geraniolsynthasen aus Basilikum (Iijima et al., 2004), Schwarznessel (Ito and Honda, 2007) und Zimt (Yang et al., 2005). Die Ähnlichkeiten von Terpensynthasen zueinander sind gering, sodass eine Homologiesuche nur selten zu Treffern führt (Tholl, 2006). Terpensynthasen sind offenbar aus unterschiedlichen Vorläufergenen entstanden und stellen Orthologe dar. Die Expression der Kandidaten-ESTs wurden in verschiedenen Geweben und in Petalen von Genotypen der Population 94/1 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Mira_c125 nicht exprimiert wird. T_1306 wird in allen Genotypen exprimiert, konnte jedoch noch nicht kartiert werden, sodass noch keine Rückschlüsse anhand der Kartenposition auf die Funktion gezogen werden können. Die weiteren ESTs T_1994 und T_1410 werden in den Petalen verschiedener Genotypen nicht exprimiert, dies lässt im Vergleich der Duftprofile keine Rückschlüsse auf die Funktionen zu. Der EST T_1994 wurde am unteren Ende der LG1 kartiert. Diese Region und der genetische Marker für T_1994 selbst zeichnen sich durch einen hohen Einfluss auf den Geraniol- und β-Citronellolgehalt aus. Das b-Allel des Markers selbst ist für 25 % höheren Geraniol und für einen 8 % höheren β-Citronellolgehalt verantwortlich. Der EST T_1410 konnte auf der LG4 lokalisiert werden. Auf dieser Kopplungsgruppe befinden sich keine weiteren Hinweise in Form von QTL, die diese EST Sequenz einer Duftterpensynthase zuordnen könnten.

4.3.5 2-Phenylethanol

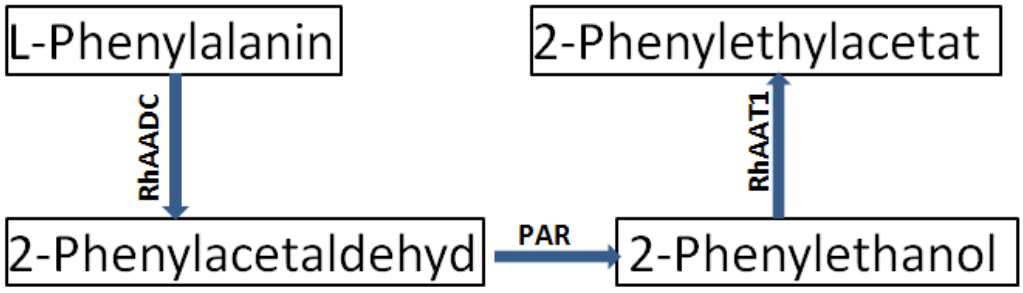


Abbildung 4. 2: Biosyntheseweg nach Sakai et al. (2007) von L-Phenylalanin zu 2-Phenylethanol. Anschließende Acetylierung von 2-Phenylethanol zu 2-Phenylethylacetat

Für die Produktion von 2-Phenylethanol wurden zwei QTL und zwei genetische Marker detektiert. Der erste QTL auf LG5 (Abbildung 3.17) ist mit einem LOD von 10 der stärkste QTL, der in der Population 94/1 für einen Duftstoff gefunden wurde. Aus den Ergebnissen der QTL-Kartierung und den Kartierungsergebnissen für T_1161, ein AADC Homolog (*Aromatic aminoacid* Decarboxylase) in der Population 97/7, kann man schließen, dass dieser QTL der Ort

der Hauptregulation der 2-Phenylethanolproduktion ist. Das AADC Homolog T_1161 zeigte in den Petalen aus allen untersuchten Genotypen eine Expression, außer im Elterngenotyp 93/1-119, in dessen Duftextrakten auch kein 2-Phenylethanol nachgewiesen wurde. Hier könnte ein funktioneller Zusammenhang vorliegen. Der zweite QTL für 2-Phenylethanol auf LG2 könnte ein Locus sein, der einen Einfluss auf die Acetylierung von 2-Phenylethanol zu 2-Phenyletylacetat hat. Auf LG2 befindet sich ein Strukturgen für die Bildung von Alkoholacetaten (*RhAAT1*). Bestimmte Allele dieses Locus könnten die Bildung von 2-Phenylethylacetat bevorzugen. Ein EST mit Sequenzähnlichkeit zu der Phenylacetaldehydreduktase (PAR), dem Enzym, das die Reduktion von 2-Phenylacetaldehyd zu 2-Phenylethanol katalysiert, wurde auf LG1 (Abbildung 3.9) kartiert (c3299). Dieser EST-Marker und die Region, in der er kartiert werden konnte, zeigen keinen Einfluss auf den 2-Phenylethanolgehalt. Der EST wird außerdem in den Petalen aller untersuchter Genotypen exprimiert, was darauf schließen lässt, dass die Biosynthese von 2-Phenylethanol nicht durch die Tätigkeit der PAR sondern durch RhAADC reguliert wird (siehe Abbildung 4.2). Sobald mehr Phenylacetaldehyd vorhanden ist, kann auch mehr zu 2-Phenylethanol umgewandelt werden.

4.3.6 Die Acetate

A1a2B1b2 X a3a4b3b4	**A1B1**	**a2B1**	**A1b2**	**a2b2**
a3b3	A1a3 B1b3	a2a3 B1b3	A1a3 b2b3	a2a3 b2b3
a3b4	A1a3 B1b4	a2a3 B1b4	A1a3 b2b4	a2a3 b2b4
a4b3	A1a4 B1b3	a2a4 B1b3	A1a4 b2b3	a2a4 b2b3
a4b4	A1a4 B1b4	a2a4 B1b4	A1a4 b2b4	a2a4 b2b4

Abbildung 4. 3: Punnett-Quadrat für die unabhängige Vererbung zweier dominanter Faktoren zur Produktion von Geranylacetat. Grün unterlegt sind die Genotypen, die Geranylacetat in den Duftextrakten enthalten, sowie die Gameten, die diese Eigenschaft vererben.

a) Geranylacetat

Das Merkmal „Vorkommen von Geranylacetat in den Duftextrakten“ zeigte ein Spaltungsmuster, wie es durch den Einfluss zweier unabhängiger, dominanter Loci verursacht wird. Es ist nur im Duftextrakt eines Elters vorhanden, müsste also im Verhältnis 1 zu 1 spalten,

wenn ein Einzellocus die Produktion von Geranylacetat bestimmen würde. Tatsächlich spaltet es im Verhältnis 3 zu 1, was einen zweiten, unabhängigen Faktor oder einen schief spaltenden Locus vermuten lässt.

Für die Produktion von Geranylacetat konnten auf LG2 zwei Kopien des Strukturgens *RhAAT1* (Guterman et al., 2002) mit Hilfe von zwei sequenzbasierten Markern kartiert werden. Der auf der Abbildung 3. 10 eingezeichnete Hauptlocus auf LG2 für das Vorhandensein von Geranylacetat in den Duftextrakten muss ein Artefakt der Kartierung sein. Keiner der Marker auf der LG2 zeigt eine ähnlich verschobene Spaltung. Es muss also zwei dominante Faktoren im Genom geben, die beide die Bildung von Geranylacetat bedingen. Diese Faktoren werden ersichtlich, wenn die Spaltungsmuster der Marker genauer betrachtet werden. Es sollte Marker im Datensatz geben, die wie in Abbildung 4.3 gezeigt spalten.

In der Gruppe der Pflanzen, die Geranylacetat in ihren Duftextrakten enthalten, müssen die Marker im Verhältnis 2 zu 1 spalten. In der Gruppe der Pflanzen, die kein Geranylacetat in ihren Duftextrakten enthalten, müssen beide rezessive Allele immer vorhanden sein.

Diese Marker findet man auf LG2 und LG7 (siehe Abbildung 3.10 und 3.12). Auf LG2 ist dies der Marker RhAAT1codingseq. Auf LG7 der AFLP-Marker E33M47-291. Diese beiden Marker spalten in der Gruppe der Pflanzen, die Geranylacetat in ihren Duftextrakten enthalten, im Verhältnis 2 zu 1. Der Marker RhAAT1codingseq ist 100 % an das „Nichtvorkommen“ von Geranylacetat gekoppelt. Der zweite Faktor liegt in der Nähe des Markers E33M47-291. Dieser ist mit drei (mehrfach überprüften) Rekombinanten (94/1-12, -56 und -88) an das „Nichtvorkommen“ von Geranylacetat gekoppelt. RhAAT1codingseq und E33M47-291 spalten in der Gruppe der Pflanzen, die Geranylacetat in ihren Duftextrakten enthalten, im Verhältnis 2 zu 1.

Der zweite Faktor muss ein Enzym sein, das genau wie die RhAAT1 die Bildung von Geranylacetat katalysiert. Es kann kein Gen für einen Kofaktor von RhAAT1 oder einer weiteren Acyltransferase sein, da die bislang beschriebenen AATs ohne Kofaktoren aktiv sind (D’Auria 2006). Es kann auch kein Gen sein, das die Bildung des Substrats beeinflusst, denn dieses ist in allen Duftextrakten vorhanden. Die Produktion von Geranylacetat könnte allerdings durch das Funktionieren eines Allels einer Geraniolisomerase oder –reduktase beeinflusst werden (siehe Abbildung 4.1). Die zusätzlichen Faktoren könnten Transkriptionsfaktoren sein, die noch nicht identifizierte Strukturgene beeinflussen. Es wurden bereits verschiedene MyB-Transkriptionsfaktoren gefunden, die die Bildung von flüchtigen Stoffen im Phenylpropanoidweg beeinflussen können (Verdonk et al. (2005) und Ben Zvi et al. (2008)). Im Endeffekt liegt eine Bereitstellung von mehr bzw. anderen Substraten für die

Biosynthese der Endprodukte vor. Solche Transkriptionsfaktoren könnten auch für die Enzyme der Terpenoidbiosynthese vorhanden sein.

Die RhAAT1 ist in *in vitro* Studien (Shalit et al., 2003; Shalit et al., 2004) in der Lage, sowohl Geranylacetat als auch Nerylacetat, Citronellylacetat und 2-Phenylethylacetat aus den jeweiligen Alkoholen und Acetyl Coenzym A zu bilden. Es wurde gleichzeitig in diesen Veröffentlichungen von einem stark unterschiedlichen Acetylierungsmuster gesprochen, wenn der Petalenrohextrakt getestet wurde. Es müssen also noch weitere Alkoholacetyltransferasen in den Extrakten vorhanden sein, die von *RhAAT1* sequenzunabhängig sind. In den Petalen der in dieser Arbeit getesteten Pflanzen wurde kein Citronellylacetat gefunden, obwohl β-Citronellol in allen Fällen vorhanden war. Diese Funktion wird in diesen Pflanzen also weder durch die RhAAT1, noch durch eine andere bislang unbekannte Alkoholacetyltransferase ausgeführt. Die Bildung von 2-Phenylethylacetat konnte nicht weiter untersucht werden (s. 2.2.6.c). Während der vorliegenden Arbeit konnten für die RhAAT1 zwei SCAR-Marker entwickelt werden. Beide SCAR-Marker kartieren auf LG2 (siehe Abbildung 3.10). Sie zeigen drei verifizierte rekombinante Genotypen zueinander. Dies zeigt, dass es sich bei den beiden detektierten Loci um zwei Genkopien handeln muss. In der kodierenden Sequenz dieser Gene gibt es nur einzelne Basenunterschiede. Dadurch werden drei Aminosäuren ausgetauscht (siehe Abbildung 4.4). Dies deutet auf eine Genduplikation vor evolutionär kurzer Zeit hin. Bislang hat die Sequenzierung der genomischen Regionen der *RhAAT1* acht verschiedene Sequenzen ergeben (siehe Abbildung 6.4). Je vier dieser Sequenzen wurden aus den Genotypen 93/1-117 (A1, B1 und C2) und -119 erhalten. Es müssen mindestens zwei Gene mit je zwei Allelen vorhanden sein. Drei der gefundenen acht Sequenzen konnten nicht in sinnvolle Proteine übersetzt werden (siehe Abbildung 4.4). Sie sind für eine sinnvolle Übersetzung zu kurz. Die Sequenz A1 weist große Deletionen in Bereichen auf, in denen die anderen (B1, C2) mit diesem Primerpaar amplifizierten Sequenzen voll informativ waren (siehe Abbildung 6.4). A1 könnte eine nicht funktionsfähige Genkopie darstellen. Aufklärung über die wirkliche Struktur der *RhAAT*-Gene im Genom dieser Rosenpopulation werden Marker bringen, die die jeweiligen Sequenzversionen spezifisch voneinander trennen und lokalisieren können. Anhand der Sequenzanalysen ist es möglich, für jede *RhAAT1*-Version spezifische Primer zu entwickeln und die einzelnen Versionen zu kartieren. Zur Bestimmung der Kopienzahl des Gens sollte ebenfalls ein *Southern Blot* durchgeführt werden.

Hendel-Rahmanim et al. (2007) fanden deutliche Unterschiede in der Expression von *RhAAT1* im Verlauf des Tages. Die Expression der *RhAAT1* war kurz vor dem Zeitpunkt der maximalen Konzentration von Geranylacetat in den Petalen am stärksten und wurde nicht, wie die ebenfalls von Hendel-Rahmanim et al. untersuchte GermacrenD-Synthase, konstitutiv

gleichmäßig exprimiert. Die Analyse der Genotypen während dieser Arbeit erfolgte zu den Blühstadien 4 und 5, den Stadien der stärksten Duftproduktion und –emission (Helsper et al., 1998, Oka et al., 1999). Die RNA-Proben wurden eine halbe Stunde vor den Duftproben genommen, so dass das Transkriptprofil im Zeitfenster der maximalen Expression der *RhAAT1* liegen sollte. Bei der Analyse der vorkommenden Acetatprofile wurden sieben verschiedene Zusammensetzungen der Acetate in den Duftprofilen der Population 94/1 identifiziert. Unter denen, die alle drei Substrate aufwiesen, wurde die *RhAAT1* nur in 18 von 24 untersuchten Fällen exprimiert. Sechs der Genotypen produzierten Acetate in unterschiedlichen Zusammensetzungen, trotz des Fehlens der *RhAAT1*-Expression und des gleichen Probennahmezeitpunkts. Die Genotypen 94/1-21 und 91 produzierten alle Acetattypen, obwohl die *RhAAT1* nicht exprimiert wurde. Dies unterstützt die Theorie, dass ein genetischer Faktor, eine andere Alkoholacetyltransferase (AAT), vorhanden sein muss, die die gleichen Substrate verwendet und die gleichen Produkte bildet wie die RhAAT1. Unabhängig von der RhAAT1 kann dieses Enzym sowohl Geraniol, 2-Phenylethanol und auch Nerol acetylieren.

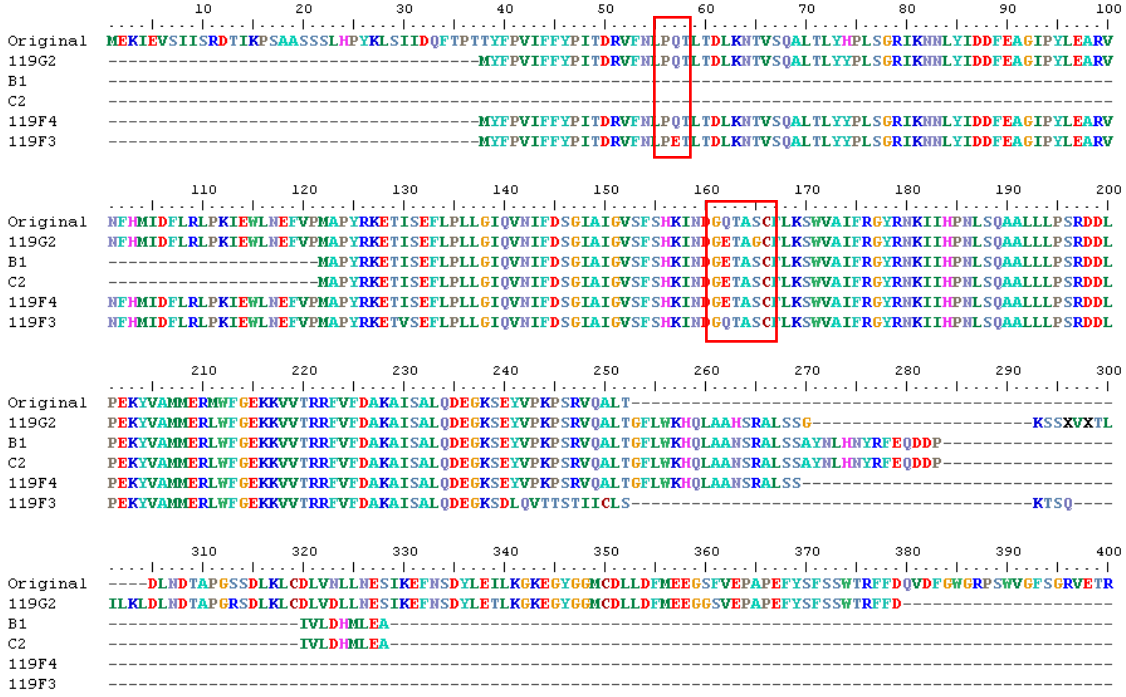


Abbildung 4.4: Fünf der acht gefundenen RhAAT1 Sequenzen konnten mit FGenesH in Proteinsequenzen übersetzt werden. Gezeigt wird hier ein Alignment dieser Sequenzen an die Originalsequenz aus Guterman et al. (2003) in BioEdit. Die kodierenden Bereiche aus den Genotypen 93/1-117 (B1 und C2) und -119 sind bis auf drei Aminosäuren gleich. Unterschiede an Position 57, 162 und 165.

