

Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg
Naturwissenschaftliche Fakultät I
(Biowissenschaften)



IDENTIFIZIERUNG VON QTLs DER
TERPENBIOSYNTHE MITTELS
„NESTED ASSOCIATION MAPPING“ (NAM)
&
„GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY“ (GWAS)
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Institut für Pharmazie
Abteilung pharmazeutische Biotechnologie

vorgelegt von

Annett Richter

Verteidigung: 05.11.2014

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Degenhardt
Prof. Dr. Gunter Reuter
Prof. Dr. Jonathan Gershenzon

Zusammenfassung

Schon seit vielen Jahrtausenden wird der aus Mexiko abstammende Mais (*Zea mays*) kultiviert und gilt weltweit als einer der wichtigsten Kulturpflanzen und findet in vielerlei Hinsicht Einsatz. Ausfälle durch Maisschädlinge wie Maiszünsler oder Maiswurzelbohrer führen zu enormen ökonomischen Verlusten. Einige Maislinien sind in der Lage sich durch chemische Kommunikation, auch „indirekte Abwehr“ genannt, gegen Herbivoren oder Pathogene zu wehren. Eine gut analysierte indirekte Abwehrstrategie ist die Emission von volatilen organischen Verbindungen (VOCs) durch Maiskeimlinge nach Herbivorie. Bei der sogenannten tritrophischen Interaktion werden durch diese VOCs parasitäre Feindesfeinde angelockt, wodurch die Überlebenschancen der Maispflanzen steigen. In dieser Arbeit wurden Methoden der quantitativen Genetik angewendet, um wichtige Biosynthesegene dieser volatilen Duftstoffe und regulatorische Gene zu identifizieren.

Das „Nested Association Mapping“ (NAM) ist eine Kartierungsmethode, welche die Vorteile der bislang sehr häufig genutzten Assoziations- und Kopplungskartierung vereint. In dieser Arbeit sollte NAM hinsichtlich der Kalkulation von QTLs (engl.: *Quantitative Trait Loci*) der Terpenbiosynthese eingesetzt werden, welche ein wichtiger Bestandteil der tritrophischen Interaktion ist. Für die Terpenmerkmale Linalool, (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten, DMNT und TMTT konnten mehrere quantitative Loci berechnet werden. Die weiterführende Eingrenzung bis hin zum Kandidatengen war für QTL_{606/607}, QTL₂₉₈, QTL₇₆₄ und QTL_{405/406} im Rahmen dieser Arbeit möglich. Insgesamt konnten 5 Herbivor-induzierte Gene für diese Terpenmerkmale lokalisiert werden. Davon kodieren 4 Gene für Enzyme denen eine Funktion in der Terpenbiosynthese nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde ein bHLH Transkriptionsfaktor identifiziert, der möglicherweise in der Signalkaskade einen wichtigen Kontrollpunkt einnimmt. Der QTL_{606/607} wurde für die vier Terpene, Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT, kalkuliert. Eine Terpensynthase, *tps2*, wurde als Kandidatengen identifiziert und ließ vermuten, dass das Gen in der Biosynthese dieser Terpene involviert ist. Biochemische Charakterisierungen am rekombinanten TPS2 bestätigten die Kartierungsergebnisse und zeigten, dass TPS2 das Monoterpen Linalool, das Sesquiterpen (*E*)-Nerolidol und das Diterpen Geranylinalool *in vitro* synthetisiert. Analysen an *tps2*-Allelen zweier NAM-Elternlinien, welche durch das Fehlen der TPS2-Produkte charakterisiert sind, verdeutlichten eine Assoziation dieses Gens mit dem QTL. Die Linie Tzi8 enthält ein inaktives *tps2*-Allel, während in Ky21 nur sehr geringe Transkriptmengen dieses Gens nachgewiesen werden konnten. In RILs mit Rekombinationsereignissen in der Nähe von *tps2*, korre-

spondierte ein *tps2*-B73 Allel mit der Synthese von TPS2-Produkten, während Linien mit einem Nicht-B73-Allel durch Fehlen dieser Terpene gekennzeichnet waren.

Zwei P450 Monooxygenasen, *cyp92c5* und *cyp92c6*, wurden mit Hilfe zwei quantitativer Loci auf Chromosom 2 (QTL₂₉₈) und 7 (QTL₇₆₄) für die beiden Homoterpene DMNT und TMTT identifiziert. Dies korreliert mit der biochemischen Charakterisierung von CYP92C5, welches beide Homoterpene unter Zugabe des Co-Faktors NADPH *in vitro* synthetisiert. Expressionsanalysen von *cyp92c5*, Aktivitätsbestimmungen und eine *dmnt*-Mutante sind Beweis für eine Assoziation dieses P450 Gens mit dem QTL₇₆₄. Die Mu-Insertionslinie (MuIII) mit einer nicht funktionellen Version von CYP92C5, ist nach Behandlung mit einem Elicitor nicht mehr in der Lage DMNT und geringere Mengen TMTT zu produzieren. Das zweite P450 Enzym, CYP92C6, wurde mit Hilfe des QTL_{S298} identifiziert und ist ausschließlich in der Lage TMTT *in vitro* zu bilden. Das erklärt, weshalb in der *dmnt*-Mutante (MuIII) weiterhin TMTT, aber kein DMNT detektierbar gewesen ist.

Ein quantitativer Locus, der für mehrere Sesquiterpene kalkuliert wurde, ist QTL_{405/406} auf Chromosom 3. Kartierungsanalysen mittels NAM identifizierten die Elternlinie Ky21 als verantwortliche Linie für diesen QTL. Anfänglich stand *fpps3* als Kandidatengen im Fokus, welches für eine aktive Farnesyldiphosphat-Synthase kodiert und FPP *in vitro* synthetisiert. Die kleine FPPS-Familie in Mais besteht aus insgesamt drei Genen, wovon einzig *fpps3* verstärkt nach Verwundung und stärker noch nach Herbivorie-Imitation exprimiert wird. Allerdings zeigten weitere Analysen, dass der QTL nicht nur mit der Regulation von *fpps3*, sondern zusätzlich mit der Regulation von Terpenbiosynthesegenen assoziiert ist. Niedrigere Hormonmengen in Ky21 vergleichsweise zu B73 ist ein weiterer Hinweis. Diese Ergebnisse deuteten auf ein anderes Kandidatengen, ein regulatorisches Element hin, welches mit dem QTL assoziiert sein könnte. Ein bHLH Transkriptionsfaktor wurde zwischen den errechneten Loci QTL₄₀₅ und QTL₄₀₆ lokalisiert und wies eine erhöhte Transkriptmenge nach Elicitor-Behandlung auf. Außerdem konnte eine Lücke von 41 Aminosäuren im Ky21-Allel vergleichsweise zum B73-Allel nachgewiesen werden, welche zu einer verminderten Aktivität oder Funktionsverlust des Faktors führen könnte.

Summary

Maize (*Zea mays*) has been cultivated for thousands of years and is one of the world's most important crop plants. Damage by herbivores leads to economical losses. Some maize lines are able to defend themselves by chemical communication which was termed "indirect defense". One well studied indirect defense reaction includes the emission of volatile organic compounds (VOCs) from maize seedlings after herbivore feeding. These VOCs attract enemies of the herbivores and provide the plant with better chances of survival.

In this thesis, methods of quantitative genetics were employed to identify important genes for the production of VOCs and its regulation by herbivory. "Nested Association Mapping" (NAM) combines the advantages of association and linkage mapping. The NAM population exists of ~ 5000 recombinant inbred lines (RILs) by crossing 25 polymorphic inbreds with the common parent line B73. NAM was used to identify quantitative trait loci (QTLs) of biosynthesis of volatile terpenes. QTLs were calculated for the traits linalool, (*E*)-nerolidol, (*E*)- α -bergamotene, (*E*)- β -farnesene, DMNT and TMTT. The QTLs were narrowed down to find candidate genes for QTL_{606/607}, QTL₂₉₈, QTL₇₆₄ and QTL_{405/406}. Finally, five herbivore-induced genes were identified. Four of these genes coded for enzymes of terpene biosynthesis that corresponded to the trait observed by the QTL. Additionally, a bHLH transcription factor was identified which may regulate the transcription of terpene biosynthesis genes.

QTL_{606/607} was determined for the traits, linalool, (*E*)-nerolidol, DMNT and TMTT. A terpene synthase gene, *tps2*, was identified as candidate gene involved in the biosynthesis of these traits. Biochemical characterization of the recombinant TPS2 demonstrated that it catalyzes the formation of the monoterpene linalool, the sesquiterpene (*E*)-nerolidol and the diterpene geranylinalool *in vitro*. To further establish that *tps2* is responsible for this QTL, the *tps2* alleles of two of the NAM parent lines which are unable to produce linalool, (*E*)-nerolidol, DMNT and TMTT were assayed. The line Tzi8 carries an inactive allele of *tps2* and the line Ky21 displayed only very low transcript levels. In RILs with recombination events close to *tps2*, the active *tps2*-B73 allele always corresponded to terpene synthase activity.

Two p450 monooxygenase genes, *cyp92c5* and *cyp92c6*, were identified with the help of two quantitative trait loci on chromosome 2 (QTL₂₉₈) and chromosome 7 (QTL₇₆₄) which were calculated for the homoterpenes DMNT and TMTT. This correlates well with the biochemical characterization of CYP92C5 which can synthesize both homoterpenes *in vitro* in the presence of the cofactor NADPH. Additional evidence for

the association of this P450 gene and QTL₇₆₄ are provided by an expression analysis and a *dmnt*-mutant line. A Mu-insertion line (MuIII) with a nonfunctional version of *cyp92c5* completely lost the ability to synthesize DMNT and produced only negligible amounts of TMTT after treatment with an elicitor. The second P450 monooxygenase enzyme, CYP92C6, is localized in proximity to QTL₂₉₈ produces only TMTT *in vitro*. This might explain the residual amount of TMTT in the *dmnt*-mutant line. The production of all volatile sesquiterpenes is dependent on a single QTL on chromosome 3 (QTL_{405/406}). Analysis of the NAM population identified Ky21 as the responsible parent line for QTL_{405/406}. First, a farnesyl diphosphate synthase gene, *fpps3*, was thought to be a candidate gene closely associated with the QTL. *In vitro*, the encoded enzyme produces FPP, the substrate of all sesquiterpenes. In addition, *fpps3* is the only of three *fpps* genes in maize and showed an increase transcription level in leaves after mechanical wounding and herbivore-imitation. However, the QTL is associated with the regulation of transcript levels not only of *fpps3* but many other genes. This in addition to lower hormone levels in Ky21 after herbivory indicates that another, regulatory element corresponds to the QTL. A bHLH transcription factor was identified between the loci QTL₄₀₅ und QTL₄₀₆. This factor is transcribed at high levels immediately after elicitor treatment. A deletion of 41 amino acids in the Ky21 allele of the bHLH transcription factor suggests that the corresponding gene is associated with the QTL.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Zur Bedeutung der Kulturpflanze Mais	1
1.2 Maisabwehr gegen Fraßfeinde durch tritrophische Interaktion	2
1.3 Terpene und deren Biosynthese	3
1.4 Die Synthese von Prenyldiphosphaten durch Prenyltransferasen	4
1.5 Struktur von Prenyltransferasen	6
1.5.1 Struktur und Merkmale von Terpensynthasen	7
1.5.2 P450 Enzyme katalysieren die Biosynthese von Homoterpenen	9
1.5.3 Regulation der Abwehrgene nach Herbivorie	10
1.5.4 Jasmonsäure in der Pflanzenabwehr gegen Herbivore	11
1.6 Entwicklung von der Mendelgenetik bis zur heutigen modernen Quantitativen Genetik in der Pflanzenwelt	12
1.6.1 Die wichtigsten Begriffe der quantitativen Genetik	13
1.6.2 Assoziationskartierung basierend auf dem Kopplungsungleichgewicht (engl.: <i>Linkage Disequilibrium</i> , LD)	14
1.6.3 Kopplungskartierung („Linkage Mapping“) innerhalb einer Familie	17
1.6.4 „Nested Association Mapping“ (NAM)	18
1.6.5 „Genome Wide Association Study“	20
1.7 Zielstellung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Pflanzenmaterial	25
2.1.2 Kultivierung und Anzucht der Pflanzen	26
2.1.3 Pflanzeninduktion mit einem Indanon-derivat	27
2.1.4 Mikroorganismen	27
2.1.5 Kultivierung und Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	28
2.1.6 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme, Oligonukleotide	28
2.1.7 Vektoren	28
2.2 Angewandte molekulargenetische Methoden	29
2.2.1 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNS aus Mais	29
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> und Konzentrationsbestimmung	30
2.2.3 Isolation von Gesamt-RNS aus Mais	30
2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	30
2.2.5 cDNA Synthese	30
2.2.6 Synthese einer RACE-Bibliothek	31

2.2.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	31
2.2.8	Quantitative Real Time PCR	32
2.2.9	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.10	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.11	Transformation in <i>E. coli</i>	34
2.2.12	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.13	DNA/Protein-Sequenzanalyse	34
2.2.14	Phylogenetische Analysen:	35
2.3	Chromatographische Analysen	35
2.3.1	Isolierung volatiler Stoffe aus Pflanzenmaterial	35
2.3.2	Chromatographische Analyse von Volatilen aus Mais mittels GC-MS/GC-FID	35
2.3.3	Messung des Pflanzenhormons Jasmonsäure	36
2.4	Proteinanalyse	36
2.4.1	Heterologe Expression und Aufreinigung von Terpensynthasen in <i>E. coli</i>	36
2.4.2	Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpen- und Isopren- noidsynthasen	37
2.4.3	Heterologe Expression von P450s in Hefe und Isolation von Mi- krosomen	37
2.4.4	Aktivitätsbestimmung der P450-Enzyme	39
2.5	Kartierungsanalysen	39
2.5.1	„Nested Association Mapping“ (NAM)	39
2.5.2	Box-Cox-Transformation zur Normalverteilung	39
2.5.3	Joint Linkage QTL Mapping	40
2.5.4	„Genome Wide Association Study“ (GWAS)	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung der NAM-Linien und NAM-RILs	43
3.1.1	Phänotypisierung der 26 NAM-Inzuchtlinien auf Terpenemission	43
3.1.2	Monoterpenakkumulation der Elternlinien und der NAM- Population	45
3.1.3	Sesquiterpenakkumulation der Elternlinien und NAM- Population	45
3.1.4	Homoterpenemission der Elternlinien und NAM-Population .	47
3.2	Nested Association Mapping (NAM) der Maisvolatilen	48
3.2.1	Erzeugen einer Normalverteilung der Terpenemissionen	48
3.2.2	Berechnung von QTLs für die Terpengehalte von Linalool, (<i>E</i>)- Nerolidol, DMNT, TMTT, (<i>E</i>)- β -Farnesen, (<i>E</i>)- α -Bergamoten und (<i>E</i>)- β -Caryophyllen.	51
3.2.3	Validierung des Kartierungsexperiments: QTL ₁₀₅₀ und QTL ₁₀₅₆ liegen in der Nähe von bekannten Terpensynthasen	53
3.2.4	Validierung des Kartierungsexperiments: Feinkartierung für den QTL ₁₀₅₀ des Merkmals (<i>E</i>)- β -Caryophyllen	54

3.3	Charakterisierung von ausgewählten QTLs für die Emission von Terpenen	55
3.3.1	Der QTL _{606/607}	55
3.3.1.1	Identifizierung der Terpensynthasegene <i>tps2</i> und <i>tps3</i>	55
3.3.1.2	Feinkartierung projiziert den QTL ₆₀₆ auf einen SNP im Promoter von <i>tps2</i>	57
3.3.1.3	Expressionsanalysen von <i>tps2</i> und <i>tps3</i> zeigen eine starke Induktion nach Elicitor-Behandlung mit einem Indanon-Derivat	58
3.3.1.4	Amplifikation und Klonierung von <i>tps2</i> und <i>tps3</i>	59
3.3.1.5	Das Muktiproduktenzym TPS2 produziert Mono-, Sesqui- und Diterpenalkohole	59
3.3.1.6	Aktivitätsbestimmung an einer N-terminal verkürzten Version von <i>tps2</i> bzw. <i>tps3</i>	61
3.3.1.7	Das Kandidatengen <i>tps2</i> besitzt zwei Transkriptionsstarts	63
3.3.1.8	Die Elternlinie Tzi8 bestätigt die Kartierungsergebnisse von NAM und GWAS und enthält nach Herbivorie geringere <i>tps2</i> Transkriptmengen als B73	64
3.3.1.9	Das Terpenspektrum von Tzi8 ist durch ein inaktives TPS2-Tzi8 Allel reduziert	67
3.3.1.10	In Ky21 ist die Expression von <i>tps2</i> nicht durch Elicitor induzierbar	68
3.3.1.11	Co-Segregationanalyse der <i>tps2</i> Allele innerhalb von RILs aus der Kreuzung der Linien Ky21 und B73	69
3.3.2	Charakterisierung des QTL ₇₆₄	71
3.3.2.1	Identifizierung einer putativen P450 Monooxygenase (CYP92C5) in der Region des QTL ₇₆₄	71
3.3.2.2	Die Behandlung mit einem Indanon-Derivat zeigte eine signifikante Transkriptakkumulation von <i>cyp92c5</i> in B73.	72
3.3.2.3	CYP92C5 konvertiert (<i>E</i>)-Nerolidol zu DMNT und Geranyllinalool in TMTT	73
3.3.2.4	Die <i>dmnt</i> -Mutante MuIII zeigt keine funktionelle DMNT-Biosynthese	74
3.3.2.5	In <i>cyp92c5</i> der <i>dmnt</i> -Mutante konnte kein Transposon lokalisiert werden	75
3.3.3	Charakterisierung des QTL ₂₉₈	76
3.3.3.1	Identifizierung eines putativen P450 Enzyms (CYP92C6) in der Region des QTL ₂₉₈	76
3.3.3.2	CYP92C6 ist Herbivor-induziert und bildet TMTT <i>in vitro</i>	78
3.3.4	Der QTL _{405/406}	80
3.3.4.1	QTL _{405/406} ist essentiell für die Sesquiterpenbiosynthese	80
3.3.4.2	Das Maisgenom besitzt 3 Farnesyldiphosphatsynthasen	81
3.3.4.3	QRT Analyse der putativen Prenyltransferasen im Elicitor-induzierten Blatt der Linien B73 und Delprim	82

3.3.4.4	QRT Analyse der putativen Prenyltransferasen in <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> induziertem Wurzelmaterial der Linie Delprim	84
3.3.4.5	Aktivitätsbestimmung der rekombinanten FPPS3 und FPPS2 <i>in vitro</i>	85
3.3.4.6	Der QTL _{405/406} beruht auf einer Veränderung in der Elternlinie Ky21 die nur eine geringere Menge von Sesquiterpenen emittiert	87
3.3.4.7	Das Strukturgen <i>fpps3</i> zeigt keine Unterschiede zwischen dem B73- und dem Ky21-Allel, jedoch ist die Transkriptmenge von <i>fpps3</i> in der Linie Ky21 verringert	89
3.3.4.8	Weitere Gene der Terpenbiosynthese zeigen eine verminderte Expression in Ky21	90
3.3.4.9	Ein bHLH-Transkriptionsfaktor könnte für den Phänotyp von Ky21 verantwortlich sein	91
3.3.4.10	Pflanzenhormone wie JA, OPDA und ABA sind in Ky21 stark reduziert nach der Behandlung mit einem Indanon-Derivat	94
4	Diskussion	97
4.1	Eine hohe genetische Diversität in der NAM-Population ist für quantitative Unterschiede in deren Terpenakkumulation verantwortlich . .	97
4.1.1	Die Identifikation der Loci von Terpensynthasegenen durch NAM und GWAS bestätigt die Effizienz der Kombination beider Methoden	98
4.1.2	Die Signifikanz von QTLs, die mit Biosynthesegenen assoziiert sind, ist höher als von QTLs die mit regulatorischen Elementen assoziiert sind	99
4.2	Charakterisierung der mittels QTL _{606/607} identifizierten TPS2 und TPS3	100
4.2.1	TPS2-B73 kodiert für ein Multiproduktenzym, während das Allel TPS3-B73 inaktiv ist	101
4.2.2	Die Gene <i>tps2</i> -B73 und <i>tps3</i> -B73 sind durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden	102
4.2.3	TPS2 könnte sowohl im Cytosol als auch in den Chloroplasten lokalisiert sein	103
4.2.4	TPS2 ist mit dem QTL _{606/607} assoziiert	104
4.2.5	TPS2 ist an der Biosynthese der Homoterpene DMNT und TMTT beteiligt	105
4.3	Charakterisierung der mittels QTL ₇₆₄ und QTL ₂₉₈ identifizierten P450 Enzyme CYP92C5 und CYP92C6	106
4.3.1	Die Funktion von Mitgliedern der CYP92-Familie wurde zuerst in in <i>Zea mays</i> identifiziert	109
4.4	Charakterisierung der Farnesyldiphosphatsynthase 3 (FPPS3), die aus QTL _{405/406} identifiziert wurde	109
4.4.1	Die FPPS3 Expression korreliert mit der Terpenakkumulation in Mais	110
4.4.2	FPPS3 ist sehr wahrscheinlich nicht mit dem QTL _{405/406} assoziiert	112

4.5	Die Biosynthesewege von DMNT und TMTT wurden mit drei quantitativen Loci identifiziert	113
4.6	Ein bHLH Transkriptionsfaktor ist ein mögliches Kandidatengen für den QTL _{405/406}	114
4.6.1	Ein bHLH Transkriptionsfaktor könnte eine Funktion als positiver Regulator in der Jasmonatantwort in <i>Zea mays</i> besitzen	115
4.6.2	Der bHLH Faktor ist ein früh regulierter Transkriptionsfaktor	117
4.7	Zusammenfassender Überblick der kartierten Kandidatengene in einem Modell	118
5	Anhang	121
5.1	Sequenzvergleich <i>fpps3</i> -B73 und <i>fpps3</i> -Ky21	122
5.2	Genotypisierung von <i>tps2</i> in den RILs der Linien B73 und Ky21 . . .	123
5.3	Phänotypisierung von <i>tps10</i> und <i>tps2</i> in Ky21 und B73	123
5.4	Phänotypisierung der Terpenemission in Ky21	125
5.5	Verteilung der Terpenakkumulation vor und nach Transformation . .	126
5.6	Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs	129
	Literaturverzeichnis	I
	Danksagung	XXIX

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
AOS	Allenoxidsynthase
AOC	Allenoxycyclase
APT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	engl.: basic Helix-Loop-Helix
CLD	chain-length determination domain
cDNA	engl.: complementary DNA
CPS	engl.: common parent specific
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMNT	(3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien
DTPS	Diterpensynthasen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DXP	Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
DXS	1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase
EAS	5-epi-Aristolochinoxidase
ET	Ethylen
FID	Flammenionisierungsdetektor
FPP	Farnesyldiphosphat
FPPS	Farnesyldiphosphat Synthase
FARM	engl.: first aspartate-rich motif
GC	Gaschromatographie
GL	Geranyllinalool
GPPS	Geranyldiphosphat Synthase
GGPPS	Geranylgeranyldiphosphat Synthase
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldiphosphat
GPPS.lsu	engl.: large subunit
GPPS.ssu	engl.: small subunit
GLV	engl.: green leaf volatiles
GWAS	engl.: Genome Wide Association Study
HIF	engl.: Heterogenous Inbred Family
IPP	Isopentenylpyrophosphat
iPCR	inverse PCR
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
LB	Lysogeny Broth (Nährmedium)
LD	engl.: Linkage Disequilibrium
LOX	Lipoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MTPS	Monoterpensynthasen
MS	Massenspektromie
MVA	Mevalonsäure
MEP	2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAM	engl.: Nested Association Mapping
NDPS1	Neryldiphosphatsynthase
NIL	engl.: Near Isogenic Line
OD	optische Dichte
ORF	engl.: open reading frame
OPDA	12-oxo- Phytodienonsäure
OPR	OPDA-Reduktase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHS1	Phellandrensynthase
PRD	Prolinreiche Domäne
PR-1	Pathogenesis-Related 1
PKU	Phenylketonurie
QRT	engl.: Quantitative Realtime (PCR)
QTL	engl.: quantitative trait locus
RT-PCR	Realtime PCR
RIL	Rekombinante Inzuchtlinie
ShSBS	Santalen- und Bergamotensynthase
STPS	Sesquiterpensynthasen
SPME	engl.: solid phase micro extraction
SSR	engl.: Simple Sequence Repeat
SARM	engl.: second aspartate-rich motif
SA	Salizylsäure
SCFCOI1	Skip-Cullin-F-Box
TPS23	Terpensynthase 23
TPS10	Terpensynthase 10
TMTT	(3E,7E)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen
TSI	Turbospray-Ionisation
UTR	engl.: untranslated region
VOCs	engl.: volatile organic compounds

1 Einleitung

1.1 Zur Bedeutung der Kulturpflanze Mais

Mais (*Zea mays ssp. mays*) ist eine der wichtigsten Getreidepflanzen (Doebley *et al.* [1997]) der Welt (Cervantes-Cervantes *et al.* [2006]) und wird bereits seit vielen tausend Jahren vom Menschen domestiziert (Doebley *et al.* [1997]). Die am nächsten verwandte Wildform ist der Teosinte, zu dem 5 Spezies in Mexiko, Guatemala und Nicaragua zählen. Archäologische und molekulargenetische Belege deuten darauf hin, dass der Mais vor über 9000 Jahren von der Teosintesubspezies (*Zea mays ssp. parviglumis*) aus Mexiko abstammt (Doebley *et al.* [1997]; Piperno & Flannery [2001]; Matsuo-ka *et al.* [2002]). Durch Domestizierungsprozesse besitzt der heutige Kulturmais eine $\sim 20\%$ geringere genetische Diversität als Teosinte (Vigouroux *et al.* [2005]). Dennoch besitzt Mais einen höheren Polymorphismus als Mensch, *Drosophila* oder viele andere Wildpflanzen (Tenaillon *et al.* [2001]). In Zukunft wird diese Getreidepflanze an Bedeutung gewinnen, da Mais bereits heute als einer der wichtigsten Nahrungsmittel, Futtermittel und Energielieferanten dient. Züchtungen innerhalb des letzten Jahrhunderts konnten die Erträge des Kulturmais enorm steigern (Russell [1991]; Troyer [1996]; Duvick [2005]). Globale klimatische Veränderungen bezüglich Temperatur, Niederschlag sowie der Befall von Maisschädlingen mindern den Ertrag beachtlich, so dass eine Selektion auf erhöhte Toleranzen für eine bessere Ertragsausbeute zwingend erforderlich ist. Da Toleranzen quantitativ vererbt werden, ist das Verständnis von quantitativer Genetik für gesteigerte und stabile Ausbeuten in Mais unumgänglich. In den letzten Jahren konnten Wissenschaftler Gene und Allele identifizieren, welche die Ausprägung von quantitativen Merkmalen kontrollieren. Erfolge konnten unter anderem bei der Identifizierung und Kartierung der Blattarchitektur (Tian *et al.* [2011]), der Blühzeit (Thornsberry *et al.* [2001]), der Trockentoleranz (Rahman *et al.* [2011]) und des Carotinoidgehaltes (Palaisa *et al.* [2003]) verzeichnet werden. Abgesehen von klimatischen Herausforderungen, stellen der Befall von Schädlingen und Krankheiten ein bedeutendes Risiko dar. So wird der Mais von Pathogenen und pflanzenfressenden Insekten an Organen wie Blatt, Sprossachse und Wurzel attackiert. Bekannte Schädlinge sind vor allem der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*; Käferlarven) und die ägyptische Baumwolleneule (*Spodoptera littoralis*; Raupen). Schäden durch den Maiswurzelbohrer in den USA werden jährlich auf eine Milliarde Dollar geschätzt. Gegen diese Feinde besitzen einige Maissorten besondere Verteidigungsstrategien, wie beispielsweise anatomische Barrieren, Freigabe toxischer Fraßhemmstoffe oder das Aussenden eines „Hilferufes“ mittels flüchtiger Duftstoffe, auch

tritrophische Interaktion genannt (Turlings *et al.* [1993]; Price *et al.* [1980]).

1.2 Maisabwehr gegen Fraßfeinde durch tritrophische Interaktion

Pflanzen sind an ihren Standort gebunden und besitzen keine Möglichkeit ihren Feinden zu entfliehen. Dies zwingt sie effektive Abwehrmechanismen auszubilden. Dazu gehören zum einen konstitutiv vorhandene Abwehrstrategien, zu denen anatomische Barrieren oder chemische Abwehrstoffe zählen (Karban & Baldwin) und induzierbare Verteidigungsmethoden, eine energetisch günstigere und spezifisch auf den Feind eingehende Strategie. Induzierbare Reaktionen auf den Feind können das Verstärken der mechanischen Barriere durch Kalloseeinlagerung (Hao *et al.* [2008]; Shinoda [1993]) oder die Bildung von Proteinaseinhibitoren sein (Broadway [1996]; Ryan *et al.* [1981]; Foard *et al.* [1983]; Lorito *et al.* [1994]), welche die Verdauung der Schädlinge hemmen. Das Anlocken von parasitären Feinden mittels tritrophischer Interaktion ist eine weitere indirekte Abwehr der Pflanze, indem durch Freisetzen maisspezifischer Duftstoffe Feinde der Maisschädlinge angelockt werden (Dicke & Sabelis [1988]; Agrawal [1998]). Es findet demzufolge ein Zusammenspiel zwischen Pflanze, Schädling und dem Feindesfeind statt. Die indirekte Abwehr gegen Maisschädlinge gelingt der Pflanze durch die Bildung und Abgabe flüchtiger, organischer Verbindungen (VOCs, engl.: *volatile organic compounds*) (Dicke & Sabelis [1988]; Bernasconi *et al.* [1998]). Die Synthese dieser VOCs kann allein durch Verwundung oder verstärkt durch orale Sekrete induziert werden (Turlings *et al.* [1990]; Dicke *et al.* [1993]). Dadurch sendet die Maispflanze nach Fraß der Schmetterlingsraupe *Spodoptera littoralis* volatile Signale aus, die die befallene Pflanze für die Schlupfwespe *Cotesia marginiventris* lokalisierbar machen (Turlings *et al.* [1990]; Abb. 1.1). Die Schlupfwespe nutzt die Raupen als Wirt zur Eiablage (Turlings *et al.* [1990]; Hoballah *et al.* [2002]; Turlings *et al.* [2005]). Die Parasitierung des Herbivors führt zur Verringerung des Fraßes und letztendlich zum Tode des Schädlings, indem die Wespen-Larven die Raupen von innen auffressen. Für die Maispflanze entstehen weniger Fraßschäden, was besonders für junge Maispflanzen mit einer geringen Biomasse entscheidend zum Überleben ist (Hoballah *et al.* [2002]; Elena Hoballah *et al.* [2004]). Die Zusammensetzung des Duftbouquets für die indirekte Abwehr variiert sehr stark und besteht zum Großteil aus Terpenen, wie Mono-, Sesqui- und Homoterpenen (Turlings *et al.* [1990]), sowie den sogenannten „green leaf volatiles“ (GLV), eine Gruppe von C₆-Verbindungen zu denen Aldehyde, Alkohole und Ester zählen. Die Emission von Volatilen in die Atmosphäre ist nur für eine begrenzte Anzahl bekannt und erfolgt lokal am Blatt an der Verwundungsstelle bis hin

zur distal gelegenen Blattspitze (Köllner *et al.* [2013]). Die indirekte Verteidigung von Pflanzen, durch die Abgabe von volatilen Substanzen, kann auch im Boden erfolgen. Bei Fraß an den Wurzeln durch den Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*) wird nur ein Terpen in den Boden abgegeben (Rasmann *et al.* [2005]; Köllner *et al.* [2008a]). Durch dieses Sesquiterpen, (*E*)- β -Caryophyllen, ist die Pflanze in der Lage, Nematoden wie *Heterorhabditis megidis*, einen natürlichen Feind des Maiswurzelbohrers, anzulocken (Rasmann *et al.* [2005]; Boff *et al.* [2001]; Van Tol *et al.* [2001]). Ein weiterer Unterschied zu den Blättern ist, dass die Abgabe von Volatilen in den Wurzeln systemisch erfolgt (Hiltpold *et al.* [2011]).

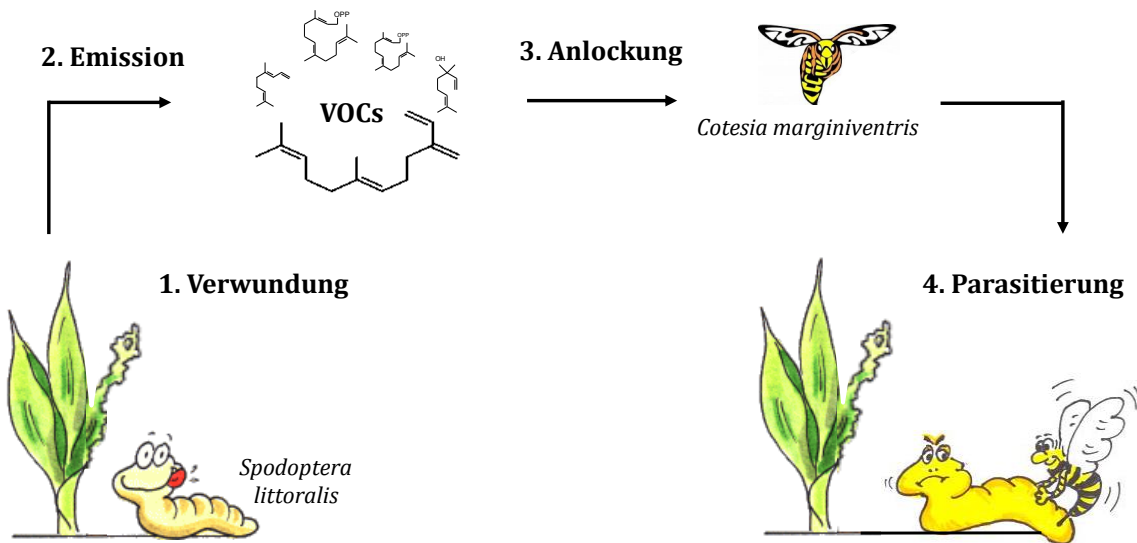


Abbildung 1.1 Interaktion zwischen Mais (*Zea mays*), Schmetterlingsraupe (*Spodoptera littoralis*) und der Schlupfwespe (*Cotesia marginiventris*). Durch Raupenfraß emittiert die Maispflanze ein Duftgemisch (VOCs, engl.: *Volatile Organic Compounds*), welches Terpene enthält. Das Duftbouquet lockt parasitäre Schlupfwespen an, die ihre Eier in die Raupen ablegen. Zeichnung von Tobias Köllner.

1.3 Terpene und deren Biosynthese

Terpene bilden mit ~ 30000 Strukturen die größte Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe (Connolly & Hill [1991]). Als gemeinsames Grundgerüst dient eine Isopreneinheit, bestehend aus 5 Kohlenstoffatomen. Die Anzahl der Isopreneinheiten bestimmt die Namensgebung der jeweiligen Terpenklasse. Volatile Terpene gehören meist zu den Klassen der Monoterpene (C_{10}) (Dewick [1999]), Sesquiterpene (C_{15}) (Fraga [2006]), Diterpene (C_{20}) (Hanson [2000]) ebenso wie Homoterpene (C_{11} , C_{16}), welche aus einer irregulären Anzahl von Kohlenstoffatomen bestehen. Die Homoterpene entstehen durch Abspalten einer C_4 -Einheit von einem C_{15} -Terpen oder einem C_{20} -Terpen (Donath & Boland [1994]).

Die Biosynthese aller Terpene besteht aus drei Schritten. Zu Beginn erfolgt die Bildung der aktiven Form des Isoprens, dem Isopentenylpyrophosphat (IPP) (Lynen & Graßl [1958]; Chaykin *et al.* [1958]) und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Diese C₅-Körper können über zwei Wege in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzenzelle gebildet werden (Abb. 1.2). Im Cytosol erfolgt die Synthese über das Zwischenprodukt Mevalonsäure (MVA), nach der dieser Biosyntheseweg als MVA-Weg bezeichnet wurde (Croteau *et al.* [2000]; Vranová *et al.* [2012]). Der in den Plastiden ablaufende Methylerythrolphosphat-Weg (MEP-Weg) wird ebenfalls nach einem Zwischenprodukt, dem 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat (MEP) benannt (Eisenreich *et al.* [1998]). Nach der Synthese der aktiven Vorläufersubstrate (IPP, DMAPP) werden diese in einem zweiten Schritt zu unterschiedlich langen Polymeren zusammengesetzt, welche in einem letzten Schritt der Biosynthese weiter zu Terpenen modifiziert werden. Die Verknüpfung von IPP und DMAPP für die Sesquiterpene findet im Cytosol statt. Im Gegensatz dazu werden die Vorläuferprodukte für Mono- und Diterpene in den Plastiden synthetisiert. Untersuchungen an Löwenmäulchen (Dudareva *et al.* [2005]) und Mohrrübe (Hampel *et al.* [2005]) zeigten, dass Sesquiterpene auch aus Substraten des MEP-Weges entstehen können. In Spinat wurde eine Möglichkeit des Austausches von kurzen Prenyldiphosphaten aus den Plastiden in das Cytosol über Membranvesikel nachgewiesen (Bick & Lange [2003]). Auch in Arabidopsis gibt es Hinweise auf einen unidirektionalen Transport von Isoprenoidintermediaten aus den Plastiden in das Cytosol (Laule *et al.* [2003]).