Zur weiteren Analyse dieser Genotypen sollte eine Zeitreihe der Expression gemessen werden, um festzustellen, ob die mRNA zum Zeitpunkt der RNA-Probenahme bereits abgebaut war. Stellt sich heraus, dass auch zu früheren Zeitpunkten in der Blütenentwicklung keine *RhAAT1* exprimiert wird, ist dies ein weiterer Beweis für die Existenz einer zusätzlichen AAT in Rosenpetalen. Man könnte auch über einen Western Blot mit spezifischen Antikörpern die

Anwesenheit des Proteins überprüfen. So sollte in den Genotypen, die keine Expression und keine Acetate zeigen, kein RhAAT1 Protein zu finden sein (diese Genotypen wären die Negativkontrolle). In den Genotypen mit unterschiedlicher Acetatzusammensetzung könnten unterschiedliche Proteine vorkommen (zu sehen an verschieden großen Banden im Western Blot). In den Genotypen, in deren Duftextrakte Acetate nachzuweisen waren, aber keine *RhAAT1*-Transkripte, sollte der *Western Blot* ebenfalls negativ sein.

b) Nerylacetat

Der Hauptlocus für Nerylacetat konnte auf der LG4 kartiert werden (siehe Abbildungen 3.11 und 16). Durch *Interval Mapping* der log-transformierten quantitativen Daten für Nerylacetat wurde auf der gleichen Kopplungsgruppe eine QTL-Region detektiert. Die LOD-Kurve ist hier allerdings nicht stetig. Diese Form der LOD-Kurve wird entweder durch mehrere QTL für Nerylacetat auf dieser Kopplungsgruppe bedingt -dies wird dadurch gestützt, dass in beiden Eltern zwei LOD-Peaks detektiert wurden, die mehr als 20 cM voneinander entfernt liegen-, oder kann auch eine nicht korrekte Anordnung der Marker auf der Kopplungsgruppe (Ferreira et al., 2006) wiederspiegeln. Der Hauptlocus für die Bildung von Nerylacetat wird unabhängig von *RhAAT1* vererbt.

Der nach Korrelationsanalysen stärkste Zusammenhang besteht zwischen Geraniol und Nerylacetat. Damit Nerylacetat gebildet werden kann, muss zuerst Geraniol isomerisiert werden. Der starke positive Zusammenhang zwischen Geraniol und Nerylacetat könnte auch von einer Enzymfunktion abhängen, die die Bildung von Nerylacetat direkt aus Geraniol katalysiert. Diese Hypothese wird durch die Zusammensetzung der Duftextrakte gestützt, in denen Nerylacetat nachgewiesen werden konnte, jedoch kein Nerol. Ein solches Enzym wurde bislang noch nicht beschrieben. Somit könnte ein Hinweis auf einen neuen Biosynthesezweig gegeben sein.

c) 2-Phenylethylacetat

2-Phenylethylacetat konnte nur in 16 von 88 untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden. In den untersuchten Extrakten der Elterngenotypen wurde diese Substanz nicht detektiert. Das Vorhandensein von 2-Phenylethylacetat in den Duftextrakten korrelierte weder mit der Expression einer der Acyltransferasekandidaten-ESTs oder der *RhAAT1*, noch zeigten genetische Marker einen signifikanten Einfluss. Die Substanz konnte nur anhand des Kovats‘ Index rechnerisch identifiziert werden. Es wird aus dem Vergleich der Duftprofile mit den Expressionsdaten für die *RhAAT1* deutlich, dass die postulierte andere Alkoholacyltransferase auch 2-Phenylethanol als Substrat verwenden kann.

d) Acyltransferasekandidaten

Über BLAST Homologiesuchen wurden in der Subtraktiven cDNA Bank ca. 20 verschiedene ESTs mit Ähnlichkeiten zu bereits bekannten BAHD-Acyltransferasen identifiziert. Für diese Kandidaten wurden Primer entwickelt. Die PCR war mit allen Primerpaaren für genomische DNA erfolgreich. Alle Kandidaten wurden auf Polymorphie zwischen den Elterngenotypen der Populationen 94/1 und 97/7 getestet. Es konnten für drei AAT-Kandidaten Marker entwickelt werden (Primersequenzen in Tabelle 6.4, Übersicht über die entwickelten Marker Tabelle 6.8). Diese befinden sich auf LG2 der 94/1 (T_178), LG4 (T_45) und LG6 (T_81) der Population 97/7. Acyltransferasen sind an vielen Stoffwechselwegen beteiligt. Die kartierten ESTs genauso wie die *AATX* (s. 4.6) könnten nicht nur zur Duftproduktion beitragen, sondern auch für Enzyme weiterer Biosynthesewege kodieren, z. B. für Enzyme der Wachsbiosynthese (King et al., 2007; Negruk et al., 1996).

e) Rekombinante Acyltransferase

Einer der Acyltransferasekandidaten-ESTs wurde im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. Über 3‘ und 5‘ RACE wurde die vollständige Acetyltransferasesequenz isoliert und auf ihre Aktivität *in vitro* getestet. Es konnte noch keine Substratspezifität gefunden werden.
Der Transkriptionsstartpunkt wurde bei Base 285 der gesamten kodierenden Sequenz gewählt. Insgesamt wurden vier Klone sequenziert. Zwei der sequenzierten Klone zeigten bis Base 319 eine andere Nukleotidabfolge. Einer der sequenzierten Klone zeigte bis Base 245 eine andere Nukleotidabfolge (siehe Abbildung 6.5). Allen gemeinsam war durchschnittlich 76 % Ähnlichkeit zu einer putativen Taxadien-5 alpha-ol O-acetyltransferase aus *Ricinus communis* (gi|223550250|gb|EEF51737.1|).
Die BAHD-Acyltransferasen können anhand des Dendrogramms in fünf Gruppen eingeteilt werden. Diese *Cluster* unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. *Cluster* I enthält hauptsächlich Acyltransferasen, die Malonyl-Reste übertragen und zwei Hydroxycinnamoyl-Transferasen. Diese Enzyme sind bei der Anthocyan-Biosynthese beteiligt. *Cluster* II besteht aus BAHDs, die die Bildung von epicuticulären Wachsen katalysieren. In *Cluster* III gruppieren sich bis auf eine Ausnahme (die Ss5MAT) Acetyltransferasen. Auch die RhAAT1 fällt in diese Gruppe, ebenso wie die Sequenz des Enzyms *Md*AAT2 (Souleyre et al., 2005) . Dieses Enzym wurde bereits in Übereinstimmung mit mehreren QTL für die Produktion von Acetaten in Apfelfrüchten auf der genetischen Karte der Apfelpopulation ‚Discovery‘ x ‚Prima‘ lokalisiert. In *Cluster* IV fällt allein die ACT aus Gerste, die den ersten Schritt in der Biosynthese von Hydroxycinnamoyl-Agmatin katalysiert. Diese Substanz und ihre Derivate spielen in Gerste eine wichtige Rolle bei der Abwehr von pilzlichen Pathogenen (Burhenne et al., 2003).

Die AATX-Sequenz ordnet sich in die nach D'Auria (2006) als *Cluster* V bezeichnete Gruppe ein. Diese Gruppe enthält die meisten und zugleich auch die unterschiedlichsten BAHD-Acyltransferasen (siehe Abbildung 3.21). Sie kann in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Ein *Subcluster* (a) enthält in der Hautsache Acyltransferasen, die an der Biosynthese verschiedener Geruchs- und Geschmacksester beteiligt sind. Unter anderem auch Enzyme, die verschiedenste Benzyl-Ester produzieren. Eine weitere Untergruppe (b) in *Cluster* V bilden die BAHD-Enzyme, die an der Taxol-Biosynthese in verschiedenen *Taxus* Arten beteiligt sind. An dieses *Subcluster* gliedert sich die BanAAT (*Musa saplentum*) an, deren Hauptaktivität *in vitro* die Übertragung von Acetyl-Resten auf Cinnamoyl-Alkohol ist (Beekwilder et al., 2004). Für dieses Enzym wird eine Rolle in der Aromabildung der Bananenfrüchte postuliert. *Subcluster* (c) besteht aus Enzymen, die Hydroxycinnamoyl- oder Benzoyl-Coenzym A als Acyldonor verwenden. Diese Enzyme spielen bei der Biosynthese von Zwischenprodukten der Ligninbildung eine Rolle. Eine letzte Untergruppe (d) bilden die zwei leicht unterschiedlichen Übersetzungen der AATX kodierenden Aminosäuresequenz mit einer noch nicht auf Funktionalität getesteten Taxadien-5alpha-ol O-Acetyltransferase aus *Ricinus communis*. *Cluster* V, in das die neue Acetyltransferase eingeordnet werden konnte, besteht somit aus Enzymen aus verschiedenen Bereichen der Biosynthese von Sekundärstoffen des pflanzlichen Stoffwechsels. Diese Enzyme nutzen sowohl Acetyl-, als auch Benzoyl-, als auch Hydroxycinnamoyl-Coenzym A als Acyldonoren. Auch gibt es in dieser Gruppe ein Enzym (AMAT), das Anthranolyl-Coenzym A als Cofaktor und Methanol als Substrat benötigt (Wang and De Luca, 2005) sowie ein Enzym, das Tigloyl-Coenzym A als Kosubstrat nutzt: die HMT/HLT aus dem Alkaloidstoffwechsel der Lupine (Okada et al., 2005). Zusätzlich zu den fünf Gruppen, die schon bei D'Auria (2006) durch einen *Neighbour-Joining* Baum gefunden wurden, gliedern sich noch zwei neue Proteinsequenzen nicht in die Gruppen ein, sondern bilden neben der ACT, die auch eine eigene Gruppe bildet, Einzelcluster. Dies sind *ph*CFAT, die Coniferyl-Alkohol-Acyltransferase aus Petunie (Dexter et al., 2007) und die EPS1 aus *Arabidopsis,* die bei der pflanzeneigenen Immunabwehr beteiligt ist (Zheng et al., 2008). Aus den in der gleichen Gruppe eingeordneten Vergleichssequenzen lässt sich bezüglich ihrer Substrat und Kosubstrat-Präferenz keine eindeutige Wahl für AATX treffen. Die Aminosäuresequenz scheint aber mehr Ähnlichkeiten zum *Subcluster* der Acyltransferasen mit Acetyl- bzw. Benzoyl-Coenzym A Präferenz zu haben, daher wurde für die Substratspezifitätstests zuerst Acetyl-Coenzym A als Kosubstrat gewählt. Souleyre et al. (2005) fanden bei der Identifizierung der *Md*AAT1, einer Alkoholacyltransferase aus Apfel, dass das rekombinante Enzym bei *in vivo* Tests in *E. coli* eine breitere Substratspezifität aufwies als das aufgereinigte Enzym. Außerdem konnten Souleyre et al. im Gegensatz zu anderen Arbeiten zu AATs (St-Pierre and De Luca, 2000) eine stark

inhibitorische Wirkung von Dithiothreitol (DTT) bei einer Konzentration von 5 mM feststellen. DTT wurde auch in der vorliegenden Arbeit als reduzierendes Agens im Assaypuffer eingesetzt; dies in einer Konzentration von 10 mM. Die AATX-Proteinsequenz wird in die gleiche Gruppe eingeordnet wie *Md*AAT1, daher sollten die Substratspezifitätstests für die AATX noch einmal ohne DTT wiederholt werden; ebenfalls mit den bislang noch nicht getesteten Kosubstraten. Über eine Säulenaufreinigung könnte das rekombinante Enzym in reinerer Form getestet werden. Auch die Expression in *E. coli* wurde noch nicht optimiert; längere und kühlere Inkubation nach Induktion könnte die Ausbeute an rekombinantem Protein verbessern.
Eine Lokalisierung eines Markers für die *AATX*-Sequenz auf den genetischen Karten könnte einen Hinweis auf die Funktion geben. Wenn die Position des Markers mit einer der für Acetate signifikanten Regionen zusammenfallen würde, könnte man daraus auf das Produkt schließen. Die Entwicklung eines für die *AATX*-Sequenz spezifischen genetischen Markers könnte in weiterführenden Studien bearbeitet werden. Diese Sequenz wird in allen bis jetzt getesteten Petalen verschiedener Genotypen exprimiert, sodass man aus der Expression nicht auf ein Produkt schließen kann. In den Chromatogrammen der Duftextrakte traten eine große Anzahl langkettiger nicht näher identifizierbarer Alkane auf. Diese könnten alternative Produkte einer Acetyltransferase sein. Acetyltransferasen sind ebenfalls an der Bildung langkettiger Fettsäureester beteiligt. Dunphy postulierte diese Funktion für Acetyltransferasen für die Speicherung von Terpenolen (Dunphy, 2006).

f) Schlussfolgerungen für die Acetatsynthese

An den verschiedenen Acetatprofilen und der unterschiedlichen Konzentration der Acetate in den Duftextrakten der untersuchten Genotypen müssen mindestens fünf Acyltransferasefunktionen beteiligt sein, die alle jede für sich die Bildung von einem oder mehreren Acetaten katalysieren kann. Die *RhAAT1*, die alle der vorkommenden Acetate synthetisieren kann, ist in mindestens zwei Kopien auf LG2 lokalisiert. Dort befindet sich ebenfalls ein weiterer Locus mit „Geranylacetatproduktionsfunktion“, dieser wird durch die vergleichende Analyse der Markerdaten unter der Annahme von zwei spaltenden Loci gefunden (Abbildung 4.3). Der vierte Locus für die Synthese von Geranylacetat befindet sich auf Kopplungsgruppe 7 in der Nähe des AFLP-Markers E33M47-291. Ein fünfter Locus, der Acetylierung von Nerol bedingt, befindet sich auf LG4. Dieser wird durch gekoppelte Marker mit der gleichen verschobenen Spaltung und einen QTL für den Nerylacetatgehalt abgesichert.

4.4 Strukturgene der Rosenduftbiosynthese

Die bereits in Rosen bekannten Gene der Duftbiosynthese *RhOOMT1* und -2, *RcOMT1*, *-2, -3, POMT* und GermacrenD-Synthase scheinen in der Biosynthese des Dufts der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rosenpopulation keine Rolle zu spielen. Die Sequenzen konnten über PCR amplifiziert und über Sequenzierung verifiziert werden. Für *RhOOMT1* und *-2*, *RcOMT1* und *-3*, *POMT* und *GDS* wurden genetische Marker entwickelt und in den genetischen Karten lokalisiert. Bis auf die *GDS* werden alle bereits bekannten ‚Duftgene' der Rose in den untersuchten Genotypen exprimiert. In den GC-Profilen der Duftextrakte der Population 94/1 konnte kein Substrat und dementsprechend auch kein Produkt dieser Enzyme detektiert werden.

4.4.1 Orcinol O-Methyltransferasen (RhOOMTs)

Es wurden Primerkombinationen für *RhOOMT1* und *RhOOMT2* erstellt. In der Population 94/1 wurden CAPS-Marker entwickelt, von denen einer (OOMT1-1-MboI) auf LG2 (siehe Abbildung 3.11) kartiert werden konnte. Die Sequenzierung der PCR-Produkte der Primerkombinationen für *RhOOMT1* und *RhOOMT2* ergaben, dass die amplifizierten Sequenzen 97% Nukleotidhomologie zeigten und das von 12 sequenzierten Fragmenten 10 eine größere Ähnlichkeit zu RhOOMT2 hatten. Im Nachhinein wurde festgestellt, dass die verwendeten Primerpaare in beiden Originalsequenzen aus Shalit et al. (2002) binden konnten. Vermutlich gibt es noch weitere *RhOOMT*-Gene in den untersuchten Genotypen. Diese Problematik wird auch bei Scalliet et al. (2002) deutlich. Dort wurden allein vier verschiedene *RhOOMT*-Sequenzen in einem untersuchten Genotyp gefunden, wobei die identifizierten Gene alle eine sehr starke Nukleotidsequenzähnlichkeit (97%) aufwiesen.

Die *RhOOMTs* werden unterschiedlich exprimiert. Für den Genotyp 93/1-117 konnte eine Expression der *RhOOMTs* in Petalen und Antheren festgestellt werden, dies deckt sich mit den Ergebnissen von Lavid et al. (2002) und Scalliet et al. (2002). Für den Genotyp 93/1-119 konnte keine Expression in Petalen oder Antheren festgestellt werden, jedoch wurde in den Blättern mit den eingesetzten Primern ein Amplifikat gebildet. Um auf eine Funktion dieser OOMT zu schließen, muss noch verifiziert werden, ob und welche *RhOOMT*-Sequenz in den Blättern der 93/1-119 exprimiert wird, und ob ein potentielles Produkt in den Blättern oder im ‚Headspace' der Blätter zu finden ist. In den Duftextrakten aus den Petalen der Elternpflanzen und Nachkommen der Population 94/1 war kein Substrat, Zwischenprodukt oder Endprodukte der RhOOMT Enzymaktivität zu identifizieren.

4.4.2 Phloroglucinol-O-Methyltransferase (POMT)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die in Wu et al. (2004) charakterisierte POMT in der Population 97/7 ein CAPS-Marker entwickelt und kartiert werden. Der Marker wird vom Genotyp 82/78-1 auf die Nachkommen vererbt und spaltet im Verhältnis 1 zu 1. Der Locus befindet sich auf LG6 (siehe Abbildung 3.13). In den Duftextrakten der Population 94/1 konnte kein Produkt dieses Enzyms nachgewiesen werden. Duftextrakte der Population 97/7 müssten untersucht werden, um eine Kopplung des Markers an die Duftsubstanz zu identifizieren. Für *POMT* konnte eine Expression detektiert werden, allerdings nicht in allen Blütenorganen oder in Blättern, sondern nur in Petalen des Genotyps 94/1-91. Genotyp 94/1-91 muss hinsichtlich der Expression der *POMT* und auch des Duftextrakts noch genauer untersucht werden.

4.4.3 Eugenol-O-Methyltransferase (RcOMT1)

Für die Eugenol-O-Methyltransferase konnte ein SSCP-Marker entwickelt und in der Population 97/7 auf LG4 kartiert werden. Die Expressionsanalysen der Eltern und Nachkommen der Population 94/1 ergaben eine Expression nur in den Petalen, jedoch in allen untersuchten Genotypen. Dies steht im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Wu et al. (2003), in der eine Expression der *RcOMT1* in Petalen und in Stamina beschrieben wird. Die Stamina waren in der dort untersuchten *Rosa chinensis* var. *spontanea* auch der Ort des größten Gehalts an Eugenol, Isoeugenol und den Methylethern der beiden Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Bildung von Methyleugenol auf Proteinebene stattfindet. Womöglich wird in Petalen die mRNA zwar gebildet, jedoch das Protein nicht translatiert oder vorzeitig abgebaut. Es konnten allerdings auch die Substrate Eugenol bzw. Isoeugenol nicht detektiert werden, sodass selbst wenn eine funktionsfähige RcOMT1 in den Petalen vorhanden wäre, kein Methyl(iso)eugenol gebildet werden kann.

Die phylogenetische Analyse ordnete die RcOMT1 zur Isoeugenol-O-Methyltransferase (IEMT) aus Petunie und nicht zu anderen bekannten Eugenol-O-Methyltransferasen ein (Wu et al., 2003). Dies zeigt, dass die gleichen Enzymfunktionen sich mindestens zweimal aus unterschiedlichen Vorläufergenen entwickelt haben.

4.4.4 Kaffesäure O-Methyltransferasen (RcOMT2 und RcOMT3)

Das spezifische Primerpaar für *RcOMT2* amplifizierte eine Sequenz mit *RcOMT2*-Ähnlichkeit. Es konnte aber kein Polymorphismus in den Populationen 94/1 oder 97/7 gefunden werden. *RcOMT2*-Transkripte wurden in Blättern, Sepalen, Petalen und Antheren gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Wu et al. (2003) überein. Dieses Enzym scheint in der Biosynthese der in dieser Arbeit untersuchten Genotypen eine allgemeinere Rolle zu übernehmen als die Produktion von speziellen Duftsubstanzen. Das rekombinante Enzym

RcOMT2 zeigte bei Wu et al. eine breite Substratspezifität, die stärkste Methylierungsaktivität bei Kaffeesäure, methylierte jedoch mit 70 % bzw. 63 % Aktivität 4(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-Butanone und Dihydroxyanisol. Das zuletzt genannte stellt einen Zwischenschritt in der Biosynthese von 1,3,5-Trimethoxybenzen dar, einem der Hauptbestandteile des Duftes von asiatischen Rosen. Daher wurde für die RcOMT2 postuliert, dass dieses Enzym die Bildung von 1,3,5-Trimethoxybenzen katalysiert.

Für *RcOMT3* wurden zwei unabhängige Loci in beiden Populationen detektiert (siehe Abbildung 3.10 und 3.11). Diese befinden sich jeweils auf Kopplungsgruppe 2 und 4. Es zeigt, dass es in den untersuchten Rosenpopulationen mindestens zwei Genorte geben muss, an denen *RcOMT3*-äquivalente Sequenzen lokalisiert sind. Im Gegensatz zu Wu et al. (2003), die nur eine cDNA-Sequenz isolierten, weisen die zwei Genorte auf eine höhere Komplexität der *RcOMT3* im Genom der untersuchten Rosen hin. *RcOMT3* wird in den untersuchten Genotypen nur in Blättern exprimiert, kann also nicht bei der Biosynthese von Blütenduft beteiligt sein. So wird die Theorie von Wu et al. (2003) bestätigt, dass dieses Enzym die Biosynthese anderer methylierter Produkte katalysiert. Es könnten zum Beispiel Schritte in der Ligninbiosynthese sein (Lam et al., 2007), bei der Kaffeesäure-o-Methyltransferasen eine wichtige Rolle spielen.

4.4.5 GermacrenD-Synthase (GDS)

Die GermacrenD-Synthase (*GDS*) konnte im Verlauf dieser Arbeit auf den Kopplungsgruppen 5 der beiden untersuchten Kartierungspopulationen lokalisiert werden. In der Population 94/1 werden durch das verwendete Primerpaar zwei SSCP-Marker erzeugt, die aus jeweils einem der Elterngenotypen stammen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bislang gefundenen Sesquiterpensynthasen zeigen eine starke Ähnlichkeit zueinander. Die Sequenzierung des PCR-Produkts aus der genomischen DNA der Elterngenotypen zeigte eine Übereinstimmung mit der EST-Sequenz aus Guterman et al. (2002), bis auf ein 93 bp langes Intron (siehe Abbildung 6.6). In der genomischen Sequenz des Genotyps 93/1-119 können zwei Versionen unterschieden werden:

a) eine Sequenz, die bis auf das Intron vollständig mit der Original cDNA-Sequenz übereinstimmt

b) eine Sequenz, die bei Base 353 eine Deletion und 483 einen Austausch zeigt.

In der genomischen Sequenz der *GDS* aus dem Genotyp 93/1-117 werden ebenfalls zwei verschiedene Versionen gefunden:

c) eine Version, die bei den Basen 352 und 353 einen Austausch und den gleichen Austausch wie b) bei Base 483 trägt

d) eine zweite Version, die dieselbe Deletion wie b) zeigt und bei Base 483 mit a) identisch ist.

Der 10 cM Abstand zwischen beiden *GDS*-Markern auf der integrierten Karte aus beiden Eltern

(siehe Abbildung 3.11) wird durch Rekombination der verschiedenen Allele mit anderen Markern auf dieser Kopplungsgruppe verursacht. Zur Darstellung der integrierten Karten wurden die Karten aus der dritten Berechnungsrunde in JoinMap gewählt, in der Marker auf der Karte platziert werden, deren Kopplung zu anderen Markern auf der gleichen Kopplungsgruppe nicht sicher ist. Dadurch kommt es zu Änderungen in der Anordnung der Marker auf der Kopplungsgruppe.

In der Population 97/7 hingegen wurde durch das gleiche Primerpaar nur ein Locus detektiert. Bei den Expressionsanalysen der GermacrenD-Synthase konnte im Gegensatz zu Shalit et al. (2003) keine Expression in einem der untersuchten Gewebe oder Genotypen der 94/1 festgestellt werden. Dies deckt sich mit der Duftanalyse. In keinem der untersuchten Duftextrakte konnte GermacrenD oder ein ähnliches Sesquiterpen gefunden werden. Hendel-Rahmanim et al. (2007) fanden, dass GermacrenD hauptsächlich früh am Tage emittiert wird, die Expression des Gens jedoch während des gesamten Tagesablaufs konstant bleibt. So hätte eine Expression der GDS in den in dieser Arbeit untersuchten Genotypen detektiert werden müssen. Die Regulation der GermacrenD-Synthese findet demnach auf Transkriptionsebene statt.

4.4.6 Schlussfolgerungen aus der Kartierung der Strukturgene

In den Duftextrakten der untersuchten diploiden Kartierungspopulation konnten die Produkte der bislang in anderen Arbeiten identifizierten Duftbiosynthesestrukturgene nicht nachgewiesen werden. Die Positionen dieser Gene auf den genetischen Karten konnten lokalisiert werden. Es wurden genetische Marker entwickelt und lokalisiert, die im Zusammenhang mit den an die Strukturgene gekoppelten Loci zur markergestützten Selektion in anderen Rosen dienen können. Zum Beispiel kann der identifizierte Polymorphismus für die RhOOMT in Teerosen Hybriden, die von asiatischen Rosen abstammen und tetraploid sind, zur Selektion auf höheren Gehalt an 1,3,5-Trimethoxybenzen -dem klassischen „Teeduft“ dieser Rosensorten- dienen. Auf diese Weise können ohne die komplexe Erstellung einer genetischen Karte gewünschte Duftkompositionen selektiert werden.

4.5 ESTs mit Duftbiosynthesegen-Ähnlichkeit

Von den über Homologiesuchen in der SSH-Bank identifizierten ESTs mit Ähnlichkeiten zu Duftbiosynthesegenen konnten insgesamt 10 Sequenzen auf den genetischen Karten lokalisiert werden. Zusätzlich zu den bereits oben erwähnten ESTs mit Ähnlichkeiten zu Terpensynthasen und Acyltransferasen wurden ESTs für eine *Carotenoid cleavage* Dioxygenase (CCD), eine N-

Methyltransferase (G_189), eine O-Methyltransferase (G_14), eine S-Adenosyl-methyltransferase (T_3043) und verschiedene weitere Acyltransferasekandidaten (G_43, T_78, G_185 und T_546) untersucht. Außerdem ein EST ohne Ähnlichkeit zu bereits bekannten Sequenzen, der jedoch exklusiv nur in der „viel Geranylacetat"-SSH-Bank gefunden wurde (G_100). Von diesen ESTs wurden CCD auf LG1 (94/1) und G_189 auf LG2 (97/7) lokalisiert.

4.5.1 *Carotenoid Cleavage* Dioxygenase (CCD)

Durch BLAST Homologiesuchen in den veröffentlichten Rosen EST-Banken aus den Petalen von ‚Duftwolke' und ‚Golden Gate' (Guterman et al. 2002) konnte ein EST mit starker Sequenzähnlichkeit zu den in Petunien (Simkin et al., 2004b), Tomaten (Simkin et al., 2004a) und Melone (Ibdah et al., 2006) charakterisierten CCDs gefunden werden. Die dort beschriebenen CCDs sind in den Pflanzen, in denen sie identifiziert wurden, für die Produktion von β-Ionon verantwortlich. Die putative *CCD1* wird in Petalen exprimiert. Jedoch zeigte nur die Hälfte der untersuchten cDNAs aus Petalen eine Expression von *CCD1*. Nicht in allen Duftextrakten der Genotypen, die eine Expression von *CCD1* zeigten, wurde auch β-Ionon nachgewiesen. Dies könnte an der Nachweisgrenze des Systems liegen. Die detektierten β-Ionongehalte waren sehr gering. Allerdings ist diese Substanz schon in sehr niedriger Konzentration von der menschlichen Nase wahrnehmbar und trägt somit sehr stark zum typischen Rosenduft bei. Bei der Verwendung von mehr Extraktionsmaterial und einer anschließenden Aufkonzentration des Extrakts, könnte man die Anreicherung von derart niedrig konzentrierten Substanzen erreichen. Somit könnte der funktionale Zusammenhang nachgewiesen werden. Und damit zum Nutzen der Rosenzüchter die Genetik der β-Ionon-Synthese aufgeklärt werden.

4.5.2 Methyltransferasen

Methyltransferasen spielen in der Duftbiosynthese eine große Rolle. Insbesondere bei der Biosynthese der Hauptduftbestandteile von asiatischen Rosen (Scalliet et al. 2008). Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnten genetische Marker für bekannte O-Methyltransferasen (s.o.) sowie für neue Sequenzen mit N-, bzw. O-Methyltransferase-Ähnlichkeit entwickelt werden. Diese Sequenzen spielen, obwohl sie exprimiert werden, in der Duftbiosynthese der untersuchten Rosenpopulation keine Rolle. In den Duftextrakten können keine potentiellen Substrate für diese Enzyme nachgewiesen werden. Methyltransferasen sind auch Bestandteil von vielen weiteren Stoffwechselwegen, sodass die lokalisierten Genorte auch Funktionen z. B. des Primärmetabolismus darstellen können.

4.5.3 β-Glucosidase

Die Synthese der Duftstoffe findet in den Zellen der oberen und unteren Epidermis der Petalen statt (Bergougnoux et al., 2007). Ungeklärt bleibt bislang die Frage, ob die gebildeten flüchtigen Stoffe im Moment ihrer Synthese emittiert werden oder ob zuerst ein Vorrat in den Petalen angelegt und erst nach und nach freigesetzt wird. Da die Alkohole hydrophob sind, scheidet die Vakuole als Lagerkompartiment aus. Gibt es in den Zellen der Blütenblätter Lysosomen, die lipophile Substanzen einlagern können? Dunphy (2006) veröffentlichte, dass Monoterpenole mit langkettigen Fettsäuren verestert und in lipophilen Umgebungen eingelagert werden, z. B. in der Wachsschicht der Kutikula. Auch die Propanoide wurden zum größten Teil glycosyliert. Bergougnoux et al. (2007) fanden bei einer Terpen-Färbung der Epidermiszellen von Rosen kleine Lipidtröpfchen in den Zellen, die die Terpene zu enthalten schienen. Sie konnten aber nicht ausschließen, dass dieses Ergebnis ein Artefakt ihrer Färbemethode war.

Für 2-Phenylethanol (Watanabe et al., 2002), β-Citronellol (Oka et al., 1998) und Geraniol (Francis and Allcock, 1969a; Francis and Allcock, 1969b) ist bereits bekannt, dass sie in den Petalen von Rosen auch in glycosylierter Form vorliegen. Um die Substanzen wieder zu aktivieren, werden β-Glucosidasen benötigt, die den Zuckerrest abspalten. In den ESTs, die durch die Subtraktive Hybridisierung gewonnen wurden, wurden viele Sequenzen gefunden, die Ähnlichkeit mit der in Sakai et al. (2008) beschriebenen β-Glucosidase zeigten (siehe Tabelle 6.6). Diese Enzymtätigkeit könnte auch in den hier untersuchten Rosen eine große Rolle spielen. Dies könnte in weiterführenden Studien untersucht werden. Man könnte das Verhältnis zwischen glycosylierten und freien Duftsubstanzen bestimmen und ‚Headspace' Analysen über die Blütenentwicklung hinweg durchführen. Anhand von Expressionsanalysen und einer Kartierung der β-Glucosidase könnte man den Einfluss der Glycosylierung auf die Duftproduktion aufklären. Die Kartenposition müsste mit einem der QTL für 2-Phenylethanol, Geraniol oder β-Citronellol korrelieren. So würde man den zeitlichen Verlauf der Duftbiosynthese aufklären. Man könnte dadurch Belege finden, ob Substrate der Acetyltransferasen zuerst gebildet, gespeichert und während der späteren Stadien der Blütenentwicklung wieder freigesetzt werden oder ob Substrate der Acetyltransferasen sofort nach der Bildung acetyliert und emittiert werden.

4.6 Suppressive Subtraktive Hybridisierung

Bei der Durchführung der Subtraktiven Hybridisierung wurde mit Pflanzengruppen gearbeitet, die zunächst aufgrund einer Fehlauswertung der Chromatogramme als „Geranylacetat enthaltend" und „kein Geranylacetat enthaltend" ausgesucht wurden. Nach der ersten

Auswertung der Duftextrakte und Extraktionsanalysen fielen Pflanzen auf, die zwar Geranylacetat in den Duftextrakten enthielten, aber keine Expression der *RhAAT1* zeigten. Es zeigte, dass es zusätzliche Faktoren geben müsste, die die Produktion von Geranylacetat kontrollieren. Diese anderen Faktoren sollten über die SSH gefunden werden.

Die klare Trennung der cDNA Pools in Geranylacetat+ und Geranylacetat- konnte nach Absenkung der Detektionsschwelle auf 0,01 mg/l nicht mehr aufrecht erhalten werden. In den Duftextrakten beider Gruppen wurde Geranylacetat nachgewiesen. Es wurden daher Sequenzen erwartet, die die Produktion von „viel“ gegenüber „wenig“ Geranylacetat bedingen. Als weiteres Problem wurde anhand von SSR-PCRs mit den vorhandenen Klonen der für die SSH verwendeten Genotypen festgestellt, dass zwei der verwendeten Pflanzen nicht in allen Klonen identisch waren.

Nach der 454-Sequenzierung, dem Assembly und einer weiteren *in silico* Subtraktion verblieben in der Geranylacetat+ Bank weniger als 100 Contigs, die theoretisch die Produktion von „viel“ Geranylacetat bedingen. Darunter wurden ca. 20 Sequenzen gefunden, die leichte Ähnlichkeit mit Acyltransferasen auf Ebene der Aminosäuresequenz zeigten. Viele der Sequenzen in der Geranylacetat+ Bank zeigten keinerlei Ähnlichkeit zu bereits bekannten Sequenzen. Unter den Sequenzen, die durch die 454-Sequenzierung gewonnen wurden, waren viele mit Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Duftbiosynthesestrukturgenen wie Monoterpensynthasen, Diterpensynthasen, Decarboxylasen, Hydroxylasen oder Aminotransferasen. Xie et al. (2008) fanden über eine Subtraktive Hybridisierung von zwei unterschiedlich duftenden Rosen ein ähnliches Spektrum. Sie konnten ESTs von RcOMT1, RcOMT2, RhMYB92 und RhGP1 detektieren, sowie Sequenzen, die bislang in keiner Datenbank erfasst waren. Dies resultierte, wie auch im Fall der in dieser Arbeit durchgeführten SSH, aus der Kürze der erhaltenen Sequenzen. Diese ESTs sind Kandidaten für neue Gene der Duftbiosynthese in Rosen. Die meisten ESTs wurden in allen untersuchten cDNAs aus Petalen exprimiert. Die ESTs aus dem Geranylacetat+ Pool wurden entweder gar nicht (G_100), mit mehreren Amplifikaten (G_189, G_43) oder in allen untersuchten Genotypen exprimiert (G_14, G_185).

Bei der Untersuchung der cDNAs der Pflanzen aus den Ausgangspools konnte keine Expression gefunden werden, die repräsentativ für einen der Pools gewesen wäre. Keiner der bislang untersuchten ESTs stellt also einen Kandidaten für die Erhöhung bzw. Erniedrigung des Geranylacetatgehalts in den Duftextrakten der eingesetzten Pflanzen dar.

5. Schlussfolgerungen/ Ausblick

Durch die phänotypische Untersuchung der Duftextrakte von Nachkommen einer spaltenden Rosenpopulation sollten verschiedene Fragestellungen näher untersucht werden:

1. Wie werden Duftkomponenten in diploiden Rosen vererbt?

Duft als Gesamteigenschaft wird als komplexes Merkmal vererbt. Dabei werden die einzelnen Duftkomponenten nach Mendelschen Regeln wie andere phänotypische Eigenschaften weitergegeben. Die Zusammensetzung wird durch Umwelteinflüsse, den Entwicklungszustand der Pflanze, bzw. der Blüte und den genetischen Hintergrund des einzelnen Genotyps bestimmt.

2. Können die einzelnen Duftfaktoren auf der genetischen Karte als distinkte Loci lokalisiert werden?

Die einzelnen Duftfaktoren werden entweder monogen, oligogen oder polygen vererbt. Die Produktion der einzelnen Faktoren wurde auf einer genetischen Karte lokalisiert. Es können sowohl die Einzelloci als auch Regionen lokalisiert werden, die auf die quantitative Ausprägung Einfluss nehmen. Es wurden zwei Einzelloci, abgesichert durch gleichartig segregierende genetische Marker, und sechs QTL-Regionen identifiziert.