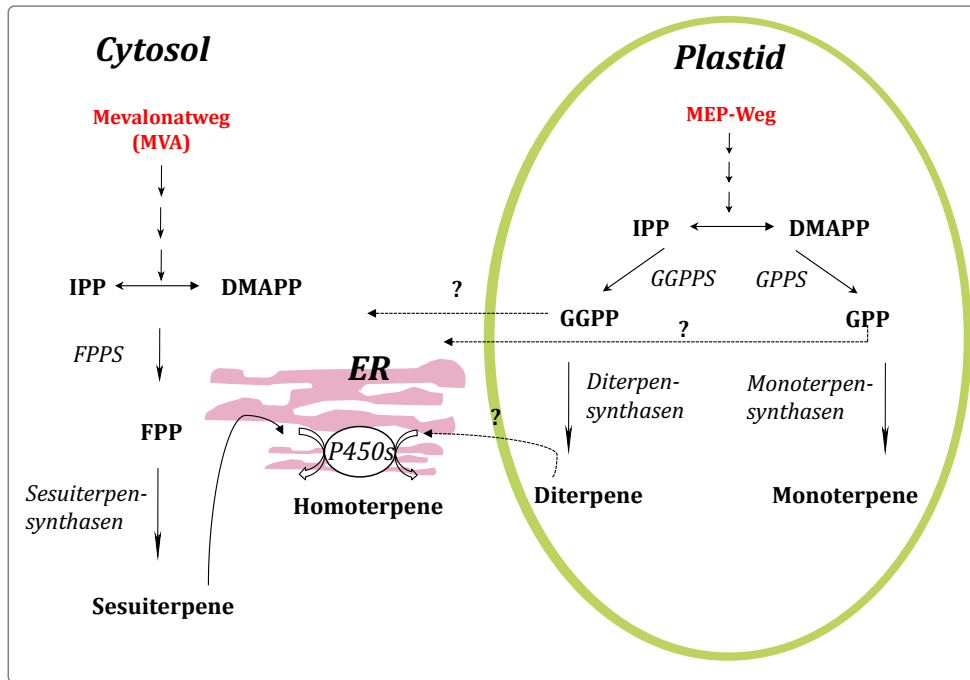


Abbildung 1.2 Isoprenoidbiosynthese *via* MVA-Weg im Cytosol und dem plastidären MEP-Weg. Schwarze Pfeile stellen die einzelnen Biosyntheseschritte dar. Mehrere Pfeile hintereinander verdeutlichen, dass mehrere Schritte ablaufen bis zum jeweiligen Produkt. Gestrichelte Pfeile zeigen den Transport von Zwischenprodukten innerhalb eines Kompartiments oder zwischen Kompartimenten. Darüber befindliche Fragezeichen deuten darauf hin, dass der Transport nicht ganz geklärt wurde. Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) sind membrangebundene P450-Enzyme, welche für die Biosynthese von Homoterpenen verantwortlich sind. MEP, 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat; GGPPS, Geranyldiphosphat (GGPP) Synthase; FPPS, Farnesyldiphosphat (FPP) Synthase; GGPPS, Geranyldiphosphat (GGPP) Synthase; IPP, Isopentenylpyrophosphat; DMAPP, Dimethylallylpyrophosphat; MT, Mitochondrium; ER, Endoplasmatisches Retikulum. Abbildung nach Vranová *et al.* [2012].

1.4 Die Synthese von Prenyldiphosphaten durch Prenyltransferasen

Die Synthese von Mono-, Sesqui- oder Diterpenen erfolgt aus IPP und DMAPP, welche Verknüpfungen der Endprodukte des MEP- bzw. MVA-Weges sind. Die sogenannte Kopf-Schwanz-Kondensation von einem Molekül DMAPP mit einer oder mehreren IPP-Einheiten wird von Prenyltransferasen katalysiert (Ramos-Valdivia *et al.* [1997]; Ogura & Koyama [1998]). Durch die Verknüpfung von einem Molekül IPP und einem Molekül DMAPP entsteht GPP, der Grundbaustein aller Monoterpene (Abb. 1.3). Diese Reaktion wird in den Plastiden von Geranyldiphosphatsynthasen (GPPS) katalysiert. Der Grundbaustein für alle Sesquiterpene ist das FPP, welches aus zwei Molekülen IPP und einem Molekül DMAPP durch Farnesyldiphosphatsynthasen (FPPS) synthetisiert wird. GGPP ist demzufolge der Grundbaustein aller Diterpene und ent-

steht aus drei Molekülen IPP und einem Molekül DMAPP (Wendt & Schulz [1998]). All diese linearen Polymere werden durch *trans*- bzw. (*E*)-Prenyltransferasen gebildet, benannt nach den *trans*-Doppelbindungen in den Produkten (Kellogg & Poulter [1997]; Ogura & Koyama [1998]; Vranová *et al.* [2012]). Eine Ausnahme bildet die *cis*- bzw. (*Z*)-Prenyltransferase in der Wildtomate, welche *cis*-Doppelbindungen im Farnesyldiphosphat bildet. So wird ausschließlich das in der Wildtomate (*Solanum lycopersicum*) produzierte (*Z,Z*)-FPP als Substrat für eine Santalen- und Bergamotensynthase (ShSBS) akzeptiert (Sallaud *et al.* [2009]; Tissier *et al.* [2013]). Ein weiteres Beispiel ist eine Neryldiphosphatsynthase (NDPS1) aus *L. lycopersicum*, welche Neryldiphosphat (NPP), das *cis*-Isomer von GPP, synthetisiert (Schillmiller *et al.* [2009]). Eine Phellandrensynthase (PHS1) nutzt dieses als Substrat für die Synthese von β -Phellandren (Schillmiller *et al.* [2009]).

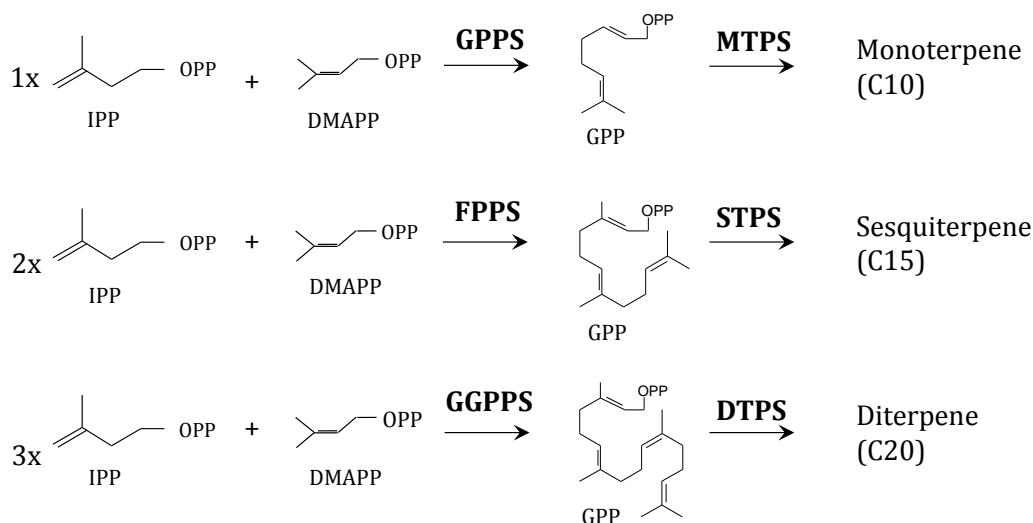


Abbildung 1.3 Biosynthese der Vorläufersubstrate GPP, FPP und GGPP bis hin zu den Terpenen. Die Abb. zeigt die Strukturformeln von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), den aktiven Prenyldiphosphateinheiten (C₅). Prenyltransferasen verknüpfen unterschiedlich viele Moleküle IPP mit einem Molekül DMAPP. Ein Molekül IPP wird mit DMAPP mittels einer Geranylpyrophosphatsynthase (GPPS) zu Geranylpyrophosphat (GPP) verknüpft. Monoterpensynthasen (MTPS) binden und modifizieren dieses Substrat zu Monoterpenen (C₁₀). Eine Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS) verknüpft zwei IPP-Einheiten mit einer DMAPP-Einheit zu Farnesylpyrophosphat (FPP). Über Sesquiterpensynthasen entstehen schließlich die Sesquiterpene (C₁₅). Geranylgeranylpyrophosphatsynthasen (GGPPS) verknüpfen drei IPPs mit einem DMAPP zu Geranylpyrophosphat (GGPP), welches das Substrat für alle Diterpensynthasen (DTPS) sind. Das Produkt dieser Enzyme sind die Diterpene (C₂₀).

1.5 Struktur von Prenyltransferasen

Die Isolation und Analyse von Prenyltransferasen aus verschiedenen Pflanzenarten zeigten, dass FPP- und GGPP-Synthasen als Homodimere und GPP-Synthasen meistens als Heterodimere (Burke *et al.* [1999]; Tholl *et al.* [2004]; Wang & Dixon [2009])

vorkommen. Die Heterodimere werden durch eine große (GPPS.lsu; engl.: *large subunit*) und eine kleine Untereinheit (GPPS.ssu; engl.: *small subunit*) zusammengesetzt, wobei nur die große Untereinheit Ähnlichkeit mit den FPP- und GGPP-Synthasen aufweist. Zwei stark konservierte Domänen, bezeichnet als das erste aspartatreiche Motiv (FARM = engl.: *first aspartate-rich motif*) und das zweite aspartatreiche Motiv (SARM = engl.: *second aspartate-rich motif*) (Ashby & Edwards [1990]; Bouvier *et al.* [2005]; Schmidt *et al.* [2010b]) konnten in diesen Prenyltransferasen identifiziert werden. Das aktive Zentrum der Prenyltransferasen wird ausschließlich aus α -Helices aufgebaut (Tarshis *et al.* [1994]). Die beiden Domänen, FARM und SARM, befinden sich auf unterschiedlichen α -Helices, wodurch sie auf den gegenüberliegenden Seiten das aktive Zentrum umschließen. Darin werden die Pyrophosphatreste von IPP und DMAPP zusammen mit Mg^{2+} gebunden und zu Prenyldiphosphaten komplexiert (Tarshis *et al.* [1994, 1996]). Durch Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass die aspartatreichen Motive entscheidend für die Aktivität und Substratbindung sind (Marrero *et al.* [1992]; Koyama *et al.* [1995, 1996]; Schmidt *et al.* [2010b]). FPP-Synthasen enthalten meist zwei Aminosäureinsertionen in dem FARM-Motiv (DDxxD), währenddessen die große Untereinheit der GPP-Synthasen und die GGPP-Synthasen größtenteils durch vier Aminosäureinsertionen im FARM-Motiv (DDxxxxD) gekennzeichnet sind. Weitere Studien zeigten, dass zwei Aminosäuren in der 4. und 5. Position vor der FARM-Domäne entscheidend für die Kettenlänge der Produkte sind (Tarshis *et al.* [1994]; Cunillera *et al.* [1996]; Ohnuma *et al.* [1996]). Deshalb werden die beiden Domänen zusammen als Kettenlänge-bestimmendes Motiv (CLD = engl.: *Chain-Length-Determining*) bezeichnet. FPP-Synthasen sind in den meisten Organismen durch zwei aromatische Aminosäuren in der 4. und 5. Position N-terminal des ersten aspartatreichen Motives gekennzeichnet (Tarshis *et al.* [1994]; Abb. 1.4A). Die relativ große Aminosäure in der 5. Position vor dem ersten „DDxxD“-Motiv ragt in das aktive Zentrum, in dem das Substrat gebunden wird. Diese Aminosäure blockiert eine weitere Kettenverlängerung von FPP (Abb. 1.4B). Tauscht man diese Aminosäuren mittels gerichteter Mutagenese durch eine kleine nichtaromatische Aminosäure aus, ändert sich die Produktspezifität zu GGPP oder längeren Prenyldiphosphaten (Tarshis *et al.* [1994, 1996]). Demzufolge besteht die 5. Position stromaufwärts der FARM-Domäne von GGPP-Synthasen hauptsächlich aus einer nicht voluminösen und nicht-aromatischen Aminosäure (Wang & Ohnuma [1999]), wodurch die Elongation zu GGPP nicht gehindert wird. Ein Aminosäureaustausch in GGPP-Synthasen mit längeren, aromatischen Aminosäuren führt stattdessen zu einer kürzeren Produktlänge (Ohnuma *et al.* [1996]; Stanley Fernandez *et al.* [2000]; Soderberg *et al.* [2001]). Für die Produktspezifität von GPP-Synthasen scheint die kleine Untereinheit eine wichtige Rolle zu spielen. Durch Co-Expression einer klei-

nen Untereinheit mit einer GGPP-Synthase entstand ein Heterodimer, welches in der Lage war GPP zu synthetisieren (Burke *et al.* [1999]).

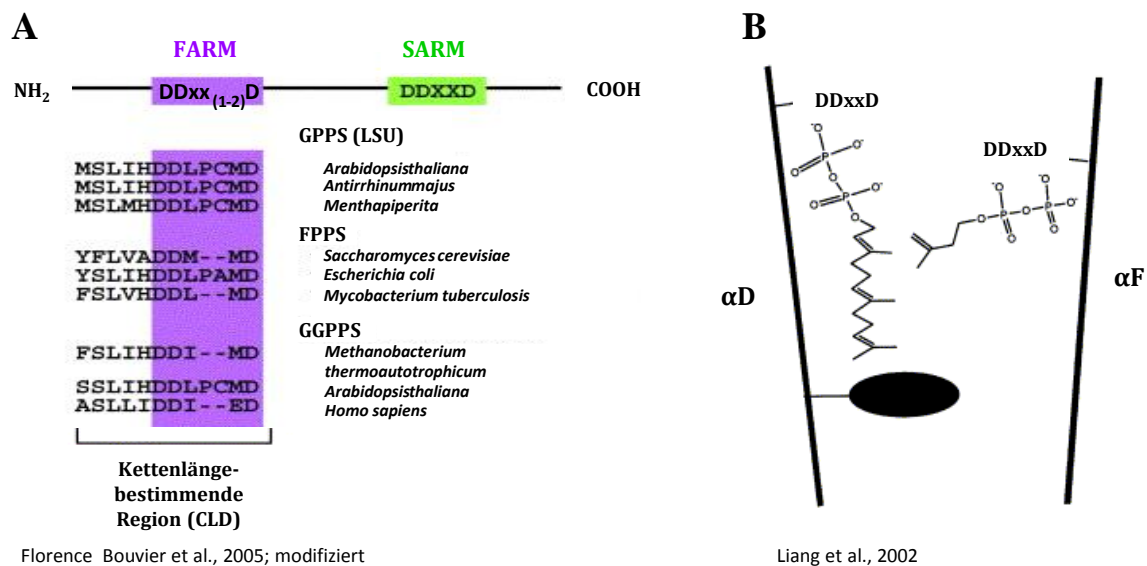


Abbildung 1.4 Struktur und Motive von Prenyltransferasen sowie die schematische Darstellung des aktiven Zentrums mit gebundenem IPP und dem Produkt FPP.

(A) Prenyltransferasen kurzkettiger Prenyldiphosphate enthalten das erste aspartatreiche Motiv (FARM) und das zweite aspartatreiche Motiv (SARM). Die Enzyme unterscheiden sich durch unterschiedlich viele Aminosäureinsertionen in FARM (lila). Die 4. und 5. Position stromaufwärts von FARM ist für die Produktlänge entscheidend und kann aus größeren aromatischen oder kürzeren nichtaromatischen Aminosäuren bestehen.

(B) Dargestellt sind die beiden gegenüberliegenden α -Helixen, in denen FARM (α D) und SARM (α F) lokalisiert sind („DDxxD“-Motive). An das zweite „DDxxD“-Motiv ist IPP gebunden und an dem ersten das FPP. Eine Elongation zu GGPP kann nicht erfolgen, da eine größere Aminosäure (schwarz gefüllte Ellipse) dies verhindert.

1.5.1 Struktur und Merkmale von Terpensynthasen

Aus den Prenyldiphosphaten GPP, FPP und GGPP werden durch die Enzymklasse der Terpensynthasen die Terpene gebildet (Connolly & Hill [1991]; Degenhardt *et al.* [2009]). Diese Enzyme werden nach ihrem Hauptprodukt benannt. Monoterpensynthasen bilden aus GPP Monoterpene, welche monozyklisch, bizeyklisch oder azyklisch sein können. Sesquiterpensynthasen binden das Substrat FPP und sind für die hohe Diversität von Sesquiterpenen verantwortlich. Diterpensynthasen modifizieren das Substrat GGPP in unterschiedliche Diterpene. Eine besonders wichtige Eigenschaft von vielen Enzymen dieser Klasse ist die Fähigkeit, mehrere Produkte aus einem Substrat zu synthetisieren. Dadurch wird die strukturelle Vielfalt von Terpenen nicht nur allein durch die hohe Anzahl von Terpensynthasen, sondern auch durch deren Produktvielfalt gebildet. Eines der ersten Multiproduktenzyme, das heterolog exprimiert wurde, ist die (+)-Sabinensynthase aus *Salvia officinales*. Sie produziert neben dem Hauptprodukt γ -Terpinen auch Terpinolen, Limonen und

Myrcen (Wise *et al.* [1998]). Zwei bekannte Beispiele in Mais sind die Terpensynthase 10 (TPS10), deren Hauptprodukte (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen sind (Schnee *et al.* [2006]; Köllner *et al.* [2009]) sowie Terpensynthase 23 (TPS23), die vor allem (*E*)- β -Caryophyllen aber auch δ -Elemen und α -Humulen synthetisiert (Köllner *et al.* [2008a]). Terpensynthasen müssen jedoch nicht ausschließlich Multiproduktenzyme sein, sondern können auch hochspezifisch ein einziges Terpen bilden, wie beispielsweise die δ -Cadinensynthase aus der Baumwolle (Tan *et al.* [2000]; Faraldos *et al.* [2012]). Weitere Beobachtungen zeigten, dass einige wenige Terpensynthasen in der Lage sind, mehr als ein Substrat in verschiedene Terpene umzusetzen. So ist es möglich, dass Terpensynthasen (*E*)-Nerolidol aus FPP, zusätzlich (*E,E*)-Geranylinalool aus GGPP und/oder Linalool aus GPP zyklisieren. Ein solches Enzym, welches alle drei Substrate akzeptiert, ist MtTPS3 aus *Medicago truncatula* (Arimura *et al.* [2008]). Weitere multifunktionale Enzyme mit der Fähigkeit mehr als ein Substrat umzusetzen, wurden in Reis (Yuan *et al.* [2008]), Arabidopsis (Chen *et al.* [2003]), Tomate (van Schie *et al.* [2007]), Löwenmäulchen (Nagegowda *et al.* [2008]), Weinrebe (Martin *et al.* [2010]) und Erdbeere (Aharoni *et al.* [2004]) identifiziert. Mono- und Diterpensynthasen werden in den meisten Fällen durch ein N-terminales Signalpeptid in die Plastiden lokalisiert (Turner *et al.* [1999]), während die cytosolischen Sesquiterpensynthasen kein Signalpeptid enthalten. Diese unterschiedlichen Lokalisationen korrelieren mit den Synthesorten von GPP und GGPP in den Plastiden sowie FPP im Cytosol. Daraus leitet sich die Frage ab, ob eine multifunktionale (*E*)-Nerolidol/Linalool-Synthase, Prenyldiphosphate aus unterschiedlichen Kompartimenten nutzen kann. Eine mögliche Erklärung ist der Austausch von Prenyldiphosphaten zwischen Cytosol und Plastiden, wie es bereits Adam & Zapp [1998] und Dudareva *et al.* [2005] zeigen konnten. Cunillera *et al.* [1996] entdeckten eine Farnesyldiphosphatsynthase (FPS1) mit alternativen Transkriptionsstarts, wodurch eine cytosolische Isoform (FPS1S) und eine mitochondriale Isoform (FPS1L) generiert werden. Ein dritte Möglichkeit konnte am Beispiel von zwei (*E*)-Nerolidol/Linalool-Synthasen (AmNES/LIS-1/AmNES/LIS-2) mit einer Identität von 95 % auf Aminosäureebene gezeigt werden (Nagegowda *et al.* [2008]). Der Unterschied der beiden Enzyme liegt am N-terminus, an dem AmNES/LIS-2 30 zusätzliche Aminosäuren enthält. Dieser Unterschied bedingt eine segregierende Kompartimentierung der beiden Synthasen in Cytosol und Plastiden, wodurch AmNES/LIS-1 für die (*E*)-Nerolidol-Produktion und AmNES/LIS-2 für die Linalool-Synthese verantwortlich ist.

Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen weisen unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen auf. Die längste Aminosäureabfolge ist den Diterpensynthasen zuzuordnen, während die Monoterpensynthasen (600-650 AS) um ca. 210 AS kürzer sind. Sesquiterpensynthasen sind durch Fehlen eines Signalpeptides um weitere 50-70 Aminosäu-

ren kürzer und werden dadurch nicht vom Cytosol in die Plastiden oder Mitochondrien transferiert. Ein gemeinsames Sequenzmerkmal dieser Enzyme ist das in die Substratbindung involvierte „DDxxD“-Motiv, welches im Eingangsbereich des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Einige wenige Terpensynthasen, darunter häufig jene, die mehrere Produkte synthetisieren, besitzen stromaufwärts ein zweites „DDxxD“-Motiv, wodurch mit großer Wahrscheinlichkeit eine weitere Substratbindestelle bereitgestellt wird (Little & Croteau [2002]).

1.5.2 P450 Enzyme katalysieren die Biosynthese von Homoterpenen

Homoterpene sind Bestandteile von vielen Blütendüften und es wurde vermutet, dass sie zur Anlockung von Blütenbestäubern dienen (Boland *et al.* [1998]). Später kam man zur Erkenntnis, dass sie auch als Alarmsignale fungieren und Insektivoren, Feinde der Maisschädlinge, anlocken (Dicke *et al.* [1990]; Takabayashi & Dicke [1996]). Homoterpene bestehen aus einer irregulären Anzahl von Kohlenstoffatomen und entstehen durch die Degradierung der regulären Terpene (*E*)-Nerolidol (C₁₅) und (*E,E*)-Geranylinalool (C₂₀) (Boland *et al.* [1998]; Gäbler *et al.* [1991]). Donath & Boland [1994] zeigten, dass durch eine oxidative Spaltung einer C-C Bindung in (*E*)-Nerolidol bzw. (*E,E*)-Geranylinalool, die beiden Homoterpene DMNT ((*3E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien) bzw. TMTT ((*3E,7E*)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen) entstehen. Nur in *Arabidopsis* konnte bisher ein P450 isoliert werden, welches beide Reaktionen *in vitro* katalysiert und *in vivo* für die TMTT-Biosynthese verantwortlich ist (Lee *et al.* [2010]). Die Familie der P450 Monooxygenasen¹ ist durch hoch konservierte Domänen gekennzeichnet. Die wohl wichtigste Domäne liegt im katalytischen Zentrum und besitzt ein Häm-System. Alle Proteine, welche in diese Familie eingeordnet sind, besitzen ein Cystein im Porphyringsystem (Ichikawa & Yamano [1967]), wodurch das Häm gebunden werden kann. Weitere Domänen sind die Prolinreiche-Domäne (PRD), I-Helix (AGxDT), K-Helix (KETRL) und eine PERF-Domäne (P(E)R(F)) (Durst & Nelson [1995]; Bak *et al.* [2011]). Das Glutamin und Arginin aus der K-Helix, sowie das Arginin aus der PERF-Domäne bilden zusammen die ERR-Triade (Kusano *et al.* [2001]).

¹(E.C.1.14.14.1)

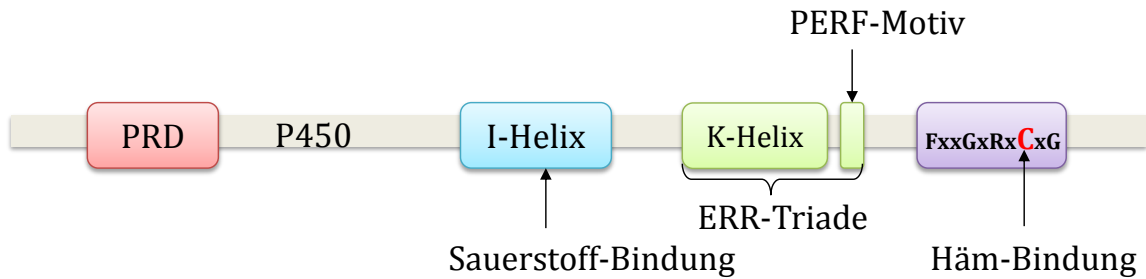
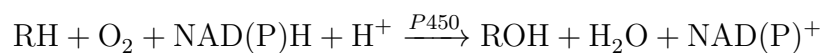


Abbildung 1.5 Konservierte Domänen von Monoxygenaseenzymen. Prolinreiche Domäne (PRD), K-Helix (KETRL), PERF-Domäne (PxRx) und das Häm-System (FxxGxRxCxG). Das rot markierte C in dieser Eisen-Bindedomäne ist hoch konserviert.

Die katalytische Hauptfunktion dieser Enzyme ist die Oxidation eines Substrates mit Hilfe von molekularem Sauerstoff (Mansuri *et al.* [1998]). Die Enzyme benötigen Kofaktoren wie NADH und NADPH, deren Elektronen über membrangebundene Elektronentransportsysteme auf das P450 übertragen werden (Hannemann *et al.* [2007]; Bak *et al.* [2011]; Jensen & Møller [2010]).



Aufgrund der großen Zahl von P450 Enzymen in allen Organismen erfolgt die Namensgebung neidentifizierter Gene nicht selbstständig, sondern durch ein Komitee². Die Namen pflanzlicher P450s wurden von CYP71A1 bis CYP99XY und von CYP701A1 aufwärts festgesetzt (Nelson & Werck-Reichhart [2011]; Bak *et al.* [2011]). Die Zahl hinter CYP gibt die Familie an, während die Subfamilie durch den Buchstaben hinter der ersten Zahl gekennzeichnet ist.

1.5.3 Regulation der Abwehrgene nach Herbivorie

In den meisten Pflanzen findet die Terpenemission nicht konstitutiv, sondern nach Verwundung durch Herbivorie statt. Das volatile Signal ist eine schnelle und gezielte Antwort auf herbivore Schädlinge, durch das z. B. die parasitären Insektivoren angelockt werden können. Die Fraß-induzierte Biosynthese von Terpenen wird durch die Expression von Schlüsselgenen reguliert. Ebenso könnten posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen, wobei Studien zeigten dass diese weniger wahrscheinlich sind (Pichersky *et al.* [1995]; Chen XY [1995]; Yin *et al.* [1997]; Phillips *et al.* [1999]; Martin *et al.* [2003]; Dudareva *et al.* [2003]). Zahlreiche Untersuchungen bezüglich Herbivor-induzierter Terpensynthesen haben gezeigt, dass eine Regulation auf Transkriptebene stattfindet. In Reis wurden beispielsweise drei aktive Herbivor-induzierte Terpensynthesen mittels Micro-Array identifiziert (Yuan *et al.*

²(David Nelson: dnelson@uthsc.edu)

[2008]) sowie 178 weitere Gene, welche nicht für metabolische Enzyme kodieren. Auch in Mais sind mehrere induzierbare Terpensynthasen bekannt (TPS1, Schnee *et al.* [2002]; TPS10, Schnee *et al.* [2006]; TPS23, Köllner *et al.* [2008a]). Micro-Array Daten von Mais zeigten, dass eine Vielzahl von Genen nach Raupenfraß (Lenk [2012]; Ankala *et al.* [2013]) oder nach Behandlung mit Jasmonsäure (Shivaji *et al.* [2010]), induziert werden. Bevor es zur Induktion der Abwehrreaktion kommt, muss die Pflanze zuerst einmal das Signal der Schädlinge wahrnehmen. Dabei kann die Pflanze zwischen einfacher Verwundung und Raupenfraß unterscheiden, wobei letzteres zu einer vielfach verstärkten Reaktion führt als Verwundung allein (Turlings *et al.* [1998]; Lawrence & Novak [2004]; Schnee *et al.* [2006]). Die Fettsäurekonjugat-Elicitoren Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin) oder *N*-Linolenoyl-L-glutamin, welche im Speichel von *Spodoptera littoralis* vorkommen, binden an bisher noch unbekannte Rezeptoren und sind unter anderem für die verstärkte Signalantwort verantwortlich (Alborn *et al.* [1997]; Spiteller *et al.* [2000]; Tumlinson & Lait [2005]; Turlings *et al.* [1990]; Schmelz *et al.* [2001]; Yoshinaga *et al.* [2010]). Neben Herbivoren können auch Pathogene wie Pilze, Bakterien oder Viren die Pflanze schädigen. Um auf diese unterschiedlichen Feinde reagieren zu können, besitzen Pflanzen verschiedene Abwehrstrategien (Reymond & Farmer [1998]; Glazebrook [2001]). Durch die Akkumulation der drei Pflanzenhormone, Salizylsäure (SA), Ethylen (ET) und Jasmonsäure (JA), können Pflanzen gezielt auf die Schädigungen entgegenwirken. Salizylsäure (SA) spielt beispielsweise eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen biotrophe Pathogeninfektionen (Glazebrook [2005]; Lorenzo & Solano [2005]; Achard *et al.* [2006]). Im Gegensatz dazu sind Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) wichtige Kontrollpunkte bei der Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene und Herbivoren (Reymond & Farmer [1998]; Schaller [2001]; Glazebrook [2005]; Lorenzo & Solano [2005]).

1.5.4 Jasmonsäure in der Pflanzenabwehr gegen Herbivore

Die Signalkaskade von der Verletzung der Pflanze durch einen Herbivor bis zur Biosynthese der Terpene besteht vermutlich aus Pflanzenhormonen und regulatorischen Elementen, wie Transkriptionsfaktoren und Kinasen. Ein besonders wichtiger Kontrollpunkt für Stress-induzierte Gene ist das Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA) und dessen Konjugate (Schmelz *et al.* [2003]; Reymond & Farmer [1998]; Schaller [2001]; Chen [2008]). Jasmonsäure wird über den Oktadekanoidweg synthetisiert, beginnend mit der Linolensäure in den Chloroplasten (Abb. 1.6). Ankala *et al.* [2009] zeigten, dass Pflanzen für Herbivorie anfälliger waren, nachdem die Akkumulation von JA durch Zusatz von Ibuprofen oder Salizylsäure (SA) verhindert wurde. Für die Abwehrantwort ist die Anwesenheit der aktiven Form des Pflanzenhormons, das Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile), notwendig. Durch Vorliegen von Jasmonsäure-Isoleucin im Zellkern

interagiert der JAZ-Repressor mit der SCF^{COI1} (Skip-Cullin-F-Box) Ubiquitin-Ligase. Die Folge ist eine Ubiquitierung des JAZ-Repressors mit anschließendem Abbau durch das 26s Proteasom. Ein bHLH-Transkriptionsfaktor (MYC2) wird nicht länger durch den Repressor reprimiert und kann die Expression von frühen Genen der Jasmonatantwort aktivieren (Howe & Jander [2008]; Halitschke & Baldwin [2003]; Kalde *et al.* [2003]; Thines *et al.* [2007]). Einige Untersuchungen haben gezeigt dass die Jasmonatantwort durch positive Rückkopplung verstärkt werden kann (Sasaki *et al.* [2001]; Bonaventure *et al.* [2007]; van der Fits & Memelink [2000]). In Arabidopsis konnten mit Hilfe von Makroarraydaten 5 Jasmonsäure-Biosynthesegene identifiziert werden, deren mRNA Expression nach Methyljasmonat induziert ist (Sasaki *et al.* [2001]). Das deutet darauf hin, dass Jasmonsäure die eigene Biosynthese induzieren kann.

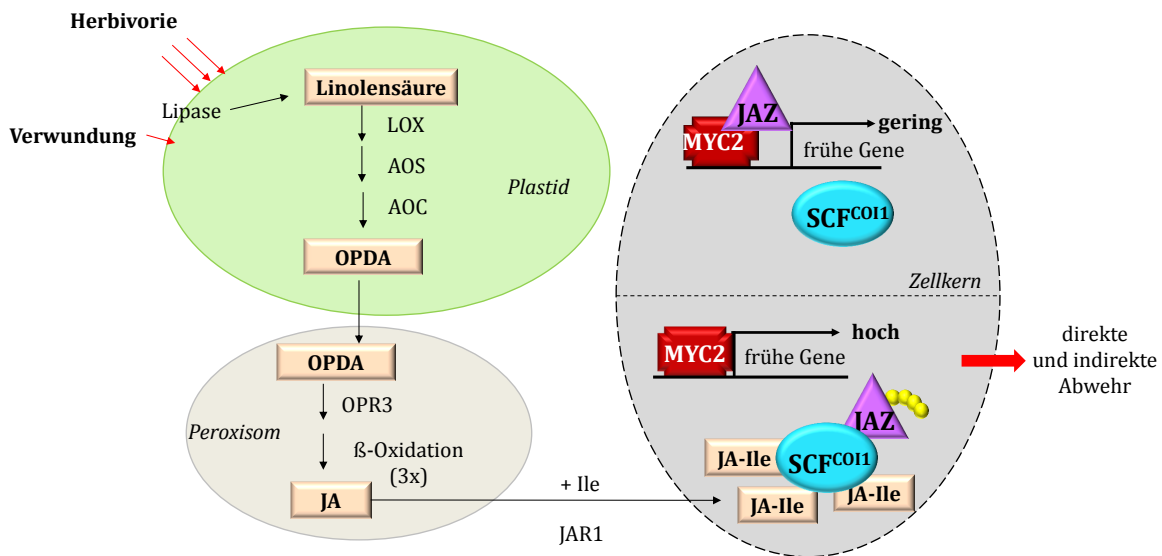


Abbildung 1.6 Regulation der Jasmonatantwort nach Herbivorie in Arabidopsis.

Durch Verwundung und verstärkt nach Herbivorie wird die Biosynthese von Jasmonsäure induziert, beginnend mit der Linolensäure in den Chloroplasten. Durch eine Lipoxidase (LOX), Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxydcyclase (AOC) wird Linolensäure weiter zu 12-oxo-Phytodienonsäure (OPDA) umgewandelt. Nach Transport von OPDA in die Peroxisomen, wird es dort durch eine OPDA-Reduktase (OPR3) reduziert. Anschließend durchläuft es drei aufeinanderfolgende β -Oxidationen bis zur Jasmonsäure (JA). Das JAR1-Protein überführt die Jasmonsäure (JA) in seine aktive Form, das Jasmonsäure-Isoleucin (Ja-Ile) (Staswick & Tiriyaki [2004]). Im Zellkern führt JA-Ile dazu, dass der SCF^{COI1}-Komplex (Skip-Cullin-F-Box) den JAZ-Repressor binden kann (untere Teil des Zellkerns). Der dadurch freiliegende MYC2-Transkriptionsfaktor kann die Transkription der Jasmonatantwort induzieren, gefolgt von der direkten und indirekten Abwehr. Wenn keine aktivierte JA-Ile im Zellkern vorliegt, ist der JAZ-Repressor an den MYC1 gebunden und verhindert so die Expression wichtiger früher Abwehrgene (oberer Teil des Zellkerns). Abbildung zum Teil nach Howe & Jander [2008].

1.6 Entwicklung von der Mendelgenetik bis zur heutigen modernen Quantitativen Genetik in der Pflanzenwelt

Den Grundstein für die heutige Genetik legte Georg Mendel bereits im 19. Jahrhundert mit seinen Studien über die Vererbungslehre. Mit Hilfe von Statistik erkannte Mendel, dass die damals von ihm als „Faktoren“ bezeichneten Gene, von den Eltern in konstanten Verhältnissen an die nächste Generation weitergegeben werden. Seitdem stellt sich die Frage, wie viele und vor allem welche Gene für bestimmte Merkmale wie Größe, Farbe und Form eines Lebewesens verantwortlich sind. Noch bevor das menschliche Genom sequenziert wurde, konnten Wissenschaftler bereits durch klassische genetische Methoden Loci und Gene auf bestimmten Chromosomen lokalisieren. Es wurden Genombereiche identifiziert, welche Einfluss auf quantitative Eigenschaften haben (z. B. Körpergröße). Diese Bereiche auf dem Chromosom bezeichnet man auch als „Quantitative Trait Loci“ (QTL; Geldermann [1975]). Damit war es möglich, menschliche Gene zu kartieren, die im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten stehen. Erfolge gab es beispielsweise bei der Identifizierung spezifischer Gene für die Huntington-Krankheit, Phenylketonurie (PKU) oder Farbenblindheit (Plomin [2001]) sowie für die spät auftretende Form der Alzheimerschen Erkrankung (Corder *et al.* [1993]). Im Bereich der Pflanzenforschung hat die quantitative Genetik einen großen Anteil an den Erfolgen der Pflanzenzüchtung gehabt. Seit der Wiederentdeckung der Mendelschen Vererbungsgesetze wurde der Mais zum experimentellen Modellorganismus in der Genetik. Ziele sind unter anderem das Identifizieren von QTLs hinsichtlich der Biomasse, Krankheitsresistenzen und Klimatoleranzen, welche das Verbessern qualitativer Merkmale von Maissorten erleichtern. Auch die Bekämpfung von Mangelernährung in über der Hälfte der Bevölkerung, vor allem in den Entwicklungsländern³, kann durch Erhöhung der Vitamingehalte unterstützt werden (Ortiz-Monasterio *et al.* [2007]). Die verschiedenen Möglichkeiten, quantitative Loci mittels heutiger Methoden zu untersuchen, sollen in den folgenden Kapiteln gezeigt werden.