3. Korrelieren diese Loci mit Positionen von Strukturgenen der Duftbiosynthese?

Die bekannten Duftbiosynthesestrukturgene sind zwar im Genom der untersuchten Rosennachkommenschaft lokalisierbar, jedoch sind die Produkte der Enzyme, für die diese Gene kodieren, nicht in den Duftextrakten dieser Genotypen nachzuweisen. Einzige Ausnahme bildet die RhAAT1, deren genetische Position mit einem der Faktoren der Bildung von Alkoholacetaten übereinstimmt. Jedoch ist dieses Gen nicht als Einzellocus vertreten, sondern mindestens in zwei Kopien vorhanden, von denen eine (RhAAT1codingseq) die RhAAT1 zu sein scheint.

Durch die vorliegende Arbeit wurden zusätzliche Loci für die Vererbung von Duftsubstanzen identifiziert. Nicht nur Loci für bekannte Strukturgene, sondern Loci, an denen sich neue Strukturgene und auch regulatorische Elemente befinden können. Die Faktoren, die die Produktion von Duftsubstanzen steuern, sind bislang nicht bekannt. Die identifizierten Loci können bereits zur markergestützten Selektion eingesetzt werden.

Über eine Positionsklonierung in der untersuchten Population können das oder die Gene der Produktion von Geraniol bzw. β-Citronellol identifiziert werden. Die Kreuzung, auf der die für

Duftkomponenten untersuchte Population beruht, wurde bereits mehrfach wiederholt, sodass die Möglichkeit besteht, über weitere Rekombinante die Positionen der QTL einzugrenzen. Die Region auf LG1 ist bereits für die 88/124-46 (die ‚Großmutter' der Population 97/7) sequenziert, und die Gene, die in der 88/124-46 dort liegen, sind bekannt. Für die Kandidatengene können Marker entwickelt werden. Die Funktion des TPS-ähnlichen EST, der in der Population 94/1 in dieser Region lokalisiert ist, sollte untersucht werden. Der EST mit AADC-Ähnlichkeit auf LG5 stellt bereits eine solche Kandidatensequenz dar. Er befindet sich in einer chromosomalen Region mit sehr starkem Einfluss auf den 2-Phenylethanolgehalt der Duftextrakte.

4. Wird die Zusammensetzung der Duftprofile der diploiden Kartierungspopulation durch die Expression von Strukturgenen reguliert?

Die bekannten Gene der Duftbiosynthese in Rosen werden in den Petalen der untersuchten Genotypen nur teilweise exprimiert. Die Produkte der Enzyme, für die diese Gene kodieren, wurden bis auf die Alkoholacetate nicht in den Duftextrakten nachgewiesen. Für die Expression der RhOOMTs bestehen genotypische Unterschiede, die jedoch nicht mit den Duftprofilen in Einklang gebracht werden können. Die Regulierung der Produktion der verschiedenen Duftsubstanzen kann nicht mit der Expression der bekannten Duftbiosynthesestrukturgene der Rosen erklärt werden. Es müssen neue Faktoren angenommen werden, die die Duftstoffzusammensetzung bestimmen.

Durch die Sequenzierung der SSH-Bank wurden viele ESTs gefunden, die mit anderen Blüteneigenschaften in Verbindung gebracht werden können. Zum Beispiel mit der Anthocyan- oder Carotenoidbildung, MADS Box Gene für Blütenorganidentität oder Seneszenzfaktoren. Über diese ESTs kann mehr über die Blütenbildung und ihre Ausprägung erfahren werden. Ebenfalls sollte die Kartierung der Gene der Ethylenbiosynthese und Signaltransduktion (*CTR1* und 2 (Müller et al. 2002) *EIN3* (Müller und Stummann 2003a), *ETR1*-3 (Ma et al. 2005; 2006) weiter verfolgt werden, um den Zusammenhang zwischen Haltbarkeit und Duft aufzuklären.

5. Können aus der Kombination von Expressions- und Spaltungsdaten Hypothesen zur Funktion einzelner Strukturgene aufgestellt werden?

Wie bereits oben erwähnt, konnten für die bekannten Strukturgene der Rosenduftbiosynthese keine Zusammenhänge zwischen Expression und genetischer Lokalisierung gezogen werden. Es wurden hingegen neue Loci identifiziert, die Duftkomponenten beeinflussen. Durch die Verwendung der genetischen Karte sind bereits Marker identifiziert worden, die direkt in der Züchtung genutzt werden könnten, um auf höheren Geraniol-, höheren 2-Phenylethanol- und

höheren Nerolgehalt zu selektieren. Wünschenswert wäre ein genetischer Marker, der mit der Produktion der wertvollen Rosenduftbestandteile gekoppelt wäre. Ein erster Schritt dazu wurde bereits mit der Entwicklung des genetischen Markers für die β-Ionon-Synthase getan. Alkoholacetate werden von mindestens fünf verschiedenen Faktoren gebildet. Dies sind keine regulatorischen Elemente sondern Faktoren mit Acyltransferasefunktion. Durch die Verwendung der diploiden Population konnten diese fünf Faktoren lokalisiert werden. Ihre Struktur bedarf noch der Aufklärung. Das Biosynthesemodell für die Bildung der Duftsubstanzen in Rosenpetalen wurde bestätigt. Zusätzlich gibt es Hinweise auf einen neuen Biosynthesezweig zur Produktion von Nerylacetat

Die in dieser Arbeit identifizierten genetischen Marker für Geraniol-, 2-Phenylethanol-, β-Citronellolgehalt, das Vorkommen von Nerylacetat, Nerol bzw. die Identifizierung der „Acetatloci“ müssen über Duftextraktuntersuchungen an anderen Rosengenotypen überprüft werden. Dazu könnten die Vergleichssortimente der Rosenzüchter dienen. Diese Genotypen hätten den Vorteil, dass viele der phänotypischen, von den Rosenzüchtern gewünschten, Eigenschaften bereits aufgenommen und katalogisiert wären. Diese Daten könnten zusammen mit den Duftdaten und der Genotypisierung in eine Assoziationsstudie einfließen, deren Ergebnis sicher an Duft gekoppelte Marker wären.

6. Anhang

6.1 Medien

‚Luria-Bertani' Medium (LB-Medium)
1 % (w/v) BactoTM Pepton (BD)
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
171 mM NaCl
pH 7,0 mit 5 M NaOH

‚Freezing Broth' (FB-Medium)
1 % (w/v) BactoTM Pepton (BD)
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
85,5 mM NaCl
36,2 mM K2HPO4
13,2 mM KH_2PO_4
1,5 mM Natriumcitrat
6,8 mM Ammoniumsulfat
365 µM $MgSO_4$
4,4 % (v/v) Glycerin
(autoklavieren)

Für Festmedium 15 g/l Bacto-Agar hinzufügen und autoklavieren. Das entsprechende Antibiotikum wird steril filtriert und nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums dazugeben.

SOB
2 % (w/v) BactoTM Pepton (BD)
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
8,5 mM NaCl
2,5 mM KCl
pH 7,0 mit 5 M NaOH
(autoklavieren)

SOC
SOB
+ 20 mM Glukose
+ 10 mM $MgSO_4$
+ 10 mM $MgCl_2$

6.2 Puffer und Lösungen

Fixierlösung zur Silberfärbung von SSCP-Gelen
7.5 % (v/v) Essigsäure

Entwicklungslösung zur Silberfärbung von SSCP Gelen
9,4 mM Na_2CO_3
0,15 % (v/v) Formaldehyd*
6,4 µM Natriumthiosulfat*

Färbelösung zur Silberfärbung von SSCP-Gelen
5,9 mM $AgNO_3$
0,15 % (v/v) Formaldehyd*

Methacryloxypropyltrimethoxysilanlösung
0,3 % (v/v)
Methacryloxypropyltrimethoxysilan
0,3 % (v/v) Essigsäure
in 100 % Ethanol

SSCP-Ladepuffer ‚Stoplösung'
95 % (v/v) Formamid
0,01 M NaOH
0,05 % (w/v) Xylenxyanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Kobayashi Puffer 1 zur DNA-Extraktion
50 mM Tris-HCl (pH 8)
5 mM EDTA
350 mM Sorbitol
1 % (v/v) Mercaptoethanol*
10 % (w/v) PEG 8000
(autoklavieren)

Kobayashi Puffer 2 zur DNA-Extraktion
50 mM Tris-HCl (pH 8)
5 mM EDTA
350 mM Sorbitol
1 % (v/v) Mercaptoethanol*
1 % (w/v) Sodiumsarcosyl
710 mM NaCl
0,1 % (w/v) CTAB
(autoklavieren)

10x Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese
0,25 % (w/v) Bromphenolblau oder OrangeG
30 % (v/v) Glycerin

1x TBE
89 mM Tris base
89 mM Borsäure
2 mM EDTA (pH 8,0)

1x TAE
40 mM Tris base
1 mM EDTA
pH 8,0 mit konzentrierter Essigsäure einstellen

1x TBE Long Run
134 mM Tris base
45 mM Borsäure
2,5 mM EDTA (pH 8,0)

1x Tris-EDTA (TE)
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)
(autoklavieren)

1x Williams-Puffer
10 mM Tris pH 8,3
50 mM KCl
2 mM $MgCl_2$
0,001 % Gelatine (BioRad)
(autoklavieren)

(* Reagenzien erst kurz vor Gebrauch der jeweiligen Lösungen zugeben)

SDS-PAA-Gel (12 %)

a) Trenngel 12 %

H_2O	2,13 ml
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,6 ml
10 % SDS	62,5 µl
10 % APS	62,5 µl
TEMED	2,5 µl

b) Sammelgel 12 %

H_2O	2,7 ml
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	680 µl
1M Tris/HCl pH6,	540 µl
10 % SDS	40 µl
10 % APS	30 µl
TEMED	8µl

Trenngel:	ca. 15 mA oder 120 V
Sammelgel:	ca. 20 mA oder 120 V

Laufpuffer mit SDS für 12 % PAA-Gele
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Silberfärbung von 12 % PAA-Gelen (Proteine)

Stopplösung: 500 ml Methanol
120 ml Eisessig (100 % Essigsäure)
ad 1L Reinst-H_2O

Die folgenden Lösungen sind immer frisch anzusetzen!

Fixierer: 50 ml Stopplösung
25 µl 37 % Formaldehyd

Na-thiosulfatlösung: 10 mg $Na_2S_2O_3$x5 H_2O
auf 50 ml Reinst-H_2O

Silberlösung: 0,5 ml 20 % $AgNO_3$-Lsg.
37,5 µl 37 % Formaldehyd
auf 50 ml Reinst-H_2O
→ vor Licht schützen

Entwickler: 3 g Na_2CO_3
25 µl 37 % Formaldehyd
1 ml Na-thiosulfatlösung
auf 50 ml Reinst-H_2O

Ponceau-Färbelösung

0,2 % Ponceaus S
3 % Trichloressigsäure

Blotting Puffer (Laufpuffer ohne SDS)

25 mM Tris
192 mM Glycin

Immunostainlösungen

10x PBS: 50 mM NaH_2PO_4x2 H_2O
10 mM Na_2HPO_4x2 H_2O
1,5 M NaCl
1x PBS pH7,4

PBST: 1x PBS + 0,05-0,1 % Tween20

Blocking Lösung: 5 % Magermilchpulver in PBST

Substratpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 9,5
0,5 mM MgCl2

NBT (Nitro Tetrazolium Blue Chloride): 30 mg/ml NBT in 70 % DMF

BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat): 10 mg/ml BCIP in 100 % DMF

Lösungen für Proteintest

Lysispuffer

50 mM Bis-Tris pH 6,9
10 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM PMSF*
1 mM DTT*
10 % Glycerin

Assaypuffer

50 mM Bis-Tris pH6,9
10 % Glycerin
5 mM $Na_2S_2O_5$
10 mM DTT

(* Reagenzien erst kurz vor Gebrauch der jeweiligen Lösungen zugeben)

6.3 Hersteller

Tabelle 6. 1: Hersteller von Geräten und Chemikalien

Hersteller	Standort	Land
Ambion	Cambridgeshire	UK
BioRad	München	D
Biozym Diagnostik	Hessisch Oldendorf	D
Eppendorf	Hamburg	D
Heraeus Sepatech	Osterode	D
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen	D
Hewlett Packard	Santa Clara	USA
Invitek	Berlin	D
Invitrogen	Karlsruhe	D
LI-COR	Lincoln	USA
Merck	Darmstadt	D
MWG Biotech	Ebersberg	D
Peqlab Biotechnologie	Erlangen	D
Promega	Madison, Wisconsin	USA
Qiagen	Hilden	D
Retsch	Haan	D
Roche Diagnostics	Mannheim	D
Roth	Karlsruhe	D
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
Nerbe plus	Winsen/Luhe	D
Sarstedt	Nürnbrecht	D
Applied Biosystems	siehe Invitrogen	D
Rockland		USA

6.4 Geräte

Tabelle 6. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Firma	Bezeichnung
Autosampler	Hewlett Packard	HP 6890 Series Injector (Enhanced Parameters)
Detektor MS	Fisons Instruments	MD 800
Doppellasersequenzsystem	LI-COR®	DNA Analyzer 4200 und 4300
Elektroblotter	BioRad	Transferblot SD semi-dry TransferCell
Elektroporationsgerät	BioRad	Micropulser
Elektroporationsküvetten	Invitrogen	E-cuvets 0.1 cm
Fotometer	LAT, Safas	
Gaschromatograph	Hewlett Packard	HP 6890 Series
Gaschromatograph MS	Fisons Instruments	GC 8000 Series
Geldokumentationssystem	Intas	Intas GDS
Gelelektrophoresekammern	Owl, MWG-Biotech, Kisker, Peqlab, Hybaid	
Injektor	Gerstel	KAS4 plus Gerstel Controller 505
Injektor GC-MS	Fisons Instruments	Cold on column 40 °C
Inkubationsschüttler	Incutec	IH50
Magnetrührer	IKAMAG	Ikamag® RET
Minispin	Neolab	C1301
Nanoküvette	Hellma	TrayCell
pH-Messgerät	Hanno Instruments	pH211 Microprocessor
Pipetten	Abimed, Eppendorf	Labmate, Multipette plus, Multichannel8
Pipettier Roboter	Eppendorf	Ep-motion 5000
Reinstwasseranlage	Sartorius	arium® G11
Replikationsstempel	Sigma	Replica plater
Scanner	LI-COR®	Odyssey® Infrared Imaging System
Schüttler	Edmund Bühler	Swip KS-10
Schwingmühle	Retsch	
Thermocycler	Peqlab	Primus 96 advanced Gradient
Ultraschallgerät	B. Braun Biotech	Labsonic® M
Vertikale Elektrophoresesysteme	Owl, Biometra	Maxigel
Vortex	VWR international	444-1372
Waagen	Sartorius, Mettler	Universal, AE260 Delta Range
Wärmeschrank	Memmert	-
Wasserbad	LAT	W16
Wankeltisch	Biometra	-
Zentrifugen	Hettich	Rotina420R, Universal 32R, Mikro200

6.5 PCR-Primer

Tabelle 6. 3: Primersequenzen für in dieser Arbeit untersuchte Duftbiosynthesestrukturgene

Name	Strukturgen	Ann. temp (°C)	Forward5'→3'	Reverse5'→3'
RhAAT1	Alcohol acyl transferase 1	64	ccatcagctgcttcctcttc	atggagccattggaacaaac
RhAAT1-Intron	Alcohol acyl transferase 1	66	aagccatatccgcgacttcaa	ccgaagcccacaaaaagta
RhAAT1-Intron2	Alcohol acyl transferase 1	64	atggaaaggatgtggtttgg	actgctccctggtgctgtat
RhAAT1codingseq	Alcohol acyl transferase 1	64	ccatcagctgcttcctcttc	ggtttggagatgcaaatgct
RcOMT3	Caffeic acid-o-methyltransferase	62	gactctgcatcaccctctcc	gaacatgccatcaccatttg
RcOMT3-Intron	Caffeic acid-o-methyltransferase Intron	62	tgatgagggcaatattccaa	gaacatgccatcaccatttg
RhOOMT1	Orcinol-o-methyltransferase1	61	caatccatccaaccaaatcc	ggagagccggtaccacatta
RhOOMT2	Orcinol-o-methyltransferase2	61	aaatggagagcattccaacg	tcagcatgtcgaagaacagc
RcOMT2	Caffeic-Acid-o-methyltransferase	64	ctcagcttccgaccaagaac	acaccagcccaaataccaac
EOMT	Eugenol-o-methyltransferase	64	aaatattcgggtgccctagc	gctgggctagtgtctggttc
GDS	GermacrenD-Synthase	64	cagcatttggggagatcagt	ttgtaaccatgctgcctcag
fc0449	MASAKO euB3	58	agcaaaccccttccattctt	cagcttgcgattacgttcaa
gg0358	Flavanone-3-hydroxylase	58	ccccaaaacagaacggaaat	ccgggtatgagaagtaggtca
AX028830	Flavanoid-3-hydroxylase	58	gcaggaggaggtaactgtgc	ctcatcccggcagatattct
AB201050	UDP-glucose: anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase	58	tgtttcgacgtcacgaaagac	ggagtccatcaactccctca
gg0052	geranylgeranyl reductase	58	aggcgacaagtgctggataa	tccgcctaaaatcttgtcctt
POMT	Phloroglucinol-o-methyltransferase	60	gccctctgtttctcttgcac	tccggaagaattgactccac
CCD1	Carotenoid cleavage dioxygenase1	64	gaaccagagccagaggagtg	gcatgaacccatcctttgaa

Tabelle 6. 4: Primersequenzen für in dieser Arbeit entwickelte EST-Marker mit Ähnlichkeiten zu Duftbiosynthese Genen oder Genen der Blütenbildung, signifikante Ähnlichkeiten mit Angabe des besten Treffers