1.6.1 Die wichtigsten Begriffe der quantitativen Genetik

Zur Identifikation von Genombereichen oder Genen, welche Einfluss auf quantitative Merkmale haben, sind molekulare Marker notwendig. Seit ihrer Entdeckung in den 80iger Jahren kann man quantitative Gene relativ günstig lokalisieren und zwischen Individuen unterscheiden. Molekulare Marker sind eindeutig identifizierbare, kurze, DNA-Abschnitte, die zwischen Individuen variabel sind und einem bestimm-

³United Nations System Standing Committee on Nutrition, 2004

ten Locus zugeordnet werden können. Die Marker können genutzt werden, Unterschiede zwischen Individuen, Populationen, Rassen und Arten zu charakterisieren. Es können verschiedene Markertypen eingesetzt werden. Oft eingesetzte Marker sind Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl.: *Single Nucleotide Polymorphism*), welche Unterschiede in einzelnen Nukleotiden zwischen Individuen darstellen. Theoretisch können SNP-Marker bis zu vier mögliche Variationen haben (A, T, C, G). Praktisch gesehen treten meist nur zwei Allele auf, bedingt durch geringe Mutationsraten oder Basensubstitutionen. SNP-Marker sind besonders für große Experimentansätze geeignet, da sie gleichmäßig alle 500-1000 bp über das gesamte Genom verteilt sind sowie günstig und standardisiert identifiziert werden können. Molekulare Marker mit einer geringeren Dichte aber höheren Anzahl an Variationen stellen die Mikrosatelliten dar (SSR, engl.: *Simple Sequence Repeat*). Das sind DNA-Segmente bestehend aus 2-4 Nukleotiden in mehrfacher Wiederholung (Bsp.: [GAA]_n). Um QTLs mittels unterschiedlicher Kartierungsmethoden zu identifizieren, werden oftmals Inzuchtlinien verwendet. Diese Linien besitzen durch wiederholte Selbstungen ein nahezu homozygotes Genom. Das heißt, die Individuen besitzen zwei gleiche Allele für ein Gen oder Locus. Sie können daher nur ein Allel an die Nachkommen weitergeben, so dass ihre Merkmale auch in der Folgegeneration erhalten bleiben. Inzuchtlinien sind untereinander durch ihre Haplotypen unterscheidbar. Ein Haplotyp setzt sich aus einzelnen SNPs eines Genombereiches zusammen, in denen sich die Individuen unterscheiden. In der Abb. 1.7 sind acht verschiedene Individuen dargestellt, welche sich in wenigen Nukleotiden unterscheiden, während die restliche DNA-Sequenz identisch ist. Der Haplotyp gibt immer nur jene Nukleotide an, welche unterschiedlich sind (Abb. 1.7, rechts) und besteht also ausschließlich aus SNPs (Rafalski & Morgante [2004]; The international HapMap Consortium, 2003). Mit Kartierungsmethoden an den Haplotypen versucht man jene SNPs zu identifizieren, welche mit einem quantitativen Locus assoziiert sind. Dadurch ist es möglich, quantitative Loci zu ermitteln, welche im Zusammenhang mit dem Merkmal stehen. Diese werden demzufolge auch als „Quantitative Trait Loci“ (QTL) bezeichnet.

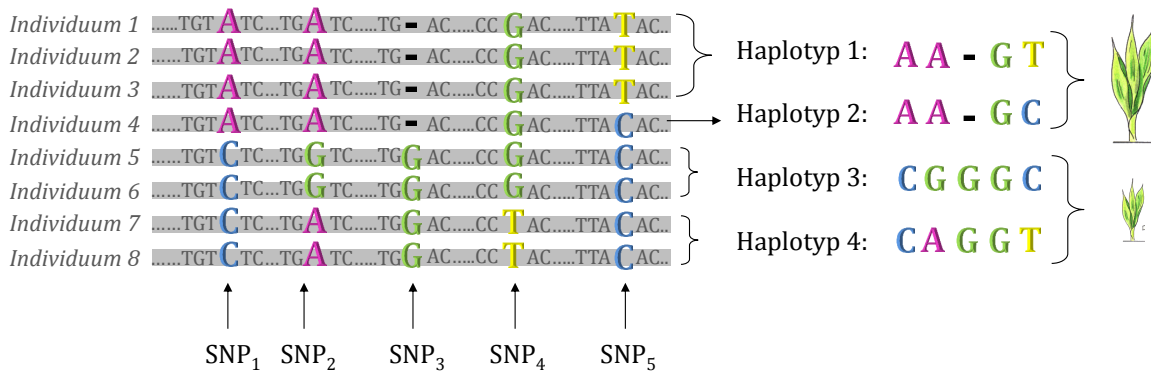


Abbildung 1.7 Verwendung von SNPs und Haplotypen zur Assoziationskartierung. Dargestellt ist ein Genomabschnitt von 8 Individuen, welche sich in nur wenigen Nukleotiden unterscheiden (farbige Nukleotide). Diese sogenannten SNPs (engl.: *Single Nucleotide Polymorphism*) bilden die verschiedenen Haplotypen. Insgesamt kommen nur 4 Haplotypen in den 8 Individuen vor, welche sich für eine bestimmte Merkmalsausprägung wie die Größe der Pflanze unterscheiden. Nur SNP1 und SNP3 kommen für die unterschiedliche Merkmalsausprägung in Frage.

1.6.2 Assoziationskartierung basierend auf dem Kopplungsungleichgewicht (engl.: *Linkage Disequilibrium, LD*)

Bei der Assoziationskartierung wird, wie der Bezeichnung zu entnehmen ist, nach einer statistischen Assoziation eines Markers mit einem bestimmten quantitativen Merkmal gesucht. Mit Hilfe dieser Methode kann man nicht nur die Chromosomenregionen sondern oftmals auch Kandidatengene bestimmen, welche einen bestimmten Phänotyp beeinflussen. Dafür müssen die Genotypen und Phänotypen der zu analysierenden, ausgewählten Individuen bestimmt werden. Anschließend sucht man nach einem Kopplungsungleichgewicht zwischen einem Kandidatengenenmarker und dem kausativen SNP des Gens, welcher für einen bestimmten Phänotyp verantwortlich ist. Das bedeutet, dass die Marker in direkter Nähe oder sogar im Kandidatengen liegen müssen und man zur Anwendung dieser Methode relativ viele Marker benötigt. Die Assoziationskartierung basiert auf Linkage Disequilibrium (LD), welche auch als Kopplungsungleichgewicht bezeichnet wird. Um den Begriff LD zu erklären, sind in Abb. 1.8 mehrere Individuen mit einem Kopplungsungleichgewicht (A) und einem Kopplungsgleichgewicht (B) dargestellt. Im ersteren Fall sind zwei Loci gekoppelt, so dass die Allele nicht unabhängig voneinander sondern häufiger zusammen auftreten. Das kann bei sehr nah liegenden Loci erfolgen, aber auch bei Loci auf unterschiedlichen Chromosomen. Ein Kopplungsgleichgewicht tritt auf, wenn beide Loci nicht gekoppelt sind und die Verteilung der beiden Loci unabhängig voneinander auftritt.

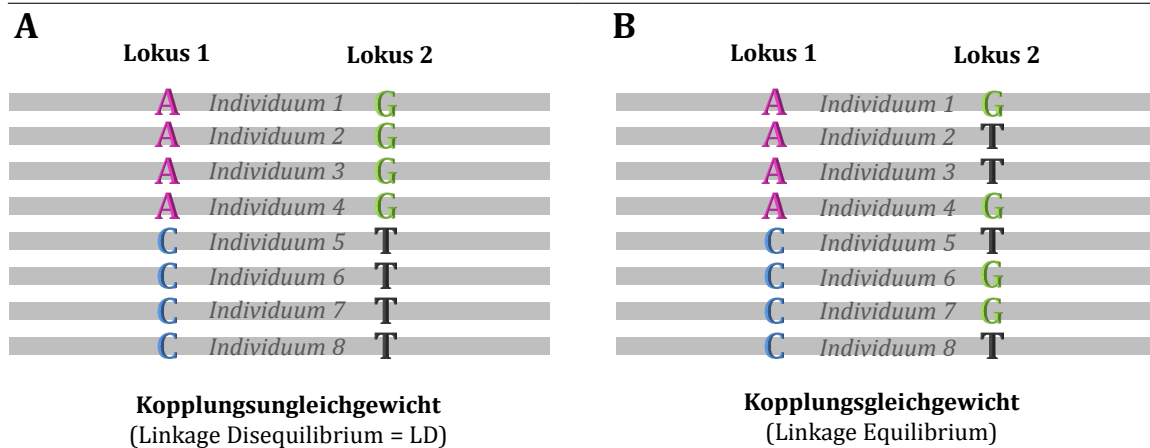


Abbildung 1.8 Kopplungsungleichgewicht und Kopplungsgleichgewicht zwischen zwei Loci.

(A) Wenn ein Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Loci vorliegt, sind diese miteinander gekoppelt und alle Individuen mit einem A am Locus 1, besitzen ein G am Locus 2.

(B) Liegt ein Kopplungsgleichgewicht zwischen den Loci vor, sind diese nicht gekoppelt und durch zufällige Rekombination kann der Locus 1 jedes Allel am Locus 2 besitzen.

Bei der Assoziationskartierung werden verschiedene Individuen bzw. eine Population analysiert, welche über viele Generationen historische und evolutionäre Rekombinationen durchlaufen haben und somit eine geringere „Linkage Disequilibrium“ (LD) aufweisen als beispielsweise bei kürzlich stattgefundenen Rekombination einer F1-Generation. Die LD in Mais ist sehr niedrig und liegt bei $\sim 1,5$ kb (Gaut & Long [2003]), da sich Mais in mehr als 2 Millionen Jahren und über viele Generationen hinweg entwickelt hat (Yu *et al.* [2007]) und viele Rekombinationsereignisse stattfinden konnten (Abb. 1.9). Zudem besitzt Mais einen hohen Polymorphismus, der dazu führt, dass sich das Genom zweier Maissorten mehr voneinander unterscheidet, als der Mensch vom Affen. Der moderne Mensch (*homo sapiens sapiens*), welcher vor ~ 200000 Jahren entstanden ist, ist durch eine höhere LD von ~ 60 kb gekennzeichnet (Remington *et al.* [2001]; Flint-Garcia *et al.* [2003]). Obwohl das menschliche Genom (*Homo sapiens sapiens*) nur wenig größer ist als das Maisgenom, reichen ~ 70000 Marker zur Genotypisierung aus, da es aus größeren Genombruchstücken besteht als vergleichsweise der Mais (Flint-Garcia *et al.* [2003]; Abb. 1.9). Für den Mais werden mehrere Millionen Marker benötigt um das Genom für Kartierungsanalysen abzudecken (Yu *et al.* [2007]). Die LD ist also maßgeblich entscheidend dafür, wie viele Marker (SNPs) benötigt werden, um das gesamte Genom zwischen den zu analysierenden Individuen unterscheiden zu können. Das heißt für Populationen mit einer geringeren LD werden aufgrund kleinerer Mosaike im Genom mehr Marker benötigt, als für Populationen mit einer größeren LD. Die LD entscheidet somit darüber, wie genau man den quantitativen Locus eingrenzen kann. Im Mais kann man auf Grund des niedrigen Kopplungsungleichgewichts den Locus bis hin zum Kandidatengen ein-

grenzen.

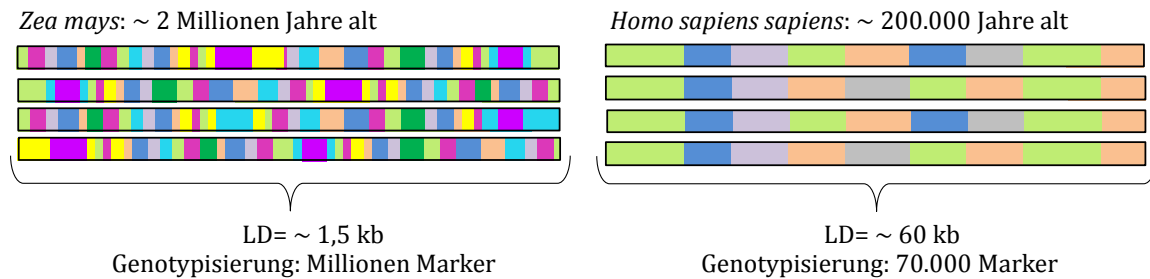


Abbildung 1.9 Schematische Darstellung des Kopplungsungleichgewichts bei *Zea mays* und *Homo sapiens sapiens*. Für beide Spezies sind DNA-Moleküle von jeweils 4 Individuen dargestellt. Die farbigen Markierungen symbolisieren einzelne DNA-Bruchstücke mit jeweils konservierter SNP-Anordnung. Beim Mais sind diese Bruchstücke kleiner und enthalten mehr Farben, da mehr Rekombinationsereignisse innerhalb mehrerer Generationen im Laufe von ~ 2 Mill Jahren stattgefunden haben. Dadurch besitzt der Mais eine geringere LD (~ 1,5 kb) als der Mensch (LD= ~ 60 kb). Demzufolge werden nur 70000 Marker gebraucht um das menschliche Genom zu genotypisieren, während beim Mais mehrere Millionen Marker notwendig sind. Zum anderen liegt in Mais eine 10 x höhere genetische Diversität vor (Tishkoff & Verrelli [2003]; Rafalski & Morgante [2004]). Dies ist durch eine geringere Anzahl identischer DNA-Bruchstücke zwischen den Individuen beim Mais im Vergleich zum Menschen erkennbar.

Ein wichtiger Faktor welcher die LD beeinflusst, ist die Populationsgeschichte, die z. B. durch Populationsengpässe, Populationsgröße, Rekombination oder geographische Expansion beeinflusst sein kann. So hat die letzte Eiszeit (30000 - 15000 Jahre) zum erheblichen Bevölkerungsverlust in Nordeuropa geführt mit anschließender Neubevölkerung, was mitunter die höhere LD bei den Europäern erklärt (Reich *et al.* [2001]). Der Modellorganismus *Arabidopsis* besitzt eine viel höhere LD (~ 250 kb) als Mais oder Mensch, bedingt durch eine >90 % ige Vermehrung durch Selbstung. In diesen Populationen kommt Rekombination vor, jedoch ohne einen Effekt auf die LD (Nordborg *et al.* [2002]).

1.6.3 Kopplungskartierung („Linkage Mapping“) innerhalb einer Familie

Die Kopplungskartierung, auch „Linkage Mapping“ oder „QTL-Mapping“ genannt, verlinkt phänotypische und genotypische Daten einer Familie miteinander. Dafür wird die segregierende F₂-Generation einer biparentalen Kreuzung verwendet, deren Eltern sich bezüglich des zu analysierenden genetischen Merkmals unterscheiden. Die elterlichen Allele segregieren in der F₂, wodurch diese rekombinante Chromosomen enthalten. Jedoch sind die Nachkommen der F₂-Generation größtenteils heterozygot und enthalten somit zwei verschiedene Allele für ein Gen bzw. einen Locus. Eine Möglichkeit dies zu umgehen, ist die Verwendung von rekombinanten Inzuchtlinien (RILs), welche nahezu homozygot für die rekombinanten Chromosomenmosaik sind.

Auch bei dieser Kartierungsmethode werden Marker benötigt mit denen die Eltern unterscheidbar sind und mit denen man die Chromosomenfragmente in den Nachkommen den Eltern zuordnen kann. Da über die wenigen Generationen relativ wenig Rekombinationen stattfinden, sind die rekombinanten Chromosomenbruchstücke wesentlich größer (1-20 cM / 1-2 Millionen bp) als jene evolutionär entstandener Mosaik. Aus diesem Grund werden viel weniger Marker benötigt, um in den Nachkommen die Bruchstücke zu bestimmen. QTLs können demzufolge nur auf bestimmte Chromosomensegmente lokalisiert und eingegrenzt werden (Abb. 1.10). Die Auflösung bei der Kopplungskartierung ist dementsprechend sehr gering, während die QTLs bei der Assoziationskartierung stärker eingegrenzt werden können.

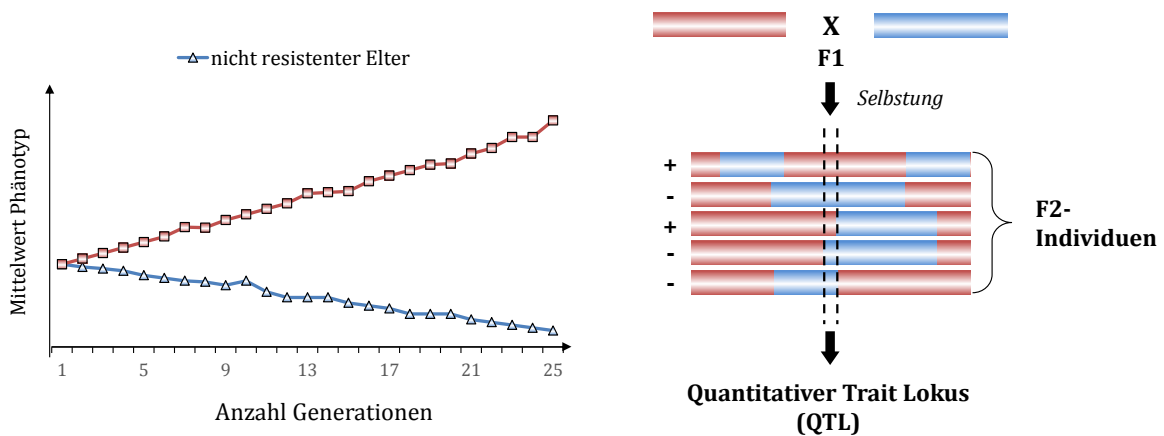


Abbildung 1.10 Kopplungskartierung in den Nachkommen zweier Inzuchtlinien.

(A) Zwei Elternlinien, welche für ein bestimmtes Merkmal, wie z. B. eine Resistenz phänotypisiert werden. Elter rot zeigt eine höhere Resistenz (viereckige Markierung) als der blaue Elter (dreieckige Markierung).

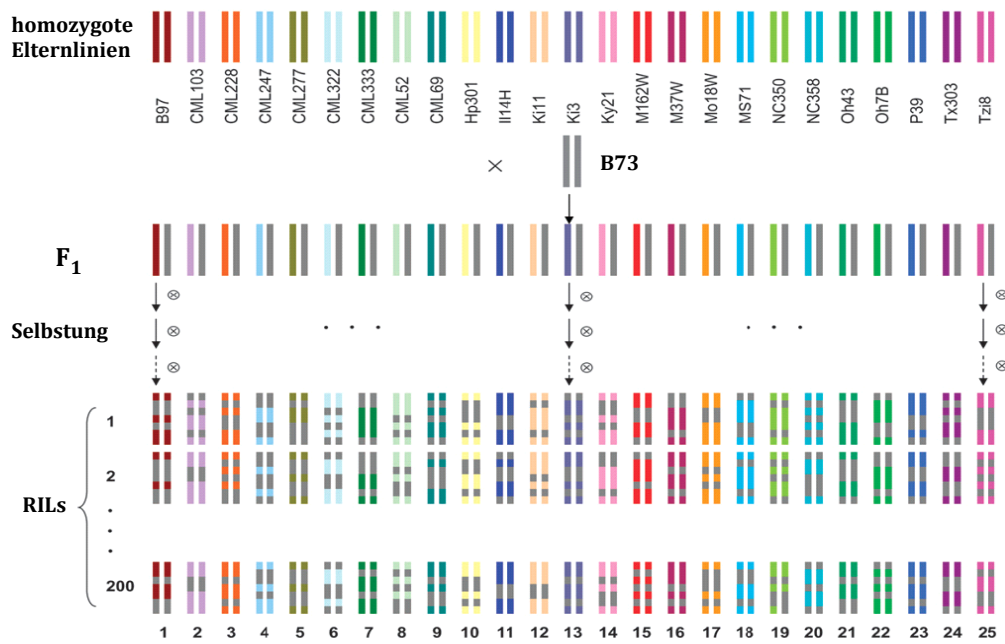
(B) Beide Eltern unterscheiden sich auch genotypisch, dargestellt durch rote bzw. blaue Balken. Nach Kreuzung beider Elternlinien wird die F1 geselbstet, wodurch rekombinante Nachkommen entstehen, welche verschiedene Chromosomenfraktionen beider Eltern enthalten. Die Kennzeichnung links neben den F2-Generierungen gibt an, welches Individuum eine Resistenz besitzt oder nicht (+ resistent; - nicht resistent). Die Strichlinien grenzen den QTL ein. Mittels Wahrscheinlichkeitsrechnung wurde dieser QTL, ein Intervall zwischen zwei Markern ermittelt, welcher mit dem Merkmal gekoppelt ist. Abb. nach Mackay [2001]

1.6.4 „Nested Association Mapping“ (NAM)

Eine Methode welche alle Vorteile der zuvor beschriebenen Kartierungsmethoden ausnutzt und zugleich die Nachteile behebt, ist das „Nested Association Mapping“ (NAM). Diese Methode wurde für Mais im Labor von Ed Buckler⁴ entwickelt (Yu *et al.* [2007]). Dabei wird die Assoziationskartierung mit der Kopplungskartierung verbunden, indem 25 verschiedene Inzuchtlinien mit einer gemeinsamen Elternlinie gekreuzt werden (Abb. 1.11). Mit den insgesamt 26 sehr unterschiedlichen Eltern,

⁴Cornell University

welche über viele Generationen eine evolutionäre und historische Entwicklung durchlaufen sind, wird die Assoziationskartierung abgedeckt. Durch Erstellen von jeweils 200 rekombinanten Inzuchtlinien (5000 RILs) aus der Kreuzung der 25 Linien mit einem gemeinsamen Elter (B73) kann eine Kopplungskartierung erfolgen. Beim „Nested Association Mapping“ werden zuerst quantitative Chromosomensegmente (QTLs) in der NAM-Population identifiziert und anschließend in einer Feinkartierung auf das Kandidatengen innerhalb dieser Chromosomenregion eingegrenzt. Dadurch dass 26 sehr diverse Elternlinien für diese Methode eingesetzt werden, liegt eine hohe genetische Vielfalt vor, wodurch die Population auf viele unterschiedliche Merkmale untersucht werden kann. Die gemeinsame Elternlinie B73 wurde bewusst gewählt, da diese in einem Maisgenom-Sequenzierprojekt bereits vollständig sequenziert wurde und die meist genutzte Maisinzuchtlinie in der Maiszüchtung ist. Des Weiteren wurde sie schon in vielen Studien molekulargenetisch analysiert (Stuber *et al.* [1992]; Morgante *et al.* [2005]). Die entscheidende Rolle bei der kombinierten Kartierungsvariante ist die Auswahl und Genotypisierung der Marker. Wie bereits erwähnt, benötigt man bei der Assoziationskartierung Millionen Marker, während bei Verwandtschaftsanalysen durch Kopplungskartierung viel weniger Marker erforderlich sind. Die NAM-Population besteht aus insgesamt >5000 zu analysierenden Individuen (5000 RILs + Elternlinien). Würden all diese für über eine Million Marker genotypisiert werden, wäre das ein enormer Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand. Demzufolge hat man zunächst nur 1106 elternspezifische Marker (CPS, engl.: *common parent specific*) verwendet, um die einzelnen Chromosomensegmente der RILs entweder einer der 25 diversen Elternlinien oder dem gemeinsamen Elter B73 zuordnen zu können. Dadurch ermittelt man die Vererbung der Chromosomensegmente, welche aus Rekombinationsereignissen während der RIL-Entwicklung entstanden sind. Demzufolge wurden alle Individuen, sowohl Eltern als auch Nachkommen der NAM-Population für diese Marker genotypisiert. Durch Kopplungsstudien zwischen den Genotypen und dem Phänotyp eines zu analysierenden Merkmals kann man QTLs für diese Merkmale errechnen. Die 1106 CPS-Marker sind über das gesamte Genom verteilt und bei Annahme von gleichen Abständen kann man einen quantitativen Lokus theoretisch auf ca. 2,9 Mb eingrenzen. Da das Genom $\sim 2,3$ Milliarden Basenpaaren besteht und ca. 32000 Gene enthält, würden etwa 35,5 Gene in diesem Bereich liegen. In einem weiteren Schritt lassen sich diese QTL-Bereiche weiter eingrenzen. Dieser Feinkartierungsschritt wird auch als „genomweite Assoziationsstudie“ bezeichnet (GWAS, engl.: „Genome Wide Association Study“).



Yu et al., 2008 (modifiziert)

Abbildung 1.11 Erstellen der rekombinanten Inzuchtlinien aus 26 diversen Elternlinien für das „Nested Association Mapping“ (NAM). Durch Kreuzung 25 diverser Inzuchtlinien mit einem gemeinsamen Elter (B73) entsteht jeweils eine heterozygote F1-Generation. Mehrere Schritte der Selbstung folgen, wodurch mosaikartige, nahezu homozygote Chromosomenfragmente aus jeweils einer Elternlinie und B73 in den Nachkommen (RILs) entstehen. Insgesamt sind 5000 Nachkommen (200 je Elternlinie gekreuzt mit B73) welche zusammen mit den Elternlinien die NAM-Population bilden und auf die zu untersuchenden Merkmale analysiert werden können. Die Elternlinien und RILs wurden für 1106 elternspezifische Marker (CPS) genotypisiert. Marker mit einer höheren Dichte (1,6 Millionen) wurden zusätzlich nur für die Eltern genotypisiert.

1.6.5 „Genome Wide Association Study“

Um die Chromosomenbereiche der QTLs weiter einzugrenzen, kommen die Marker für die Assoziationskartierung zum Einsatz. Diese Marker müssen mit einer sehr hohen Dichte über das Maisgenom verteilt sein, um die Kandidatengene identifizieren zu können. Dadurch dass die Marker nahezu das gesamte Genom abdecken, wird dieser Teil der kombinierten Kartierungsmethode auch als „Genome Wide Association Study“ (GWAS) bezeichnet. Der Markersatz für das GWAS besteht aus 1,6 Millionen SNPs, wodurch es möglich ist den Chromosomenbereich bis auf ~ 10 kb einzugrenzen. Der wesentliche Unterschied beim GWAS zum vorigen Kartierungsschritt ist, dass nur die 26 Elternlinien für die 1,6 Millionen Marker genotypisiert worden sind. Demzufolge waren die Genotypen der 5000 RILs bezüglich dieser Marker unbekannt. Aus diesem Grund wurden im nachfolgenden Schritt die 1,6 Millionen SNPs auf die segregierenden RILs projiziert. Die Projektion dieser Marker erfolgt anhand der bekannten Chromosomenfragmente, welche im ersten Kartierungsschritt in den RILs genotypisiert worden. Wenn man davon ausgeht, dass keine Doppelrekombination

stattgefunden hat und zwei angrenzende Marker entweder vom B73–Elter (0) oder von einem Nicht–B73–Elter (2) sind, ist die Projektion der SNPs auf die RILs eindeutig. Das heißt alle SNPs zwischen beispielsweise zwei B73–Markern sind 0 (RIL2, Abb. 1.12) und umgekehrt sind alle SNPs zwischen zwei Nicht–B73–Markern 2 (RIL1, Abb. 1.12). Sind jedoch die flankierenden Marker von unterschiedlichen Eltern, wird ein Rekombinationsevent mit Hilfe der genetischen Abstände zwischen zwei Markern simuliert (siehe Absatz 2.5.4). Die mittels Formeln errechneten SNP-Werte sind >0 und <2 . Liegt also ein SNP genau in der Mitte von einem B73–Marker und einem Nicht–B73–Marker, erhalten die SNPs eine 1. Liegt ein SNP allerdings 75% vom B73–Marker entfernt, wird er mit einer 1,5 nummeriert und bei 25% mit einer 0,5. Die gleiche Nummerierung erfolgt, bei Flankieren eines heterozygoten Markers an einen homozygoten Marker. Ist der homozygote Marker vom B73–Elter, werden für die SNPs Werte zwischen 0 und 1 vergeben (RIL3, Abb. 1.12). Liegen die SNPs zwischen einem heterozygoten und einem Nicht–B73–Marker, erhalten diese Werte zwischen 1 und 2 (RIL4, Abb. 1.12).

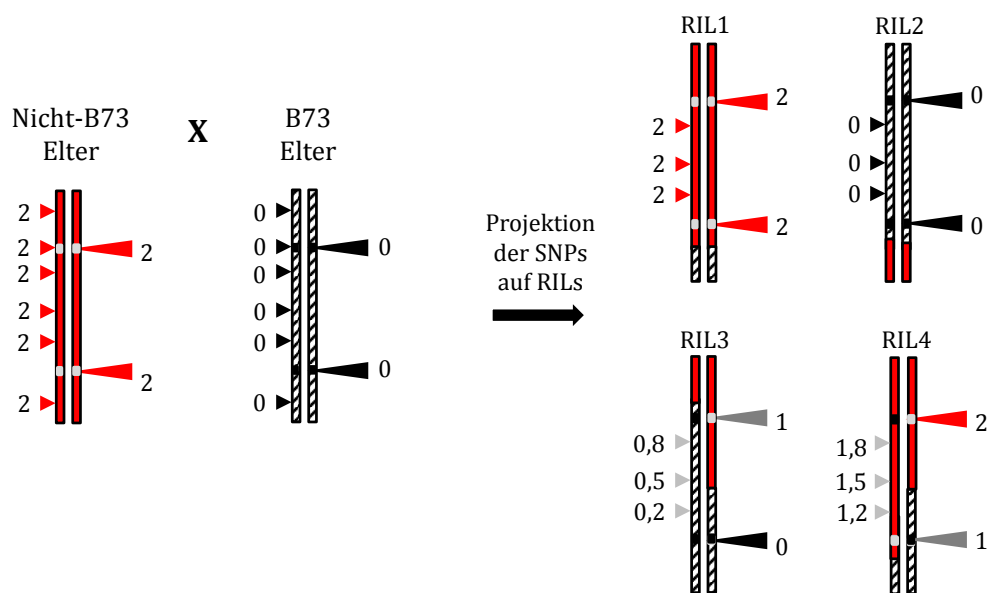


Abbildung 1.12 Interpolation von SNPs auf die Nachkommen zweier Inzuchtlinien mit Hilfe von genetischen Markern. Dargestellt ist die Kreuzung von B73 (gestreift) mit einer Inzuchtlinie (Nicht–B73–Elter, rot). Beide Elternlinien wurden sowohl für die (CPS, engl.: *common parent specific*, große Dreiecke), als auch für die SNPs (kleine Dreiecke) genotypisiert. Die SNPs kommen in einer größeren Dichte vor als die CPS-Marker. Die Zahlen neben den Dreiecken geben an, welchem Elter sie zugehörig sind. Dabei steht die 0 für B73 und eine 2 für Nicht–B73. Die CPS-Marker wurden auch in den Nachkommen, den RILs („Recombinant Inbred Line“) genotypisiert, in denen auch heterozygote Bereiche (graue markierte Dreiecke) vorkommen und mit einer 1 gekennzeichnet sind. Mit Hilfe der in den RILs bekannten Chromosomenabschnitte konnten die noch unbekannt genotypisierten SNPs transferiert werden. Alle SNPs welche in einem Intervall von zwei B73–Markern liegen erhalten eine 0 und alle zwischen Nicht–B73–Markern eine 2. Hat ein crossing-over Event stattgefunden und grenzen zwei Marker von unterschiedlichen Eltern aneinander, so wird die Wahrscheinlichkeit ausgerechnet, ob ein SNP dem B73–Elter entspricht oder nicht. Dabei wird der Abstand des SNP zum B73–Marker durch den Abstand zwischen zwei CPS-Markern dividiert

Nachdem die SNPs auf die Nachkommen projiziert wurden, kann die Assoziationskartierung mit den evolutionär stattgefundenen Rekombinationen erfolgen. Diese genomweite Assoziationsstudie wird nur für jenes Chromosom durchgeführt, auf dem sich der QTL befindet. Nach 100-facher Wiederholung dieser Berechnung, wird jener SNP-Marker ermittelt, welcher am häufigsten berechnet wurde, also die höchste Signifikanz besitzt.

1.7 Zielstellung

Mais produziert volatile Terpene nach Befall von Maisschädlingen. Die Biosynthese dieser volatilen Terpene sollte im Modellorganismus *Zea mays* aufgeklärt und die daran beteiligten Enzyme und Regulationsfaktoren identifiziert werden.

Quantitative Genetik ist eine besonders geeignete Methode, um die für einen Biosyntheseweg relevanten Gene aus größeren Genfamilien zu identifizieren. Auch bisher unbekannt regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktoren oder Kinasen von Biosynthesewegen können durch die Phänotypisierung der Pflanzen gefunden werden. *Cis*-Elemente, zu denen „Enhancer“ oder „Silencer“ Elemente zählen, sind möglicherweise ebenso von Interesse und können mit dieser Methode identifiziert werden. Das „Nested Association Mapping“ (NAM) in Kombination mit der Feinkartierungsstudie „Genome Wide Association Study“ (GWAS) ist eine effektive Methode der quantitativen Genetik, mit der Kandidatengene identifiziert bzw. lokalisiert und folglich charakterisiert werden können. Ziel dieser Arbeit ist es Gene zu identifizieren, welche direkt mit einem quantitativen Merkmal der Terpenbiosynthese assoziiert werden können. Die Kandidatengene sollten danach biochemisch charakterisiert werden und deren Assoziation mit dem QTL nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Pflanze *Zea mays* aus der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) wurde für diese Doktorarbeit verwendet. Für den Großteil der Versuche wurde der Kultivar B73 genutzt, da die genomische Sequenz dieser Linie durch Sequenzierprojekte nahezu aufgeklärt ist und öffentliche Datenbanken zur Verfügung stehen. Für die Kartierungsexperimente wurden zusätzlich zu B73 die 25 Elternlinien der „Nested Association Mapping“ (NAM) Population (siehe Tabelle 2.1.1) und die rekombinanten Inzuchtlinien (Tabelle 2.2) verwendet, welche aus Kreuzungen der Elternlinien mit B73 hervorgehen.

Tabelle 2.1 Verwendete Pflanzenkultivare

Name	Eigenschaften	Herkunft
B73	Inzucht Linie (Reid Yellow Dent)	KWS (Einbeck)
B97	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML103	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML228	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML247	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML277	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML322	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML333	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML52	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
CML69	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
HP301	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
IL14H	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Ki11	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Ki3	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Ky21	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
M162W	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
M37W	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Mo18W	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
MS71	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
NC350	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
NC358	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)

Tabelle 2.1 Verwendete Pflanzenkultivare

Name	Eigenschaften	Herkunft
OH43	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
OH7B	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
P39	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Tx303	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)
Tzi8	Inzucht Linie	Maize Stock Center (Urbana, IL)

Für die Analyse einer Assoziation von QTL_{606}/QTL_{607} mit dem Kandidatengen, wurden rekombinante Inzuchtlinien (RILs) der Linien B73 und Ky21 verwendet. Diese ausgewählten RILs sind durch Rekombinationsereignisse nahe des QTLs bzw. Kandidatengens gekennzeichnet.

Tabelle 2.2 Verwendete Rekombinante Inzuchtlinien

Elternlinien	Rekombinante Inzuchtlinien	Herkunft
B73x Ky21	Z14E0012; Z14E0124; Z14E0145; Z14E0085; Z14E0051	Maize Stock Center (Urbana, IL)

Für die Analyse einer Assoziation des QTL_{764} mit dem Kandidatengen *cyp92c6*, wurde eine Mu-Transposon-Linie im B73 Hintergrund verwendet. Diese Linie wurde bis in die F4-Generation geselbstet, mit B73 rückgekreuzt und anschließend bis zur F3-Generation geselbstet.

Tabelle 2.3 Verwendete Mutantenlinie

Mutante	Herkunft
MuIII (dmnt-Mutante)	DuPont Pioneer

2.1.2 Kultivierung und Anzucht der Pflanzen

Die Keimung der Maissamen erfolgte durch die Inkubation in mit Wasser gefüllten Petrischalen bei 37 °C über Nacht und anschließendem Aufbewahren für weitere 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Alle Pflanzen wurden dann einheitlich in den Klimakammern der Firma York Int (York, USA) angezogen. Durch Aussähen der Sämlinge in 40 x 60 x 6 cm großen Schalen mit Tonsubstrat (Klasmann, Gross-Hesepe, Deutschland), wurde für gleiche Bedingungen gesorgt. Die Anzucht in den Klimakammern

wurde folgendermaßen durchgeführt: Lichtstärke: $1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für 16 h am Tag, Luftfeuchte: 65 %, Temperatur am Tag: $22 \text{ }^\circ\text{C}$, Temperatur nachts: $18 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.1.3 Pflanzeninduktion mit einem Indanon-derivat

Um die Terpenbiosynthese zu induzieren, wurde ein Indanon-derivat (Abb. 2.1) verwendet. Indanon imitiert die Funktion von Coronantin (JA) (Weiler *et al.* [1994]; Krumm *et al.* [1995]; Blechert *et al.* [1999]; Schüler *et al.* [2001]). Sehr wahrscheinlich interagiert das Indanon-Derivat mit dem JA- und OPDA-Rezeptor und induziert die Jasmonat- bzw. Oktadecanoidsignalantwort (Schüler *et al.* [2001]). Dies ist durch die strukturelle Ähnlichkeit der Keto- oder Hydroxylgruppe am Fünf-Ring zu den Jasmonaten möglich (Zhang *et al.* [1997]). Für die Induktion wurde das 3. Blatt von 2 Wochen alten Sämlingen abgeschnitten und in ein Reagenzglas mit 1 ml Elicitorlösung ($2,3 \mu\text{M}$ Indanon-Derivat) für 24 h gestellt. Der Zeitpunkt der Induktion war wenn nicht anders beschrieben kurz nach dem Mittag. Zum Aufbewahren der Proben sind diese in flüssigen Stickstoff eingefroren worden. Die Blätter der Kontrollpflanzen wurden direkt nach dem Abschneiden in flüssigen Stickstoff gegeben. Um die Pflanzen auf ihren Terpengehalt vermessen zu können, wurden die Blätter mit Pistill und Reibschale pulverisiert unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff.

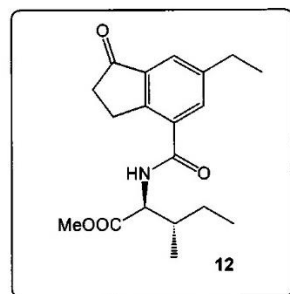


Abbildung 2.1 Das Indanoyl Konjugat 6-ethyl-Indanoyl-Isoleucin wurde als Elicitor zur Pflanzeninduktion eingesetzt. Abbildung aus Schüler *et al.* [2001].

2.1.4 Mikroorganismen

Für Klonierungs- und Expressionsexperimente wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10 (INVITROGEN, Karlsruhe) als Wirt eingesetzt. Dieser hat folgenden Genotyp: $F^- \text{ } mrcA \ \Delta(mrr - hsdRMS - mcrBC), \ \Phi80lacZ\Delta M15 \ \Delta lacX74 \ deoR \ recA1, \ araD139 \ \Delta(ara - leu)7697 \ galU \ galK, \ rpsL \ (\text{Str}^R) \ endA1 \ nupG$.