Marker-name	Ähnlichkeit	Ann. (°C)	5'→3'	3'→5'
G_100	no homolog	60	tgacaggttatttgtctacg	cagagaacgaaagcagcaag
G_189	gi|226919133|gb|ACO91805.1| phospholipid N-methyltransferase [Glycine max]	58	aacaatggggatagcagcag	acggcagatgaagagaaacc
Mira_c125	gi|45478053|gb|AAS66357.1| (-)-germacrene D synthase [Vitis vinifera]	59	gctccaacaattgcatcaga	tgtctttctgtcgcaccgta
T_1410	gi|223525828|gb|EEF28267.1| protein farnesyltransferase alpha subunit, putative [Ricinus communis]	60	gacatttttacaattctgcttgga	acagattccaagacaaaacaagc
T_1161	(+T_4901+T_999+T_3209) gi|149941642|dbj|BAF64843.1| aromatic L-amino acid decarboxylase [Rosa x damascena]	60	ggagacatgcttcagcttcc	tgcttttcctcggacagagt
c3299	gi|170286897|dbj|BAG13450.1| phenylacetaldehyde reductase [Rosa x damascena]	62	tgatggatgcgaatgtgttt	gctgcacacttgtgttgagag
T_178	gi|20155398 Acetyl CoA: benzylalcohol acetyltransferase; BEAT [Clarkia breweri]	60	ggatcaacgaggccttctaa	gattcatccggtgaaaatgc
T_1994	gi|225466053|ref|XP_002263278.1| PREDICTED: ripening-related protein-like [Vitis vinifera]	60	acgactgccttgaggagatg	ataaaacactgactggggtatacat
T_249	No hit	59	ttgatgccgtttctgacaag	accaagtctcctgctgaacg
T_2724	gi|33339703|gb|AAQ14331.1|AF283506_1 MYC1 [Catharanthus roseus]	60	tacgagcaagaaggggtcaa	Gtcgaatgtctgctgaccaa
T_45	Alcohol Acetyltransferase [Fragaria x ananassa]-like	60	tgctatgctctctctctataagattgt	ttcggtcttactctgtttcatcc
T_81	Benzylalcohol acetyltransferase	60	attgcctggagtgaaaaagc	catcagttcaccactgaacca
G_43	Transferase Familie	60	aaaatttgcttacaagaaaaatcc	gagaggacaagccttttgagg
G_185	gb|ACM45718.1|endo-1,3-beta-glucanase [Pyrus pyrifolia]	60	gattgtgatttccaaggaagg	cttgtttcgccttccaactc
G_101	gi|124360402|gb|ABN08415.1| Helicase, C-terminal [Medicago truncatula]	60	ttggaggagatggttactgga	acttgaagaagccggacaga
T_546	gi|223546033|gb|EEF47536.1| 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase, putative [Ricinus communis]	60	gacatttaagcatcactacaagca	ggcagcaaagaacacaatgc

T_78	gi|242047002|ref|XP_002461247.1| hypothetical protein SORBIDRAFT_02g043510 [Sorghum bicolor]	60	tgcatacaagaaacaacaatgg	cccagagttccttaacctgatg
T_1306	Triterpensynthase	60	tgattgttgccatgtctcgt	ttcaacatggcgttctgtgt
T_3043	gi|10177179|dbj|BAB10313.1| pectate lyase [Arabidopsis thaliana]	60	tttgccaaagaggtgacaca	gaccagaccggcaattaaga
G_14	O-Methyltransferase	60	acgttgaggctgtcaaggag	gcatggttaattgagtcccaaa

Tabelle 6. 5: Primersequenzen AATX (c430)

Primer	Sequenz 5‘ → 3‘	Ann-temp.(°C)	Hersteller
cdsAATXforward	caccatgggggataacaattac	64	Invitrogen
cdsAATXreverse	ggactgcatcaactcttcaaac	64	Invitrogen
3‘RACE	caccatgggggataacaattac	64	Invitrogen
RACEc430Outer	ttacttccttctcaggcacacc	60	Invitrogen
RACEc430Inner	tcaaaagagttgctgtcaaagaag	60	Invitrogen

Tabelle 6. 6: Andere Primer

Primer	Sequenz 5‘ → 3‘	Hersteller	Verwendung
M13uni	gtaaaacgacggccagt	MWG Biotech	Insert PCR
M13reverse	caggaaacagctatgac	MWG Biotech	Insert PCR
Actin-forward	cgaggaagatctggcatca	MWG Biotech	Kontroll-PCR RT
Actin-reverse	aggagctgctcttggcagt	MWG Biotech	Kontroll-PCR RT

6.6 Zusätzliches Material

6.6.1 Ergebnisse der Subtraktiven Hybridisierung

Tabelle 6. 7: Liste der in den subtraktiven Pools am stärksten exprimierten Contigs (Quelle: Statistik der Firma Cogenics)

Name	# im Geranylacetat minus Pool	# im Geranylacetat plus Pool	Algorithmus	E-Wert	Ähnlichkeit zu
mira_c1076	0	11	BLASTx	9.00E-29	>gi|223538984|gb|EEF40581.1| phosphoglycerate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]
mira_c1232	0	14	BLASTx	7.00E-05	>gi|21929220|dbj|BAC06184.1| 110 kDa 4SNc-Tudor domain protein [Pisum sativum]
mira_c5789, 40	12	14, 89	BLASTx	8.00E-20	>gi|124109177|gb|ABM91064.1| xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase precursor XTH-38 [Populus tremula x Populus tremuloides]
mira_c348	0	29	BLASTn	2.00E-14	>gi|37783284|gb|AY205603.1| Antirrhinum majus mutant cincinnata mRNA, complete cds
mira_c273	0	37	BLASTn	5.00E-60	>gi|71034458|gb|DQ115404.1| Malus x domestica starch branching enzyme I (SbeI) gene, complete cds
mira_c5793	17	43	BLASTx	7.00E-15	>gi|223526820|gb|EEF29039.1| nucleic acid binding protein, putative [Ricinus communis]
mira_c60, 403	40, 56	82, 96	BLASTx	3.00E-23	>gi|15219147|ref|NP_173069.1| TMS membrane family protein / tumour differentially expressed (TDE) family protein [Arabidopsis thaliana]
mira_c463	49	64	BLASTx	2.00E-30	>gi|579402|emb|CAA31008.1| PR1a preprotein [Nicotiana tabacum]
mira_c365	65	123	BLASTx	5.00E-43	>gi|223527274|gb|EEF29429.1| Pectinesterase-3 precursor, putative [Ricinus communis]
mira_c3811	70	160	BLASTx	6.00E-09	>gi|226503437|ref|NP_001146997.1| flower-specific gamma-thionin

					[Zea mays]
mira_c1815	76	130	BLASTx	3.00E-14	>gi|87162609|gb|ABD28404.1| hypothetical protein MtrDRAFT_AC148340g20v2
mira_c1182	85	124	BLASTx	5.00E-19	>gi|110622992|emb|CAJ55406.1| ADP-sugar diphosphatase [Solanum tuberosum]
mira_c938	89	137	BLASTx	5.00E-29	>gi|223534187|gb|EEF35903.1| sterol desaturase, putative [Ricinus communis]
mira_c6	90	147	BLASTx	6.00E-17	>gi|83628260|gb|ABC26010.1| 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5 [Citrus clementina]
mira_c366	94	202	BLASTn	2.00E-139	>gi|1143510|emb|Z47076.1| M. domestica Borkh mRNA for serine/threonine protein phosphatase (PPX)
mira_c303	96	71	BLASTx	4.00E-22	>gi|225437447|ref|XP_002272357.1| PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L19 [Vitis vinifera]
mira_c50	98	0	BLASTn	0.00E+00	>gi|226001014|dbj|AB370116.1| *Rosa* hybrid cultivar RhEXPA1 mRNA for alpha expansin, complete cds
mira_c35	99	0	BLASTx	7.00E-18	>gi|226531508|ref|NP_001149014.1| rhodanese-like domain containing protein [Zea mays]
mira_c5783,4417, 5819, 3296, 1, 123, 945	108, 125, 207, 180, 675, 100, 164	21	BLASTx	1.00E-23	>gi|15221521|ref|NP_177044.1| ATNUDT1 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 1); dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase/ hydrolase
mira_c59	118	0	BLASTx	2.00E-08	>gi|16516825|emb|CAD10106.1| Gip1-like protein [Petunia x hybrida]
mira_c46	118	24	BLASTx	9.00E-29	>gi|15235514|ref|NP_195447.1| MEE59 (maternal effect embryo arrest 59) [Arabidopsis thaliana]
mira_c138	120	4	BLASTx	1.00E-08	>gi|223545501|gb|EEF47006.1| conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
mira_c25	130	0	BLASTx	5.00E-23	>gi|223536866|gb|EEF38504.1| oxidoreductase, putative [Ricinus communis]
mira_c1313	130	151	BLASTn	7.00E-79	>gi|139001603|dbj|AB272752.1| Malus x domestica UGE mRNA for UDP-galactose, complete cds
mira_c15	136	0	BLASTn	2.00E-129	>gi|82621243|gb|DQ279095.1| *Rosa* x *borboniana* xyloglucan endotransglucosylase hydrolase mRNA, complete cds

mira_c56	138	17	BLASTn	3.00E-126	>gi|124109190|gb|EF194054.1| Populus tremula x Populus tremuloides xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase precursor XTH-14 mRNA, complete cds
mira_c21	140	0	BLASTx	6.00E-43	>gi|223543659|gb|EEF45187.1| Auxin-responsive protein IAA4, putative [Ricinus communis]
mira_c14	147	0	BLASTx	2.00E-24	>gi|30684653|ref|NP_180618.2| BTB/POZ domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]
mira_c2090	155	0	BLASTx	5.00E-40	>gi|5031285|gb|AAD38148.1|AF139501_1 beta-amylase [Prunus armeniaca]
mira_c2	160	263	BLASTx	1.00E-33	>gi|493636|dbj|BAA06153.1| CR9 [Cucumis sativus]
mira_c716	222	0	BLASTx	9.00E-18	>gi|224069539|ref|XP_002326368.1| SAUR family protein [Populus trichocarpa]
mira_c83	225	0	BLASTx	8.00E-72	>gi|163914197|dbj|BAF95867.1| putative plastid lipid-associated protein [Vitis hybrid cultivar]
mira_c802, 57, 1865, 5820	1557, 178, 163, 73	1, 1, 120	BLASTn	2.00E-160	>gi|170286898|dbj|AB426520.1| *Rosa* hybrid cultivar mRNA for beta-glucosidase, complete cds

6.6.2 Kartierung

Tabelle 6. 8: Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte [1], vervollständigte [2], neu in die Karten der Populationen 94/1 und 97/7 integrierte [3] Marker

Marker	<117x119>	95/13-39xSp3	Marker	<117x119>	95/13-39xSp3
155SSR[2]	<abxcd>	<abxaa>	**Rh78[2]**	<aaxab>	<abxcd>
AAT1codingseq[1]	<abxab>		**Rh79[2]**	<abxcd>	
AAT1-Intron2[1]	<abxab>	<abxab>	**Rh79-1[2]**	<aaxab>	
C139-2[3]	<aaxab>		**Rh80[2]**	<abxab>	<abxac>
C139-3[3]	<abxaa>		**Rh80-2[2]**	<aaxab>	
ccd1_RsaI[1]	<abxab>		**Rh83-1[2]**	<abxab>	
Cl2980[3]	<abxcd>	<abxac>	**Rh85-1[2]**	<aaxab>	
Cl2996-1[3]		<abxab>	**Rh91[2]**	<abxac>	
Cl2996-2[3]		<abxac>	**Rh93-1[2]**	<abxaa>	
eomtMboI-1[1]		<abxab>	**Rh96[2]**	<abxac>	
EST_c125[1]	<abxaa>		**RhABT12[2]**	<abxcd>	
EST_G_100[1]	<abxaa>		**RhABT12_2[2]**	<abxaa>	
EST_G_189_HinfI[1]		<aaxab>	**RMS001[2]**	<aaxab>	
EST_T_1161_BseGI[1]		<abxaa>	**RMS003[2]**	<abxac>	<abxcd>
EST_T_1410_AluI[1]	<abxaa>		**RMS008[2]**	<abxac>	
EST_T_178[1]	<abxaa>		**RMS015[2]**	<abxcd>	<abxac>
EST_T_1994[1]	<abxab>		**RMS035[2]**	<abxac>	
EST_T45_SSCP[1]		<abxab>	**RMS039[2]**	<abxab>	<abxab>
EST_T81_SSCP[1]		<abxac>	**RMS039_2[2]**	<abxcd>	
Geranylacetat [1]	<abxab>		**RMS043[2]**	<abxac>	<abxcd>
GDS_1[1]	<aaxab>		**RMS045[2]**	<abxaa>	
GDS-2[1]	<abxaa>	<abxaa>	**RMS054[2]**		<abxab>
gg0358[3]		<aaxab>	**RMS060[2]**	<abxac>	
H10D03[3]	<abxcd>	<abxac>	**RMS061[2]**	<abxaa>	
H20G01[3]		<abxaa>	**RMS063[2]**		<aaxab>
H22E04[3]		<aaxab>	**RMS065[2]**		<abxab>
H2F12[3]	<abxcd>	<abxcd>	**RMS066[2]**		<abxac>
HaeIII-C1[1]	<abxab>		**RMS070[2]**		<abxab>
MboIOOMT1-1[1]	<abxaa>		**RMS086[2]**		<abxab>
MboIOOMT1-2[1]	<aaxab>		**RMS088[2]**		<aaxab>
MboIOOMT2[1]	<aaxab>		**RMS091-1[2]**	<abxab>	
NerolI[1]	<abxab>		**RMS091-2[2]**	<aaxab>	
Nerylacetat [1]	<abxaa>		**RMS091-3[2]**	<aaxab>	
pomt_MboI[1]		<aaxab>	**RMS091-4[2]**	<abxab>	
Rcomt3Intr265[1]	<aaxab>	<abxab>	**RMS108[2]**	<abxab>	
Rcomt3Intr280[1]	<aaxab>	<abxab>	**RMS108-1[2]**		<abxaa>
Rh48-1[2]	<aaxab>	<abxac>	**RMS108-2[2]**		<abxac>
Rh48-2[2]	<abxab>		**RMS132[2]**	<abxac>	
Rh50[2]	<abxac>	<abxaa>	**RMS137[2]**	<aaxab>	
Rh58[2]	<abxac>	<abxac>	**RMS146[2]**		<aaxab>

Marker	<117x119>	95/13-39xSp3	Marker	<117x119>	95/13-39xSp3
Rh59-1[2]	<abxaa>	<abxab>	**RMS147[2]**	<abxac>	
Rh59-2[2]	<abxaa>	<abxac>	**RMS35-1-1[2]**		<aaxab>
Rh59-3[2]		<abxcd>	**RMS35-1-2[2]**		<abxab>
Rh59-4[2]		<abxab>	**RMS35-2-1[2]**		<abxaa>
Rh59-5[2]		<aaxab>	**RMS35-2-2[2]**		<abxaa>
Rh60-1[2]	<aaxab>		**RMS35-3[2]**		<abxcd>
Rh65-1[2]	<abxaa>		**Rw11E5[3]**	<aaxab>	<aaxab>
Rh65-2[2]	<aaxab>	<aaxab>	**Rw11E5-2[3]**	<abxab>	
Rh65-3[2]	<aaxab>	<abxaa>	**Rw11E5-5[3]**	<aaxab>	
Rh65-4[2]	<abxab>		**Rw11E5-6[3]**	<abxab>	
Rh65-5[2]	<abxaa>		**Rw11E5-7[3]**	<abxaa>	
Rh72[2]	<abxab>	<abxab>	**Rw12J12[3]**	<abxcd>	<abxac>
Rh73[2]	<abxab>	<aaxab>	**RW22A3-1[3]**		<aaxab>
Rh76-1[2]	<abxaa>		**RW22A3-2[3]**		<abxaa>
Rh77-1[2]	<aaxab>		**Rw55E12[3]**	<abxcd>	<abxac>

Tabelle 6. 9: EST-Marker aus der während dieser Arbeit entwickelten SSH-Bank mit Ähnlichkeiten zu Duft- und Blütenbildungsrelevanten Sequenzen, wobei in der Bezeichnung G_ viel Geranylacetat, T_ relativ wenig Geranylacetat und Mira_c für Sequenzen aus dem SAMS als Quelle

Marker-name	Ähnlichkeit	Polymorph in 94/1	Polymorph in 97/7	Ausgewertet?	Kartiert?
G_100	Kein Treffer	SSCP		in 94/1	Nicht gruppiert
G_101	(+G_33) Valencensynthase	SSCP	SSCP		
G_104	Acetyltransferase verwandt	MseI?			
G_185	Fragaria x ananassa alcohol acyltransferase related F25C20.1;	MseI	MseI		
G_189	gi|109633769|N-methyltransferase	AluI, BsuRI	RsaI, HinfI	in 97/7	KG2
G_43	Transferase Family Protein	BsaBI?	BsaBI		
Mira_c125	Terpensynthase (Diterpene)	SSCP	SSCP	in 94/1	KG5
T_1410	(+c1877) Farnesyltransferase	HinfI, AluI		in 94/1	KG4
Mira_c3299	(+c4547) Linalool Synthase		BfuCI		
T_102	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase [Clarkia breweri]	TaaI?			
T_1161	(+T_4901+T_999+T_3209) gi|149941641|*Rosa* x *damascena* aromatic L-amino acid decarboxylase	BseGI	BseGI	in 97/7	KG5
T_178	gi|20155398 Acetyl CoA: benzylalcohol acetyltransferase; BEAT [Clarkia breweri]	SSCP		in 94/1	KG2

T_1994	Linalool Synthase [Mentha aquatica]	SSCP	SSCP	in 94/1	KG1
T_249	No hit	SSCP	MboI, AluI	in 94/1	KG4
T_2724	Myrcene/(E)-beta-ocimene synthase-like	SSCP	SSCP	in 94/1	Nicht gruppiert
T_45	Alcohol acyltransferase [Fragaria x ananassa]-like		SSCP	in 97/7	KG4
T_78	putative N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase [Arabidopsis thaliana]		SSCP		
T_81	Benzylalcohol acetyltransferase	SSCP	SSCP	in 97/7	KG6

6.6.3 Ergebnisse der Sequenzierung von RhAAT1

Auf den folgenden zwei Seiten ist das Alignment der acht verschiedenen gefundenen RhAAT1 Sequenzen abgebildet.
Die Sequenzen wurden durch verschiedene Primerpaare aus genomischer DNA der Genotypen 93/1-117 und 119 über PCR amplifiziert, in *E. coli* kloniert und sequenziert.
Das Alignment erfolgte in BioEdit, die graphische Darstellung mit BioEdit Graphic View.
In der Originalsequenz:
Die Primer für RhAAT1codingseq binden an der Stelle 5‘ → 3‘ bp27 und 3‘ → 5‘ bp 2669.

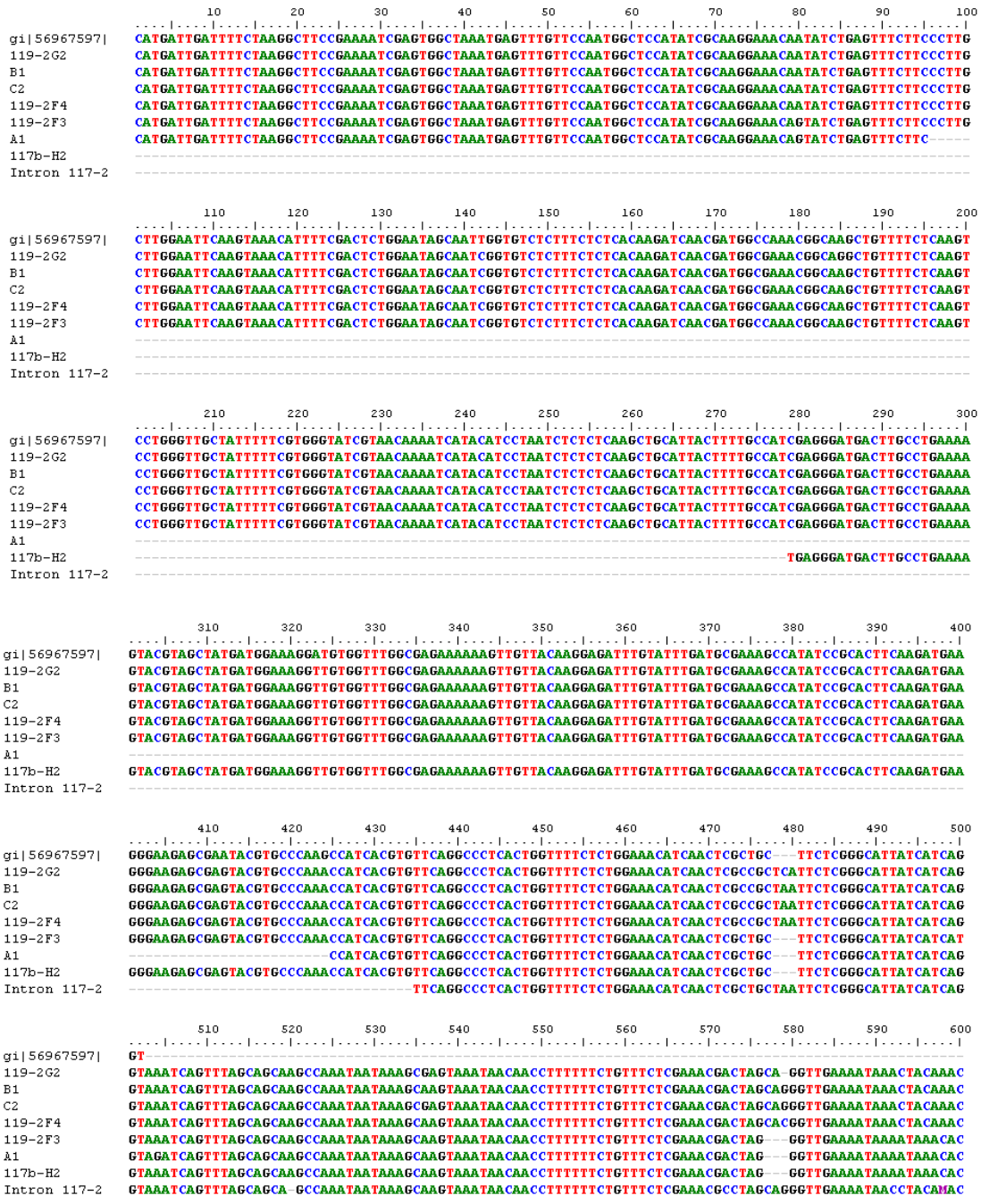
Die Primer für RhAAT1_Intron2 binden an der Stelle 5‘ → 3‘ bp 308 und 3‘ → 5‘ bp 2207.

Die Primer für RhAAT1 binden 5‘ → 3‘ bp 27 und 3‘ → 5‘ bp 375.

Die Primer für RhAAT_Intron binden 5‘ → 3‘ bp 310 und 3‘ → 5‘ bp 2210.

(stimmt nicht mit den Nukleotidpositionen auf den folgenden Abbildungen überein!)

Auf den Folgenden zweieinhalb Seiten ist ein Screenshot des Alignments der Nukleotidsequenzen der acht Versionen der RhAAT1 zu sehen. Abgebildet sind dabei nur die Bereiche, die das Intron umschließen.


gi|56967597|
119-2G2
B1
C2
119-2F4
119-2F3
A1
117b-H2
Intron 117-2

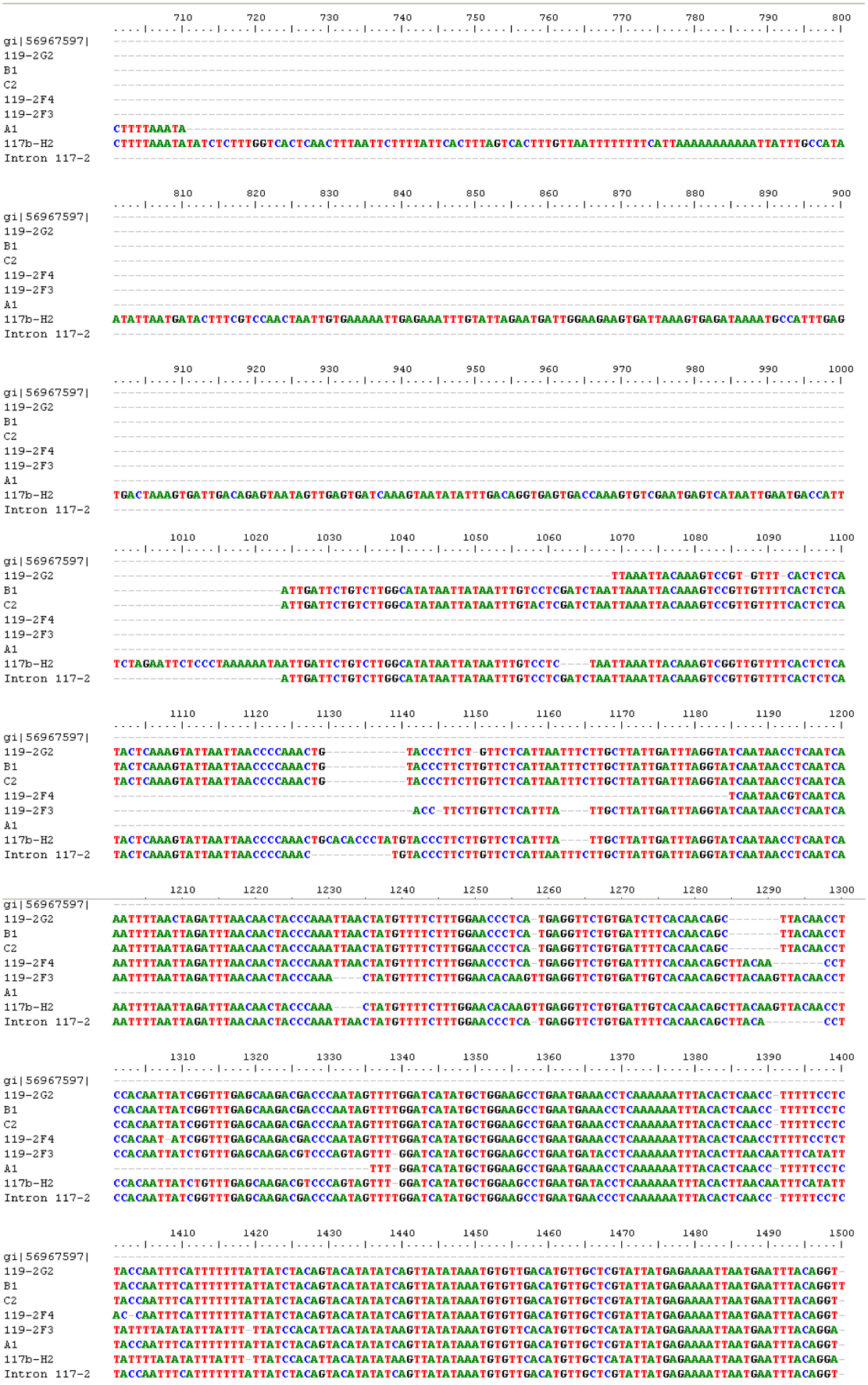

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
gi|56967597|
119-2G2
B1
C2
119-2F4
119-2F3
A1
117b-H2
Intron 117-2
CTTTTAAATA
CTTTTAAATATATCTCTTTGGTCACTCAACTTTAATTCTTTTATTCACTTTAGTCACTTTGTTAATTTTTTTTCATTAAAAAAAAAAATTATTTGCCATA
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
ATATTAATGATACTTTCGTCCAACTAATTGTGAAAAATTGAGAAATTTGTATTAGAATGATTGGAAGAAGTGATTAAAGTGAGATAAAATGCCATTTGAG
910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
TGACTAAAGTGATTGACAGAGTAATAGTTGAGTGATCAAAGTAATATATTTGACAGGTGAGTGACCAAAGTGTCGAATGAGTCATAATTGAATGACCATT
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
TTAAATTACAAAGTCCGT-GTTT-CACTCTCA
ATTGATTCTGTCTTGGCATATAATTATAATTTGTCCTCGATCTAATTAAATTACAAAGTCCGTTGTTTTCACTCTCA
ATTGATTCTGTCTTGGCATATAATTATAATTTGTACTCGATCTAATTAAATTACAAAGTCCGTTGTTTTCACTCTCA
TCTAGAATTCTCCCTAAAAAATAATTGATTCTGTCTTGGCATATAATTATAATTTGTCCTC----TAATTAAATTACAAAGTCGGTTGTTTTCACTCTCA
ATTGATTCTGTCTTGGCATATAATTATAATTTGTCCTCGATCTAATTAAATTACAAAGTCCGTTGTTTTCACTCTCA
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
TACTCAAAGTATTAATTAACCCCAAACTG----------TACCCTTCT-GTTCTCATTAATTTCTTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
TACTCAAAGTATTAATTAACCCCAAACTG----------TACCCTTCTTGTTCTCATTAATTTCTTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
TACTCAAAGTATTAATTAACCCCAAACTG----------TACCCTTCTTGTTCTCATTAATTTCTTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
TCAATAACGTCAATCA
ACC-TTCTTGTTCTCATTTA----TTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
TACTCAAAGTATTAATTAACCCCAAACTGCACACCCTATGTACCCTTCTTGTTCTCATTTA----TTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
TACTCAAAGTATTAATTAACCCCAAAC----------TGTACCCTTCTTGTTCTCATTAATTTCTTGCTTATTGATTTAGGTATCAATAACCTCAATCA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
AATTTTAACTAGATTTAACAACTACCCAAATTAACTATGTTTTCTTTGGAACCCTCA-TGAGGTTCTGTGATCTTCACAACAGC-------TTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAATTAACTATGTTTTCTTTGGAACCCTCA-TGAGGTTCTGTGATTTTCACAACAGC-------TTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAATTAACTATGTTTTCTTTGGAACCCTCA-TGAGGTTCTGTGATTTTCACAACAGC-------TTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAATTAACTATGTTTTCTTTGGAACCCTCA-TGAGGTTCTGTGATTTTCACAACAGC-------TTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAA----CTATGTTTTCTTTGGAACACAAGTTGAGGTTCTGTGATTGTCACAACAGCTTACAAGTTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAA----CTATGTTTTCTTTGGAACACAAGTTGAGGTTCTGTGATTGTCACAACAGCTTACAAGTTACAACCT
AATTTTAATTAGATTTAACAACTACCCAAATTAACTATGTTTTCTTTGGAACCCTCA-TGAGGTTCTGTGATTTTCACAACAGCTTACA--------CCT
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
CCACAATTATCGGTTTGAGCAAGACGACCCAATAGTTTTGGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAAACCTCAAAAAATTTACACTCAACC-TTTTTCCTC
CCACAATTATCGGTTTGAGCAAGACGACCCAATAGTTTTGGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAAACCTCAAAAAATTTACACTCAACC-TTTTTCCTC
CCACAATTATCGGTTTGAGCAAGACGACCCAATAGTTTTGGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAAACCTCAAAAAATTTACACTCAACC-TTTTTCCTC
CCACAAT-ATCGGTTTGAGCAAGACGACCCAATAGTTTTGGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAAACCTCAAAAAATTTACACTCAACCTTTTTCCTCT
CCACAATTATCTGTTTGAGCAAGACGTCCCAGTAGTTT-GGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGATACCTCAAAAAATTTACACTTAACAATTTCATATT
TTT-GGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAAACCTCAAAAAATTTACACTCAACC-TTTTTCCTC
CCACAATTATCTGTTTGAGCAAGACGTCCCAGTAGTTT-GGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGATACCTCAAAAAATTTACACTTAACAATTTCATATT
CCACAATTATCGGTTTGAGCAAGACGACCCAATAGTTTTGGATCATATGCTGGAAGCCTGAATGAACCCTCAAAAAATTTACACTCAACC-TTTTTCCTC
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
TACCAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGT-
TACCAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGTT
TACCAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGT-
AC-CAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGT-
TATTTTATATATTTATTT-TTATCCACATTACATATATAAGTTATATAAATGTGTTCACATGTTGCTCATATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGA-
TACCAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGT-
TATTTTATATATTTATTT-TTATCCACATTACATATATAAGTTATATAAATGTGTTCACATGTTGCTCATATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGA-
TACCAATTTCATTTTTTTATTATCTACAGTACATATATCAGTTATATAAATGTGTTGACATGTTGCTCGTATTATGAGAAAATTAATGAATTTACAGGT-

Abbildung 6. 1: Alignment der acht verschiedenen RhAAT1 Sequenzen, die Unterschiede bestehen in den Bereichen die das Intron umschließen, sowie im Intron selbst. B1, C2, A1 Sequenzen aus 93/1-117

6.6.4 Abbildung des 5'-RACE Alignments

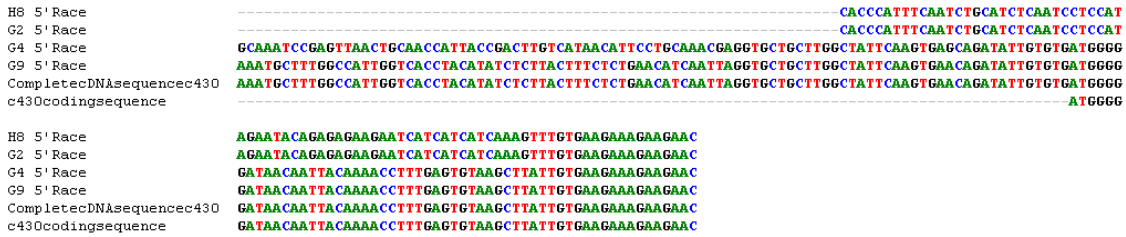


Abbildung 6. 2: Alignment der 5'-RACE Produkte zur Veranschaulichung der Sequenzunterschiede der sequenzierten Klone der AATX

6.6.5 Signifikanzschwellen für die QTL-Regionen bei *Interval Mapping*

Tabelle 6. 10: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente Geraniol

Geraniol	Schwellenwert(LOD)	Geraniol	Schwellenwert(LOD)
LG A1	3,0	**LG B1**	3,1
LG A2	3,2	**LG B2**	3,2
LG A3	2,7	**LG B3**	3,4
LG A4	3,2	**LG B4**	3,2
LG A5	3,2	**LG B5**	2,5
LG A6	2,7	**LG B6**	3,1
LG A7	3,0	**LG B7**	3,1
Genomweit	4,1	**Genomweit**	4,3

Tabelle 6. 11: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente β-Citronellol

β-Citronellol	Schwellenwert(LOD)	β-Citronellol	Schwellenwert(LOD)
LG A1	3,1	**LG B1**	3,3
LG A2	3,2	**LG B2**	3,1
LG A3	3,6	**LG B3**	3,1
LG A4	3,2	**LG B4**	3,2
LG A5	2,9	**LG B5**	3,0
LG A6	2,8	**LG B6**	2,9
LG A7	3,0	**LG B7**	3,0
Genomweit	4	**Genomweit**	4,2

Tabelle 6. 12: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente 2-Phenylethanol

2-Phenylethanol	Schwellenwert(LOD)	2-Phenylethanol	Schwellenwert(LOD)
LG A1	3,0	**LG B1**	3,1
LG A2	3,3	**LG B2**	3,3
LG A3	2,8	**LG B3**	3,4
LG A4	3,0	**LG B4**	3,2
LG A5	3,2	**LG B5**	2,7
LG A6	2,5	**LG B6**	3,2
LG A7	3,1	**LG B7**	3,0
Genomweit	4,1	**Genomweit**	4,3

Tabelle 6. 13: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente Nerylacetat

log(Nerylacetat)	Schwellenwert(LOD)	log(Nerylacetat)	Schwellenwert(LOD)
LG A1	3,3	**LG B1**	3,5
LG A2	3,4	**LG B2**	3,4
LG A3	2,9	**LG B3**	3,7
LG A4	3,5	**LG B4**	3,7
LG A5	3,2	**LG B5**	3,2
LG A6	2,8	**LG B6**	3,1
LG A7	3,2	**LG B7**	3,1
Genomweit	4,5	**Genomweit**	4,7