2.1.5 Kultivierung und Nährmedien für *Escherichia coli*

Die Vermehrung der *E. coli* Bakterien erfolgte im flüssigen LB-Medium [20 g LB-Medium/L (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)] bei 37 °C und 220 min⁻¹ über Nacht im Schüttelinkubator oder nach Transformation von Plasmid-DNA auf LB-Agarplatten [35 g LB-Agar/L (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)] bei 37 °C im Brutschrank. Zum Anziehen einer Kultur über das Wochenende wurde nur bei 18 °C und 220 min⁻¹ geschüttelt. Die jeweiligen Medien wurden, dem Selektionsmarker der Plasmide entsprechend, Antibiotika hinzugefügt: Ampicillin (100 mg l⁻¹), Carbencillin (50 mg l⁻¹), Kanamycin (50 mg l⁻¹).

2.1.6 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme, Oligonukleotide

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Biorad (München) und Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Die Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und DNA-Polymerasen mit entsprechenden Puffern wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) oder Promega (Madison, USA) geliefert.

2.1.7 Vektoren

In Tabelle 2.1.7 sind die während der Arbeit verwendeten Plasmide mit Angabe ihrer wichtigsten Merkmale, der Verwendung und der Herkunft aufgelistet.

Tabelle 2.4 Verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Verwendung	Firma
pASK-IBA37+	Bakterieller Expressionsvektor mit N-terminalen His(6)-tag, 3271bp, Apr	Überexpression His-markierter Proteine in <i>E. coli</i>	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA-33+	Bakterieller Expressionsvektor mit C-terminalen His(6)-tag, 3250bp, Apr	Überexpression His-markierter Proteine in <i>E. coli</i>	IBA GmbH, Göttingen

Tabelle 2.4 Verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Verwendung	Firma
pESC-LEU	Hefe Expressionsvektor mit GAL1 und GAL10 promotor in entgegengesetzter Richtung, 7800bp, Apr	Überexpression von Proteinen in Hefezellen	Aligent Technologies, Böblingen
pCR [®] ₄ – TOPO [®]	bakterieller Klonierungsvektor 3957bp, Kmr, Apr	Klonierung von PCR Fragmenten mit 3'-A-Überhang	Invitrogen, Carlsbad
pJET1.2/blunt	bakterieller Klonierungsvektor 2974bp, Apr	Klonierung von PCR Fragmenten mit glatten Enden	Thermo Scientific

2.2 Angewandte molekulargenetische Methoden

2.2.1 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNS aus Mais

Um genomische DNA aus Maisblättern isolieren zu können, wurde zu Beginn das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff mit Pistill und Mörser fein gemörsert. Für die DNA-Extraktion wurden 2 verschiedene Methoden angewendet. Zum einen kam das „DNeasy[®] Plant Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll zum Einsatz oder es wurde nach der Methode von Brandstädter *et al.* [1993] vorgegangen. Das Pflanzenmaterial wurde hierfür in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM [®]-Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) aufgenommen und resuspendiert. Nach Inkubation von 10 min bei 65 °C wurden 300 µl essigsäure Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und die Proben für 10 min auf Eis gestellt. Um die Zelltrümmer von der pflanzlichen DNA, den Proteinen und Lipiden zu trennen, wurden die Proben 15 min bei 20000 x g zentrifugiert und die Zelltrümmer somit sedimentiert. Der Überstand wurde ohne Zellrester in ein neues Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25 : 24 : 1) konnte die pflanzliche DNA extrahiert werden. Die anschließende Zentrifugation von 6 min bei 6000 x g konnte das Gemisch in 2 Phasen trennen. Die wässrige Oberphase mit der DNA und RNA und

die organische Unterphase mit dem Phenol, Chloroform und Anthocyanen. Zwischen den beiden Phasen haben sich die Proteine und Lipide als weiße Schicht abgesetzt. Die DNA wurde aus der wässrigen Oberphase mit 500 µl Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 µg ml⁻¹ RNase A aufgenommen.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* und Konzentrationsbestimmung

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde ausschließlich das Plasmidpräparationskit von der Firma Macherey & Nagel (Düren) genutzt. Dafür wurde eine Übernachtskultur von 2 ml angezogen und laut dem Herstellerprotokoll die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.3 Isolation von Gesamt-RNS aus Mais

Auch hier wurde entweder mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) gearbeitet oder Trizol[®] der Firma life Technologies (Darmstadt) verwendet. Für die Trizol-Methode wurde ca. 500 mg gemörsertes Blattmaterial mit 1 ml Trizol versetzt und gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 240 µl Chloroform hinzugegeben, auf dem Vortexer gemischt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol ausgefällt und 10 min bei 20000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl steril filtrierten Wasser aufgenommen.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure wurde genutzt, um für Sequenzierreaktionen die erforderliche Konzentration berechnen zu können oder um für die cDNA-Synthese gleiche Mengen an RNA einzusetzen. Hierfür kam das Infinite[®]200 PRO NanoQuant Gerät von der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) zum Einsatz, womit sowohl die Konzentrationen von DNS, RNS und Plasmid-DNS bestimmt werden konnte.

2.2.5 cDNA Synthese

Um aus reiner pflanzlicher RNA eine c-DNA zu erzeugen, wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Thermo Scientific verwendet. Zuvor musste ein DNase-

verdau durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass für die quantitative PCR nur RNA als Template eingesetzt wird.

2.2.6 Synthese einer RACE-Bibliothek

Durch eine Race-Bibliothek kann man ausgehend von einem bekannten Genabschnitt der mRNA, unbekannte Gensequenzen vervollständigen bis zum 3'-Ende (3'-RACE) oder zum 5'-Ende (5'RACE). Dabei wird die mRNA in cDNA umgewandelt und am 3'-Ende bzw. am 5'-Ende eine Ankersequenz angehängt. Verwendet wurde hierfür das Kit „SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) und die RACE-Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls.

2.2.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Unter Verwendung spezifischer Primerpaare (siehe Anhang 5.4) wurden die gewünschten DNA-Fragmente mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dafür wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Für analytische PCRs kam die GoTaq (Promega) zum Einsatz. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus den RACE-Reaktionen erfolgte mit Hilfe von „Advantage[®]2 Polymerase Mix“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA). Für sehr schwer amplifizierbare, GC-reiche Fragmente konnte nur die Advantage[®]GC Genomic LA Polymerase (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) genutzt werden. Die DNA-Fragmenten, welche zum Klonieren in Expressionsvektoren vorgesehen waren, amplifizierte die „PfuTurbo[®] DNA Polymerase“ (Stratagene, La Jolla, USA) um PCR-Fehler so gering wie möglich zu halten. Für die PCR kam wurde nach folgendem Schema gearbeitet: 2 µl Oligonukleotid-1 (10 pmol ml⁻¹), 2 µl Oligonukleotid-2 (10 pmol ml⁻¹), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 – 10 µl Polymerasepuffer (je nach Herstellerprotokoll), 0,25 – 1 µl Polymerase (je nach Herstellerempfehlung), 1 – 2 µl Template-DNA. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit autoklaviertem Wasser bis auf 50 µl aufgefüllt. Mit Hilfe des Thermocyclers peqSTAR 96 UNIVERSAL (peqlab, Erlangen) konnte die PCR-Reaktion folgendermaßen programmiert werden:

Tabelle 2.5 PCR-Bedingungen

initiale Denaturierung der DNA-Matrize	94 °C für	} 30-38x
Denaturierung der DNA-Matrize	94 °C für 30 s	
Anlagerung der Primer an die Matrize (Annealing)	58 – 62 °C für 30 s	
Synthese des Komplementärstranges (Extension)	72 °C für	
Vervollständigung der DNA-Synthese	72 °C für 5 min	
Kühlung und Aufbewahrung	94 °C	

2.2.8 Quantitative Real Time PCR

Für eine quantitative Echtzeit-PCR, wurde cDNA ausgehend von 1 µg RNA Endkonzentration verwendet. Das SYBR-Green wurde entweder von der Firma BIO-RAD (iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit, BIO-RAD, München) oder von Thermo Scientific (Maxima SYBR Green). CFX96 (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet nach folgendem Ansatz:

Tabelle 2.6 PCR-Bedingungen

PCR-Ansatz	PCR Bedingungen	
10 µl SYBR Green	Start Denaturierung	95 °C für 10 min
5 µl forward Primer	Denaturierung	95 °C für 1 min
5 µl reverse Primer	Annealing	95 °C für 1 min
1 µl cDNA	Extention	72 °C für 1 min
8 µl H ₂ O	Schmelzkurve:	95 °C für 1 min
		60 – 95 °C für 30 s

Die PCR wurde in der CFX96 Real Time Maschine (BIO-RAD, München, Deutschland) durchgeführt. Ein cDNA-Pool aus den verwendeten Templates sollte für eine Standardkurve mit Verdünnungen von 3 x bis $\frac{1}{27}$ x eingesetzt werden. Zusätzlich zum untersuchenden Gen, wurde die QRT für ein Referenzgen (APT1) durchgeführt. Mit dem Programm CFX Manager konnte die Expression mittels ΔC_T (Δ -threshold cycle) relativ zum Referenzgen ermittelt werden. Der C_T -Wert wurde jeweils aus drei biologischen Replikaten berechnet, welche sich wiederum aus jeweils drei technischen Replikaten ergaben.

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen mittels Elektrophorese. Die Agarose (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde in Konzentrationen von 0,8 % - 1,5 % in 0,5x TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat pH 7,8, 2 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst. Zum Anfärben der DNA wurden $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA-Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen und zuvor mit Stoppuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 120 mM EDTA; 50 % Glyzerin; 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Als Größenmarker wurde eine 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, USA) auf das Gel aufgetragen. Nach dem Auftrennen der DNA-Proben, entsprechend ihrer Größe, bei 100 V in einer i-Mupid mini Elektrophoresekammer (Helixx, Ontario, Canada), konnte die Nucleinsäure unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für die Dokumentation der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem (Syngene G:Box, Syngene, Cambridge, Großbritannien) genutzt.

2.2.10 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmenten zu klonieren, wurden entweder PCR-Fragmente oder DNA-Fragmente, welche bereits in Plasmiden vorlagen, mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Restriktionsenzyme mit den zugehörigen Puffern der Firmen NEB (Schwalbach) und Thermo Scientific verdauten die DNA-Fragmente entsprechend der Schnittstellen. Der Restriktionsansatz erfolgte mit 1 bis 5 U Enzym pro μg DNA in entsprechenden Puffern und inkubierte für mindestens 1 h bei 37°C im Brutschrank oder einem Thermocycler. Nach dem Verdau aus einem Vektor wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Verwendung eines DNA-Extraktionskits (MACHEREY-NAGEL, Düren) aus dem Gel eluiert. Danach wurden die Restriktionsfragmente mittels T4-Ligase in die entsprechenden linearisierten Vektoren in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1 gemischt mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 18°C oder 2 h bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von $10 \mu\text{l}$ ligiert. Für die Ligation der DNA-Fragmente in die pASK-IBA Vektoren wurde ein Ansatz verwendet, bei dem ein Restriktionsverdau und eine Ligation gleichzeitig ablaufen. Grund hierfür sind die verwendeten Restriktionsenzyme der Klasse II, welche verhindern, daß ein erfolgreich kloniertes Fragment nicht mehr aus dem Vektor geschnitten werden kann. Zuerst wurde der pASK-IBA Vektor für 1 – 2 h bei 37°C mit dem entsprechenden Enzym verdaut. Anschließend erfolgte ein weiterer Verdau des Vektors zusammen mit dem zu ligierenden Fragment in einem Verhältnis von 1:5 für 2–3 h bei 37°C . Zu diesem Restriktionsgemisch sollte dann durch Zugabe von $2 \mu\text{l}$ ATP und 1 U T4-DNA-Ligase die gleichzeitige Ligation in den Vektor erfolgen. Bei Verwendung

der TOPO-Vektoren von Invitrogen übernimmt die kovalent an die Vektorenden gebundene Topoisomerase I die Funktion der Ligase. Die Ligation wurde in diesem Fall gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Ligation von PCR-Fragmenten, welche durch die PfuTurbo[®] DNA Polymerase von Clontech amplifiziert wurde, erfolgte in den Vektor pJET mittels des CloneJET[™] PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), da diese Polymerase keine Poly-A Überhänge synthetisiert.

2.2.11 Transformation in *E. coli*

Vom Ligationsansatz wurden schließlich zu 50 µl kompetenten *E. coli* Zellen TOP10 (INVITROGEN, Karlsruhe) gegeben. Für die Transformation wurde der Transformationsansatz erst 20 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgte ein Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad für 45 s. Die *E. coli* Zellen wurden nun 2 min auf Eis wieder abgekühlt, 200 µl LB-Medium hinzugegeben und dann für mindestens 1 h bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten, mit entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.12 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzanalyse von PCR-Fragmenten oder Plasmiden konnte mit Hilfe der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) und GATC (Konstanz) durchgeführt werden. Die DNA-Proben wurden entsprechend der Firmen auf die gewünschte Konzentration in einem vorgegebenen Volumen eingestellt. Ebenso wurde mit den Sequenzierprimern vorgegangen.

2.2.13 DNA/Protein-Sequenzanalyse

Die Sequenzrohdaten konnten von den Firmen Eurofins MWG (Ebersberg) und GATC (Konstanz) direkt heruntergeladen werden und anschließend mit der Software Bioedit (Ibis Biosciences, Carlsbad) oder „Editseq“ (DNASTAR Inc.) analysiert, editiert, in Proteinsequenzen übersetzt und mit anderen Sequenzen abgeglichen werden. Zum Abgleichen mit anderen Sequenzen eignete sich auch die Internetsoftware Multalign¹. Zum Lokalisieren der DNA-Sequenzen in Genomdatenbanken von Mais wurden Internetseiten verwendet^{2,3,4,5}.

¹<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI - National Centre for Biotechnology Information)

³<http://www.maizesequence.org/index.html> (maizesequence)

⁴<http://www.tigr.org/> (TIGR)

⁵<http://www.plantgdb.org/> (PlantGDB)

2.2.14 Phylogenetische Analysen:

Sequenzanalysen wurden mit DNASTar (Lasergene) durchgeführt. Die Nukleotidsubstitutionsraten wurden nach der Methode von Nei & Gojobori [1986] in dem Programm Syn-SCAN⁶ bestimmt. Für die Dendrogrammanalysen wurden die ORFs mit DNASTar unter der Verwendung des ClustalW Algorithmus gegeneinander abgeglichen. Mit dem Softwarepaket TREECON 1.3b (Van de Peer & De Wachter [1994]) konnten mittels „Neighbor-joinin“-Algorithmus die Dendrogramme erstellt werden.

2.3 Chromatographische Analysen

2.3.1 Isolierung volatiler Stoffe aus Pflanzenmaterial

Um Unterschiede in der Terpenproduktion zwischen den 26 verwendeten Inzuchtlinien zu identifizieren, wurden Blätter von unbehandelten Pflanzen als auch induzierter Pflanzen in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert. Für die Isolation volatiler Terpene wurden davon ca. 100 mg bzw. 3-4 Spatelspitzen eingesetzt und in entsprechende 1 ml Glasröhrchen (DuPont, Wilmington, USA) gefüllt, welche mit einem Polypropylendeckel verschlossen wurden. Zur Isolierung der Terpene aus der Gasphase platzierte man eine SPME-Faser (PDMS-100, Polydimethylsiloxan, Sulpeco, Bellafonte, USA) durch das Septum des Deckels, so dass sie sich in der Gasphase des Glasröhrchens für 45 min und 42 °C befand.

2.3.2 Chromatographische Analyse von Volatilen aus Mais mittels GC-MS/GC-FID

Die chromatographische Trennung und Analyse von volatilen Stoffen erfolgte mit dem Shimadzu Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Duisburg) und einem daran gekoppelten Massenspektrometer (GCMS-QP 2010 Plus, Shimadzu). Für die Injektionstemperatur wurden 220 °C gewählt und als Trägergas kam Wasserstoff mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ zum Einsatz. Um die volatilen Terpene aufzutrennen, wurde eine EC5-MS Säule (30 m Länge; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke; Grace Deerfeld, IL, USA) unter folgenden Bedingungen genutzt: 80 °C für 2 min, erster Anstieg mit 7 °C min⁻¹ auf 200 °C, zweiter Anstieg mit 100 °C min⁻¹ auf 300 °C (2 min konstant halten). Das Massenspektrometer kam unter folgenden Einstellungen zum Einsatz: Transferline-Temperatur: 250 °C, Ionenquelle: 200 °C, Ionisierungspotential: 70 V und ein Scan-Bereich von 46-350 Atommasseeinheiten. Anschließend

⁶<http://hivdb.stanford.edu/pages/synscan.html>

wurden die Daten in der Shimadzu Software „GCMS Postrun“ analysiert mit Hilfe der Bibliotheken „Wiley 8“ (Hewlett–Packard) und „Shim2205“ (Schimadzu). Die Quantifizierung von Terpenen wurde durch die Kopplung der GC an ein Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Das Trennen der Substanzen erfolgte wie oben beschrieben und anschließend wurden diese über den FID (Detektortemperatur: 250 °C) analysiert.

2.3.3 Messung des Pflanzenhormons Jasmonsäure

Zur Isolierung von Pflanzenhormonen wurden ca. 100 mg Blattmaterial mit Methanol versetzt, welches 40 ng 9,10-D2-9,10-Dihydrojasmonsäure, D4-Salizylsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA), 8 ng Jasmonsäure-¹³C₆-Isoleucinkonjugat und 40 ng D6-Abszissinsäure (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) als interne Standards enthielt. Anschließend wurden die Extrakte auf einer HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) gekoppelt an einem API 3200 Tandemmassenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit der TSI (TurboSpray-Ionisation) Ionisationsmethode analysiert. Die Auftrennung erfolgte mit einem Gradienten von Ameisensäure (0,05 %) in Wasser und Acetonitril auf einer Zorbax Eclipse XDB-C18 Säule (60 x 4,6 mm, 1,8 µm, Agilent). Der Massenspektrometer wurde im negativen Ionenmodus im MRM („Multiple Reactions Monitoring“) Mode betrieben. Die Daten wurden mit der Software Analyst 1.5 (Applied Biosystems) generiert und verarbeitet. Die Hormone konnten schließlich relativ zum internen Standard quantifiziert werden.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von Terpensynthasen in *E. coli*

Da zur Synthese rekombinanter Proteine die Leserahmen der putativen Terpensynthasen und Prenyltransferasen in die pASK-IBA-Vektoren (IBAGmbH, Göttingen, Deutschland) kloniert wurden, erfolgte die Expression in dem *E. coli* Stamm TOP10. Dafür wurden für jedes Konstrukt 100 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Klons angeimpft. Die Kulturen wurden so lange geschüttelt bei 37 °C, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 zu vermessen war. Die Vektoren der IBA-GmbH besitzen Tetracyclin-Promotoren und konnten somit durch Zufügen von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 200 µg l⁻¹) induziert werden. Für die Proteinexpression wurden die Kulturen anschließend für ca. 18–22 h bei 18 °C geschüttelt. Ein Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 x g, 4 °C) folgte mit anschließendem Resuspendieren der

Pellets in 3 ml kaltem Extraktionspuffer (50 mM MOPSO, 10 % Glycerol, 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM DTT, 5 mM Natriumascorbat, 0,5 mM PMSF, pH 7,0). Zum Zellaufschluss wurden die Extrakte jeweils 3 x 30 s mit Ultraschall (Bandelin UW2070, Berlin, Deutschland) behandelt. Das Entfernen der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugieren (14000 g). Der Überstand wurde zusammen mit 1 ml Ni-NTA Agarose (Profinity IMAC Ni-Charged Resin, BioRAD, München, Deutschland) in einem Becherglas bei 10 °C und 70 min⁻¹ leicht geschüttelt, damit die Fusionsproteine mit dem His-tag an die Nickelteilchen binden konnten. Nach 1 h Inkubation, wurde der Ansatz vorsichtig auf eine 0,8 x 4 cm Polyprep Chromatographiesäule (BioRAD, München, Deutschland) transferiert. Die folgenden Aufreinigungsschritte unter nativen Bedingungen wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt und anschließend durch Erhöhen der Imidazolkonzentration (siehe Hersteller) eluiert.

2.4.2 Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpen- und Isoprenoidsynthasen

Für die Enzymassays der Terpensynthasen wurden 38 µl aufgereinigtes Proteinextrakt und 62 µl Reaktionsgemisch [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % Glycerol; 1 mM DTT; 60 µM GPP/FPP (Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA); 10 mM MgCl₂. Die Aktivitätsbestimmung mit Geranylinalool als Substrat wurde mit 100 µl Proteinextrakt und 400 µl Reaktionsgemisch [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % Glycerol; 1 mM DTT; 60 µM GGPP (Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA); 10 mM MgCl₂. Die Reaktionsprodukte konnten mit Hilfe einer SPME-Faser (PDMS-100, Polydimethylsiloxan, Supelco, Bellafonte, USA), welche für 45 min bei 42 °C über dem Reaktionsansatz platziert wurde, aus der Gasphase isoliert werden. Die anschließende Auftrennung und Analyse der Produkte erfolgte wie unter Absatz 2.3.2 beschrieben. Für die Assays der Prenyltransferasen wurden ebenfalls 38 µl aufgereinigtes Proteinextrakt mit 62 µl Reaktionsgemisch [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % [v/v] Glycerol; 1 mM DTT; 60 µM IPP und 30 µM DMAPP (Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA); 10 mM MgCl₂ versetzt und 45 min bei 42 °C inkubiert. Es wurde gleichermaßen vorgegangen wie zuvor bei den Terpensynthase-Assay beschrieben.

2.4.3 Heterologe Expression von P450s in Hefe und Isolation von Mikrosomen

Zum Klonieren der Leserahmen von P450 Enzymen, wurde der pESC-Leu2d Vektor (Ro *et al.* [2008]) verwendet, um die nachfolgenden Expressionsschritte in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durchführen zu können. Dabei wurden zwei unterschiedliche

Hefestämme, WAT11 und W[®] (Denis Pompon & Waterman [1996]), genutzt, welche eine P450 Reduktase von *Arabidopsis thaliana* bzw. Hefe überexprimieren, um einen guten Elektronentransfer während der Katalyse zu ermöglichen. Die chemische Transformation wurde durchgeführt wie bereits publiziert (Daniel Gietz & Woods [2002]). Eine Übernachtskultur der entsprechenden Klone in 307 ml SC Minimalmedium [(ohne Leucine) 6,7 g Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfate) (Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim, Deutschland); 100 mg l⁻¹ der Aminosäuren Adenine, Arginine, Cysteine, Lysine, Threonine, Tryptophan, Uracil; 50 mg der Aminosäuren Asparaginsäure, Histidine, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Proline, Serin, Tyrosin, Valin; 20 g D-glucose] wurde über Nacht angezogen bei 28 °C und 160 min⁻¹. Am nächsten Tag wurden 100 ml YPGA Medium [10 g Hefeextrakt, 10 g Bactopeptone (BD, Le Pont de Claix, France), 74 mg Adenin Hemisulfat, 20 g D-glucose] mit 2 Teilen einer Übernachtskultur von einer OD₆₀₀ = 0,5 inokuliert und für bei 28 °C und 160 min⁻¹ geschüttelt. Nachdem eine OD₆₀₀ = 0,7-0,9 erreicht wurde, folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 5000 x g mit anschließendem Resuspendieren in 100 ml YPGA Medium (10 g Hefeextrakt, 10 g Bactopeptone, 74 mg Adenin Hemisulfat, 20 g D-galactose). Zum Isolieren der Mikrosomen, wurde die Kultur für weitere bei 160 min⁻¹, 25 °C geschüttelt, zentrifugiert (10 min, 7500 x g, 4 °C) und in 307 ml TEK Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM KCL) resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt (10 min, 7500 x g, 4 °C) wurde wiederholt und das Pellet in 1 ml TES Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 600 mM Sorbitol, 10 g Bovine Serum Albumin und 1,5 mM β-Mercaptoethanol) gelöst. Die Suspension wurde vollständig in ein 50 ml Falcon transferiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Glaskugeln (0,45 – 0,5 mm Durchmesser, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Suspension und anschließendem Schütteln (5 x für 1 min, 1 min Pause). Das Trennen der Mikrosomen von den Glaskügelchen erreichte man durch Zugabe von 5 ml TES Puffer zum Rohextrakt, leichtes Schwenken und Abnahme der Suspension in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß, welches mit dreimaliger Wiederholung durchgeführt wurde bis zu einem Endvolumen von 22 ml. Dabei ist es vorteilhaft mit der Pipettenspitze bis zum Boden des Falcon-Reaktionsgefäßes zu gehen und die Suspension aufzuziehen. Um größere Zellfragmente von den Mikrosomen zu trennen, wurde die Suspension bei 7500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Mikrosomen konnte man anschließend vorsichtig abnehmen für einen weiteres Zentrifugieren in einer Ultrazentrifuge (100000 x g, 60 min, 4 °C). Das Pellet mit den mikrosomalen Proteinen wurde 1 x mit 5 ml TES Puffer gewaschen und anschließend mit 2,5 ml TEG Puffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 30 % glycerol [w/v]). Für die Homogenisierung des Pellets wurden die Glashomogenisierer (Potter-Elvehjem, Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet und in 1 ml TEG Puffer durch

auf- und abziehen der Potter gelöst.

2.4.4 Aktivitätsbestimmung der P450-Enzyme

Für die Enzymassays wurden in 1 ml Glasröhrchen, S70 Mikrosomenextrakt (0,3 – 3 µg Protein) und 230 µl Reaktionsgemisch [75 mM Natrium Phosphat Puffer, pH 6,8, und 100 µM Substrat (gelöst in maximal 6 µl DMSO), 1 mM NADPH] pipettiert. Eine SPME-Faser wurde dann für 1 h und 30 °C über der Gasphase platziert, um die volatilen Produkte zu binden. Die Analyse und Auftrennung der Stoffe erfolgte wie unter Absatz 2.3.2 beschrieben.

2.5 Kartierungsanalysen

2.5.1 „Nested Association Mapping“ (NAM)

Das „Nested Association Mapping“ kombiniert zwei Methoden, das Joint Linkage Mapping und die Assoziationskartierung. Für diese Kartierungsstrategie wurden 25 verschiedene Inzuchtlinien (siehe Tab. 2.1.1) mit dem gemeinsamen Elternteil B73 gekreuzt (Yu *et al.* [2007]). Durch mehrmaliges Selbsten der F1-Generation erhielt man eine F6-Generation, welche nahezu homozygot ist. Pro Elternlinie wurden 200 Rekombinante Inbred Lines (RILs) der F6-Generation ausgesät. Dazu kamen >200 Linien der gemeinsamen Elternlinie B73 und jeweils mehrere Samen der 25 Elternlinien. Die gesamte Kartierungspopulation von 5981 Sämlingen wurde im Mai/Juni 2007 während eines „public growout“ auf einem Feld nahe der Cornell University, NY, USA angebaut. Von jeder RIL wurde im Alter von 10-16 Tagen ein Blatt geerntet und mit dem Elicitor (2,3 µM Ethyl-Indanon in Leitungswasser) für 18 h im Licht induziert. Die insgesamt 5981 Sämlinge wurden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen induziert (Tag 1: 500 Sämlinge, Tag 2: 1000 Sämlinge, Tag 3: 1000 Sämlinge, Tag 4: 1000 Sämlinge, Tag 5: 1000 Sämlinge, Tag 6: 1000 Sämlinge, Tag 7: ~ 500 Sämlinge). Anschließend wurden alle Proben wie unter Abschnitt 2.3.1 und Abschnitt 2.3.2. behandelt, d. h. alle volatilen Stoffe wurden aus dem Pflanzenmaterial isoliert und mit GC-MS analysiert. Meine Doktorarbeit begann mit der Analyse der Rohdaten der GC-Messungen.

2.5.2 Box–Cox–Transformation zur Normalverteilung

Um Kartierungsanalysen mit den quantitativ vermessenen GC-MS Daten der NAM-Population durchführen zu können, musste geprüft werden, ob die Daten normal verteilt sind. Für die Merkmale, deren Messwerte keiner Normalverteilung entsprachen,

wurde die Box–Cox–Transformation angewendet, um die bestmögliche Transformation zu ermitteln, die zur Herstellung einer Normalverteilung notwendig ist. Dabei wurde folgende Formel angewendet:

$$Y^\lambda = \begin{cases} \frac{(Y_t+c)^\lambda-1}{\lambda} & (\text{für } \lambda \neq 0) \\ \ln(Y_t + c) & (\text{für } \lambda = 0) \end{cases}$$

2.5.3 Joint Linkage QTL Mapping

Die NAM-Strategie, welche zwei unterschiedliche Kartierungsmethoden kombiniert, beginnt mit dem Linkage Mapping. Dafür wurde mit der Software SAS 9.2 (SAS Institute GmbH, Heidelberg, Deutschland) gearbeitet. Zuerst wurden die Rohdaten in das Programm geladen. Zu den Rohdaten gehören die CPS-Marker („Common Parent Specific“), die Messdaten der einzelnen Terpene der 25 Elternlinien und des gemeinsamen Elters B73. Das Markerset, bestehend aus 1106 CPS-Markern, wurde sowohl in den 26 Elternlinien, als auch in den RILs sequenziert und genotypisiert. Da diese Marker über das gesamte Genom verteilt sind, liegen diese mit ca. 2,5 Mb Abstand voneinander entfernt. Da das Maisgenom ca. 2,3 Milliarden bp und 32000 Gene enthält, würden ca. 35,5 Gene zwischen zwei Markern liegen. Im zweiten Schritt wurden die Rohdaten bearbeitet. Das heißt die mit der Box–Cox–Transformation berechnete Transformation⁷ wurde für das jeweilige Merkmal angewendet. Des Weiteren wurden die Tabellen aus den Daten mit Hilfe von SQL (Structured Query Language) Befehlen⁸ abgefragt und so für die Kalkulationen formatiert. Im dritten Schritt konnten die Felddaten mit einbezogen werden. B73 diente dabei als Kontrolle, um unterschiedliche Bedingungen in den einzelnen Feldern ermitteln zu können. Dafür wurden die RIL–Pflanzen und die Elternlinien in einzelnen Blocks ausgesät, mit B73–Pflanzen dazwischen, wie folgt dargestellt:

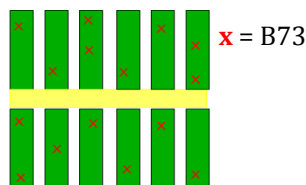


Abbildung 2.2 Feldaufsicht mit der ausgesäten Kartierungspopulation von 5981 Sämlingen im Mai/Juni 2007 während eines „public growout“ auf einem Feld nahe der Cornell University, NY, USA.

Im 4. Schritt wurde die Berechnung von QTLs durchgeführt unter Verwendung der Prozedur [PROC GLMSELECT].

⁷Alex Lipka, Cornell University

⁸Zhiwu Zhang, Cornell University

2.5.4 „Genome Wide Association Study“ (GWAS)

Um die Chromosomenbereiche der berechneten QTLs weiter einzugrenzen, wurde eine Assoziationskartierung, die „Genome Wide Association Study“ (GWAS), angewendet. Bei der Assoziationskartierung werden SNPs identifiziert, welche mit dem zu untersuchenden Merkmal in der Population assoziiert sind. Der Markersatz für das GWAS besitzt mit 1,6 Mill SNPs eine viel höhere Markerdichte, die über das gesamte Maisgenom verteilt sind. Damit kann man den Chromosomenbereich bis auf ~ 10 kb eingrenzen, womit es in manchen Regionen des Genoms möglich sein sollte, einzelne Gene zu kartieren. Der Unterschied dieser Marker zu den 1106 NAM-Markern liegt darin, dass diese nur für die 26 Elternlinien genotypisiert worden sind und nicht zusätzlich für die > 5000 RILs. Jedoch konnten die 1,6 Mill SNPs auf die segregierenden RILs projiziert werden, mit Hilfe der in diesen Linien sequenzierten NAM-Marker. Solange zwei angrenzende Marker entweder B73 oder Nicht-B73 entsprechen, ist die Projektion der SNPs der Elternlinien auf die RILs eindeutig, unter der Annahme, dass keine Doppelrekombination stattgefunden hat. Wenn allerdings ein B73-Marker an einen Nicht-B73-Marker grenzt, muss die Projizierung zwischen diesen Intervallen geschätzt werden. Nach folgender Formel wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass der SNP nicht dem B73-Elter entspricht:

$$P(\text{SNP ist nicht B73}) = \frac{\text{Abstand SNP vom B73-Marker}}{\text{Abstand zwischen zwei Markern}}$$

Für P können nur Werte zwischen 0 und 1 berechnet werden. In einer nachfolgenden Berechnung werden die CPS-Markerwerte mit einbezogen, welche zwischen 0 und 2 liegen. Dabei sind B73-Marker mit einer Null nomenklatiert, während Nicht-B73-Marker mit einer 2 beschriftet wurden. Mit folgender Formel kann schließlich die SNP-Position errechnet werden:

$$\text{Wert(SNP)} = \text{linker Markerwert} \cdot (1-P) + \text{rechter Markerwert} \cdot P$$

Die Berechnung des SNP-Wertes ergibt Werte < 2 . Die Abbildung 1.12 verdeutlicht diese Interpolation der SNPs. SNP-Werte < 1 , deuten auf SNPs hin, welche sich zwischen einem heterozygoten und einem B73-Marker befinden. SNP-Werte > 1 bedeuten, dass der SNP zwischen einem heterozygoten und einem Nicht-B73-Marker liegt. Die Interpolation beim „GWAS“ und die Wahrscheinlichkeit eines SNPs mit einem Phänotyp assoziiert zu sein, wird für jedes Chromosom einzeln und in 100-facher Wiederholung mit `[java-Xmx1024M -cp]` schrittweise berechnet. Der SNP-Marker, welcher am häufigsten berechnet wurde, ist derjenige mit der höchsten Signifikanz.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der NAM–Linien und NAM–RILs

3.1.1 Phänotypisierung der 26 NAM–Inzuchtlinien auf Terpenemission

Die Kalkulation von QTLs, welche mit Elementen der Terpenbiosynthese assoziiert sind, erforderte eine Phänotypisierung der NAM–Inzuchtlinien sowie der NAM–Population. In Vorbereitung für die Berechnung und Analyse von QTLs mittels „Nested Association Mapping“ wurden sowohl die 26 Elternlinien als auch die >5000 RILs aus den Kreuzungen dieser Elternlinien mit dem gemeinsamen Elter B73 auf Terpenemission phänotypisiert. Dafür wurden alle Pflanzen im Sommer 2007 auf einem Versuchsfeld in der Nähe von Ithaca (New York, USA) ausgesät¹. Anschließend wurden die 2–wöchigen Keimlinge an 7 aufeinanderfolgenden Tagen induziert, da es arbeitstechnisch an weniger Tagen nicht umsetzbar war. Die Induktion erfolgte indem man am Tag 1 und 7 jeweils 500 Keimlinge mit einem Indanon–Derivat induzierte. An den Tagen 2–6 wurde die doppelte Anzahl an Keimlingen induziert. Das Indanon–Derivat imitiert die Funktion von Coronantin (JA) (Weiler *et al.* [1994]). Die Verwendung eines Elicitors an Stelle von *Diabrotica* Larven vereinfachte die Induktion einer großen Anzahl von Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf die Abgabe von Herbivor–induzierten volatilen Terpenen untersucht. Das Extrahieren der Pflanzeninhaltsstoffe erfolgte mittels Hexan-Extraktion, da diese Methode eine quantitative Analyse der unterschiedlichen Terpene ermöglichte. Die Proben wurden schließlich gaschromatographisch mit GC–MS analysiert und quantifiziert. Das Terpenspektrum des Kultivars B73 wurde bereits untersucht (Turlings & Benrey [1998]), währenddessen die Terpenspektren der anderen 25 NAM–Linien noch nicht bekannt waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die 6000 GC–MS Chromatogramme ausgewertet und eine Übersicht über die Terpengehalte der NAM–Linien sowie der RILs geschaffen (Abb. 3.1). Für die Analyse der RILs wurden ausschließlich die F6 Generationen verwendet. Diese entstanden aus wiederholten Selbstungen der F1–Hybriden, welche aus Kreuzungen der jeweiligen Inzuchtlinien mit B73 entstammen. Die Auswertungen zeigten, dass (*E*)- β -Farnesen das anteilig am meisten und mit den höchsten Konzentrationen vorkommende Terpen dieser 26 Inzuchtlinien ist. Auch wurde (*E*)- α -Bergamoten, welches genau wie

¹Prof. Dr. J. Degenhardt

(*E*)- β -Farnesen von TPS10 (Schnee *et al.* [2006]) produziert wird, vom Großteil der NAM-Linien in hohen Mengen gebildet (Abb. 3.1). Andere Terpene wie Linalool, DMNT und (*E*)- β -Caryophyllen konnten nur in geringen Mengen nachgewiesen werden und kamen in ca. der Hälfte der Inzuchtlinien vor. (*E*)-Nerolidol und TMTT wurden in fast allen Linien in gut detektierbaren Mengen gemessen. Die Linie B97 fällt durch eine besonders hohe Akkumulation an Terpenen auf, gefolgt von Tx303 und IL14H. Andere Linien wiederum sind charakteristisch für eine sehr geringe Terpenakkumulation, wie Ky21, CML247 und NC350. In den nachfolgenden Kapiteln erfolgt eine Analyse der verschiedenen Terpenklassen innerhalb der Eltern und der NAM-Population. Dabei wurden die Mono-, Sesqui- und Homoterpene ausgewertet. Die Auswertung von Diterpenen wurde nicht durchgeführt, da diese begrenzt wasser-dampfflüchtig sind und durch die Messungen mit der GC-MS nicht ausreichend erfasst werden konnten.

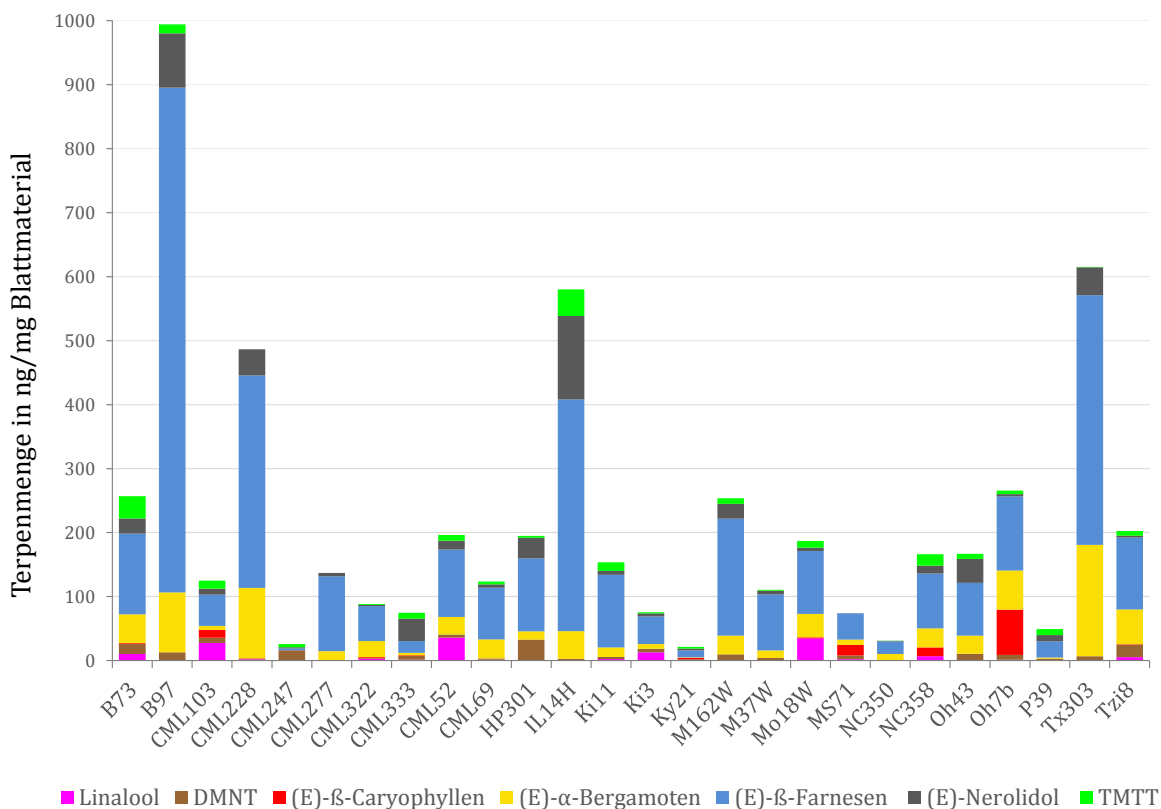


Abbildung 3.1 Terpenakkumulation in ng mg^{-1} Blattmaterial 14 Tage alter Keimlinge der 26 Elternlinien nach Induktion mit einem Indanon-Derivat. Die Terpenisolation erfolgte mittels Hexanextraktion. Die zu analysierenden Terpenmerkmale Linalool, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Caryophyllen, DMNT und TMTT wurden mittels GC-MS analysiert und quantifiziert. Anhand der Retentionszeiten und Massenpeaks von Standardsubstanzen konnten die Terpene identifiziert werden.

3.1.2 Monoterpenakkumulation der Elternlinien und der NAM-Population

Das einzige Monoterpen, das in B73 und den anderen Inzuchtlinien detektiert werden konnte ist Linalool (Abb. 3.2; Abb. 3.1). Dabei weist B73 mit einer Akkumulationsmenge von ~ 10 ng/mg Blattmaterial relativ wenig dieses Monoterpens auf. Eine Inzuchtlinie, welcher nicht in der Lage war, dieses Monoterpen zu synthetisieren, ist B97 (Abb. 3.2; Abb. 3.1). Ein Teil der RILs aus den Kreuzungen von B97 mit B73 besaßen dagegen die Fähigkeit, Linalool in ähnlich hohen Mengen (~ 9 ng/mg) wie B73 zu produzieren (Abb. 3.1). Von den Elternlinien CML103, Mo18W und CML52, welche die höchste Menge an Linalool aufwiesen, zeigten auch die RILs eine höhere Produktion an Linalool als B73. In den anderen NAM-Linien (siehe Anhang, Kapitel 5.5) wurde nur sehr wenig bis kein Linalool detektiert, während wiederum rund 20-40 % der Nachkommen aus den Kreuzungen dieser Eltern mit B73 in der Lage waren, das Monoterpen genau wie die Linie B97 (Abb. 3.2) zu produzieren. Die Menge an Linalool dieser F6-Generationen war ähnlich hoch wie die von B73.

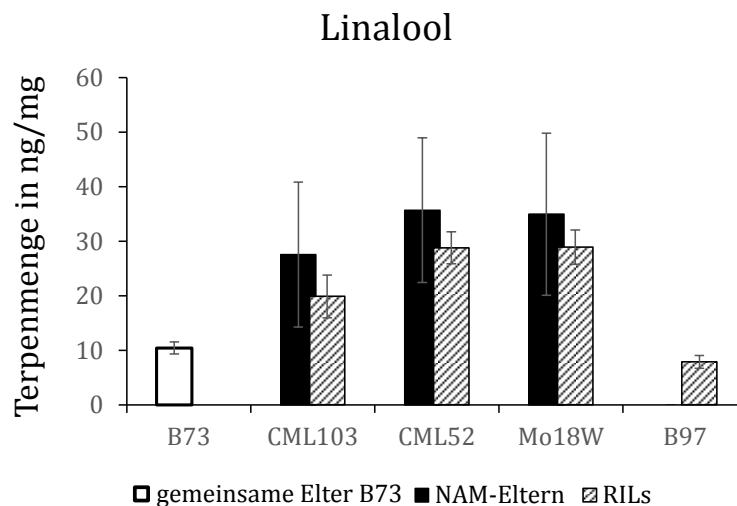


Abbildung 3.2 Linaloolgehalt in ng mg^{-1} Blattmaterial 14 Tage alter Keimlinge der Elternlinien und der NAM-Population nach Induktion mit einem Indanon-Derivat. Die Hexanextrakte der Elternlinien und der RILs wurden mittels GC-MS quantifiziert. Der weiße Balken zeigt den Linaloolgehalt der gemeinsamen Elternlinie B73. Die schwarzen Balken stellen Mengen vier weiterer Inzuchtlinien dar und die gemusterten Balken die der entsprechenden RILs. Von B73 wurden insgesamt 211 Pflanzen, von den Eltern jeweils 9 und von den RILS jeweils 200 Pflanzen vermessen und jeweils die Mittelwerte gebildet.

3.1.3 Sesquiterpenakkumulation der Elternlinien und NAM-Population

Zu der Gruppe der Sesquiterpene gehören (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Caryophyllen. Die Linie B73 war in der Lage alle diese

Terpene zu produzieren, wobei (*E*)- β -Caryophyllen in nur sehr geringen Mengen ($1,2 \text{ ng mg}^{-1}$) vorkam. Die anderen Sesquiterpene wurden im Gegensatz dazu in wesentlich höheren Mengen ($23-128 \text{ ng mg}^{-1}$) in B73 gemessen. Die höchste Produktion an (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten zeigte jedoch die Linie B97 (Abb. 3.3; Abb. 3.1; Anhang Kapitel 5.5). Auch die RILs aus den Kreuzungen von B97 mit B73 zeigten eine höhere Akkumulation an (*E*)-Nerolidol als die Linie B73. Im Gegensatz dazu ähnelten die Mengen an (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten der Linie B73, während B97 höhere Mengen aufwies. Die Linie Ky21 ist besonders charakteristisch in ihrem Terpenprofil. Akkumulationen von (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten oder (*E*)- β -Caryophyllen kamen in nur sehr geringen Mengen vor. Die RILs der Elternlinie Ky21 und B73 waren wiederum in der Lage, diese Sesquiterpene in detektierbar hohen Mengen zu produzieren (Abb. 3.3, A-D). Die beiden Sesquiterpene (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten konnten bis auf eine Ausnahme in allen Elternlinien gemessen werden. Die einzige Inzuchtlinie, welche diese beiden Produkte von TPS10 nicht synthetisierte, war CML247 (Abb. 3.1, Abb. 3.3). Deren RILs wiederum waren in der Lage (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten zu synthetisieren (Abb. 3.3). Vergleicht man die Mengenverhältnisse dieser Terpene unter den Eltern, fällt auf, dass jede Elternlinie mehr (*E*)- β -Farnesen als (*E*)- α -Bergamoten produzierte, so wie es bereits in Schnee *et al.* [2006] beschrieben wurde. Das Sesquiterpen (*E*)- β -Caryophyllen konnte in den wenigsten NAM-Linien nachgewiesen werden. Ausschließlich die Eltern MS71, NC358 und Oh7b produzierten messbare Mengen dieses Sesquiterpens. Ky21 zeigte genau wie B73 mit $1,2 \text{ ng ml}^{-1}$ eine sehr geringe Produktion an (*E*)- β -Caryophyllen. Allerdings waren die RILs dieser Linien in der Lage, das Sesquiterpen in relativ hohen Mengen zu akkumulieren (Abb. 5.10, siehe Anhang).

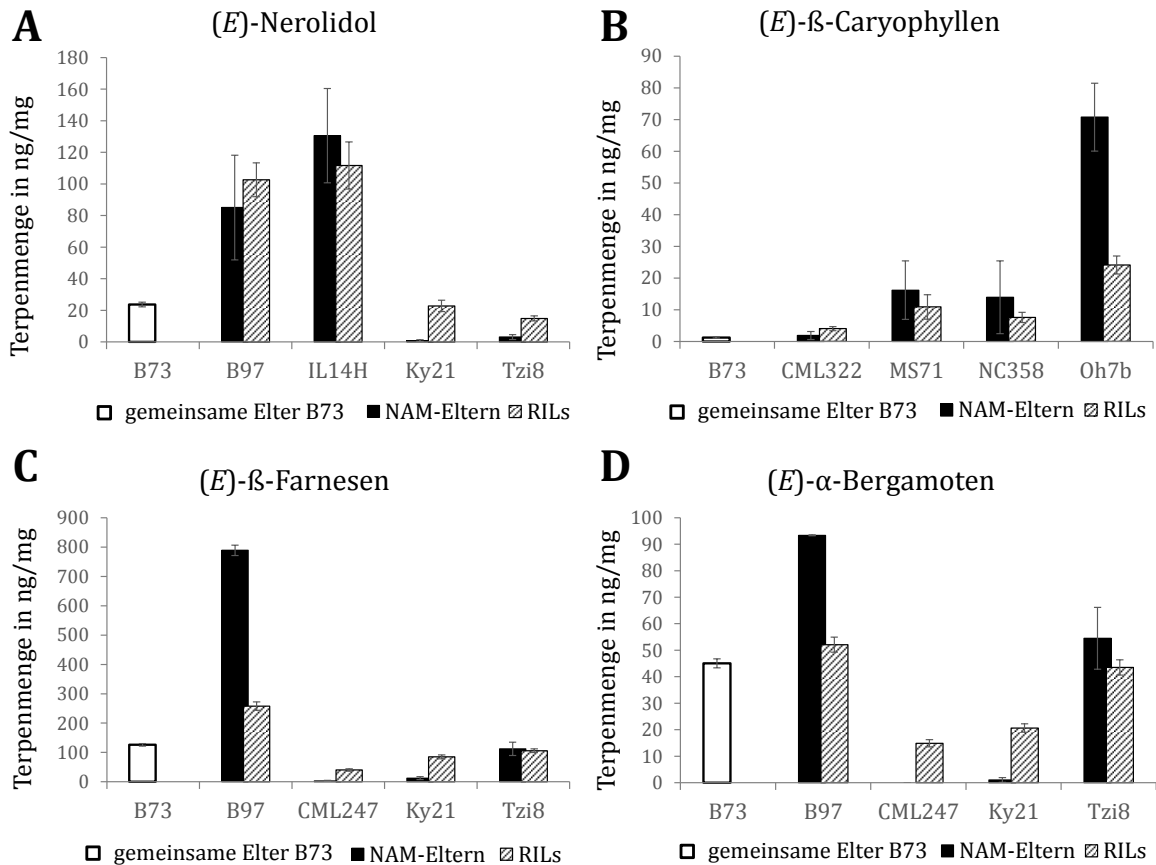


Abbildung 3.3 Akkumulationswerte der Sesquiterpene (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten in ausgewählten NAM-Elternlinien und Populationen von jeweils 200 RILs nach Induktion mit einem Indanon-Derivat in 2 Wochen alten Pflanzen. Die durch Hexanextraktion isolierten Terpene wurden mittels GC-MS quantifiziert. Für jedes Terpen wurde der Mittelwert von dem Elter B73 (weiße Balken) und 4 weiteren Elternlinien (schwarze Balken) gebildet. In den gestreiften Balken dargestellt sind die Mittelwerte der entsprechenden RILs.

3.1.4 Homoterpenemission der Elternlinien und NAM-Population

Die beiden Homoterpene DMNT (C_{11}) und TMTT (C_{16}), welche aus einer irregulären Anzahl von Kohlenstoffatomen bestehen, werden von rund 60 % der Elternlinien produziert. Die höchste Akkumulation an DMNT wurde in der Linie HP301 gemessen, während die höchste Abgabe von TMTT in der Linie IL14H verzeichnet werden konnte (Abb. 3.1). Die Elternlinien, die beide Homoterpene produzierten, akkumulierten TMTT meist in höheren Mengen als DMNT. Eine Ausnahme bilden nur wenige Linien wie z. B. CML247, HP301, Ki3 und Tzi8, die höhere Mengen an DMNT enthielten (Abb. 3.1). CML277 ist eine Elternlinie, die weder DMNT noch TMTT produzierte. Trotzdem haben die RILs aus CML277 und B73 wiederum beide Homoterpene gebildet (Abb. 3.4). Auch Ky21 produzierte keines dieser flüchtigen Terpene. Allerdings

ist diese Linie bereits in den vorigen Abschnitten durch ein geringes Terpenspektrum aufgefallen. Eine Beispiellinie, die nur DMNT produziert, ist Tx303. Ein Gegenbeispiel stellt die Linie NC358 dar, bei der kein DMNT jedoch TMTT gemessen werden konnte. Für beide Linien gilt jedoch gleichermaßen, dass deren RILs höhere Mengen TMTT produzierten, wie es auch schon bei den meisten Inzuchtlinien zu beobachten war.

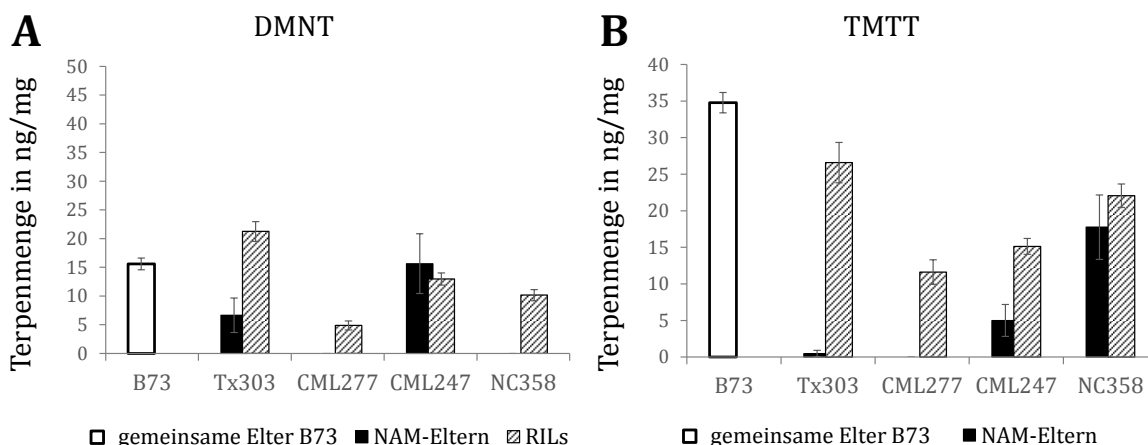


Abbildung 3.4 Akkumulation der beiden Homoterpene DMNT und TMTT in den NAM-Elternlinien und RILs nach Induktion 14 Tage alter Keimlingen mit einem Indanon-Derivat. Dargestellt sind die Mittelwerte der quantifizierten Hexanextrakte. Die schwarzen Balken zeigen die Terpenmittelwerte vier verschiedener Elternlinien (Tx303, CML277, CML247 und NC358). Der weiße Balken entspricht der gemeinsamen Elternlinie B73. In den gestreiften Balken dargestellt sind die Emissionsmittelwerte der entsprechenden RILs.

3.2 Nested Association Mapping (NAM) der Maisvolatilen

3.2.1 Erzeugen einer Normalverteilung der Terpenemissionen

Die Berechnung von QTLs erfordert eine Normalverteilung der Messdaten der einzelnen Terpene. Dafür wurden mit Hilfe von Pivot-Tabellen alle Akkumulationswerte gezählt und in ein Diagramm überführt. Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft die Verteilung der (*E*)- α -Bergamoten-Akkumulation, die keiner Normalverteilung entspricht. Die Diagramme für die anderen Terpene sind analog zu der von (*E*)- α -Bergamoten und zeigen somit ebenfalls keine Normalverteilung (siehe Anhang, Abb. 5.5 - 5.7).

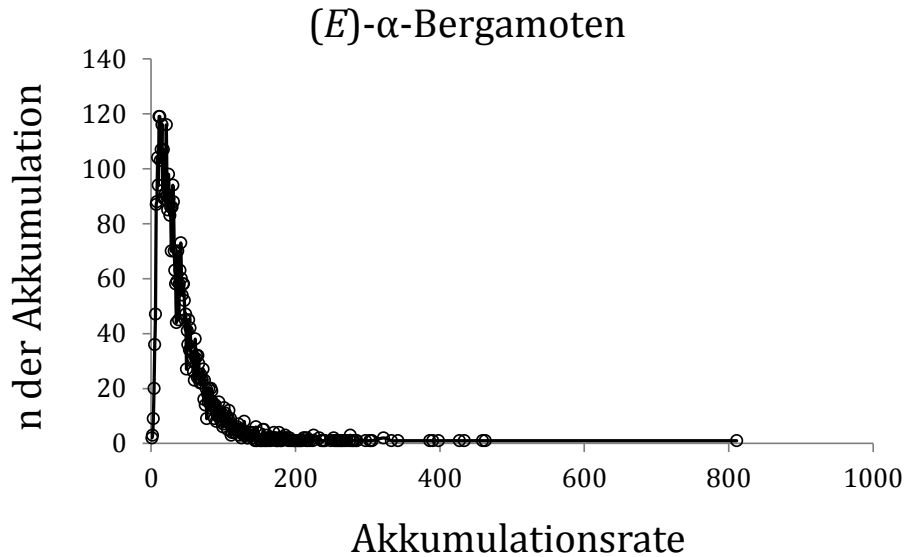


Abbildung 3.5 Verteilung der (E)- α -Bergamoten Akkumulationswerte der NAM-Population nach Induktion mit dem Indanon-Derivat. Mit Hilfe einer Pivot-Tabelle wurde die Anzahl der gemessenen Akkumulationswerte der NAM-Population ermittelt grafisch dargestellt. Die Kurve entspricht keiner Normalverteilung.

Um die Messwerte so zu transformieren, dass sie einer Normalverteilung entsprechen, wurde die Box-Cox-Transformation angewendet². Mit diesem Modell von Box und Cox (Box & Cox [1964]) wurde die geeignetste Transformation für die jeweiligen Terpene ermittelt, ein Exponent, der die Zielgröße normalisiert. Lambda (λ) gibt dabei den Wert an, mit dem die Daten exponentiert werden sollen.

$$Y^\lambda = \begin{cases} \frac{(Y_t+c)^\lambda-1}{\lambda} & (\text{für } \lambda \neq 0) \\ \ln(Y_t + c) & (\text{für } \lambda = 0) \end{cases}$$

Die Box-Cox-Transformation wertete die Ergebnisse von $\lambda = -5$ bis $\lambda = 5$ aus, um jeweils den bestmöglichen Wert zu identifizieren. So ergab sich für die Merkmale Linalool, (E)-Nerolidol, (E)- β -Farnesen, (E)- α -Bergamoten, (E)- β -Caryophyllen, DMNT und TMNT folgende optimale Transformationswerte:

²Alex Lipka, Cornell University

Tabelle 3.1 Lambda–Werte für die jeweiligen Merkmale zur Normalisierung der Messdaten.

Merkmals	Transformation
Linalool	$\hat{(-0,25)}$
(<i>E</i>)-Nerolidol	$\hat{(-0,05)}$
(<i>E</i>)- β -Farnesen	$\hat{0,1}$
(<i>E</i>)- α -Bergamoten	$\hat{0,1}$
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	$\hat{0,1}$
DMNT	$\hat{0,1}$
TMTT	$\hat{(-0,05)}$

Nach Transformation aller Messdaten mit dem entsprechenden Koeffizienten, wurden die normalisierten Werte wiederum mittels Pivot-Tabelle gezählt und in ein Diagramm überführt, um die Normalverteilung zu veranschaulichen. Nach erfolgreicher Transformation war die Normalverteilung anhand einer Gauß'schen Glockenkurve erkennbar, wie im Beispiel für (*E*)- α -Bergamoten dargestellt (Abb. 3.6). Die gleichen Ergebnisse konnten ebenso für die anderen Terpene erreicht werden (siehe Anhang, Abb. 5.5 - 5.7).

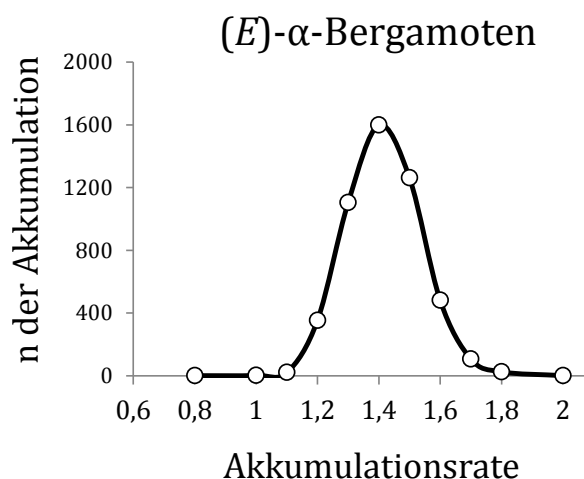


Abbildung 3.6 Verteilung der normalisierten Akkumulationswerte von (*E*)- α -Bergamoten. Mit Hilfe der Box–Cox–Transformation wurde der Exponent $\lambda = 0,1$ ermittelt, welcher am geeignetsten für eine Normalverteilung ist. Nach dem Exponentieren wurden die Werte mittels Pivot-Tabelle gezählt und grafisch dargestellt.

3.2.2 Berechnung von QTLs für die Terpengehalte von Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT, TMTT, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Caryophyllen.

Mit den ermittelten λ -Werten der einzelnen Terpene konnte die Berechnung der QTLs erfolgen. Dies wurde mit Hilfe des Programms SAS 9.2 durchgeführt. Dafür wurde ein Script geschrieben, mit dessen ersten Befehlen die Rohdaten, und die 1106 NAM-Marker eingefügt wurden³. Weitere Befehle normalisierten die Daten, erstellten Tabellen, rechneten die Feldverhältnisse mit ein, wie im Material- und Methodenteil unter Absatz 2.5.3 beschrieben. Für jedes einzelne Merkmal konnten so die signifikantesten Loci der insgesamt 10 Chromosomen berechnet werden, welche eine wichtige Rolle in der Biosynthese der jeweiligen Terpene spielen. Mit dem Script für das SAS Programm sollten nur QTLs mit einer Signifikanz von $<0,00001$ ermittelt werden. Die Berechnung der QTLs erfolgte mittels Assoziationskartierung, wofür 1106 elternspezifischen Marker verwendet wurden. Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, wurden mehrere QTLs für jedes Merkmal berechnet. Jene QTLs welche mit einer farbigen Markierungsfüllung gekennzeichnet wurden, sollten im Rahmen dieser Arbeit weiter analysiert und zum Teil charakterisiert werden. Dazu gehört der QTL₆₀₆, welcher auf dem Chromosom 5 lokalisiert ist (gelbe Markierung) und für (*E*)-Nerolidol, DMNT und Linalool berechnet wurde. Der QTL₆₀₇ für TMTT ist ebenfalls in Gelb dargestellt, da er sehr wahrscheinlich mit dem Locus von QTL₆₀₆ assoziiert ist. Die beiden Sesquiterpene (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten haben einen gemeinsamen QTL auf Chromosom 10 (QTL₁₀₅₆; grüne Markierungsfüllung). Weiter stromaufwärts gelegen, befindet sich der signifikanteste Marker für das Merkmal (*E*)- β -Caryophyllen (QTL₁₀₅₀; rote Markierungsfüllung). Für die Berechnung der QTLs für (*E*)- β -Caryophyllen wurden alle Akkumulationswerte die über 0 ng mg^{-1} und unter 20 ng mg^{-1} Blattmaterial lagen, aus dem Datensatz entnommen. Diese Werte konnten keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob die jeweilige Pflanze in der Lage war, (*E*)- β -Caryophyllen zu produzieren oder nicht. Dieses Vorgehen war für die Assoziationskartierung dieses Terpens entscheidend, da (*E*)- β -Caryophyllen im Gegensatz zu den anderen Merkmalen nur von wenigen Elternlinien und zudem in geringeren Mengen produziert wurde (Abb. 3.1). Auch die Tatsache, dass B73 kein (*E*)- β -Caryophyllen produzierte, hatte zur Folge dass ein wesentlich geringerer Anteil der RILs in der Lage waren, das Terpen zu synthetisieren. Für TMTT konnte der QTL₂₉₈ (blaue Markierungsfüllung) kalkuliert werden, in dessen Nähe sich ein P450 Enzym befindet. Da bereits in *A. thaliana* (Lee *et al.* [2010]) gezeigt wurde, dass eine Monooxygenase für die Biosynthese von

³Zhiwu Zhang

den Homoterpenen TMTT und DMNT in verantwortlich ist, wurde in Mais ein ähnlicher Biosyntheseweg vermutet. Für das zweite Homoterpen DMNT konnte nur mit der Ratio aus den Messdaten von DMNT und (*E*)-Nerolidol ein QTL (QTL₇₆₄; lila Markierung) berechnet werden, welcher ebenfalls in der Nähe einer P450 Monooxygenase liegt. Dieser Locus befindet sich auf dem Chromosom 7. Der QTL₄₀₅ wurde für die Sesquiterpene (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten berechnet und ist auf dem Chromosom 3 lokalisiert. Ein weiterer QTL in dieser Region ist QTL₄₀₆, welcher ebenfalls für ein Sesquiterpen, (*E*)-Nerolidol, kalkuliert wurde. Beide QTLs wurden durch eine graue Markierungsfüllung gekennzeichnet, da sie sehr wahrscheinlich mit dem gleichen Locus assoziiert sind.

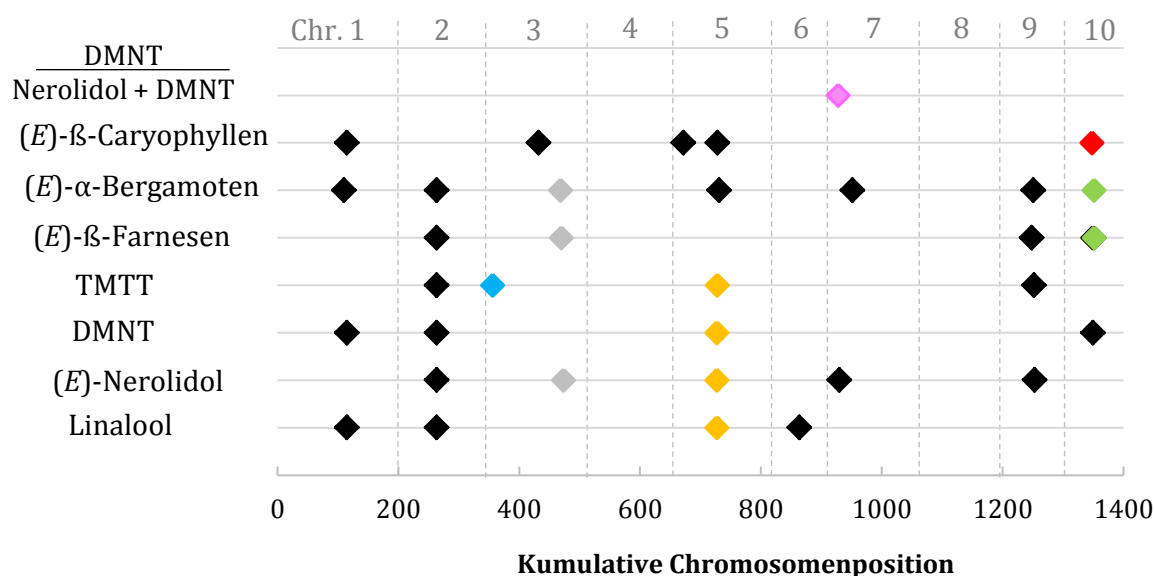


Abbildung 3.7 QTLs der Terpene Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT, TMTT, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Caryophyllen. Es wurden die QTLs der zu untersuchenden Merkmale (*y*-Achse) mittels Assoziationskartierung berechnet. Für die Kalkulationen wurden 1106 elternspezifische Marker verwendet. Die QTLs wurden gegen die kumulative Chromosomenposition (*x*-Achse) aufgetragen. Die gestrichelten Linien markieren jeweils die Grenzen der Chromosomen 1-10, wodurch ersichtlich ist, auf welchem Chromosom die QTLs lokalisiert sind. Die farblich markierten QTLs wurden in den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit genauer analysiert und charakterisiert. QTL₆₀₆/QTL₆₀₇ (gelbe Markierung); QTL₁₀₅₆ (grüne Markierung); QTL₁₀₅₀ (rote Markierung); QTL₂₉₈ (blaue Markierung); QTL₇₆₄ (lila Markierung); QTL₄₀₆ (graue Markierung).

3.2.3 Validierung des Kartierungsexperiments: QTL₁₀₅₀ und QTL₁₀₅₆ liegen in der Nähe von bekannten Terpensynthasen

Die beiden Terpene (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten werden von dem Multiproduktenzym TPS10 synthetisiert (Schnee *et al.* [2006]). Das entsprechende Gen *tps10* befindet sich auf dem Chromosom 10. Da TPS10 für die Emission der zwei Volatile verantwortlich ist, sollte die Kartierung einen QTL an der Position von *tps10* aufzeigen, wenn mindestens eine der NAM-Elternlinien ein inaktives Allel von *tps10* besitzt. Der dem Gen *tps10* am nächsten liegende Marker ist der QTL₁₀₅₆ (NAM-Marker m1056; PHM2770.19; HapMapV1: 72,56 Mb), welcher ebenso auf Chromosom 10 liegt (Abb. 3.8 A, B). Dieser QTL wurde sowohl für (*E*)- β -Farnesen als auch (*E*)- α -Bergamoten errechnet und ist der signifikanteste Lokus ($F_{[(E)-\beta\text{-Farnesen}]} = 40,46$; $F_{[(E)-\alpha\text{-Bergamoten}]} = 24,75$) für beide Merkmale. Die Terpensynthase *tps10* liegt bei 74,3 Mb (HapMapV1) im QTL-Intervall und könnte somit sehr wahrscheinlich das gesuchte Kandidatengen sein. Das Terpensynthasegen *tps23* (Köllner *et al.* [2008a]) wurde als Synthase von (*E*)- β -Caryophyllen identifiziert und eignete sich ebenfalls zum Testen der NAM Methode. Für dieses Merkmal zeigte die Analyse den signifikantesten QTL₁₀₅₀ (NAM-Marker m1050; PZA03491.1) mit einem F-Wert von 11,3. Dieser QTL ist laut der Chromosomenkarte (Maize HapMapV1) auf dem Chromosom 10 bei 45,4 Mb lokalisiert (Abb. 3.8 A, B). Die Terpensynthase *tps23* (Köllner *et al.* [2008a]) befindet sich ebenfalls auf Chromosom 10 bei 41,7 Mb (HapMapV1) und liegt mit einem Abstand von 3,7 Mb im Bereich des QTLs (Abb. 3.8 B). Der Marker (m1050) ist der dem Gen *tps23* am nächsten liegende SNP. Die angrenzenden Marker m1049 (30,8 Mb) und m1051 (61,6 Mb) befinden sich weiter entfernt von dem Terpensynthase-Gen (Abb. 3.8 B), als der errechnete QTL₁₀₅₀. Im Vergleich zu anderen Chromosomenbereichen liegt an diesem Lokus eine sehr geringe Markerdichte von ~ 10 Mb vor (Abb. 3.9), so dass eine genauere Eingrenzung auf das Kandidatengen mit dem QTL-Mapping nicht möglich war. Vergleichsweise besitzen andere Bereiche einen Markerabstand von $\sim 2,5$ Mb. Aus diesem Grund sollte eine Feinkartierung durchgeführt werden, um den quantitativen Lokus weiter einzugrenzen.

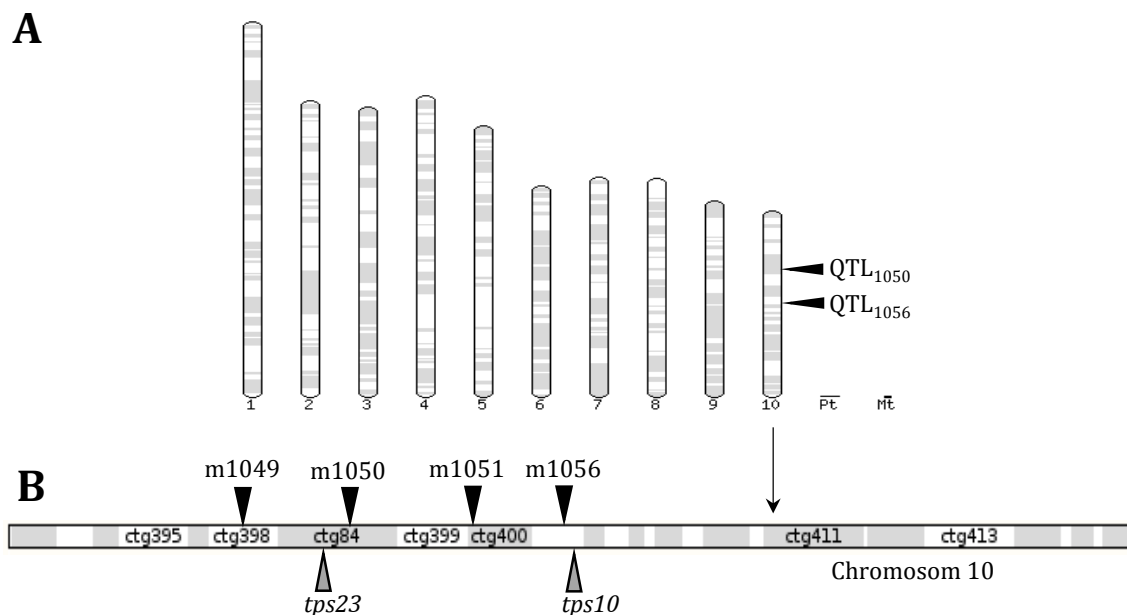


Abbildung 3.8 Lokalisation von QTL₁₀₅₀ und QTL₁₀₅₆ im Maisgenom. Kalkulation der QTLs erfolgte mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnten die Marker auf Chromosom 10 lokalisiert werden (A). Zusätzlich wurden die Positionen von *tps10* und *tps23* mittels BLAST-Suche identifiziert (B).

3.2.4 Validierung des Kartierungsexperiments: Feinkartierung für den QTL₁₀₅₀ des Merkmals (*E*)- β -Caryophyllen

Um den quantitativen Chromosomenbereich weiter eingrenzen zu können, wurde mit der Feinkartierungsmethode „GWAS“, eine Assoziationskartierung durchgeführt. Bei dieser Methode kamen 1,6 Millionen SNPs für die Kalkulationen zum Einsatz. Im Gegensatz zu den 1106 elternspezifischen NAM-Markern (CPS-Marker, engl.: *Common Parent Specific*) sind diese SNPs nur in den Elternlinien genotypisiert und werden mit Hilfe von Wahrscheinlichkeitsrechnungen auf die RILs projiziert (siehe Kapitel 2.5.4). Da der QTL auf dem Chromosom 10 liegt, war es ausreichend, diese Methode allein für dieses Chromosom zu berechnen. Wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, wurden zwei Maxima auf dem Chromosom 10 berechnet, die auf einen quantitativen Lokus deuten. Der erste liegt bei 41,75 Mb und ein weiterer bei 70,3 Mb. Das Kandidatengen das mit dem QTL₁₀₅₀ assoziiert ist, sollte innerhalb des Bereiches von 30,8 - 61,6 Mb liegen, da die Bereiche stromaufwärts und stromabwärts bereits den nächsten CPS-Markern zugeordnet sind. Ausschließlich der erstere Lokus in der Abbildung liegt im Bereich des QTL₁₀₅₀ und ist mit 28 Wiederholungen der signifikanteste SNP (SNP_41758245). Mit steigender Anzahl der Wiederholungen der Berechnungen steigt die Signifikanz

und kann bei 100 Wiederholungen maximal bei 100 liegen. Zwischen dem GWAS Marker SNP_41758245 und *tps23* liegen nur 0,4 Mb. Demzufolge ist der mittels GWAS berechnete SNP wesentlich näher an *tps23* gelegen als der QTL-Marker m1050. Der zweit-signifikanteste SNP auf diesem Chromosom befindet sich zu weit von dem zu analysierenden Bereich entfernt und kann somit für diese Analyse vernachlässigt werden.