Tabelle 6. 14: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente Geranylacetat

log(Geranylacetat)	Schwellenwert(LOD)	log(Geranylacetat)	Schwellenwert(LOD)
LG A1	2,9	**LG B1**	3,2
LG A2	3,2	**LG B2**	3,4
LG A3	2,6	**LG B3**	3,5
LG A4	3,2	**LG B4**	3,5
LG A5	3,4	**LG B5**	2,7
LG A6	2,7	**LG B6**	3,2
LG A7	3,2	**LG B7**	3,0
Genomweit	4,3	**Genomweit**	4,4

Tabelle 6. 15: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für die Population 94/1 für die Duftkomponente Nerol

log(Nerol)	Schwellenwert(LOD)	log(Nerol)	Schwellenwert(LOD)
LG A1	3,3	**LG B1**	3,1
LG A2	3,1	**LG B2**	3,4
LG A3	2,9	**LG B3**	3,9
LG A4	3,4	**LG B4**	3,8
LG A5	3,4	**LG B5**	3,2
LG A6	3,0	**LG B6**	3,5
LG A7	3,2	**LG B7**	3,2
Genomweit	4,7	**Genomweit**	4,9

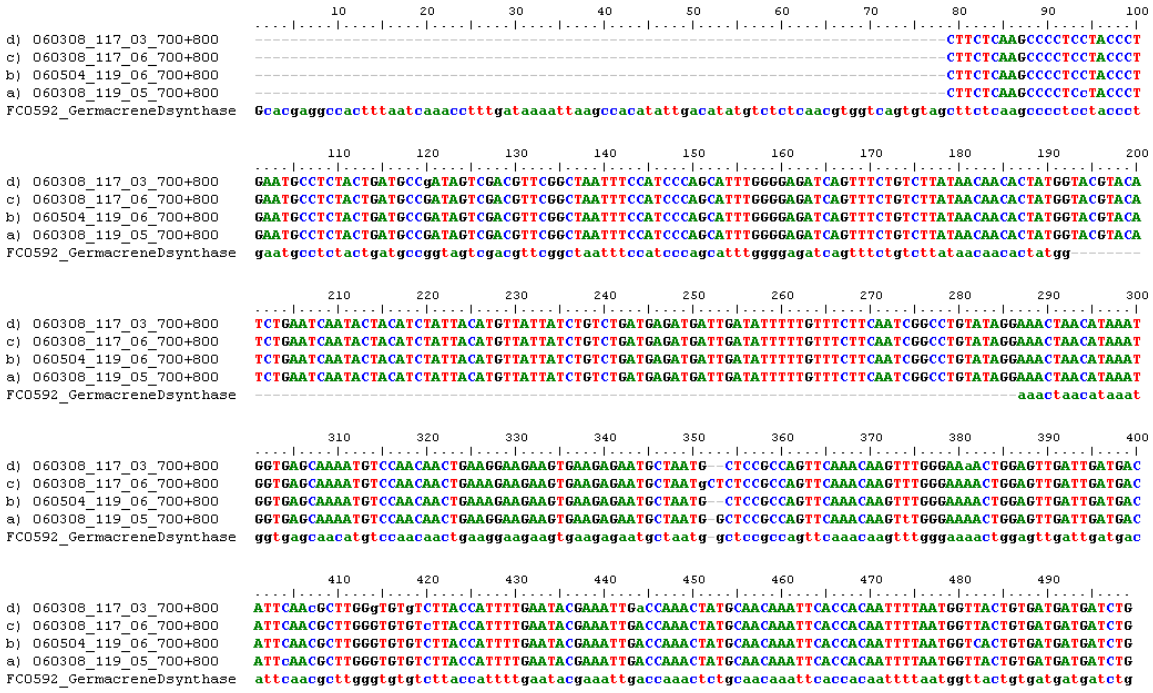


Abbildung 6. 3: Sequenzalignment der vier verschiedenen Versionen der GermacrenD-Synthase

6.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1: Überblick über die Terpenbiosynthese in Kompartimenten. 9

Abbildung 1.2: Ausschnitt aus der Phenylpropanoid-Biosynthese 11

Abbildung 1. 3: Die beliebtesten Schnittblumen 12

Abbildung 1. 4: Blütestadien der Entwicklung von Rosenblüten 15

Abbildung 1. 5: Biosyntheseschritte in der Produktion der Komponenten des Rosendufts in Epidermiszellen der Petalen 15

Abbildung 1. 6: Biosyntheseweg von Phloroglucinol zu 1,3,5-Trimethoxybenzen 19

Abbildung 1. 7: Biosyntheseschritte, die von der RcOMT1 katalysiert werden 19

Abbildung 1. 8: Die GermacrenD-Synthase 20

Abbildung 1. 9: Die CCD1 21

Abbildung 2. 1: Abstammungsübersicht 94/1 24
Abbildung 2. 2: Abstammungsübersicht 97/7 25
Abbildung 2. 3: Blütestadien der Population 94/1 27
Abbildung 2. 4: Definition des Kovats‘ Index 28
Abbildung 3. 1: Chromatogramme aus GC-MS Analysen 51
Abbildung 3. 2: Relative Anteile der Gehalte der verschiedenen identifizierten Duftstoffe..... 52
Abbildung 3. 3: Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Duftsubstanzen 54
Abbildung 3. 4: Boxplots der gemittelten absoluten Duftstoffgehalte 55
Abbildung 3. 5: Darstellung der Korrelationen zwischen den absoluten Gehalten..... 57
Abbildung 3. 6: Boxplots der Mittelwerte der Geranylacetatgehalte 59
Abbildung 3. 7: Agarosegel der PCR-Produkte der Subtraktiven Hybridisierung 59
Abbildung 3. 8: Schlüsselcharakteristika des 454 Laufs..... 60
Abbildung 3. 9: Homologe Kopplungsgruppen 1 der Populationen 94/1 und 97/7 67
Abbildung 3. 10: Homologe Kopplungsgruppen 2 und 3 der Populationen 94/1 und 97/7..... 68
Abbildung 3. 11: Homologe Kopplungsgruppen 4 und 5 der Populationen 94/1 und 97/7..... 69
Abbildung 3. 12: Homologe Kopplungsgruppen 6 und 7 der Populationen 94/1 und 97/7..... 70
Abbildung 3. 13: Kopplungsgruppen 1 von 93/1-117 (A1) und von 93/1-119 (B1). 75
Abbildung 3. 14: Kopplungsgruppen 2 von 93/1-117 (A2) und von 93/1-119 (B2) 76
Abbildung 3. 15: Kopplungsgruppen 3 von 93/1-117 (A3) und von 93/1-119 (B3) 77
Abbildung 3. 16: Kopplungsgruppen 4 von 93/1-117 (A4) und von 93/1-119 (B4) 78
Abbildung 3. 17: Kopplungsgruppen 5 von 93/1-117 (A5) und von 93/1-119 (B5) 79
Abbildung 3. 18: Kopplungsgruppen 6 von 93/1-117 (A6) und von 93/1-119 (B6) 80
Abbildung 3. 19: Kopplungsgruppen 7 von 93/1-117 (A7) und von 93/1-119 (B7) 81
Abbildung 3. 20: Alignment der Aminosäuresequenzen der AATX und der putativen Taxadien-5-alpha-ol O-Acetyltransferase 89
Abbildung 3. 21: Dendrogramm der BAHD Aminosäuresequenzen. 91
Abbildung 3. 22: Pilotexpression, Proteinanreicherung nach Induktion 92
Abbildung 3. 23: Membran nach Inkubation mit Antikörpern. 93
Abbildung 4. 1: Teil der Terpenoidsynthese 101
Abbildung 4. 2: Biosyntheseweg nach Sakai et al. von L-Phenylalanin zu 2-Phenylethanol ... 103
Abbildung 4. 3: Punnett-Quadrat für die unabhängige Vererbung zweier dominanter Faktoren zur Produktion von Geranylacetat. 104
Abbildung 4.4: Fünf der acht gefundenen RhAAT1 Sequenzen 107
Abbildung 6. 1: Alignment der acht verschiedenen RhAAT1 Sequenzen 138
Abbildung 6. 2: Alignment der 5’-RACE Produkte..... 138

Abbildung 6. 3: Sequenzalignment der vier verschiedenen Versionen der GermacrenD-Synthase 140

6.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2. 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme 26
Tabelle 2. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide. 26
Tabelle 2. 3: Adaptersequenzen, die zur Unterscheidung der einzelnen Fragmentbanken in der 454-Sequenzierung dienten 30
Tabelle 3. 1 Substanzen die in den Duftextrakten aus den Petalen der Elterngenotypen 93/1-117, -119 und der Population 94/1 nachgewiesen werden konnten. 49
Tabelle 3. 2: Segregrationsmuster der eindeutig identifizierten Duftsubstanzen 56
Tabelle 3. 3: Gemittelte Gehalte der Duftsubstanzen, dargestellt in mg/l 56
Tabelle 3. 4: In der vorliegenden Arbeit kartierte Duftbiosynthesestrukturgene 63
Tabelle 3. 5: In dieser Arbeit kartierte ESTs 64
Tabelle 3. 6: Vergleich der Merkmale der integrierten Karten 94/1 und 97/7 65
Tabelle 3. 7: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung der Mittelwerte 71
Tabelle 3. 8: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mit den log-transformierten Mittelwerten 71
Tabelle 3. 9: Unkartierte signifikante Marker nach Kruskal-Wallis berechnet 72
Tabelle 3. 10: Zusammenfassung über die in der Population 94/1 detektierten QTLr 73
Tabelle 3. 11: Geschätzter Einfluss der QTL auf die phänotypische Ausprägung 82
Tabelle 3. 12: Expressionsmuster der untersuchten Duftbiosynthesestrukturgene und ESTs 83
Tabelle 3. 13: Genotypspezifische Expression 84
Tabelle 3. 14: Expressionsmuster für die untersuchten Primerkombinationen der RhAAT1 86
Tabelle 3. 15: Für Substratspezifitätstests verwendete Substrate 94
Tabelle 4. 1: Zuordnung der Kopplungsgruppen zur genetischen Karte von Oyant et al. 98
Tabelle 6. 1: Hersteller von Geräten und Chemikalien 125
Tabelle 6. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte 126
Tabelle 6. 3: Primersequenzen untersuchter Duftbiosynthesestrukturgene 127
Tabelle 6. 4: Primersequenzen für in dieser Arbeit entwickelte EST-Marker 128
Tabelle 6. 5: Primersequenzen AATX (c430) 129
Tabelle 6. 6: Andere Primer 129
Tabelle 6. 7: Liste der in den subtraktiven Pools am stärksten exprimierten Contigs 130

Tabelle 6. 8: Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte [1], vervollständigte [2], neu in die Karten der Populationen 94/1 und 97/7 integrierte [3] Marker 133
Tabelle 6. 9: EST-Marker 134
Tabelle 6. 10: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für Geraniol 138
Tabelle 6. 11: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für β-Citronellol 139
Tabelle 6. 12: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für 2-Phenylethanol 139
Tabelle 6. 13: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für Nerylacetat 139
Tabelle 6. 14: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für Geranylacetat 139
Tabelle 6. 15: 95 % LOD Signifikanzschwellenwerte für Nerol 140

7. Literatur

AHARONI A, JONGSMA MA, BOUWMEESTER HJ (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, **10:** 594-602.

AHARONI A, KEIZER LCP, BOUWMEESTER HJ, SUN ZK, VAREZ-HUERTA M, VERHOEVEN HA, et al. (2000). Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, **12:** 647-661.

BANTHORPE DV, LEPATOUREL GN, FRANCIS MJ (1972). Biosynthesis of geraniol and nerol and beta-D-glucosides in *Pelargonium graveolens* and *Rosa dilecta*. *Biochem. J.*, **130:** 1045-1054.

BEEKWILDER J, VAREZ-HUERTA M, NEEF E, VERSTAPPEN FWA, BOUWMEESTER HJ, AHARONI A (2004). Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, **135:** 1865-1878.

BEN ZVI MM, FLORENCE NZ, MASCI T, OVADIS M, SHKLARMAN E, BEN-MEIR H, et al. (2008). Interlinking showy traits: co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnology Journal*, **6:** 403-415.

BERGOUGNOUX V, CAISSARD JC, JULLIEN F, MAGNARD JL, SCALLIET G, COCK JM, et al. (2007). Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta*, **226:** 853-866.

BINO RJ, HALL RD, FIEHN O, KOPKA J, SAITO K, DRAPER J, et al. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.*, **9:** 418-425.

BOATRIGHT J, NEGRE F, CHEN X, KISH CM, WOOD B, PEEL G, et al. (2004). Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol*, **135:** 1993-2011.

BOHLMANN J, KEELING CI (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant Journal*, **54:** 656-669.

BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72:** 248-254.

BURHENNE K, KRISTENSEN BK, RASMUSSEN SK (2003). A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *J. Biol. Chem.*, **278:** 13919-13927.

CAUSSE M, SALIBA-COLOMBANI V, LECOMTE L, DUFFE P, ROUSSELLE P, BURET M (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany*, **53:** 2089-2098.

CHAANIN A (2003). Breeding/Selection strategies for cut roses. In: Roberts A V, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of Rose Science,* Elsevier Ltd: Oxford, UK, pp 33-41.

CHERRI-MARTIN M, JULLIEN F, HEIZMANN P, BAUDINO S (2007). Fragrance heritability in hybrid tea roses. *Scientia Horticulturae*, **113:** 177-181.

CHRISTIANSON DW (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12:** 141-150.

CHURCHILL GA, DOERGE RW (1994). Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. *Genetics*, **138:** 963-971.

COMINO C, LANTERI S, PORTIS E, ACQUADRO A, ROMANI A, HEHN A, et al. (2007). Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. *Bmc Plant Biology*, **7**.

CRESPEL L, CHIROLLET M, DUREL CE, ZHANG D, MEYNET J, GUDIN S (2002). Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in Rosa using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **105:** 1207-1214.

CROTEAU R, GERSHENZON J (1994). Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (Mentha: Lamiaceae). In: Ellis BE, Kuroki GW, Stafford HA (eds) *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism,* Plenum Press: New York, pp 193-229.

D'AURIA JC (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology*, **9:** 331-340.

D'AURIA JC, CHEN F, PICHERSKY E (2002). Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiology*, **130:** 466-476.

D'AURIA JC, PICHERSKY E, SCHAUB A, HANSEL A, GERSHENZON J (2007a). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **49:** 194-207.

D'AURIA JC, REICHELT M, LUCK K, SVATOS A, GERSHENZON J (2007b). Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: Anthocyanidin 5-O-glucoside-6 ''-O-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters*, **581:** 872-878.

DE LUCA V, ST PIERRE B (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, **5:** 168-173.

DE VRIES DP, DUBIOS LAM (1984). Inheritance of the recurrent flowering and moss characters in F1 and F2 Hybrid Tea×*Rosa centifolia muscosa* (Aiton) Seringe populations. *Gartenbauwissenschaft 12*, 97-100.

DEBENER T, MATTIESCH L, VOSMAN B (2001). A molecular marker map for roses. *Acta Hort.*, **547:** 582-587.

DEBENER T (1999). Genetic analysis of horticulturally important morphological and physiological characters in diploid roses. *Gartenbauwissenschaft*, **64:** 14-20.

DEBENER T, LINDE M (2009). Exploring Complex Ornamental Genomes: The Rose as a Model Plant. *Critical Reviews in Plant science*, **28:** 267-280.

DEBENER T, MATTIESCH L (1999). Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **99:** 891-899.

DEXTER R, QUALLEY A, KISH CM, MA CJ, KOEDUKA T, NAGEGOWDA DA, et al. (2007). Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. *Plant Journal*, **49:** 265-275.

DUDAREVA N (2005). Plant volatiles: From compounds to metabolic pathways and their regulation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **230:** U155.

DUDAREVA N, D'AURIA JC, NAM KH, RAGUSO RA, PICHERSKY E (1998). Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase--an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.*, **14:** 297-304.

DUDAREVA N, PICHERSKY E (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol*, **122:** 627-633.

DUGO ML, SATOVIC Z, MILLAN T, CUBERO JI, RUBIALES D, CABRERA A, et al. (2005). Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, **111:** 511-520.

DUNEMANN F, BOUDICHEVSKAIA A, GRAFE C (2009a). QTL and Candidate Gene Mapping for Aroma Compounds in the Apple Progeny 'Discovery' x 'Prima'. *ISHS Acta Horticulturae I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species*, **839**.

DUNEMANN F, ULRICH D, BOUDICHEVSKAIA A, GRAFE C, WEBER WE (2009b). QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Molecular Breeding*, **23:** 501-521.

DUNPHY PJ (2006). Location and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals. *Phytochemistry*, **67:** 1110-1119.

EL-SHARKAWY I, MANRIQUEZ D, FLORES FB, REGAD F, BOUZAYEN M, LATCHE A, et al. (2005). Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, **59:** 345-362.

FERREIRA A, DA SILVA MF, SILVA LDCE, CRUZ CD (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology*, **29:** 187-192.

FLAMENT I, DEBONNEVILLE C, FURRER A (1993). Volatile Constituents of Roses - Characterization of Cultivars Based on the Headspace Analysis of Living Flower Emissions. *Acs Symposium Series*, **525:** 269-281.

FRANCIS MJO, ALLCOCK C (1969a). Monoterpene Beta-D-Glucosides in Roses - Isolation and Formation from Dl-[2-14C]Mevalonate. *Biochemical Journal*, **113:** 38-&.

FRANCIS MJO, ALLCOCK C (1969b). Geraniol Beta-D-Glucoside - Occurrence and Synhesis in Rose Flowers. *Phytochemistry*, **8:** 1339-&.

GANG DR (2005). Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56:** 301-325.

GOWRI G, BUGOS RC, CAMPBELL WH, MAXWELL CA, DIXON RA (1991). Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L) .10. Molecular-Cloning and Expression of S-Adenosyl-L-Methionine-Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase, A Key Enzyme of Lignin Biosynthesis. *Plant Physiology*, **97:** 7-14.

GUDIN S (2000). Rose: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Reviews*, **17:** 159-189.

GUTERMAN I, MASCI T, CHEN XL, NEGRE F, PICHERSKY E, DUDAREVA N, et al. (2006). Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: Rose alcohol

acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers. *Plant Molecular Biology*, **60:** 555-563.

GUTERMAN I, SHALIT M, MENDA N, PIESTUN D, FNY-YELIN M, SHALEV G, et al. (2002). Rose scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell*, **14:** 2325-2338.