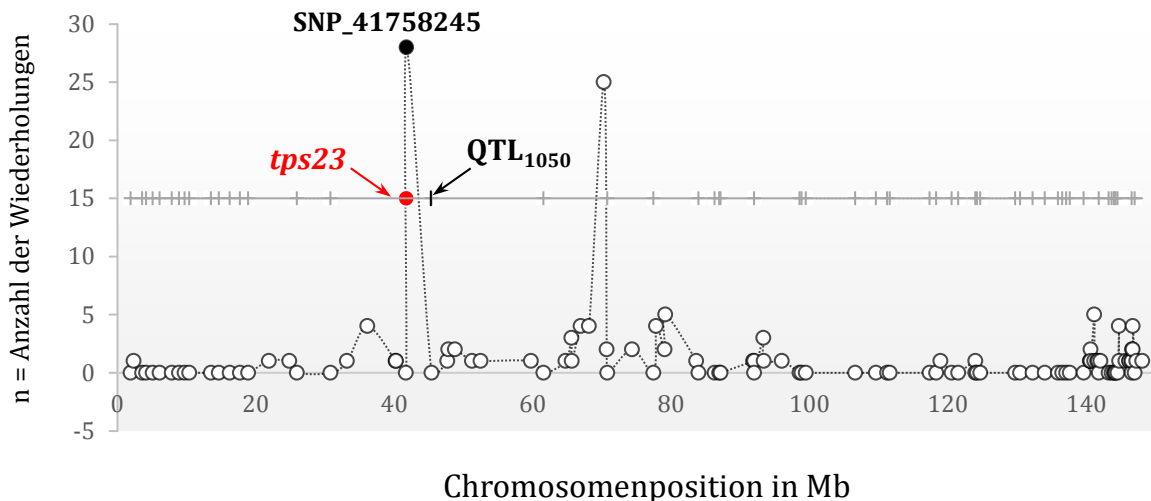


Abbildung 3.9 Feinkartierung für das Merkmal (*E*)- β -Caryophyllen auf dem Chromosom 10 mittels GWAS. Die weißen Markierungen (Kreise) sind die errechneten SNPs, die gegen die Chromosomenposition aufgetragen wurden (x-Achse). Das GWAS wurde mit insgesamt 100 Wiederholungen berechnet und die Signifikanz des jeweiligen SNPs ergibt sich aus der Anzahl seiner Wiederholungen (y-Achse). Bei $n=15$ wurden die NAM Marker (graue Striche) aufgetragen, die für das QTL-Mapping verwendet wurden. In schwarz hervorgehoben ist der QTL-Marker m1050. Der rote Kreis zeigt die Lokalisation von *tps23*. Der signifikanteste SNP_41758245 mit 28 von 100 möglichen Wiederholungen wurde durch einen schwarzen Kreis dargestellt.

3.3 Charakterisierung von ausgewählten QTLs für die Emission von Terpenen

3.3.1 Der QTL_{606/607}

3.3.1.1 Identifizierung der Terpensynthasegene *tps2* und *tps3*

Der gelb dargestellte QTL₆₀₆ (Abb. 3.7; NAM-Marker m606; PZA02525.1; Chromosom 5: 69,39 Mb) wurde für mehrere Terpene wie Linalool, (*E*)-Nerolidol und DMNT gleichermaßen berechnet. Auch für das Merkmal TMTT wurde ein QTL in dieser Region ermittelt. Dieser QTL₆₀₇ (NAM-Marker m607; PZA03677.1; Chromosom 5: 71,09 Mb) für TMTT ist der nächste stromabwärts liegende Marker von QTL₆₀₆. Sehr wahrscheinlich sind beide Marker mit dem gleichen Locus assoziiert. Eine Erklärung für die Berechnung von zwei Markern in dieser Region könnte ein Kandidatengen

sein, welches sich zwischen den beiden Loci befindet. Demzufolge wurde bei der Suche nach einem Kandidatengen der Bereich auf beide Loci erweitert. Zwei putative Terpensynthasegene, *tps2* (70,57 Mb) und *tps3* (70,63 Mb), in der Nähe zu beiden QTLs konnten identifiziert werden (Abb. 3.10 B). Für die Suche wurde auf die frei zugängliche Datenbank von „Maize Sequence“ zurückgegriffen und im Umkreis von ~ 1 Mb um die Loci nach Kandidatengenen gesucht. Zum einen könnten beide oder eines dieser beiden Schlüsselgene mit diesen QTLs assoziiert sein. Es könnte aber auch ein weiteres Gen in der Nähe der Marker mit dem QTL₆₀₆ bzw. QTL₆₀₇ assoziiert sein, welches unter anderem eine regulatorische Funktion besitzt, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Enhancer- oder Supressorelemente. Die putativen Terpensynthasegene *tps2* und *tps3* liegen zwischen den beiden QTLs auf dem Chromosom 6 und sind $\sim 0,06$ Mb voneinander entfernt. Ein Sequenzvergleich von TPS2 (GRMZM2G046615, 581aa) und TPS3 (GRMZM2G064406, 574aa) zeigte, dass beide Gene eine sehr hohe Aminosäureidentität von 92,5% haben (Abb. 3.14). Kein weiteres Gen im Maisgenom weist eine so hohe Ähnlichkeit zu *tps2* oder *tps3* auf. Mit 6 Introns und 7 Exons lassen sich beide Gene in Anlehnung an die von Trapp & Croteau [2001] aufgestellte Klassifikation der Genstrukturen von Terpensynthasen in die Klasse-III der Terpensynthasen einordnen. Zu dieser Klasse gehören die Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen von Angiospermen. Typisch für Terpensynthasen ist das „DDxxD“-Motiv, das auch bei TPS2 und TPS3 zu finden ist. Außerdem besitzen beide Proteine stromaufwärts ein zweites „DDxxD“-Motiv, welches besonders häufig bei multifunktionellen Terpensynthasen vorkommt (Little & Croteau [2002]). Die Position des QTLs ermöglicht keine Aussage darüber, ob entweder *tps2* oder *tps3* für den QTL verantwortlich ist und welches der beiden Terpensynthasegene eine Rolle in der Biosynthese von Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT spielen könnte. Um die Vorteile des Nested Association Mapping zu nutzen, wurde anschließend eine Feinkartierung mit den 1,6 Millionen SNPs durchgeführt, um den Bereich weiter eingrenzen zu können (Abb. 3.11 A).

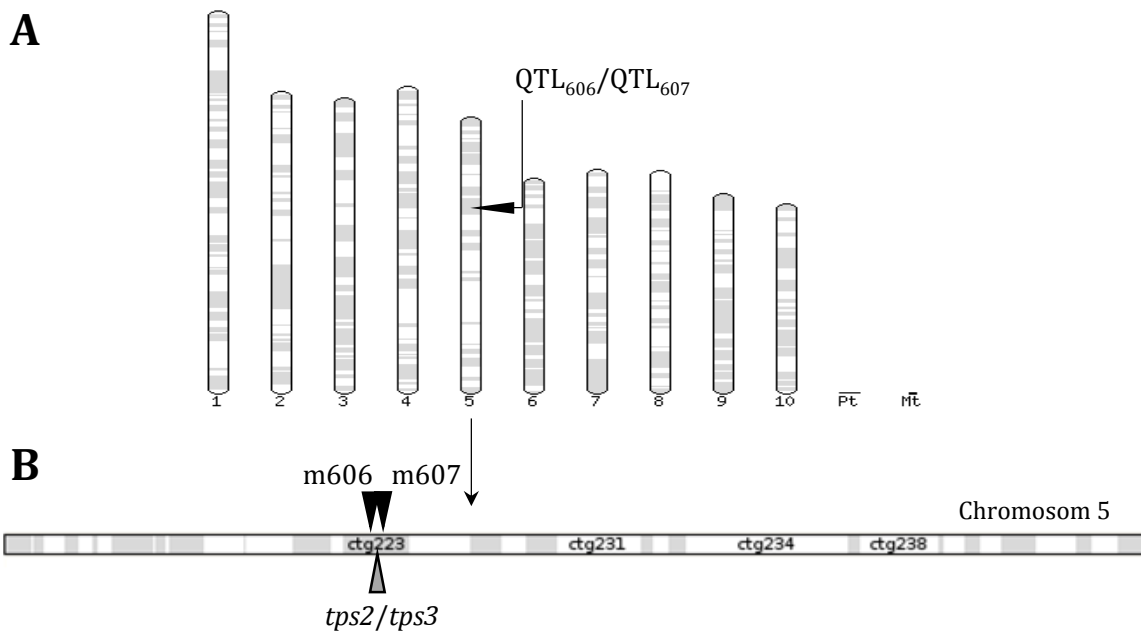


Abbildung 3.10 Lokalisation von QTL_{606} und QTL_{607} im Maisgenom. Kalkulation der für Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT errechneten QTLs erfolgte mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnten die QTL-Marker im Genom lokalisiert werden (A). Zusätzlich wurden die Positionen der QTL-Marker (m606, m607) und der beiden Kandidatengene *tps2* und *tps3* auf dem Chromosom 5 identifiziert (B).

3.3.1.2 Feinkartierung projiziert den QTL_{606} auf einen SNP im Promoter von *tps2*

Eine Feinkartierung wurde für den QTL_{606} auf dem Chromosom 5 durchgeführt, um einen Hinweis zu bekommen ob *tps2* oder *tps3* mit dem Marker m606 assoziiert sein könnte. Nach 100 Wiederholungen der Feinkartierung wurde die Häufigkeit der errechneten SNP-Marker mit Hilfe einer Pivot-Tabelle gezählt (Abb. 3.11 A). Das Ergebnis zeigte, dass drei Marker häufiger vorkamen als die anderen SNPs. Der SNP_70571650 mit 95 Wiederholungen von 100 möglichen weist die höchste Signifikanz auf. Die Marker SNP_141123449 mit 66 Wiederholungen und SNP_154446187 mit 17 Wiederholungen liegen jedoch außerhalb des Bereichs des hier zu analysierenden QTLs. Nach Vergleich der Chromosomenpositionen von *tps2* und *tps3* in Bezug auf den SNP-Marker SNP_70571650, wurde festgestellt, dass sich dieser direkt im Promoter von *tps2* befindet (Abb. 3.11 B). Der SNP wurde nur 160 bp stromaufwärts vom Start-Codon lokalisiert. Der Abstand des Markers zu *tps3* ist mit 64,3 kb wesentlich größer. Ein anderer SNP-Marker, der näher zu *tps3* liegt, konnte mittels GWAS nicht errechnet werden.

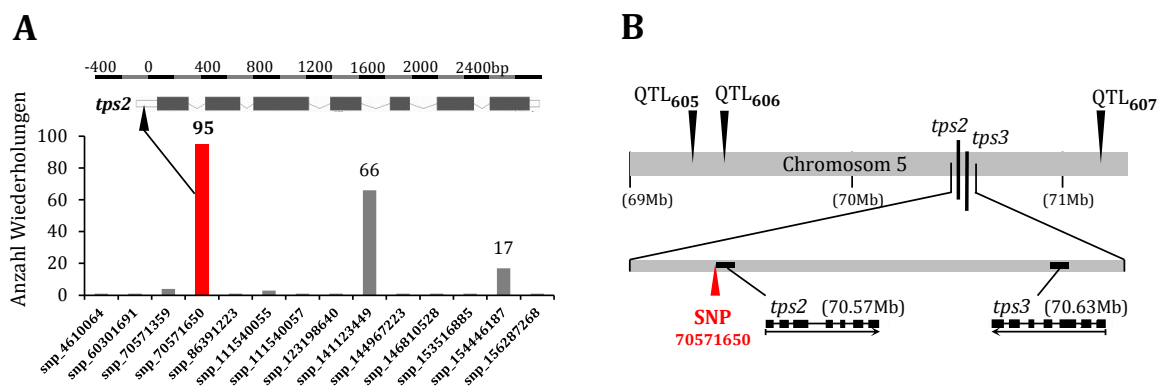


Abbildung 3.11 Feinkartierung für den QTL₆₀₆ auf dem Chromosom 5 mittels GWAS.

(A) Die Kalkulation erfolgte mit 1,6 Millionen SNPs und 100 Wiederholungen. Die y-Achse gibt die Anzahl der Wiederholungen der kalkultierten SNPs an. Der signifikanteste Marker SNP_70571650 ist in Rot dargestellt. Die Intron-Exon-Struktur von *tps2* ist über dem Diagramm eingezeichnet.

(B) Bereich auf Chromosom 5 zwischen 69–71,3 Mb. QTL-Marker (QTL₆₀₅, QTL₆₀₆, QTL₆₀₇), *tps2* und *tps3* konnten in diesem Bereich identifiziert werden. Der rot eingetragene Marker ist der mittels GWAS kalkultierte SNP (SNP_70571650) mit der höchsten Signifikanz und liegt bei 70,5 Mb.

3.3.1.3 Expressionsanalysen von *tps2* und *tps3* zeigen eine starke Induktion nach Elicitor-Behandlung mit einem Indanon-Derivat

Die Berechnungen der Feinkartierung deuten darauf hin, dass *tps2* das gesuchte Kandidatengene für die Biosynthese der Merkmale Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT sein könnte. Im nachfolgenden Schritt sollte getestet werden, ob *tps2* oder *tps3* nach Herbivorie eine erhöhte Transkriptakkumulation aufweisen. Dafür wurde eine QRT-PCR mit Kontrollpflanzen und mit Pflanzen, welche mit dem Indanon-Derivat induziert wurden, durchgeführt. Die Induktion von Maissämlingen der Elternlinie B73 erfolgte genauso wie es mit der gesamten NAM-Population gemacht wurde (siehe Kapitel 2.1.3). Dies ermöglichte ein besseres Vergleichen der Ergebnisse. Als Referenzgen diente eine putative Adenin-Phosphoribosyltransferase (APT1A; TA172777_4577). Die quantitative Analyse der Transkriptmengen zeigte, dass beide Gene durch Indanonbehandlung stark induzierbar sind (Abb. 3.12). Transkripte von *tps2* und *tps3* waren in den Kontrollpflanzen kaum detektierbar, währenddessen die mit Indanon behandelten Pflanzen einen deutlichen Anstieg der Transkriptmenge zeigten. Da die QRT-Primer (Anhang, Tab. 5.4) für beide Gene an der gleichen Stelle gebunden haben und die Sequenzen nahezu identisch sind, konnten die Transkriptmengen direkt miteinander verglichen werden. Der Vergleich ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression beider Gene nach Induktion.

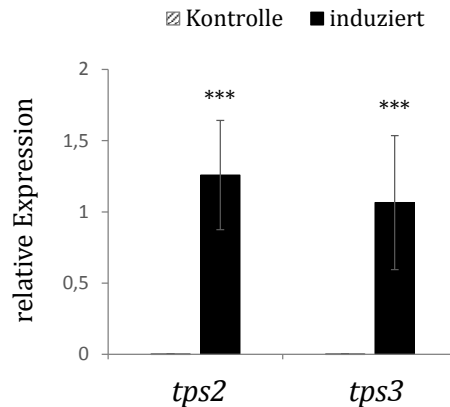


Abbildung 3.12 QRT Analyse der Kandidatengene *tps2* und *tps3* an unbehandeltem und induziertem Pflanzenmaterial der Linie B73. Blätter wurden nachmittags in 2,35 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten des Materials wurde die Transkriptakkumulation von jeweils drei biologischen Replikaten mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Kapitel 2.2.8). Zu sehen sind die Balken der jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten Blättern wurden mittels einfaktorier ANOVA berechnet und P-Werte $<0,001$ (***) gekennzeichnet.

3.3.1.4 Amplifikation und Klonierung von *tps2* und *tps3*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Transkriptmenge von *tps2* und *tps3* in induzierten Maispflanzen der Linie B73 vorkommt, sollten die entsprechenden Proteine TPS2 und TPS3 auf enzymatische Aktivität getestet werden. Dafür wurde jeweils die vollständige mRNA aus B73-cDNA amplifiziert. Zum Überprüfen der Sequenzen erfolgte eine Klonierung der Amplikons in den Sequenziervektor pCR-TOPO (TOPO-TA Kit, Invitrogen). Allerdings ergab die Sequenzierung verschiedener Klone mehrfach unterschiedlich offene Leserahmen mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit. Dadurch, dass beide Gene eine hohe Identität besitzen, bildeten sich in der PCR-Reaktion Chimäre, d. h. Gemische, aus beiden Sequenzen. Um die Chimärbildung zu unterbinden, wurden neue Primer synthetisiert (Tabelle 5.4, Anhang), welche spezifisch im 5' und 3' UTR von *tps2* bzw. *tps3* binden. Das Einbauen der erfolgreich amplifizierten *tps2* und *tps3* Transkripte in den Expressionsvektor pASK-IBA37+ ermöglichte die heterologe Expression in *Escherichia coli*.

3.3.1.5 Das Muktiproduktenzym TPS2 produziert Mono-, Sesqui- und Diterpenalkohole

Die statistischen Berechnungen des GWAS deuten darauf hin, dass *tps2* das gesuchte Kandidatengene ist und für die Terpenproduktion von Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT eine Rolle spielt. Da beide Terpensynthasegene, *tps2* und *tps3*, stark nach Herbivorie induzierbar sind, waren Aktivitätsbestimmungen notwendig, um die

Ergebnisse der Feinkartierung zu bestätigen. Hierfür wurden TPS2 und TPS3 in *E. coli* heterolog als His-tag-Fusionsproteine exprimiert und anschließend über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden auf Funktionalität als Mono-, Sesqui- und Diterpensynthase getestet, durch Inkubation mit den entsprechenden Substraten GPP, (*E,E*)-FPP und (*E,E,E*)-GGPP. Die Ergebnisse zeigten, dass TPS2 eine Affinität für alle drei Substrate aufwies und GPP in Linalool, FPP in (*E*)-Nerolidol und GGPP in Geranylinalool umwandelte (Abb. 3.13 A, B und C). Um das nur schwer flüchtige Diterpen Geranylinalool mit der GC-MS detektieren zu können, wurde für den Assay mit GGPP das Substrat in wesentlich höherer Menge zugesetzt als bei GPP und FPP. Während TPS2 in der Lage war, alle getesteten Substrate umzuwandeln, konnte für TPS3 keine Aktivität als Mono-, Sesqui- oder Diterpensynthase beobachtet werden (Abb. 3.13 A, B und C). Die Produkte nach Inkubation der Substrate mit TPS3 entsprachen denen vom Leervektor pASK-IBA37+. Der Enzymansatz von TPS2 nach Zugabe von GPP zeigte neben dem Hauptprodukt Linalool einen weiteren kleineren Peak für (*E*)-Nerolidol. Dies deutet darauf hin, dass das Substrat GPP wahrscheinlich mit FPP verunreinigt gewesen ist. Ein weiterer Assay wurde mit dem Stereoisomer von (*E,E*)-FPP, dem (*Z,Z*)-FPP durchgeführt⁴. In Tomate ist gezeigt worden, dass von manchen Terpensynthasen nur das (*Z,Z*)-FPP als Substrat akzeptiert wurde. Um zu untersuchen, ob TPS2 und TPS3 mit (*Z,Z*)-FPP eine enzymatische Aktivität besitzen, wurden die Enzyme mit (*Z,Z*)-FPP inkubiert. Diese Assays zeigten keine messbaren Sesquiterpenprodukte⁵. Mit Hilfe der Aktivitätsbestimmungen konnte gezeigt werden, dass TPS2 als Multi-produktenzym die Biosynthese von Linalool, (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool katalysiert, während TPS3 als Terpensynthase inaktiv ist. Somit konnten die Ergebnisse der Feinkartierung bestätigt und *tps2* als Kandidatengen nachgewiesen werden.

⁴(Daten nicht gezeigt)

⁵(Daten nicht gezeigt)

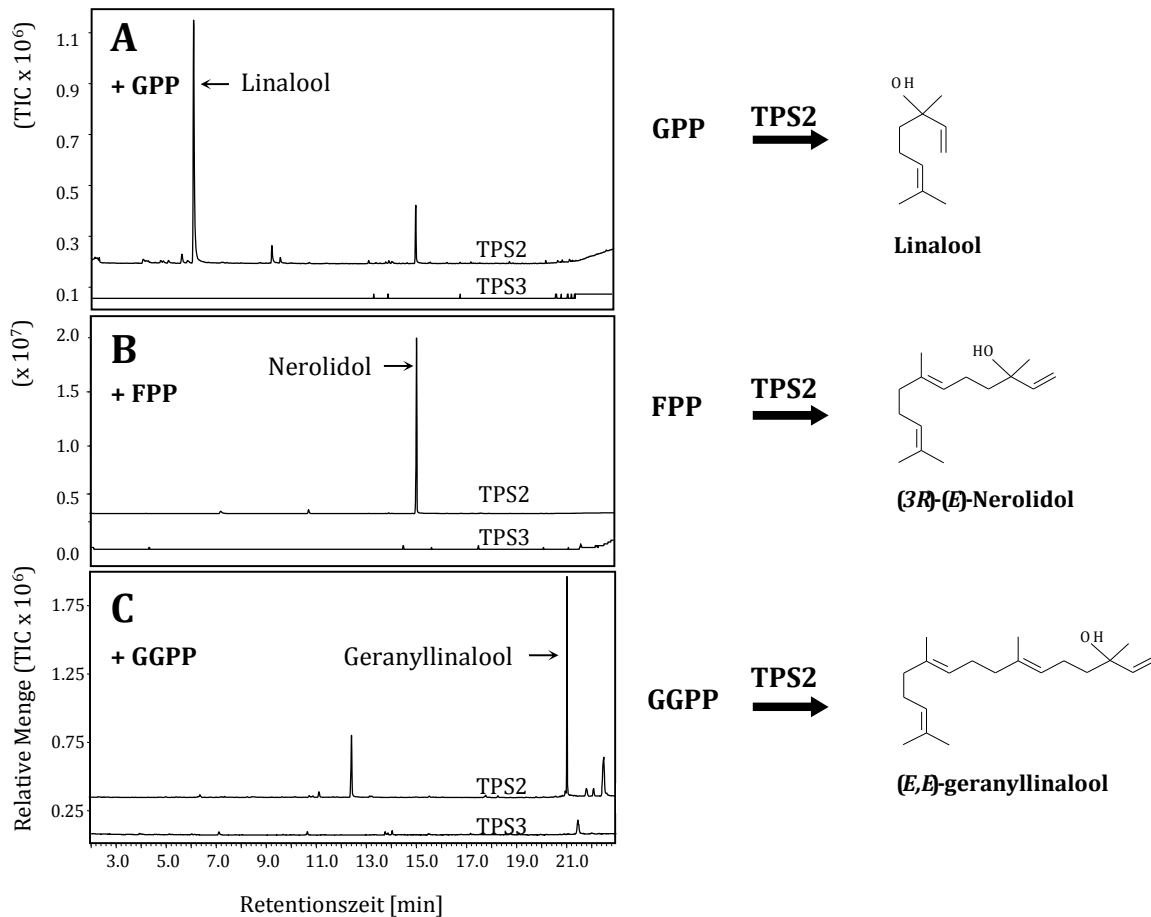


Abbildung 3.13 Aktivitätsbestimmung der rekombinant exprimierten Proteine TPS2 und TPS3. Die heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine wurden über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend jeweils mit GPP, (*E,E*)-FPP und (*E,E,E*)-GGPP inkubiert. Die mittels SPME-Faser isolierten Terpene wurden gaschromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Terpenprodukte erfolgte durch ein Massenspektrometer, welcher an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards, konnten die Terpene Linalool, (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool (GL) identifiziert werden.

3.3.1.6 Aktivitätsbestimmung an einer N-terminal verkürzten Version von *tps2* bzw. *tps3*

Mono- und Diterpensynthesen unterscheiden sich von Sesquiterpensynthesen durch das Vorhandensein eines N-terminalen Signalpeptides. Vorhersagen für die Sequenzen von TPS2 und TPS3 mit den Vorhersageprogrammen SignalP⁶ und ChloroP⁷ deuteten auf das Vorhandensein eines Signalpeptides hin (rot markierte Aminosäuren, Abb. 3.14). Zum einen sollte überprüft werden, ob TPS3 durch Abschneiden eines postulierten Signalpeptides an Aktivität gewinnt. Zum anderen sollte getestet werden, ob die aktive Terpensynthase TPS2 als trunkierte Version ihre Enzymaktivität beibehält. Daraufhin wurden die verkürzten Konstrukte von *tps2* und *tps3* in den

⁶<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Nielsen *et al.* [1997])

⁷<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> (Emanuelsson *et al.* [1999])

pASK-IBA37+ Vektor inseriert. Laut Vorhersagen der Schnittstellen für die Signalpeptide erfolgte die Deletion von 21 Aminosäuren von *tps2* und 22 AS von *tps3* jeweils am N-terminalen Ende (Abb. 3.14). Die Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass auch die verkürzte Version von TPS2 Aktivität als Mono-, Sesqui- und Diterpensynthese besaß⁸. Die trunkierte Version von TPS3 zeigte genau wie die Vollängenversion des Proteins keine Aktivität als Terpensynthese⁹.

TPS2-B73	M YSLPGATMSA A PA S IISS S	S---	FVEPLLLAAAS	PAAAA	AAANSHHQVRQRGHLVRTL	ASSSSNTLLR	
TPS2-Tzi8	MYS L PGATMSA A PA S IISS	S---	FVEPLLLAAAS	PAAAA	AAANSHHQVRQRGHLVRTL	ASSSSNTLLR	
TPS3-B73	M YSLPGATMSA A PA R VISS S	SSSS	FVEPLLLAAAS	----	S	AAANSHHQVRQRGHLVRTL	ASSSSNTLLR
	71		▼			140	
TPS2-B73	SDFDLQEG L TTDVK R MLRQR	QKKS	GGGREMLVTIDNLKRL	CIDHYF	EEEEIEGAMATGACT	RL L HS D DLFD	
TPS2-Tzi8	SDFDLQEG L TTDVK R MLRQR	QKKS	GGGREMLVTIDNLKRL	CIDHYF	DEEIEGAMATGACT	G LLHS D DLFD	
TPS3-B73	SDFDLQEG L TTDVK R MLRQR	QKKS	GGGREMLVTIDNLKRL	CIDH	FFEEEIEGAMATGACT	RL L HS D DLFD	
	141					210	
TPS2-B73	ATLAFRLLREAGHDVSAKDD	VLRRFIDG	ASGDFKLSL	SND	VRGLLSLHDMSHLDVGG	E-A ALLHRAKEFS	
TPS2-Tzi8	ATLAFRLLREAGHDVSAKDD	VLRRFIDG	ASGDFKLSL	SND	VRGLLSLHDMSHLDVGG	E-A ALLHRAKEFS	
TPS3-B73	ATLAFRLLREAGHDVSAKED	VLRRFIDG	VS	GDFKLSLND	VRGLLGLHDMSHLDVGG	E-A ALLHRAKEFS	
	211					280	
TPS2-B73	SRHLASAVRYLDDPSLAEYV	RQSLDHPYHLSLTQYKARHH	LRYLQSLPS	--RDA	AAVERLA	VAEFQLNKSL	
TPS2-Tzi8	SRHLASAVRYLDDPSLAEYV	RQSLDHPYHLSLTQYKARHH	LRYLQSLPS	--RDA	AAVERLA	VAEFQLNKSL	
TPS3-B73	SSHASAVRYQDNPSLAEYV	RQSLDHPYHLSLTQYKARHH	LRYLQSLPS	SCRDA	AAVERLA	VAEFQLNKSL	
	281					DDxxD 350	
TPS2-B73	HQ G EMREIKRWWMDLGLAEE	IPVVRDQVMKWYMWSMAALQ	GSSFS	R	YRVEITKIISLVYV	V D DIFD L VGT	
TPS2-Tzi8	HQ G EMREIKRWWMDLGLAEE	IPVVRDQVMKWYMWSMAALQ	GSSFS	C	YRVEITKIISLVYV	V D DIFD L VGT	
TPS3-B73	HQ R EMREIKRWWMDLGLAEE	IPVVRDQVMKWYMWSMAALQ	GSSFS	R	YRV-----YV	V D DIFD L VGT	
	351					420	
TPS2-B73	LEELSAFTEAVKMWD T VAAD	SLPSCMRSCYKALHTVTNEI	AEIAQKEHGSNHVNRLRKAW	AVL	FDGMVE		
TPS2-Tzi8	LEELSAFTEAVKMWD T VAAD	SLPSCMRSCYKALHTVTNEI	AEIAQKEHGSNHVNRLRKAW	AVL	FDGMVE		
TPS3-B73	LEELSAFTEAVKMWD T AAAD	SLPSCMRSCYKALHTVTNEI	AEIAHKEHGSN P INRLRKAW	VVL	FDGMVE		
	421					490	
TPS2-B73	ARWLATDQVPTAEDYLRNGV	ITSGVPLTFMHIFSMGLYDD	PSTEEEEEA	I	DHMPSIISC	PAKILRLWDD	
TPS2-Tzi8	ARWLATDQVPTAEDYLRNGV	ITSGVPLTFMHIFSMGLYDD	PSTEEEEEA	I	DHMPSIISC	PAKILRLWDD	
TPS3-B73	ARWLATDQVPTAEDYLRNGV	VTSGVPLTFLHIFSMGLYDD	PSTEEEEEA	I	DHMPSIISC	PAKILRLWDD	
	491					560	
TPS2-B73	MGSAEDEAQEGFDGSYRDFY	LMENPSRSPGAEAAHMRGLI	AREWEV	LNRECFCRRTF	PSN	LVQVCLNTAR	
TPS2-Tzi8	MGSAEDEAQEGFDGSYRDFY	LMENPSRSPGAEAAHMRGLI	V REWEV	LNRECFCRRTF	PSD	L AQVCLNTAR	
TPS3-B73	MGSAEDEAQEGFDGSYRDFY	LMENPSRSPGAEAAHMRGLI	AREWEV	LNRECFCRRTF	PSD	IAQVCLNTAR	
	561		587				
TPS2-B73	MVSVMYSYNKEQRL P VLEDY	AAMMLVL					
TPS2-Tzi8	MVSVMYSYNKEQRL P VLEDY	AAMMLVL					
TPS3-B73	MVSVMYSYNKEQRL L VLEDY	AAMMLVL					

Abbildung 3.14 Vergleich der Aminosäuresequenzen von TPS2-B73, TPS3-B73 und TPS2-Tzi8. In dem Sequenzvergleich sind Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen TPS2-B73 und TPS3-B73 grau hinterlegt. Unterschiedliche Aminosäuren zwischen TPS2-B73 und TPS2-Tzi8 wurden gelb markiert. Die 21 bzw. 22 AS, welche von TPS2-B73 und TPS3-B73 für die verkürzten Versionen abgeschnitten wurden, sind rot markiert. Das schwarze Dreieck zeigt den alternativen Anfang von TPS2-B73. Das „DDxxD“-Motiv ist rot eingerahmt.

⁸(Daten nicht gezeigt)

⁹(Daten nicht gezeigt)

3.3.1.7 Das Kandidatengen *tps2* besitzt zwei Transkriptionsstarts

Die Biosynthese von Sesquiterpenen läuft überwiegend im Cytosol ab, während die Mono- und Sesquiterpene in den Chloroplasten gebildet werden. Unter Absatz 3.3.1.5 wurde gezeigt, dass das rekombinant exprimierte TPS2 als Mono-, Sesqui- und Di-terpensynthase aktiv sein kann. Daraufhin sollte untersucht werden, ob *tps2* in beiden Kompartimenten exprimiert wird. Diese Möglichkeit wurde bereits durch Aharoni *et al.* [2004] diskutiert. So identifizierten Aharoni *et al.* [2004] in der kultivierten Erdbeere (*F. ananassa*) eine Nerolidol/Linalool-Synthase mit unterschiedlichen Transkriptionsstarts. Durch die alternativen Starts befindet sich die Volllängenversion FaNES2 in Mitochondrien und Plastiden, während die verkürzte Synthase FaNES1 im Cytosol lokalisiert ist. Dieser Aspekt sollte auch für *tps2* untersucht werden. Mittels RACE-PCR an einer 5'-RACE-Bibliothek der Linie B73 wurde *tps2* auf unterschiedlich lange mRNAs untersucht. Ein Primer, welcher im 3'-UTR von *tps2* bzw. *tps3* bindet, wurde in Kombination mit dem Anker/UPM-Primer vom Kit „SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Nach dem Auftragen der PCR auf ein Agarosegel fiel auf, dass bei der PCR für *tps2* die Bande für die Volllängenversion zu sehen war, jedoch zusätzlich eine kleinere, schwächere Bande bei ~1500 bp. Alle Fragmente wurden einzeln kloniert. Genau wie für FaNES1 beschrieben, stellte sich das kleinere Fragment von 1463 bp als eine verkürzte Version von *tps2* heraus (alternativer Start, schwarzes Dreieck in Abb. 3.14). Die RACE-PCR wurde an einer weiteren B73-RACE-Bibliothek mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Zum Überprüfen dieses Fragments auf Aktivität, erfolgte die Klonierung der trunkierten *tps2* Version in den pASK-IBA-37+ Vektor. Die Aktivitätsbestimmungen zeigten keinerlei Umsatz der Substrate GPP, FPP oder GGPP in die entsprechenden Terpene¹⁰. Diese Studien deuten darauf hin, dass das verkürzte *tps2*-Transkript zu kurz ist, um für ein funktionelles Protein zu kodieren. Da keine wichtigen Domänen im N-Terminus bekannt sind, könnte möglicherweise eine fehlerhafte Faltung von Terpensynthase 2, bedingt durch den alternativen Start, eine Erklärung dafür sein. Im Gegensatz zur Nerolidol/Linalool-Synthase aus der Erdbeere, konnte für *tps2* kein alternativer Transkriptionsstart nachgewiesen werden, welcher durch das Fehlen des Signalpeptides eine Aktivität von TPS2 im Cytosol erklären könnte.

¹⁰(Daten nicht gezeigt)

3.3.1.8 Die Elternlinie Tzi8 bestätigt die Kartierungsergebnisse von NAM und GWAS und enthält nach Herbivorie geringere *tps2* Transkriptmengen als B73

Um weitere Hinweise zu finden, dass *tps2* mit dem QTL₆₀₆ assoziiert ist, wurde nach NAM-Linien gesucht, die nicht mehr in der Lage sind, TPS2-Produkte zu synthetisieren. In der Linie Tzi8 ist die Menge aller nicht von TPS2 abhängigen Terpene wie (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen, ähnlich hoch wie in B73. Im Gegensatz dazu sind Terpene wie Linalool und (*E*)-Nerolidol nicht detektierbar. In Abb. 3.17 A sind die Terpenspektren von B73 und Tzi8 in einem Chromatogramm dargestellt. Die Hauptprodukte (*E*)- α -Bergamoten (6) und (*E*)- β -Farnesen (5) sind in beiden Linien sehr gut zu erkennen. Die anderen Terpene wie Linalool, DMNT, (*E*)-Nerolidol und TMTT waren im Gegensatz zu B73 nicht in Tzi8 detektierbar. Um Unterschiede der Terpenemissionen zwischen B73 und Tzi8 erklären zu können, wurden die Transkriptmengen von *tps2* mittels QRT-PCR zwischen diesen Linien verglichen (Abb. 3.15 A).

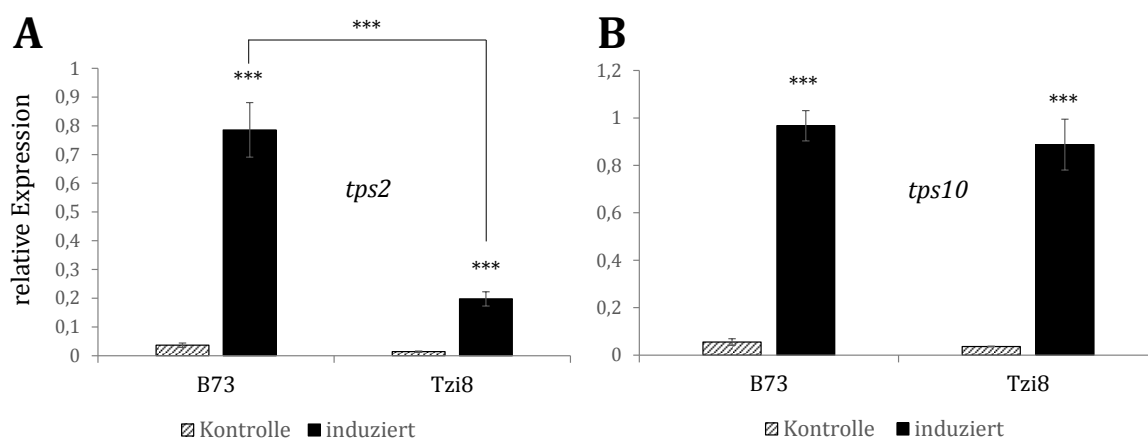


Abbildung 3.15 QRT Analyse von *tps2* und *tps10* an unbehandelten und induzierten Pflanzenmaterial der Linien Tzi8 und B73. Blätter von jeweils drei biologischen Replikaten wurden nachmittags in 2,35 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h inkubiert. An diesem Material wurde die Transkriptakkumulation für *tps2* (A) und *tps10* (B) mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Absatz 2.2.8) und anschließend die Mittelwerte aus den biologischen Replikaten gebildet (Balken). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten Blättern sowie zwischen den Allelen *tps2*-B73 und *tps2*-Tzi8 nach Induktion, wurden mittels einfaktorier ANOVA berechnet und P-Werte <0,001 (***) gekennzeichnet.

In den unbehandelten Blättern ist die Expression von *tps2* in beiden Linien sehr gering. Nach Induktion mit dem Elicitor bildete die Linie Tzi8 nur geringe aber signifikante Mengen von *tps2*-Transkripten, während in B73 ein starker Anstieg der *tps2* Expression gemessen wurde. Vergleicht man die Transkriptmengen nach Elicitor-Behandlung von *tps2*-B73 und *tps2*-Tzi8 miteinander sind signifikante Unterschiede festzustellen (ANOVA, $P < 0,001$). Zusätzlich wurde die Expression eines weiteren

induzierbaren Gens, *tps10*, in B73 und Tzi8 gemessen. Die Abb. 3.15 B zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptmengen von *tps10* nach Elicitor-Behandlung beider Linien (schwarze Balken) festgestellt werden konnte. Sowohl die Terpenproduktion von TPS2 als auch die Expression von *tps2* ist in Tzi8 gegenüber B73 reduziert, während die Bildung anderer Terpene unverändert ist. Der QTL₆₀₆ beruht daher vermutlich auf einer verringerten Expression von *tps2* in der Linie Tzi8. Um zu testen, ob die verringerte Transkriptmenge von *tps2* in Tzi8 auf eine geringeren Promoteraktivität des Gens beruhen könnte, wurde der Promoter von *tps2* in Tzi8 sequenziert. Die grau markierten Boxen in Abb. 3.16 stellen Unterschiede zwischen den B73- und Tzi8-Promoter dar. Besonders auffällig ist ein 690 bp-Insert in Tzi8, 566 bp stromaufwärts vom Startcodon. Möglicherweise verringert dieses Insert die Aktivität des Promoters in Tzi8. Diese Hypothese müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

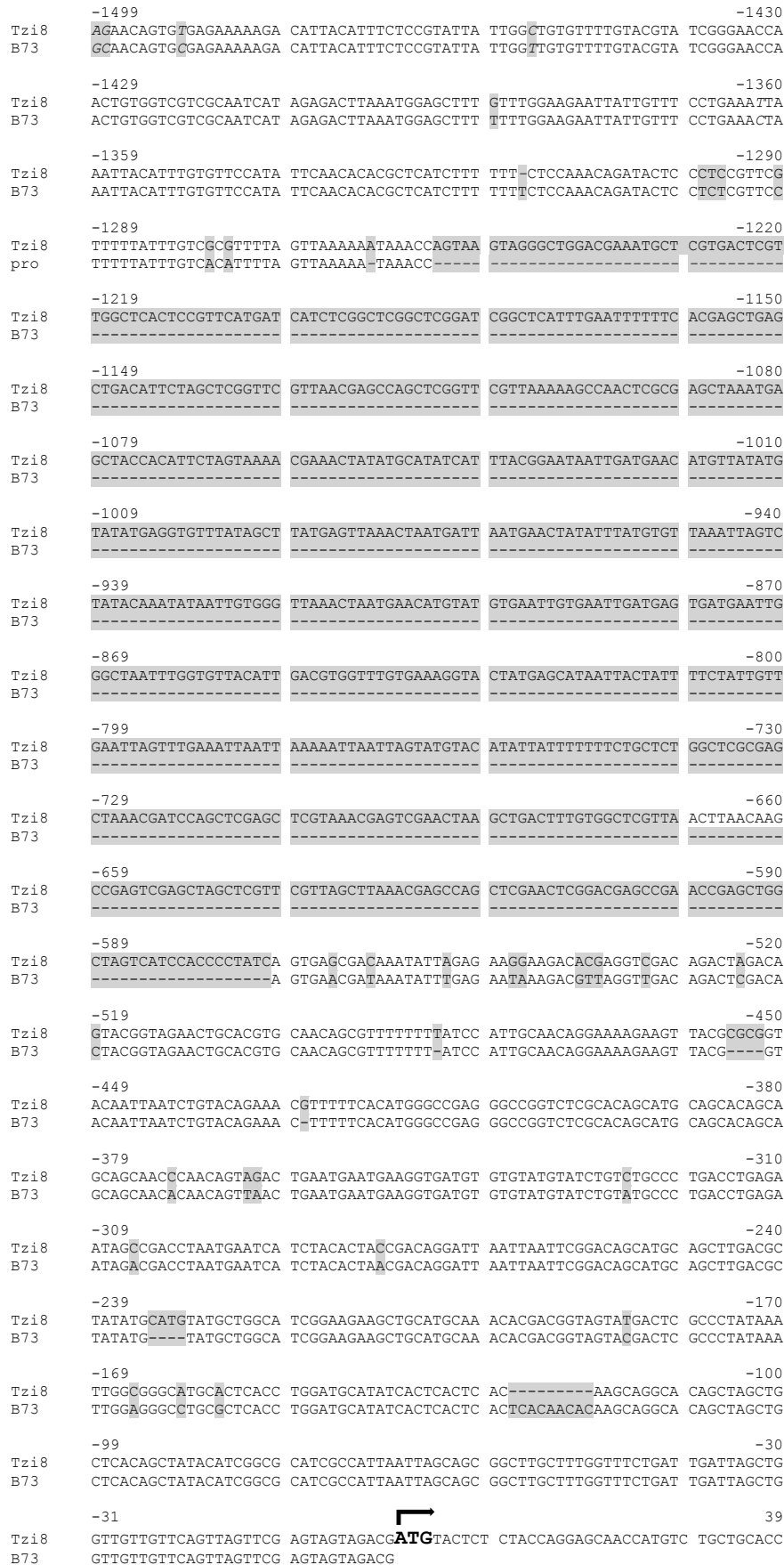


Abbildung 3.16 Vergleich der Promotersequenz von TPS2-B73 und TPS2-Tzi8. In dem multiplen Alignment sind Unterschiede in der Nukleotidsequenz grau hinterlegt. Die Promotersequenz enthält -1499 bp stromaufwärts von Startcodon (ATG), welches durch einen Pfeil gekennzeichnet ist.

3.3.1.9 Das Terpenspektrum von Tzi8 ist durch ein inaktives TPS2-Tzi8 Allel reduziert

Die geringere Transkriptakkumulation von *tps2*-Tzi8 erklärt nicht unbedingt das Fehlen der TPS2-Produkte im Terpenspektrum dieser Elternlinie (Abb. 3.17 A). Die fehlende Terpenakkumulation könnte auch durch eine verringerte Enzymaktivität zu erklären sein. Um die Hypothese zu prüfen, wurde die mRNA von *tps2* aus der Linie Tzi8 mittels RACE-PCR isoliert. Ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene zeigte, dass 4 Aminosäuren (Abb. 3.14; Gelb hinterlegte AS) zwischen TPS2-Tzi8 und TPS2-B73 unterschiedlich sind. Anschließend wurde das Allel von Tzi8 auf enzymatische Aktivität untersucht, indem TPS2-Tzi8 heterolog in *E. coli* exprimiert wurde. So zeigt die Abb. 3.17 B, dass das TPS2-Tzi8 Allel keine Aktivität als Terpensynthase besitzt und weder in der Lage ist (*E*)-Nerolidol noch Linalool oder Geranylinalool (GL) zu synthetisieren. Die Resultate dieser Aktivitätsstudien sind eine Erklärung für das Fehlen von TPS2-Produkten in der Elternlinie Tzi8 und ermöglichten vermutlich zusammen mit der geringen Promoteraktivität von *tps2* die Berechnung von QTL_{606/607}.

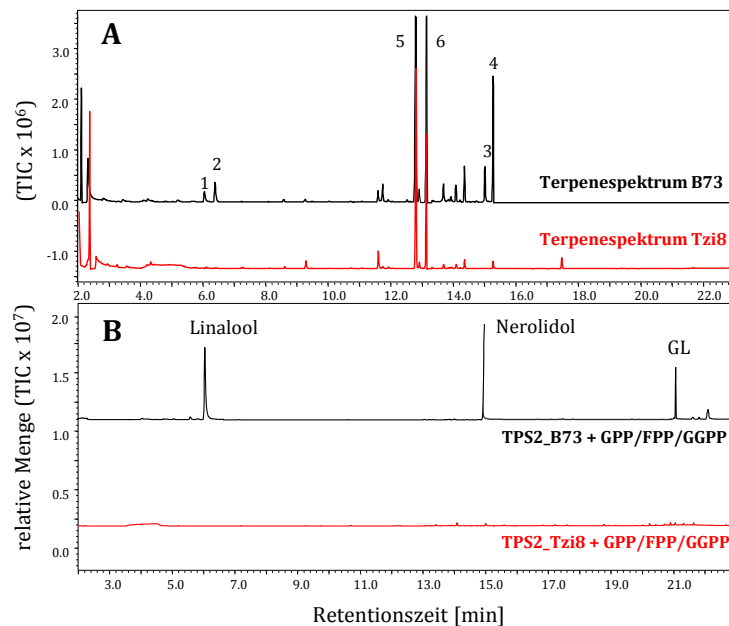


Abbildung 3.17 Vergleich der Terpenspektren und der TPS2-Aktivität zwischen den Linien Tzi8 und B73.

(A) GC-MS Chromatogramme der beiden Elternlinien B73 (schwarze Linie) und Tzi8 (rote Linie) nach Inkubation mit 2,35 μM Indanon (in Leitungswasser) für 24 h. Die mittels SPME-Faser isolierten Terpene wurden gaschromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Terpenprodukte erfolgte durch ein Massenspektrometer, welches an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards bzw. Bibliotheken (Wiley, Shimadzu), konnten die Terpene Linalool (1), DMNT (2), (*E*)-Nerolidol (3), TMTT (4) (*E*)- α -Bergamoten (5) und (*E*)- β -Farnesen (6) identifiziert werden.

(B) Heterolog in *E. coli* exprimierte Konstrukte TPS2-B73 (schwarze Linie) und TPS2-Tzi8 (rot Linie) wurden gleichzeitig mit GPP, FPP und GGPP inkubiert. Terpenprodukte wurden wie unter A beschrieben isoliert und detektiert.

3.3.1.10 In Ky21 ist die Expression von *tps2* nicht durch Elicitor induzierbar

Eine weitere in NAM genutzte Linie die zum QTL_{606/607} beiträgt, ist Ky21. Wie Tzi8 emittiert Ky21 hauptsächlich (*E*)- α -Bergamoten (5) und (*E*)- β -Farnesen (6) (Abb. 3.18). Die von TPS2 gebildeten Terpene wie Linalool (1), (*E*)-Nerolidol (3), DMNT (2) und TMTT (4) konnten nur in Spuren bzw. gar nicht gemessen werden. Zusätzlich war in Ky21 ein kleiner Peak an (*E*)- β -Caryophyllen detektierbar.

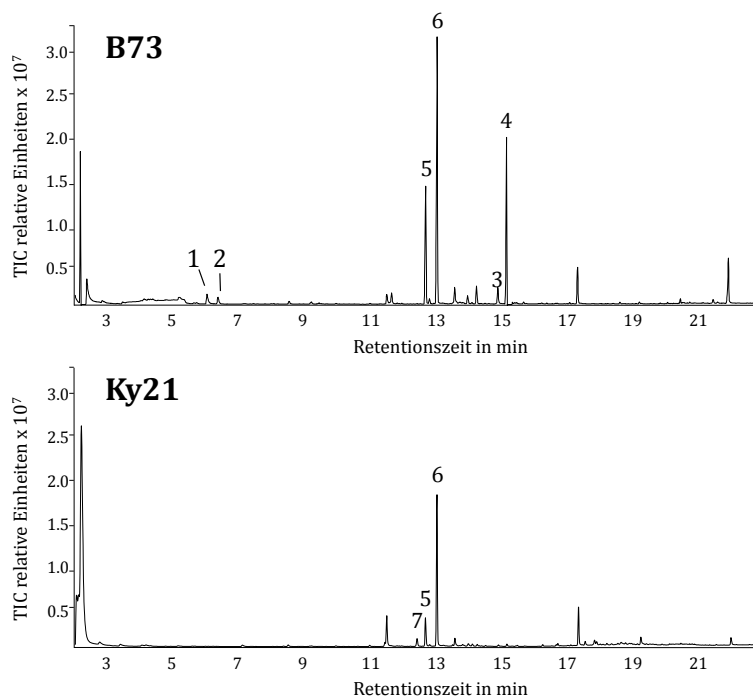


Abbildung 3.18 Vergleich der Terpenspektren der Elternlinien Ky21 und B73. GC-MS Chromatogramme der beiden Elternlinien B73 (oben) und Ky21 (unten) nach Inkubation mit 2,35 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h. Die mittels SPME-Faser isolierten Terpene wurden gaschromatographisch (GC-2010, Shimadzu, Duisburg) aufgetrennt. Die Detektion der Terpenprodukte erfolgte durch ein Massenspektrometer, welcher an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards bzw. Bibliotheken (Wiley, Shimadzu), konnten die Terpene Linalool (1), DMNT (2), (*E*)-Nerolidol (3), TMTT (4) (*E*)- α -Bergamoten (5), (*E*)- β -Farnesen (6) und (*E*)- β -Caryophyllen identifiziert werden.

Um die Ursache für das Fehlen der TPS2-Produkte zu bestimmen, wurde die Expression von *tps2* in Ky21 nach Elicitor-Behandlung mittels QRT gemessen und mit B73 verglichen. Aus Abb. 3.19 ist zu entnehmen, dass *tps2*-Ky21 im Gegensatz zu *tps2*-B73 nach Behandlung mit dem Indanon-Derivat kaum exprimiert ist und die Expressionswerte denen der uninduzierten Kontrollpflanzen ähneln. Die stark verminderte Expression des *tps2* Allels in Ky21 ist ein weiterer Hinweis für eine Assoziation von *tps2* mit diesem QTL.

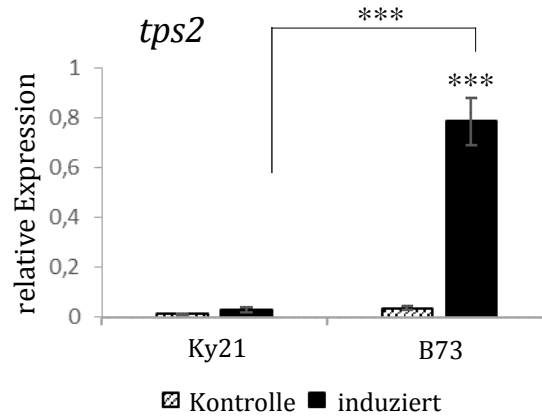


Abbildung 3.19 QRT Analyse von *tps2* an unbehandelten und induzierten Pflanzmaterial der Linien Ky21 und B73. Die Balken entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 3 biologischen Replikaten. Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-bahndelten Blättern sowie zwischen dem B73- und Ky21-Allel nach Induktion, wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet und P-Werte $<0,001$ (***) gekennzeichnet. Terpeninduktion erfolgte wie in Abb. 3.15 beschrieben.

3.3.1.11 Co-Segregationanalyse der *tps2* Allele innerhalb von RILs aus der Kreuzung der Linien Ky21 und B73

Um mit genetischen Methoden zu bestimmen, ob der QTL_{606} mit *tps2* assoziiert ist, wurde die Co-Segregation von SNPs im Bereich des *tps2* Gens mit der *tps2* Expression in den RILs aus Ky21 und B73 untersucht. Die Markerinformationen der entsprechenden RILs konnten aus den Daten von <http://www.maizegenetics.net> entnommen werden. Zusätzlich wurde *tps2* in diesen Linien mittels PCR genotypisiert (Tab. 3.2; Tab. 5.4, siehe Anhang). Durch SNPs konnte zwischen einem B73- und einem Ky21-Allel von *tps2* unterschieden werden (Abb. 5.2, siehe Anhang). Folgende RILs wurden für die QRT-Analysen gewählt: Z14E0012, Z14E0124, Z14E0051, Z14E0085 und Z14E0145. Der Genotyp dieser RILs wurde im Bereich von *tps2* und stromaufwärts bzw. stromabwärts für die Marker in Tab. 3.2 dargestellt. Alle Marker welche in den RILs dem Elternteil B73 entsprechen, sind mit einer 0 (grüne Markierung) gekennzeichnet, während eine 2 (rötliche Markierung) für die Elternlinie Ky21 steht. Alle Marker, welche mit Werten zwischen 0 und 2 (graue Markierung) gekennzeichnet sind, sind heterozygot. Dabei bekommt der Marker eine 1, wenn er in einem Intervall von heterozygoten Markern flankiert wird. Ist der Marker von heterozygoten und homozygoten Markern umgeben, dann erhält er eine 0,5 oder 1,5, abhängig davon ob der homozygote ein B73- oder nicht-B73-Allel trägt. Demzufolge enthalten die RILs Z14E0012 und Z14E0124 *tps2*-B73. Die Linien Z14E0145 und Z14E0051 enthalten *tps2*-Ky21. Heterozygot für *tps2* ist nur die RIL Z14E0085 mit einem Wert von 1, umgeben von heterozygoten Markern.

Tabelle 3.2 Genotyp für die CPS-Marker m600-m609 und *tps2* sowie die Induzierbarkeit von *tps2* nach Herbivorie der Linien B73, Ky21 und fünf RILs aus Kreuzung dieser Eltern. Der Genotyp der Marker wurde aus Datensätzen erhältlich auf maizegenetics.net entnommen. Der Genotyp für *tps2* (rot umrahmt) wurde mittels PCR aufgrund von Sequenzunterschieden ermittelt. Die letzte Spalte enthält die Information, ob *tps2* nach Behandlung mit dem Indanon-Derivat in den Linien exprimiert ist oder nicht („+“ = induzierbar, relative Expression >0,18; „-“ = nicht induzierbar, relative Expression <0,065). Allele für B73 sind mit einer „0“ gekennzeichnet und grün hinterlegt, während eine „2“ mit orangenem Hintergrund für Allele der Linie Ky21 stehen. Heterozygote Pflanzen sind mit einer „1“ und grauem Hintergrund markiert.

Marker	m600	m601	m602	m603	m604	m605	m606	<i>tps2</i>	m607	m608	m609	<i>tps2</i> Expr.
B73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Ky21	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
Z14E0012	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	+
Z14E0124	2	1.429	1.429	0.857	0	0	0	0	0	0	0	+
Z14E0145	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	-
Z14E0085	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	+
Z14E0051	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-

B73
 Ky21
 heterozygot

Nachdem der Genotyp für *tps2* in diesen RILs identifiziert war, wurden die Linien auf das Vorhandensein von *tps2* Produkten phänotypisiert. In Tabelle 3.2 ist die *tps2*-Induzierbarkeit der einzelnen Linien nach Elicitor-Behandlung durch ein Plus (+; relative Expression zu APT1 < 0,065) oder ein Minus (-; relative Expression zu APT1 > 0,18) in der letzten Spalte dargestellt. Jene RILs (Z14E0145; Z14E0051), welche *tps2*-Ky21 enthalten, transkribierten *tps2* in sehr geringen Mengen analog zur Elternlinie Ky21. Die geringere Transkriptmenge von *tps2* in Ky21 und den entsprechenden RILs korreliert mit einer niedrigen Terpenakkumulation von TPS2-Produkten als in B73 (Bsp. Terpen TMTT; Abb. 5.4, siehe Anhang). RILs (Z14E0012; Z14E0124), welche das *tps2*-B73 Allel tragen, zeigten eine höhere Expression von *tps2* als in Ky21 gemessen wurde. Die Geno- und Phänotypisierung der untersuchten RILs von Ky21 und B73 zeigen eine Co-Segregation von SNPs im Bereich des *tps2* Gens und der Expression der jeweiligen Allele bzw. der Akkumulation von TPS2-Produkten. Dies wiederum verdeutlicht eine Assoziation von QTL₆₀₆ mit dem Kandidatengen *tps2*.

3.3.2 Charakterisierung des QTL₇₆₄

3.3.2.1 Identifizierung einer putativen P450 Monooxygenase (CYP92C5) in der Region des QTL₇₆₄

Es ist bekannt, dass das Sesquiterpen (*E*)-Nerolidol und das Diterpen Geranylinalool in der Pflanze weiter modifiziert werden (Boland *et al.* [1998]; Degenhardt & Gershenzon [2000]). Kürzlich konnte aus *A. thaliana*, eine Cytochrom P450 Monooxygenase, CYP82G1 (At3g25180) identifiziert werden, die in der Lage ist, eine oxidative Spaltung der C-C Bindungen von (*3E*)-Nerolidol und Geranylinalool *in vitro* zu katalysieren, wodurch die Homoterpene (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT) bzw. (*3E,7E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) gebildet werden (Lee *et al.* [2010]; Tholl [2006]). Da in Mais sowohl (*E*)-Nerolidol als auch DMNT im Terpenspektrum detektiert wurden (Abb. 3.1), kann angenommen werden, dass (*E*)-Nerolidol in Mais ebenfalls durch ein P450 modifiziert wird. Demzufolge wurde nach einem P450-Protein mit gleicher Funktion in Mais gesucht. Dafür wurde ein Abgleich der Proteinsequenz von CYP82G1 aus *A. thaliana* gegen das Maisgenom auf der Internetseite von Maize Sequence¹¹ durchgeführt. Die BLAST¹²-Suche identifizierte weit über 100 putative P450 Gene, wovon die höchste Homologie ein putatives P450 Enzym mit 37% Identität auf Proteinebene zeigte. Jedoch befanden sich keine der identifizierten Monooxygenasegene in der Nähe der für DMNT berechneten QTLs (Tab. 3.3). Ebenso konnte keiner der QTLs in der Nähe eines putativen P450 lokalisiert werden, woraufhin das Verhältnis aus DMNT und einem weiteren Terpen (Vorläuferterpen) gebildet wurde. Mit diesem statistischen Hilfsmittel kann man Loci identifizieren, welche für die späten Biosyntheseschritte verantwortlich sind. Da DMNT sehr wahrscheinlich aus (*E*)-Nerolidol synthetisiert wird, wurde das Verhältnis aus (*E*)-Nerolidol und DMNT berechnet (Tab. 3.3).

Tabelle 3.3 QTLs für das Merkmal DMNT und das Verhältnis aus DMNT und (*E*)-Nerolidol mit Angabe der F-Werte.

Merkmal	QTLs	F-Wert
DMNT	606	9,27
DMNT	215	6,3
DMNT	89	4,1
DMNT	1053	3,8
DMNT/Nerolidol	764	3,77

¹¹<http://www.maizesequence.de>

¹²(Basic Local Alignment Search Tool)

Die Berechnung ergab einen einzigen quantitativen Locus auf dem Chromosom 7, QTL₇₆₄ (5,96 Mb, HapMapV1). Dieser QTL (m=764) liegt in der Nähe des Gens GRMZM2G102079 (6,4 Mb, HapMapV1), welches auf Grund seiner Domänen als Enzym mit einer Monooxygenaseaktivität postuliert wurde. Das homologe Protein von *Arabidopsis* wies eine Identität von 33 % auf Aminosäureebene auf.

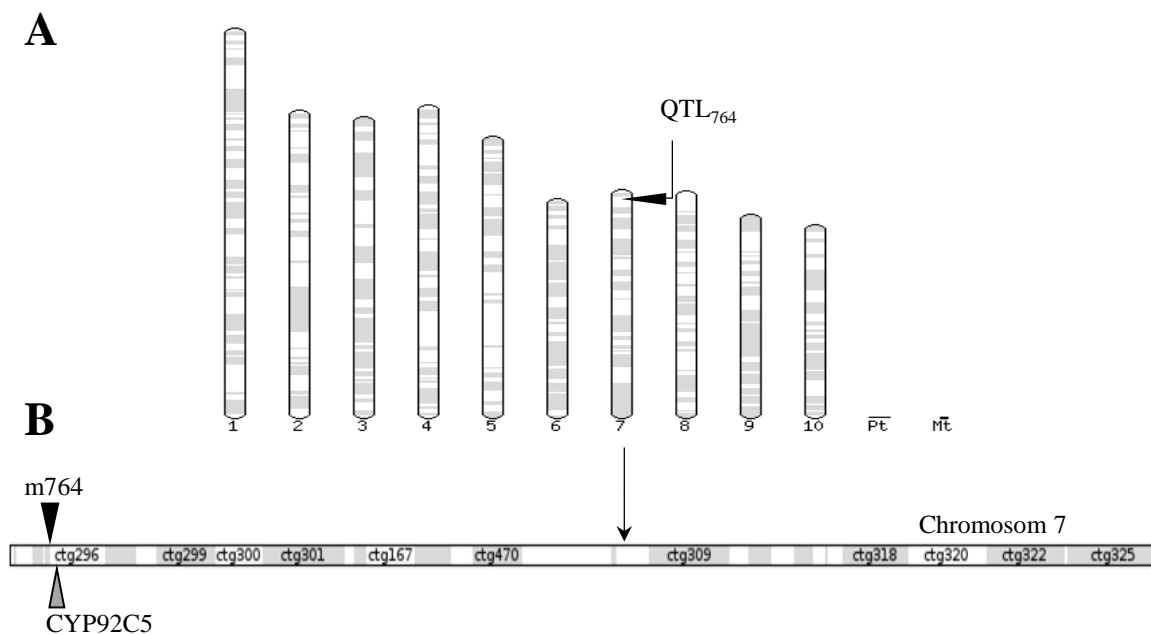


Abbildung 3.20 Lokalisation von QTL₇₆₄ im Maisgenom. Kalkulation des QTLs aus dem Verhältnis von DMNT und (*E*)-Nerolidol erfolgte mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnten die Marker lokalisiert werden (A). Zusätzlich wurden die Positionen vom QTL-Marker (m764) und dem Kandidatengen *cyp92c5* auf Chromosom 7 identifiziert (B).

Das Gen GRMZM2G102079 kodiert für das Protein CYP92C5. Diese Genfamilie der P450s existiert in vielen Pflanzengattungen wie z. B. in Reis, Tabak oder Pinus (Nelson *et al.* [2004]). Allerdings ging im Laufe der Evolution die CYP92 Familie in *Arabidopsis* verloren (Nelson *et al.* [2004]). Das Protein CYP92C5 besitzt zudem ein PFxxGxRxCxG/A Motiv, welches für die Eisen-Bindedomäne codiert und ein hoch konserviertes Cystein enthält. Des Weiteren enthält die Aminosäuresequenz das typische PERF Motiv, eine K-Helix und eine Prolin-reiche Domäne, sowie die ERR-Triade, welche sich aus dem Glutamin und Arginin der K-Helix und dem Arginin aus der PERF-Domäne zusammensetzt (Abb. 3.24) (Kusano *et al.* [2001]). Alle diese strukturellen Domänen deuten auf ein P450 Enzym mit Monooxygenaseaktivität hin.

3.3.2.2 Die Behandlung mit einem Indanon-Derivat zeigte eine signifikante Transkriptakkumulation von *cyp92c5* in B73.

Eine QRT-Analyse von GRMZM2G102079 sollte Aufschluss darüber geben, ob dieses Gen genau wie *tps2* und *tps10* in B73 verstärkt nach Herbivorie exprimiert wird. Dafür wurde wie in den QRT-Analysen von *tps2* und *tps3* unter Abschnitt 3.3.1.3 vorgegangen. Die Transkriptmenge von *cyp92c5* wurde zwischen Elicitor behandelten (Verwundung + 2,37 μ M Indanon-Derivat) und unbehandeltem Blattmaterial unter Verwendung des Referenzgens APT1 und einer Standardkurve verglichen. Diese quantitative RT-PCR zeigte signifikante Unterschiede (ANOVA, $p < 0,001$; $t = 12,8$) in den Transkriptmengen dieser beiden Behandlungen. Durch die Behandlung mit dem Indanon-Derivat wurde *cyp92c5* in B73-Keimlingen stark erhöht, während in den Kontrollen kaum Transkript detektierbar war (Abb. 3.21).

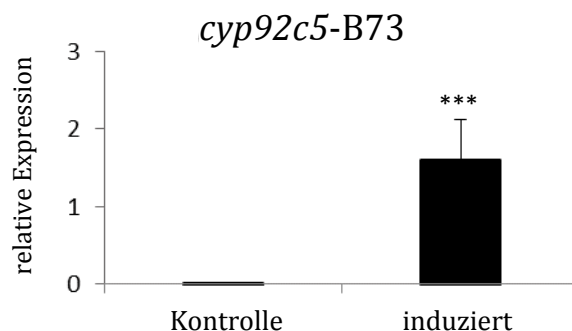


Abbildung 3.21 Expressionsvergleich von *cyp92c5* in induzierten und unbehandelten Blattmaterial von B73-Keimlingen. Blätter von jeweils drei biologischen Replikaten wurden nachmittags in 2,37 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h inkubiert. An diesem Material wurde die Transkriptakkumulation mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Abschnitt 2.2.8) und anschließend die Mittelwerte aus den biologischen Replikaten gebildet (Balken). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten Blättern wurden mittels zweifaktorieller ANOVA berechnet und P-Werte $< 0,001$ (***) gekennzeichnet.

3.3.2.3 CYP92C5 konvertiert (*E*)-Nerolidol zu DMNT und Geranylinalool in TMTT

Um die Assoziation des QTLs mit der Monooxygenase *cyp92c5* zu untersuchen, wurde das rekombinante Protein auf Aktivität getestet. Die Amplifikation der mRNA erfolgte auf Grund des sehr hohen Anteils an Guanin und Cytosin (72,6 %) mit einer speziellen Polymerase für GC-reiche Sequenzen (GC-rich Polymerase). Anschließend folgte die Klonierung in den Expressionsvektor (pESC-Leu) und eine heterologe Expression in Hefe. Die Aktivitätsbestimmung wurde mit den isolierten Mikrosomen aus Hefe und dem Substrat (*E*)-Nerolidol *in vitro* durchgeführt (Abb. 3.22 A). Nur

nach Zugabe des Cofaktors NADPH konnte das Substrat in das Homoterpen DMNT umgewandelt werden. Da das Protein CYP82G1 aus *Arabidopsis* sowohl DMNT aus (*E*)-Nerolidol, als auch TMTT aus Geranylinalool *in vitro* synthetisieren kann (Lee *et al.* [2010]), wurde zusätzlich Geranylinalool als Substrat getestet (Abb. 3.22 B). Auch hier konnte eine Umsetzung des Diterpens Geranylinalool in das Homoterpen TMTT festgestellt werden. Die Negativkontrollen mit einem Leervektor und den jeweiligen Substraten zeigten keine Homoterpenproduktion.

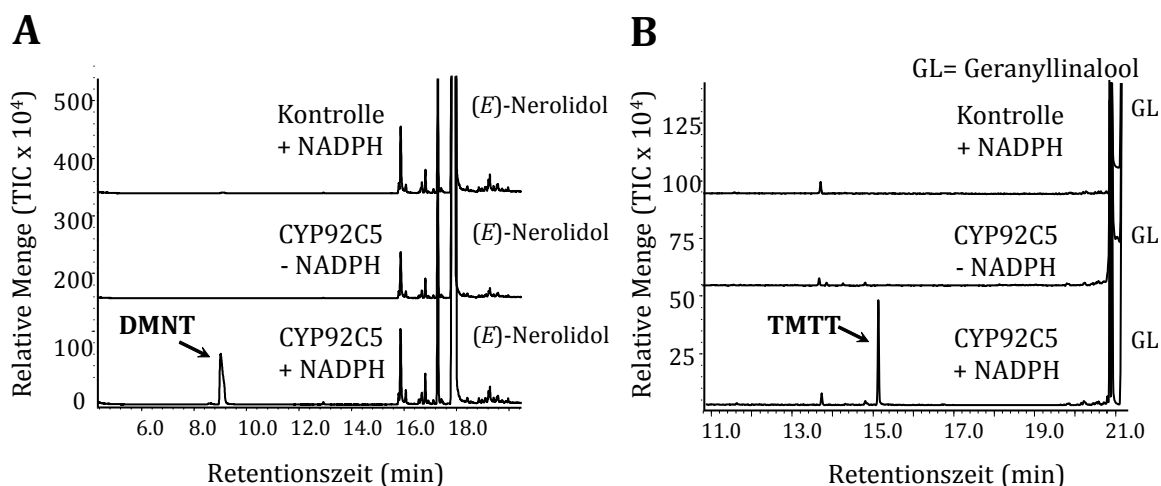


Abbildung 3.22 Aktivitätsbestimmung der rekombinant exprimierten P450-Monooxygenase CYP92C5-B73. Die heterologe Expression erfolgte in den Hefestämmen WAT1 und W[®], welche zusätzlich eine *Arabidopsis thaliana* bzw. eine Hefe P450-Reduktase überexprimierten. Die isolierten Mikrosomen wurden mit dem Substrat (*E*)-Nerolidol (A) bzw. Geranylinalool (B) inkubiert. Die Auftrennung der mittels SPME-Faser isolierten Terpene erfolgte gaschromatographisch und die Detektion der Terpenprodukte durch einen Massenspektrometer, welcher an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards konnten die Homoterpene DMNT und TMTT identifiziert werden.

3.3.2.4 Die *dmnt*-Mutante MuIII zeigt keine funktionelle DMNT-Biosynthese

Die Mu-Insertions-Mutagenese erlaubt die gezielte Inaktivierung von Genen in Maispflanzen. Eine Mu-Transposon-Linie (MuIII) im B73 Hintergrund zeigte einen für diese Arbeit interessanten Phänotyp und sollte eine Assoziation von *cyp92c5* mit dem QTL₇₆₄ beweisen. Diese Maislinie ist nicht in der Lage, das Homoterpen DMNT zu produzieren, weder in unverletzten Kontrollpflanzen noch im induzierten Blattmaterial (Abb. 3.23 A). Vergleicht man das Terpenspektrum dieser Mu-Transposon-Linie mit B73, konnte eine verminderte Akkumulation an TMTT und zusätzlich eine erhöhte Akkumulation an (*E*)-Nerolidol detektiert werden (Abb. 3.23 A). Diese Mutante wurde von Christiane Schnee (Dissertation 2004) bis zur F4 Generation geselbtest, anschließend mit B73 rückgekreuzt und wiederum bis zur F3 geselbtest. Mittels QRT-PCR sollte die Transkriptmenge von *cyp92c5* zwischen der *dmnt*-Mutante und B73

verglichen werden, um zu testen ob die Expression dieses Gens durch die Insertion eines Transposons verändert wurde und verantwortlich für den Phänotyp ist. Die Abbildung Abb. 3.23 B zeigt eine sehr starke Genexpression von *cyp92c5* im induzierten Blattmaterial von B73 im Vergleich zu der sehr schwachen bis kaum detektierbaren Expression in der *dmnt*-Mutante. Die geringe Transkriptmenge von *cyp92c5*, die fehlende Akkumulation von DMNT sowie geringere Mengen TMTT in der Mutante, korreliert mit den Kartierungsergebnissen vom NAM und lassen zusammen mit den Aktivitätsstudien eine Assoziation dieses Monooxygenasegens mit dem QTL₇₆₄ vermuten.

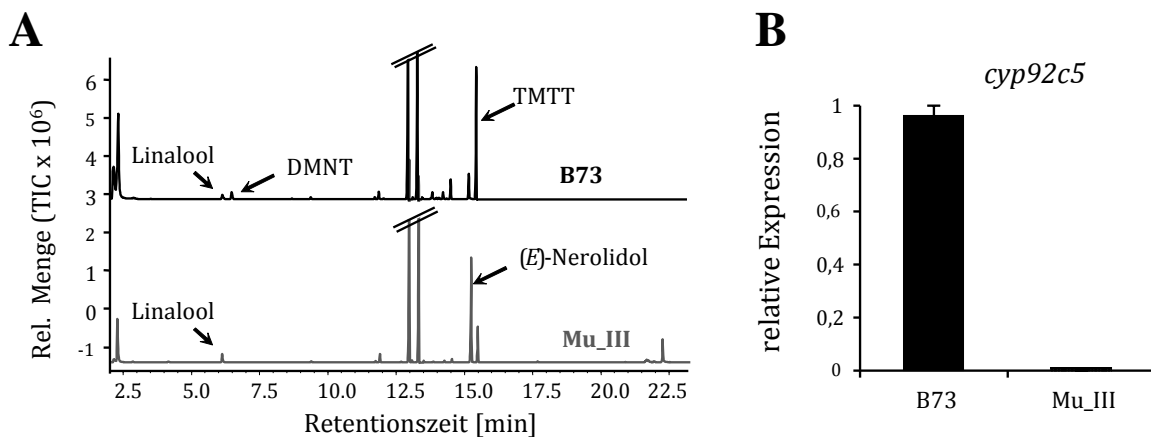


Abbildung 3.23 Vergleich der Terpenspektren und der *tps2* Expression zwischen B73 und der *dmnt*-Mutante.

(A) GC-MS Chromatogramme von B73 und der *dmnt*-Mutante (Mu_III, B73 Hintergrund,) nach Inkubation mit 2,37 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h. Das obere Chromatogramm (schwarze Linie) zeigt das Terpenspektrum von B73 mit hohen Mengen an TMTT und geringe Mengen (*E*)-Nerolidol. Das darunterliegende Chromatogramm (graue Linie) zeigt das Terpenspektrum der *dmnt*-Mutante mit geringeren Menge an TMTT, jedoch einer höheren Akkumulation von (*E*)-Nerolidol.

(B) QRT-Analyse am selben Pflanzenmaterial für das Monooxygenasegen *cyp92c5* unter Verwendung des Referenzgens APT1. Aus jeweils drei biologischen Replikaten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

3.3.2.5 In *cyp92c5* der *dmnt*-Mutante konnte kein Transposon lokalisiert werden

Die Lokalisierung des Transposons in der *dmnt*-Mutante sollte Aufschluss darüber geben, ob das Gen GRMZM2G102079 in der MuIII-Linie durch eine Transposoninsertion inaktiviert wurde. Allerdings war die genaue Identifizierung der Position des Transposons nicht erfolgreich. Unter der Annahme, dass das Transposon direkt im Gen bzw. Promoter von GRMZM2G102079 lokalisiert ist, wurden PCRs mit genspezifischen Primern in Kombination mit Primern für das Mu-Transposon durchgeführt. Nachdem diese PCRs kein Amplikon produzierten, folgte eine Nested

PCR mit Nested Primer für das Mu-Transposon, jedoch ebenfalls ohne Erfolg. Eine weitere Möglichkeit war die „inverse“ PCR. Durch die inverse PCR ist es möglich, angrenzende unbekannte DNA-Bereiche zu identifizieren. Hierfür wurde DNA aus der MuIII-Linie isoliert und jeweils mit den Enzymen MboI, BspMI und SacI geschnitten. Diese Enzyme wurden gewählt, da sie relativ häufig schneiden, so dass nach dem Ligationsschritt keine zu großen zirkulären DNA-Moleküle entstehen und anschließend PCR-Fragmente amplifiziert werden können. Leider konnte für keine der iPCR-Bibliotheken ein gewünschtes PCR-Produkt amplifiziert werden, welches Aufschluss über angrenzende, unbekannte DNA-Bereiche geben könnte. Weiterhin wurde eine 5'- und 3'-RACE-Bibliothek von der Mu-Insertionslinie erstellt. Mittels RACE-PCR konnte so ein Fragment von einer Länge von 888 bp isoliert werden, was einer Länge von 296 Aminosäuren entspricht. Diese RACE-PCR wurde an einer zweiten 5'-RACE-Bibliothek wiederholt, bei der das gleiche Fragment amplifiziert wurde. Allerdings beginnt dieses PCR-Produkt nicht ab dem Start-Codon von CYP92C5, sondern 708 bp stromabwärts (Abb. 3.24, schwarzes Dreieck). Damit liegt in der Mutante eine verkürzte, sehr schwach exprimierte Version des Proteins vor, im Vergleich zu der vollen Länge von 532 Aminosäuren in B73.