HEINRICHS F (2008). International Statistics Flowers and Plants. In: AIPH/Union Fleurs, pp 16-90.

HELSPER JPFG, DAVIES JA, BOUWMEESTER HJ, KROL AF, VAN KAMPEN MH (1998). Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty. *Planta*, **207:** 88-95.

HENDEL-RAHMANIM K, MASCI T, VAINSTEIN A, WEISS D (2007). Diurnal regulation of scent emission in rose flowers. *Planta*, **226:** 1491-1499.

IBDAH M, AZULAY Y, PORTNOY V, WASSERMAN B, BAR E, MEIR A, et al. (2006). Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, **67:** 1579-1589.

IIJIMA Y, GANG DR, FRIDMAN E, LEWINSOHN E, PICHERSKY E (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*, **134:** 370-379.

INOUE K, SEWALT VJH, BALLANCE GM, NI WT, STURZER C, DIXON RA (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology*, **117:** 761-770.

ITO M, HONDA G (2007). Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry*, **68:** 446-453.

KEARSEY MJ (1998). The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, **49:** 1619-1623.

KEARSEY MJ, FARQUHAR AG (1998). QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity*, **80:** 137-142.

KING A, NAM JW, HAN J, HILLIARD J, JAWORSKI JG (2007). Cuticular wax biosynthesis in petunia petals: cloning and characterization of an alcohol-acyltransferase that synthesizes wax-esters. *Planta*, **226:** 381-394.

KNUDSEN, ERIKSSON R, GERSHENZON J, STÅHL B (2006). Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review*, **72:** 1-120.

KOBAYASHI NHTKHHTTK (1998). A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tiss Cult and Biotech*, **4:** 76-81.

KOEDUKA T, FRIDMAN E, GANG DR, VASSAO DG, JACKSON BL, KISH CM, et al. (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103:** 10128-10133.

KORBAN SS (2007). III.1 Roses. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 61,* Springer- Verlag: Berlin, Heidelberg, pp 227-239.

KOSAMBI DD (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics*, **12:** 172-175.

KOVATS E (1958). Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1 : Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, **41:** 1915-1932.

LAL SD, SETH JN, YADAV JP, DANU NS (1982). Genetic variability and correlation studies in rose. *Progressive Horticulture*, **14:** 234-236.

LAM KC, IBRAHIM RK, BEHDAD B, DAYANANDAN S (2007). Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, **50:** 1001-1013.

LANDER ES, BOTSTEIN D (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121:** 185-199.

LAVID N, WANG JH, SHALIT M, GUTERMAN I, BAR E, BEUERLE T, et al. (2002). O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiology*, **129:** 1899-1907.

LINDE M, HATTENDORF A, KAUFMANN H, DEBENER T (2006). Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping. *Theoretical and Applied Genetics*, **113:** 1081-1092.

LOUIE GV, BAIGA TJ, BOWMAN ME, KOEDUKA T, TAYLOR JH, SPASSOVA SM, et al. (2007). Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase. *PLoS One.*, **2:** e993.

MA XY, KOEPKE J, PANJIKAR S, FRITZSCH G, STOCKIGT J (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **280:** 13576-13583.

MATHIEU S, CIN VD, FEI ZJ, LI H, BLISS P, TAYLOR MG, et al. (2009). Flavour compounds in tomato fruits: identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *Journal of Experimental Botany*, **60:** 325-337.

MERCKE P, KAPPERS IF, VERSTAPPEN FWA, VORST O, DICKE M, BOUWMEESTER HJ (2004). Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiology*, **135:** 2012-2024.

MULLER,R.; OWEN,C.A.; XUE,Z.T.; WELANDER,M.; STUMMANN,B.M (2002A). Characterization of two CTR-like protein kinases in Rosa hybrida and their expression during flower senescence and in response to ethylene; Journal of Experimental Botany, **53**, 1223-1225

MULLER,R.; OWEN,C.A.; XUE,Z.T.; WELANDER,M.; STUMMANN,B.(2002b). The transcription factor EIN3 is constitutively expressed in miniature roses with differences in postharvest life. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, **78**, 10-14

NEGRE F, KOLOSOVA N, KNOLL J, KISH CM, DUDAREVA N (2002). Novel S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methyl benzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **406:** 261-270.

NEGRUK V, YANG P, SUBRAMANIAN M, MCNEVIN JP, LEMIEUX B (1996). Molecular cloning and characterization of the CER2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **9:** 137-145.

OKA N, IKEGAMI A, OHKI M, SAKATA K, YAGI A, WATANABE N (1998). Citronellyl disaccharide glycoside as an aroma precursor from rose flowers. *Phytochemistry*, **47:** 1527-1529.

OKA N, OHISHI H, HATANO T, HORNBERGER M, SAKATA K, WATANABE N (1999). Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, **54:** 889-895.

OKADA T, HIRAI MY, SUZUKI H, YAMAZAKI M, SAITO K (2005). Molecular cloning and characterization of tigloyl-CoA : 13 alpha-hydroxymultiflorine/13 alpha-hydroxylupanine O-tigloyltransferase from *Lupinus albus*: The first gene identification involved in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, **46:** S55.

OLBRICHT K, GRAFE C, WEISS K, ULRICH D (2008). Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. *Plant Breeding*, **127:** 87-93.

ORITA MSYSTHK (1998). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5:** 874-879.

OYANT LHS, CRESPEL L, RAJAPAKSE S, ZHANG L, FOUCHER F (2008). Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. *Tree Genetics & Genomes*, **4:** 11-23.

PHILLIPS MA, D'AURIA JC, GERSHENZON J, PICHERSKY E (2008). The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell*, **20:** 677-696.

PICHERSKY E (2004). Plant scents - What we perceive as a fragrant perfume is actually a sophisticated tool used by plants to entice pollinators, discourage microbes and fend off predators. *American Scientist*, **92:** 514-521.

PICHERSKY E, GERSHENZON J (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5:** 237-243.

PICHERSKY E, RAGUSO RA, LEWINSOHN E, CROTEAU R (1994). Floral Scent Production in Clarkia (*Onagraceae*) .1. Localization and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity. *Plant Physiology*, **106:** 1533-1540.

PICHERSKY E, SHARKEY TD, GERSHENZON J (2006). Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge? *Trends in Plant Science*, **11:** 421.

PICONE JM, CLERY RA, WATANABE N, MACTAVISH HS, TURNBULL CGN (2004). Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosa damascena semperflorens* cv. 'Quatre Saisons'. *Planta*, **219:** 468-478.

POTT MB, PICHERSKY E, PIECHULLA B (2002). Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. *Journal of Plant Physiology*, **159:** 925-934.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2008. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 2008.

RAJAPAKSE S, BYRNE DH, ZHANG L, ANDERSON N, ARUMUGANATHAN K, BALLARD RE (2001). Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, **103:** 575-583.

SABLOWSKI RW, MOYANO E, CULIANEZ-MACIA FA, SCHUCH W, MARTIN C, BEVAN M (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.*, **13:** 128-137.

SAKAI M, TOMITA S, HIRATA H, ASAI T, DOHRA H, HARA M, et al. (2008). Purification and characterization of beta-glucosidase involved in the emission of 2-phenylethanol from rose flowers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72:** 219-221.

SAMBROOK JRDW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, NY, USA.

SCALLIET G, JOURNOT N, JULLIEN F, BAUDINO S, MAGNARD JL, CHANNELIERE S, et al. (2002). Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases. *Febs Letters*, **523:** 113-118.

SCALLIET G, PIOLA F, DOUADY CJ, RETY S, RAYMOND O, BAUDINO S, et al. (2008). Scent evolution in Chinese roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105:** 5927-5932.

SCHUELKE M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18:** 233-234.

SCHWAB W, WILLIAMS DC, CROTEAU R (2002). Mechanism of monoterpene cyclization: stereochemistry of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **19:** 415-421.

SCHWARTZ SH, QIN XQ, ZEEVAART JAD (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *Journal of Biological Chemistry*, **276:** 25208-25211.

SHALIT M, GUTERMAN I, VOLPIN H, BAR E, TAMARI T, MENDA N, et al. (2003). Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiology*, **131:** 1868-1876.

SHALIT M, SHAFIR S, LARKOV O, BAR E, KASLASSI D, ADAM Z, et al. (2004). Volatile compounds emitted by rose cultivars: Fragrance perception by man and honeybees. *Israel Journal of Plant Sciences*, **52:** 245-255.

SHEPHERD M, CHAPARRO JX, TEASDALE R (1999). Genetic mapping of monoterpene composition in an interspecific eucalypt hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, **99:** 1207-1215.

SHUPERT DA, BYRNE DH, PEMBERTON HB (2007). Inheritance of flower traits, leaflet number and prickles in roses. *Acta Hort*, **751:** 331-335.

SIMKIN AJ, SCHWARTZ SH, AULDRIDGE M, TAYLOR MG, KLEE HJ (2004a). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant Journal*, **40:** 882-892.

SIMKIN AJ, UNDERWOOD BA, AULDRIDGE M, LOUCAS HM, SHIBUYA K, SCHMELZ E, et al. (2004b). Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology*, **136:** 3504-3514.

SOULEYRE EJ, GREENWOOD DR, FRIEL EN, KARUNAIRETNAM S, NEWCOMB RD (2005). An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS J.*, **272:** 3132-3144.

ST-PIERRE B, DE LUCA V (2000). Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Evolution of Metabolic Pathways*, **34:** 285-315.

STAM P (1993). Construction of Integrated Genetic-Linkage Maps by Means of A New Computer Package - Joinmap. *Plant Journal*, **3:** 739-744.

STEWART C, KANG BC, LIU K, MAZOUREK M, MOORE SL, YOO EY, et al. (2005). The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant Journal*, **42:** 675-688.

STUURMAN J, HOBALLAH ME, BROGER L, MOORE J, BASTEN C, KUHLEMEIER C (2004). Dissection of Floral Pollination Syndromes in Petunia. *Genetics*, **168:** 1585-1599.

TAMURA M, USHIJIMA K, SASSA H, HIRANO H, TAO R, GRADZIEL TM, et al. (2000). Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **101:** 344-349.

THOLL D, BOLAND W, HANSEL A, LORETO F, ROSE USR, SCHNITZLER JP (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, **45:** 540-560.

TIEMAN DM, ZEIGLER M, SCHMELZ EA, TAYLOR MG, BLISS P, KIRST M, et al. (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *J. Exp. Bot.*, **57:** 887-896.

VAINSTEIN A, LEWINSOHN E, PICHERSKY E, WEISS D (2001). Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant Physiology*, **127:** 1383-1389.

VAN OOIJEN J. JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. [4]. 2006. Wageningen, Netherlands, Kyazma B. V.

VAN OOIJEN J. MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. [6]. 2009. Wageningen, Netherlands, Kyazma B. V.

VASSAO DG, GANG DR, KOEDUKA T, JACKSON B, PICHERSKY E, DAVIN LB, et al. (2006). Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **4:** 2733-2744.

VERDONK JC, HARING MA, VAN TUNEN AJ, SCHUURINK RC (2005). ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell*, **17:** 1612-1624.

WANG J, DE LUCA V (2005). The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate. *Plant Journal*, **44:** 606-619.

WATANABE S, HAYASHI K, YAGI K, ASAI T, MACTAVISH H, PICONE J, et al. (2002). Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers: Incorporation of [H-2(8)]L-phenylalanine into 2-phenylethanol

and its beta-D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66:** 943-947.

WU SQ, WATANABE N, MITA S, DOHRA H, UEDA Y, SHIBUYA M, et al. (2004). The key role of phloroglucinol O-methyltransferase in the biosynthesis of *Rosa chinensis* volatile 1,3,5-trimethoxybenzene. *Plant Physiology*, **135:** 95-102.

WU SQ, WATANABE N, MITA S, UEDA Y, SHIBUYA M, EBIZUKA Y (2003). Two O-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96:** 119-128.

XIANG L, MILC JA, PECCHIONI N, CHEN LQ (2007). Genetic aspects of floral fragrance in plants. *Biochemistry (Mosc.)*, **72:** 351-358.

XIE JR, XIONG YH, LIANG GL, CHENG ZQ, TANG KX, HUANG XQ (2008). Identification of differentially expressed genes in fragrant rose Jinyindao with suppressive subtraction hybridization. *Scientia Horticulturae*, **116:** 318-323.

XU Q, WEN XP, DENG XX (2007). Cloning of two classes of PR genes and the development of SNAP markers for powdery mildew resistance loci in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Molecular Breeding*, **19:** 179-191.

XU Q, WEN XP, DENG XX (2005). Isolation of TIR and nonTIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Theoretical and Applied Genetics*, **111:** 819-830.

YAN Z, DENNEBOOM C, HATTENDORF A, DOLSTRA O, DEBENER T, STAM P, et al. (2005a). Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **110:** 766-777.

YAN ZF, DOLSTRA O, HENDRIKS T, PRINS TW, STAM P, VISSER PB (2005b). Vigour evaluation for genetics and breeding in rose. *Euphytica*, **145:** 339-347.

YANG RQ, YI NJ, XU SZ (2006). Box-Cox transformation for QTL mapping. *Genetica*, **128:** 133-143.

YANG T, LI J, WANG HX, ZENG Y (2005). A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry*, **66:** 285-293.

YE ZH (1997). Association of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiology*, **115:** 1341-1350.

YOKOYA K, ROBERTS AV, MOTTLEY J, LEWIS R, BRANDHAM PE (2000). Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany*, **85:** 557-561.

ZHANG L H (2003). Genetic linkage map in tetraploid and diploid roses. Clemson University.

ZHENG Z, QUALLEY A, FAN B, DUDAREVA N, CHEN Z (2008). An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. *Plant J.*.

Veröffentlichungen

Poster '*A Unified Genetic Map of Roses*', Plant Genetics Conference, September 2006, Kiel

Poster '*Identification and Mapping of Loci affecting floral scent in Rose Petals*', Molecular Mapping and Marker assisted Selection in Plants, Februar 2008, Wien

Konferenzbeitrag '*Identification and Mapping of Loci affecting floral scent in Rose Petals'*, W346, Plant and Animal Genome Conference XVII, Januar 2009, San Diego, CA, USA

'*Microsatellite markers from a BAC contig spanning the Rdr1 locus: a tool for marker-assisted selection in roses'*, Biber A, Kaufmann H, Linde M, Spiller M, Terefe D und Debener T, Juni 2009, *Theoretical Applied Genetics*, akzeptiert

'*Genetic and molecular analyses of key loci involved in self incompatibility and floral scent in roses*' Debener T, Bretzke M, Spiller M, *Acta horticulturae* , Proceedings of the international rose symposium 2009, eingereicht

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Genetische Untersuchung der Vererbung des Blütendufts in Rosen“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 22. Oktober 2009

_____

(Unterschrift)

Monika Spiller

Lebenslauf

Persönliche Daten

Monika Spiller geb. Müller

Geboren am:

22. Februar 1979 in Neustadt am Rübenberge

Schulische Ausbildung

[1986- 1990] Grundschule Stockhausenstraße in Neustadt a. Rbge
[1990- 1992] Orientierungsstufe Süd in Neustadt a. Rbge
[1992- 1998] Gymnasium Gaußstraße in Neustadt a. Rbge, Abschluss: Abitur (2,7)

Berufliche Ausbildung

Ausbildung

[07/1998- 07/2000] Gerd Deiters, Gartenbau in Neustadt OT Mandelsloh, Gärtnerlehre, Gärtnerin im Zierpflanzenbau (2,0)

[09/2000- 09/2001] OBI Bau- und Heimwerkermarkt, Gehrhardt-Merkatorstraße 6, 31535 Neustadt, Gärtnerin

Studium

[10/2001- 12/2005]Universität Hannover, Fachbereich Gartenbau
Studiengang/-fach: Gartenbau (Diplom)
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (1,5)

Thema der Diplomarbeit:
„Untersuchung zur Expressionsstabilität des rekombinanten PGIPs aus Himbeere (*Rubus idaeus* L.) in transgenen Erbsen (*Pisum sativum* L.)“ (1,0)

[01/2003- 12/2005] Universität Hannover, Fachbereich Biologie, Lehrgebiet Molekulargenetik, Studentische Hilfskraft (40 h/Monat), praktische Laborarbeit, Betreuung von Gewächshauspflanzen.

[01/2006- heute] Leibniz Universität Hannover, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung, Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotion, wissenschaftliche Arbeit im Labor, Betreuung von Diplomarbeiten, Bsc- und Msc-Studenten, BTA-Schülern und Praktika

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Thomas Debener für den Arbeitsplatz, die Bereitstellung des Themas, die kompetente Betreuung und immer neue Ideen sowie Frau Professor Traud Winkelmann für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Dr. RG Berger und dem Institut für Lebensmittelchemie, insbesondere Marco Fraatz, Sven Krügener, Meike und Annette, danke ich für die Zusammenarbeit bei der gaschromatografischen Analyse der Duftextrakte. Ulli Krings für die geduldige Identifizierung der Inhaltsstoffe mit der GC-MS und Stefan Lunkenbein für die offenen Ohren.

Ich danke ganz besonders Inka Gawenda.

Ann-Katrin Lühmann, Stephan Schie dafür, dass sie meine Ausbrüche ertragen haben und für die tolle gemeinsame Zeit.

Dank an Marcus, Helgard, Dietmar und Andrea, die meine Arbeit Korrektur gelesen und konstruktive Vorschläge gemacht haben.

Vielen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung für die gute Zusammenarbeit.

Dank auch an Anka, Korinna, Lena, Martina, Julia, Galina, Laura, Maren und Corinna.

Dank an die lieben Mitarbeiter (vor allem Nicole, André und Maren) der Abteilung Pflanzenbiotechnologie für die Bereitstellung von Materialien und Wissen über den Western Blot.

Vielen Dank auch an Daniel und Frank für die Hilfe bei Problemen statistischer Art.

Astrid! Ohne Dich….

Nadine und Christoph, vielen Dank für Zeit und Mühe.

Nicht zuletzt Dank an meine großartigen Eltern, die immer an mich glauben und an meine lieben Schwiegereltern für die Unterstützung.

Und an Jens: Du bist das Beste, was mir je passiert ist,….