3.3.3 Charakterisierung des QTL₂₉₈

3.3.3.1 Identifizierung eines putativen P450 Enzyms (CYP92C6) in der Region des QTL₂₉₈

Durch bereits publizierte Daten (Boland *et al.* [1998]; Degenhardt & Gershenzon [2000]) konnte davon ausgegangen werden, dass eine Monooxygenase für die Synthese von TMTT verantwortlich ist, so dass auch für dieses Terpen nach QTLs gesucht wurde, welche für die Biosynthese entscheidend sind. Dadurch dass in der *dmnt*-Mutante (Kapitel 3.3.2.4) weiterhin TMTT detektiert werden konnte, musste ein weiteres Enzym für die Biosynthese verantwortlich sein. Der QTL₂₉₈, welcher allein für das Merkmal TMTT errechnet wurde, ist mit einem sehr hohen F-Wert von 12,59 der zweitsignifikanteste QTL für dieses Terpen und befindet sich auf dem Chromosom 2 bei 231,19 Mb (PZA02170.1; HapMapV1; Abb. 3.25 A, B). Bei der Suche nach potentiellen Kandidatengenen wurde zuerst nach Genen der P450-Familie gesucht. Stromabwärts vom Marker befindlich liegt bei 231,2 Mb (HapMapV1) ein Gen (GRMZM2G139467_T01), welches für ein putatives P450 kodiert (Abb. 3.25 B). Zwischen diesem Gen und dem CPS-Marker (PZA02170.1; HapMapV1) liegen nur 2 Gene. Der Leserahmen des putativen P450 setzt sich aus einem Exon zusammen, ebenso wie beim CYP92C5. Ein Sequenzvergleich mit *cyp92c5* zeigte, dass beide Gene eine Identität von 86 % auf DNA-Ebene haben (Abb. 3.24). Eine BLAST-Suche

verdeutlichte, dass im Maisgenom *cyp92c5* die höchste Homologie zu diesem putativen P450 besitzt.

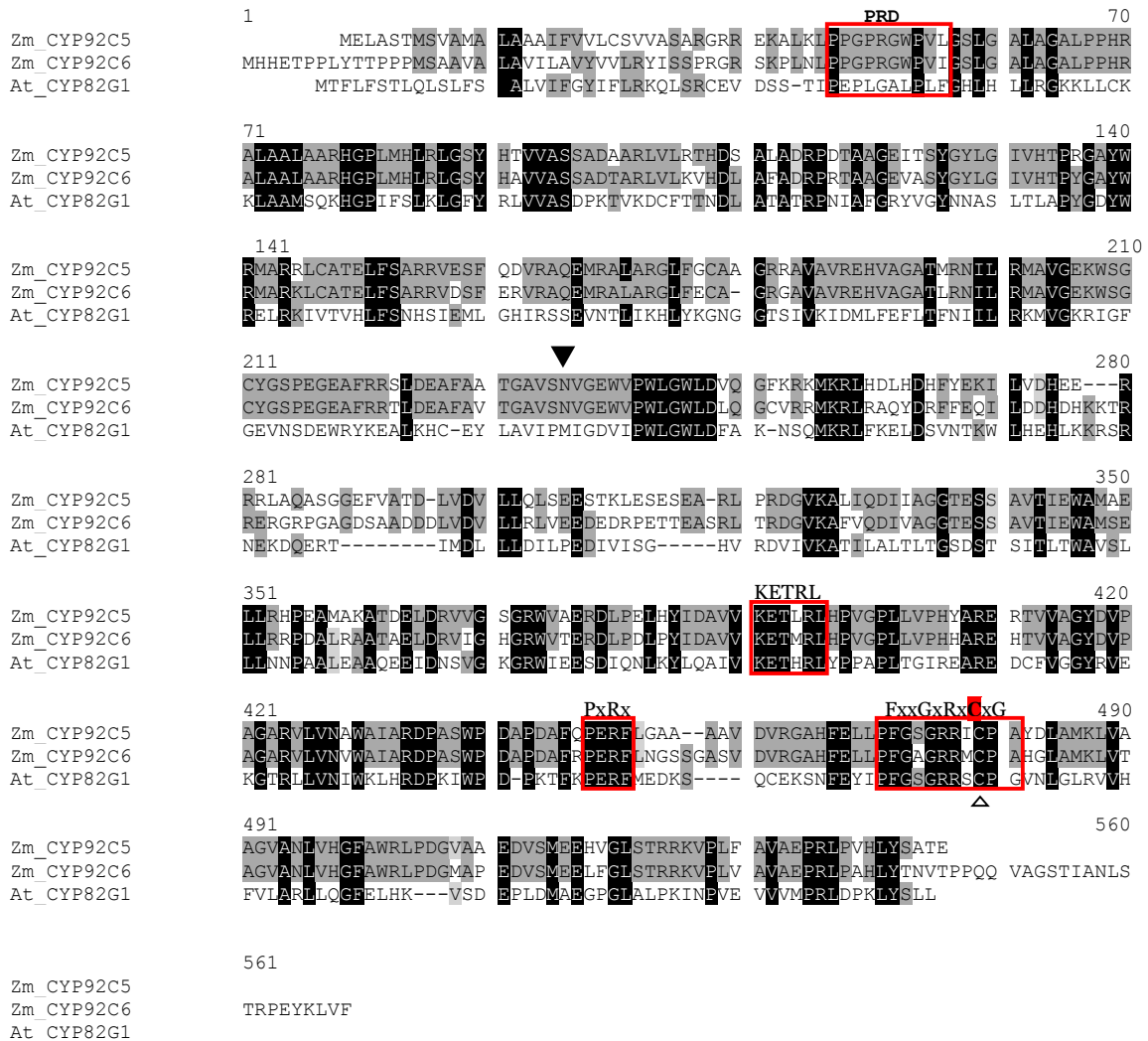


Abbildung 3.24 Vergleich der Aminosäuresequenzen von CYP92C5-B73, CYP92C6-B73 und AtCYP82G1. In dem multiplen Alignment sind identische Aminosäuren zwischen allen drei Proteinsequenzen schwarz hinterlegt. Grau hinterlegte Aminosäuren weisen Identität zwischen mindestens zwei Proteinsequenzen auf. Konservierte Domänen sind rot umrahmt: Prolinreiche Domäne (PRD), K-Helix (KETRL), PERF-Domäne (PxRx) und das Häm-System (FxxGxRxCxG). Das rot markierte C in dieser Eisen-Bindedomäne ist hoch konserviert. Das schwarze Dreieck gibt den Start von CYP92C5 in der *dmnt*-Mutante (MuIII) an.

Das Protein auf Chromosom 2 enthält ebenfalls typische Domänen wie das PERF Motiv, die K-Helix und die Prolin-reiche Domäne (PRD), sowie eine Eisen-Bindedomäne (PFxxGxRxCxG/A Motiv), welches ein Cystein enthält und für die Aktivität entscheidend ist. Trotz der typischen Domänen für P450 war das Gen noch nicht in die

Familie der P450 Gene eingeordnet. Durch Prof. David Nelson¹³ erfolgte nach Anfrage die Namensgebung des putativen P450, welches als CYP92C6 benannt wurde. Die Einordnung dieses Proteins erfolgte in dieselbe Klasse wie CYP92C5.

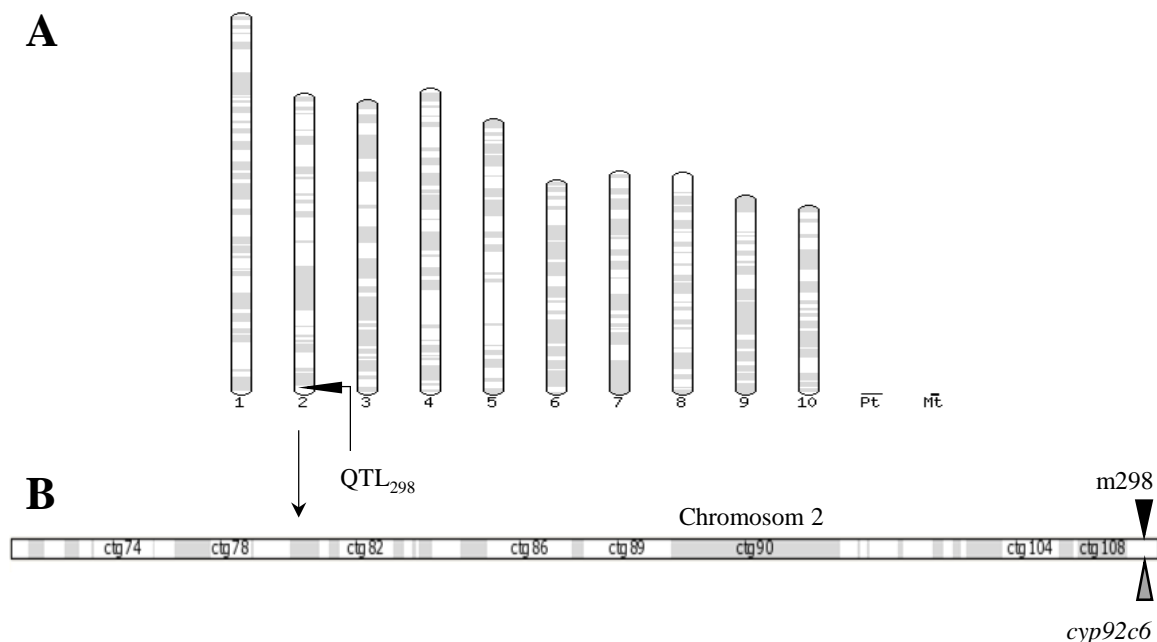


Abbildung 3.25 Lokalisation von QTL₂₉₈ im Maisgenom. Kalkulation der QTLs erfolgte mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnten die Marker auf Chromosom 2 lokalisiert werden (A). Zusätzlich wurde die Position vom QTL-Marker und des Kandidatengens *cyp92c5* mittels BLAST-Suche identifiziert (B).

3.3.3.2 CYP92C6 ist Herbivor-induziert und bildet TMTT *in vitro*

Weitere Untersuchungen waren nötig, um herauszufinden ob die lokalisierte Monooxygenase für die Biosynthese von TMTT verantwortlich ist. QRT-Analysen sollten klären, ob *cyp92c6* in der Elternlinie B73 nach der Behandlung mit dem Indanon-Derivat induzierbar ist und somit in einer erhöhten Kopienzahl vorliegt. Die Ergebnisse, welche in der Abb. 3.26 dargestellt sind, zeigen einen deutlichen Transkriptanstieg von *cyp92c6* nach Elicitor-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

¹³(dnelson@uthsc.edu)

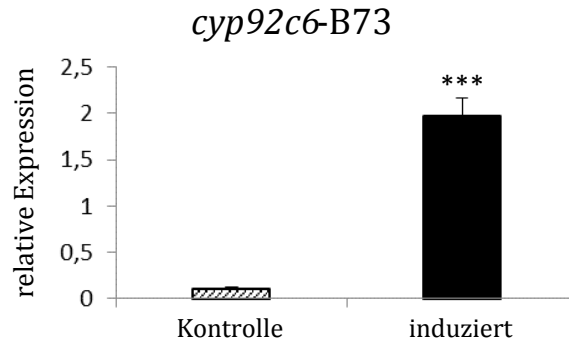


Abbildung 3.26 Expressionsvergleich von *cyp92c6* in induzierten und unbehandelten Blattmaterial von B73-Keimlingen. Blätter von jeweils drei biologischen Replikaten wurden nachmittags in 2,37 μ M Indanon (in Leitungswasser) für 24 h inkubiert. An diesem Material wurde die Transkriptakkumulation mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Abschnitt 2.2.8) und anschließend die Mittelwerte aus den biologischen Replikaten gebildet (Balken). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten Blättern wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet und P-Werte $<0,001$ (***) gekennzeichnet.

Um die Theorie zu bestätigen, dass *cyp92c6* das gesuchte Kandidatengen und mit dem QTL₂₉₈ assoziiert ist, wurden Aktivitätsstudien durchgeführt. Das Amplifizieren und Isolieren der mRNA von *cyp92c6* konnte nur mit einer spezifischen Polymerase für GC-reiche Sequenzen erreicht werden, welches für die anschließende Klonierung in den Hefevektor pESC-Leu erforderlich war. Nach heterologer Expression in Hefe konnten die Mikrosomen isoliert und für die Enzymassays genutzt werden. Die Assays erfolgten genau wie bei CYP92C5 jeweils mit und ohne Zugabe des Kofaktors NADPH zu den jeweiligen Substraten Geranylinalool und (*E*)-Nerolidol. CYP92C6 zeigte nur für Geranylinalool Aktivität (Abb. 3.27), währenddessen es nicht in der Lage war (*E*)-Nerolidol in DMNT umzusetzen¹⁴. Die Aktivitätsbestimmung mit einem Leervektor zeigte keinen Umsatz der Substrate. Die hohen Transkriptmengen von *cyp92c6* nach Herbivorie-Imitation und die Aktivitätsanalysen bestätigen die Theorie, dass *cyp92c6* vermutlich für den QTL₂₉₈ verantwortlich und essentiell für die TMTT-Biosynthese ist. Ein weiterer Hinweis ist die Mu-Insertionslinie (MuIII), welche ohne funktionelles CYP92C5 weiterhin TMTT synthetisieren kann.

¹⁴(Daten nicht gezeigt)

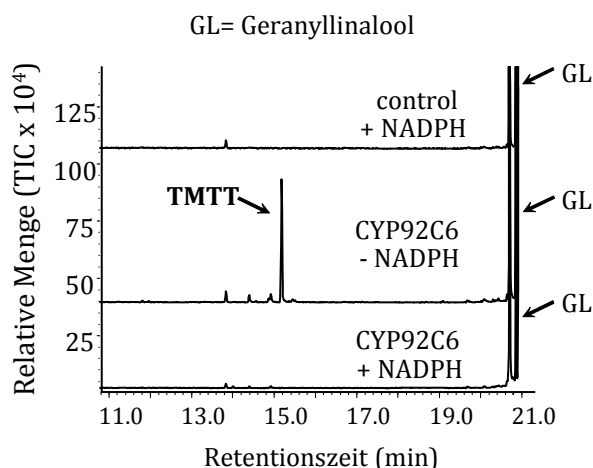


Abbildung 3.27 Aktivitätsbestimmung des rekombinant exprimierten P450-Enzym CYP92C6-B73. Die heterologe Expression erfolgte in den Hefestämmen WAT1 und W[®], welche zusätzlich eine *Arabidopsis thaliana* bzw. eine Hefe P450-Reduktase überexprimierten. Die isolierten Mikrosomen wurden mit dem Substrat (*E*)-Nerolidol bzw. Geranylinalool inkubiert. Die Auftrennung der mittels SPME-Faser isolierten Terpene erfolgte gaschromatographisch und die Detektion der Terpenprodukte durch einen Massenspektrometer, welcher an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards, konnte das Homoterpen TMTT identifiziert werden.

3.3.4 Der QTL_{405/406}

3.3.4.1 QTL_{405/406} ist essentiell für die Sesquiterpenbiosynthese

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nach QTLs gesucht, welche wichtig für die Sesquiterpenbiosynthese sind, um die Gene für diesen Biosyntheseweg identifizieren zu können. Die beiden QTLs, QTL₄₀₅ (PZA03154.4) und QTL₄₀₆ (PZA02733.1), auf dem Chromosom 3 konnten nicht für Mono- oder Homoterpene, sondern ausschließlich für (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten berechnet werden, welche in die Klasse der Sesquiterpene einzuordnen sind (Abb. 3.7). Nur (*E*)- β -Caryophyllen bildet eine Ausnahme, da für dieses Sesquiterpen dieser QTL nicht gefunden wurde. Der Marker m406 (PZA02733.1) liegt auf dem Chromosom 3 bei 203,3 Mb (Hap-MapV1; Abb. 3.28 A, B). Der Marker m405 liegt stromaufwärts bei 202,3 Mb (Hap-MapV1; Abb. 3.36). Im Bereich des QTL₄₀₆ konnte ein Gen, welches für eine putative Farnesyldiphosphatsynthase (FPPS) codiert, identifiziert werden. Diese Enzymklasse synthetisiert Farnesyldiphosphat (FPP), das Substrat für Sesquiterpene.

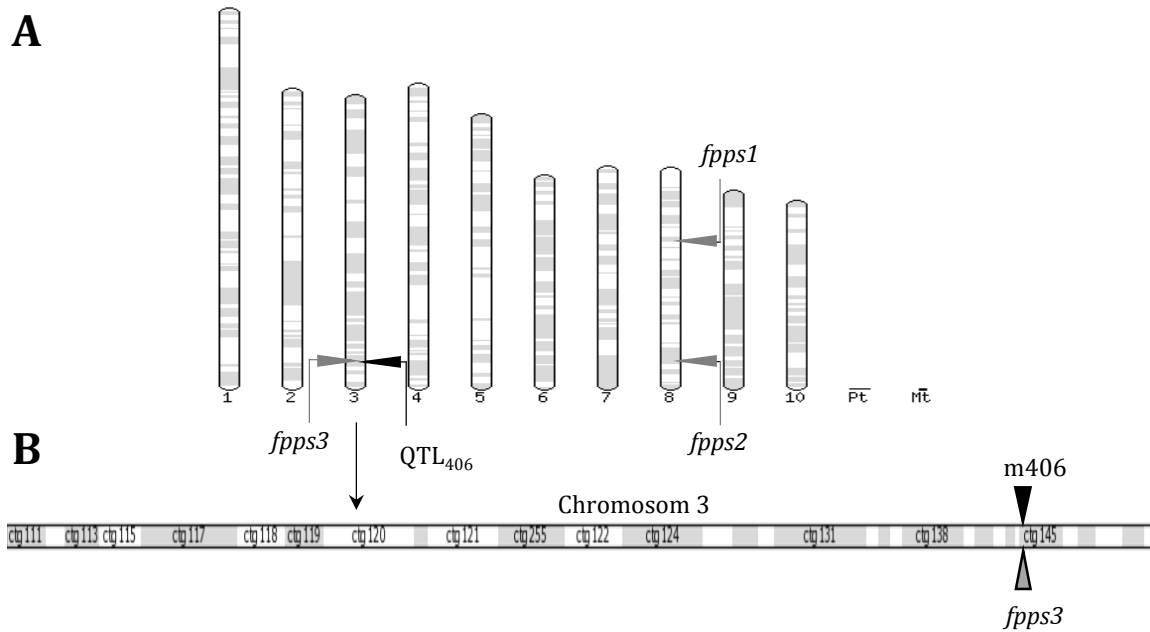


Abbildung 3.28 Lokalisation von QTL_{406} im Maisgenom.

(A) Kalkulation des QTLs erfolgte mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnte der Marker auf Chromosom 3 lokalisiert werden. Das Maisgenom enthält insgesamt drei putative Farnesyldiphosphatsynthasen (graue Pfeile).

(B) Zusätzlich wurde die Position des QTL-Markers und des Kandidatengens *fpps3* mittels BLAST-Suche identifiziert.

3.3.4.2 Das Maisgenom besitzt 3 Farnesyldiphosphatsynthasen

Die putative FPP-Synthase ist das dem QTL_{406} am nächsten liegende Gen und sollte somit weiter analysiert und charakterisiert werden. Das Gen liegt im QTL-Intervall auf dem Chromosom 3 bei 203,35 Mb (HapMapV1; Abb. 3.28 B) und ist nur 0,04 Mb von m406 entfernt. Eine BLAST-Suche mit der Nukleotidsequenz¹⁵ zeigte, dass das Maisgenom insgesamt zwei weitere Leserahmen für FPPS-Synthasen besitzt. Beide FPPS Gene befinden sich auf dem Chromosom 8, wovon *fpps1* (FPPS1, 63 Mb; GRMZM2G168681_P01) bereits als aktives Enzym publiziert wurde (Li & Larkins [1996]; Cervantes-Cervantes *et al.* [2006]). Das zweite noch unbekanntes Gen auf Chromosom 8 (153 Mb) wurde als *fpps2* (FPPS2, GRMZM2G147721_T01) und das auf Chromosom 3 befindliche Gen als *fpps3* (FPPS3, GRMZM2G098569_T01) bezeichnet. Alle drei Aminosäuresequenzen weisen typische Domänen für die Klasse der Prenyltransferasen auf, welches z. B. die aspartatreichen Motive SARM (FQ...DDxxD) und FARM (DD(xx)₁₋₂D...RRG) beinhaltet. Diese Motive sind für die katalytische Funktion entscheidend (Cervantes-Cervantes *et al.* [2006]; Koyama [1999]; Hemmi *et al.* [2003]). Die Kettenlänge bestimmende Region (CLD = engl.: *Chain-Length-*

¹⁵auf <http://www.maizesequence.org>

Determining) klassifiziert alle drei Proteine in Klasse I FPP-Synthasen, aufgrund von zwei aromatischen Aminosäuren in der 4. Und 5. Position stromaufwärts vom ersten „DDxxD“-Motiv (Abb. 3.29), (Hemmi *et al.* [2003]; Bouvier *et al.* [2005]). Beide aromatischen Aminosäuren zusammen mit der FARM Region korrelieren mit der Synthese von dem kurzkettigen Prenyldiphosphat FPP (Ohnuma *et al.* [1996]). Ein Sequenzvergleich der drei Gene verdeutlichte eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen *fpps2* und *fpps3* mit einer Identität von 92% auf Aminosäureebene, währenddessen *fpps1* nur 79,6–80% Identität zu den beiden Genen aufwies. Auffällig ist auch, dass die Gene *fpps2* und *fpps3* von 11 Exons mit identischer Exon-Intronstruktur kodiert werden, während *fpps1* aus 12 Exons besteht. Sequenzanalysen des N-Terminus mittels Signal-P deuten auf kein Signalpeptid hin, was für eine Enzymaktivität im Zytoplasma spricht. Für die nachfolgenden Experimente zur Charakterisierung von ZmFPPS3 wurden ZmFPPS2 und ZmFPPS1 zum Vergleich hinzugezogen.

	1				70	
FPPS2-B73	MATVEVVVANGLGADTKTV	FKETYSK	KLKEEMLDDPAFEF	TDESLQWIDRMLDYNVLGGK	CNRGLSVIDS	
FPPS3-B73	MATAEVVVANGSGGADTKTA	FKEIYSK	LQEMLEDPAFEF	TDESLQWIDRMLDYNVLGGK	CNRGLSVVDS	
FPPS1-B73	MAAGGNGAGG-DTRAA	FARIYKT	LKEELLTDPAFEF	TEESRQWIDRMDYDYNVLGGK	CNRGLSVVDS	
	71		FARM		140	
FPPS2-B73	YRILKGV	DVLSKEETFLACT	LGWCIEWLQAYFLVLD	DDIME	NSQTRRGQPCWFRVPQVGLI	AVNDGIILRN
FPPS3-B73	YKILKGV	DVLSKEETFLACT	LGWCIEWLQAYFLVLD	DDIME	NSQTRRGQPCWFRVPQVGLI	AVNDGIILRN
FPPS1-B73	YKLLKGADALGEEETFLACT	LGWCIEWLQAF	FFLVLD	DDIME	DSHTRRGQPCWFRVPQVGLI	AANDGIILRN
	141		CLD		210	
FPPS2-B73	HISRI	LQRHF	KGKPYVDVI	DLFNEVEFKTASGQMLDLIT	THEGEKDLTKYNLTVRRHIV	QYKTAYYSFY
FPPS3-B73	HISRI	LQRHF	KGKPYVDII	DLFNEVEFKTASGQMLDLIT	THEGEKDLTKYNLTVHRRIV	QYKTAYYSFY
FPPS1-B73	HISRI	LRHF	KGKPYADLL	DLFNEVEFKTASGQLLDLIT	THEGEKDLTKYNTIVHGRIV	QYKTAYYSFY
	211		SARM		280	
FPPS2-B73	LPVACALLLAGENLDNFGDV	KNILVEMGTY	FCVQDDYLD	FGDPEFIGKIGTDIEDYKCS	WLVVQALEHA	
FPPS3-B73	LPVACALLLAGENLENFVDV	KNILVEMGTY	FCVQDDYLD	FGDPEFIGKIGTDIEDYKCS	WLVVQALERA	
FPPS1-B73	LPVACALLLAGENLDNYGDV	ENILVEMGTY	FCVQDDYLD	YGDPEFIGKIGTDIEDYKCS	WLVVQALERA	
	281				350	
FPPS2-B73	DEKQK	NILFESYGKSDPACV	AKVKDLYKELKLEEVFQAYE	RESYNKLIADIEAQPSKAVQ	SVLKSFLHKI	
FPPS3-B73	AENQK	SILFENYKSDPACV	AKVKDLYKELKLEEVFHEYE	RESYNKLIADIEAQPSKAVQ	TVLKSFLHKI	
FPPS1-B73	DESQK	RILFENYKSDPACV	AKVKNLYKELDLEAVFQEYE	NESYKLIADIEAQPSIAVQ	KVLKSFLHKI	
	351					
FPPS2-B73	YKRDK					
FPPS3-B73	YKRDK					
FPPS1-B73	YKRQK					

Abbildung 3.29 Vergleich der Aminosäuresequenzen von FPPS1-B73, FPPS2-B73 und FPPS3-B73. In dem multiplen Alignment sind Unterschiede in den Aminosäuresequenzen grau hinterlegt. Die rot markierten und umrandeten AS definieren die FARM- und SARM-Motive. Gelb hinterlegte Aminosäuren sind die zwei aromatischen Aminosäuren der CLD-Region (CLD = engl.: *Chain-Length-Determining*).

3.3.4.3 QRT Analyse der putativen Prenyltransferasen im Elicitor-induzierten Blatt der Linien B73 und Delprim

Um die Regulation der Prenyltransferasen bei der Produktion von volatilen Terpenen nach Herbivorfraß zu ermitteln, wurde die Transkriptmenge von *fpps1*, *fpps2* und *fpps3* im Blattmaterial der Linie B73 und der Hybridlinie Delprim untersucht. Die Expressionsanalysen wurden an unbehandelten, mechanisch verwundeten und Elicitor-induzierten Blattmaterial durchgeführt. Für die QRT-PCR wurden Primerpaare verwendet (Anhang, Tab. 5.4), die sehr spezifisch für die zu untersuchenden Gene sind und jeweils an der gleichen Position der drei Gene binden. Dadurch entstehen gleich große, fast identische PCR-Fragmente, wodurch ein direkter Vergleich an Transkriptmenge der drei Gene ermöglicht wurde. (Abb. 3.30 A, B).

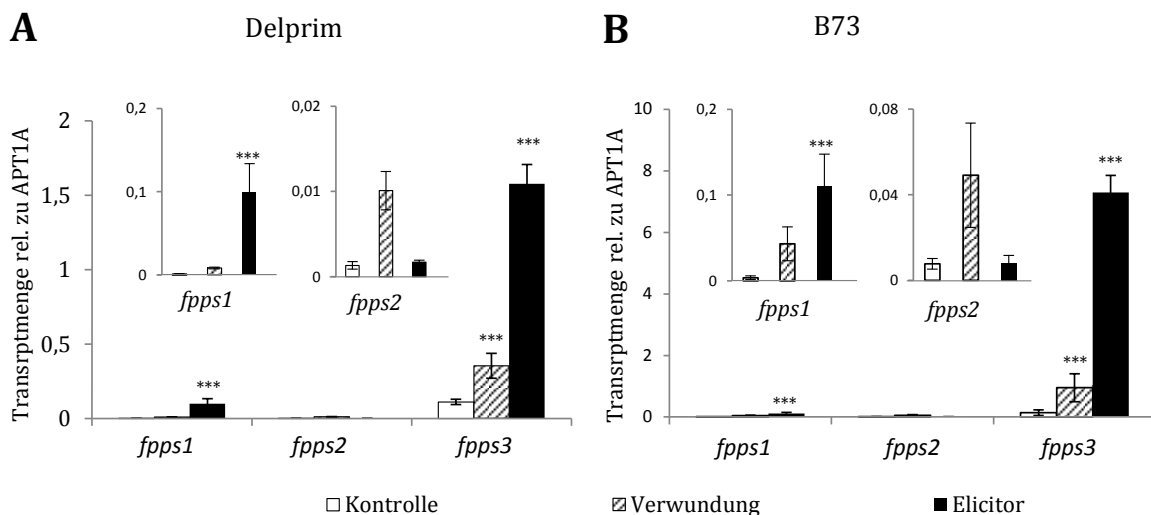


Abbildung 3.30 Expressionsvergleich der drei FPP-Synthasen an induzierten, mechanisch verwundeten und unbehandelten Blattmaterial von Delprim- und B73-Wurzeln. Blätter von jeweils drei biologischen Replikaten der Linien Delprim (A) und B73 (B) wurden nachmittags in 2,37 μ M Indanon (in Leitungswasser) oder nur in Leitungswasser (Verwundung) für 24 h inkubiert. An diesem Material wurde die Transkriptakkumulation von *fpps1*, *fpps2* und *fpps3* mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Kapitel 2.2.8) und anschließend die Mittelwerte aus den biologischen Replikaten gebildet (Balken). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-bahndelten Blättern wurden mittels einfaktorier ANOVA berechnet und P-Werte $<0,001$ durch *** gekennzeichnet.

In Delprim zeigte *fpps3* einen 3-fachen Anstieg in mechanisch verwundeten Blättern und einen 15-fachen Anstieg ($P \leq 0,001$; $t=6,9$) nach Elicitor Behandlung ($P \leq 0,001$; $t=4,6$) (Abb. 3.30 A). Die Maislinie B73 ergab ebenfalls einen signifikanten Anstieg der *fpps3* Expressionswerte nach Induktion, allerdings etwas höher als in Delprim (Abb. 3.30 B). Nach mechanischer Verwundung konnte ein rund 6-facher Anstieg ($P=0,001$; $t=3,791$) und nach Elicitor-Induktion ein 52-facher Anstieg in B73 ($P \leq 0,001$; $t=6,763$) nachgewiesen werden. Die Transkriptmenge der unverletzten

Kontrollen war in beiden Linien ungefähr gleich hoch. Vergleicht man die Kontrollwerte von *fpps3* mit den Expressionswerten der anderen beiden Gene, wird deutlich, dass diese in jedem Fall die von *fpps2* und *fpps1* übersteigen. Trotzdem zeigte auch *fpps1* einen signifikanten Anstieg an mRNA nach Elicitorbehandlung im Vergleich zu den unverletzten Kontrollen ($P=0,001$; $t=15,5$). Für das dritte Prenyltransferasegen, *fpps2*, konnte weder allein nach Verwundung noch nach Verwundung und zusätzlicher Gabe von Indanon-Derivat ein signifikanter Unterschied der Transkriptmenge ermittelt werden.

3.3.4.4 QRT Analyse der putativen Prenyltransferasen in *Diabrotica virgifera virgifera* induziertem Wurzelmaterial der Linie Delprim

Die Larven des westlichen Maiswurzelbohrers *Diabrotica virgifera virgifera* sind Maischädlinge, die die Wurzeln befallen. Die Wurzeln reagieren mit der Synthese von (*E*)- β -Caryophyllen (Köllner *et al.* [2008a]). Um zu testen, ob es eine Korrelation zwischen der Terpenemission und der Induktion der *fpps* Gene gibt, sollten QRT-Analysen der drei Prenyltransferasegene mit *D. virgifera*-induziertem Wurzelmaterial durchgeführt werden (Abb. 3.31 A). Zusätzlich wurden, wie im vorigen Versuch, mechanisch verwundete und unbehandelte Wurzeln zum Vergleich hinzugezogen. Ein Grund weshalb die Expressionsanalysen sowohl in B73 als auch in der Linie Delprim durchgeführt wurden, ist dass die Linie Delprim, im Gegensatz zu B73, in der Lage ist (*E*)- β -Caryophyllen zu synthetisieren (Köllner *et al.* [2008a]).

In Abb. 3.31 A ist der Expressionsvergleich der drei Prenyltransferasen in unterschiedlich behandeltem Wurzelmaterial der Linie Delprim dargestellt. Einzig *fpps3* zeigte signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Kontrollen und *D. virgifera*-induzierten Wurzeln ($P\leq 0,001$; $t=9,297$). Nach mechanischer Verwundung konnte keine signifikante Steigerung der mRNA Mengen gemessen werden. Vergleicht man die Expression von *fpps1* zwischen den unterschiedlich behandelten Wurzeln, sind nur geringe Differenzen festzustellen. Die Expressionswerte nach Fraßbefall liegen unter denen der Kontrollwerte. Insgesamt betrachtet konnte für *fpps1* eine relativ hohe, konstitutive Expression von *fpps1* in dem unterschiedlich behandelten Wurzelmaterial gemessen werden, welche ähnlich hoch ist wie die für *fpps3* nach Herbivorie. Für das dritte Gen, *fpps2*, sind Transkripte kaum detektierbar gewesen, sowohl in den Kontrollen als auch in den induzierten Wurzeln. Die QRT-Analyse von *tps23* zeigte einen signifikanten Anstieg der mRNA dieses Gens nach Behandlung mit dem Indanon-Derivat (Abb. 3.31 B). Nach mechanischer Verwundung ist ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge an *tps23* im Vergleich zu den Kontrollen detektiert worden.

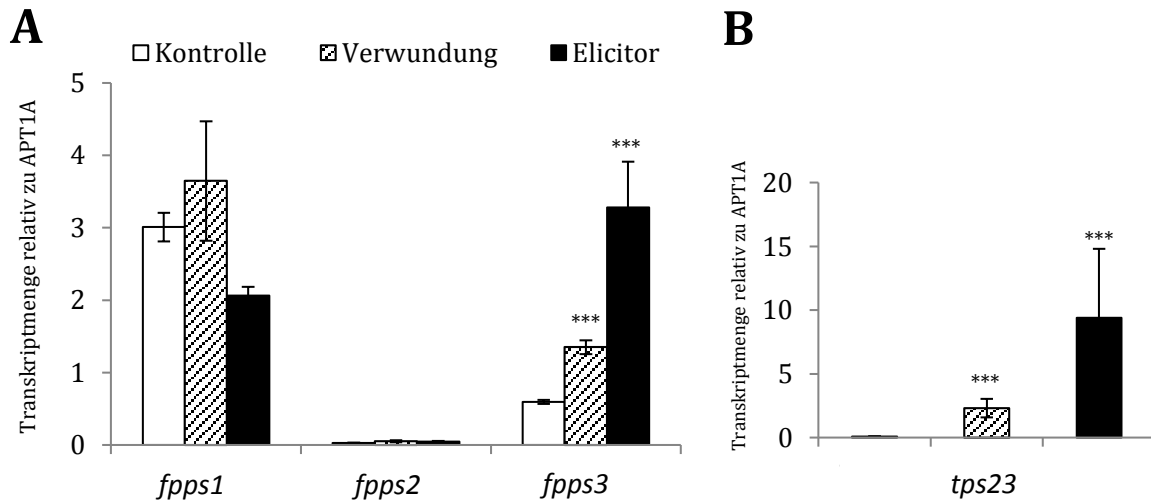


Abbildung 3.31 Expressionsvergleich der drei FPP-Synthasen und *tps23* an induzierten, mechanisch verwundeten und unbehandelten Blattmaterial von Delprim- und B73-Wurzeln. Blätter von jeweils drei biologischen Replikaten wurden nachmittags in 2,37 μ M Indanon (in Leitungswasser) oder nur in Leitungswasser (Verwundung) für 24 h inkubiert. An diesem Material wurde die Transkriptakkumulation von *fpps1*, *fpps2*, *fpps3* (A) und *tps23* (B) mittels quantitativer PCR gemessen. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Kapitel 2.2.8) und anschließend die Mittelwerte aus den biologischen Replikaten gebildet (Balken). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten bzw. mechanisch verwundeten Blättern wurden mittels einfaktorier ANOVA berechnet und P-Werte <0,001 durch *** gekennzeichnet.

3.3.4.5 Aktivitätsbestimmung der rekombinanten FPPS3 und FPPS2 *in vitro*

Die Lokalisation von *fpps3* im Bereich des QTL_{405/406} sowie die erhöhten Transkriptmengen in Blatt und Wurzel nach Verwundung bzw. Herbivorie, lassen eine Assoziation dieses Gens mit dem QTL vermuten. Um diese Theorie nachzuweisen, wurden Aktivitätsstudien durchgeführt. Für diese Assays wurden die offenen Leserahmen von *fpps2* und *fpps3* in Expressionsvektoren kloniert, welche entweder 6 Histidine am C- oder am N-Terminus besitzen. Herr Dr. Köllner isolierte bereits die mRNA der putativen Farnesyldiphosphatsynthase 3 aus dem B73 Maisgenom, welche somit für alle Folgeschritte zur Verfügung stand. Die Isolation der cDNA von FPPS2 erwies sich als schwierig. Durch die sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu FPPS3 entstanden durch PCR-Fehler stets Chimäre aus FPPS3 und FPPS2. Erst spezifische Primer mit Bindestelle im UTR-Bereich ermöglichten die Isolation der gewünschten Sequenz (Anhang, Tab. 5.4). Außerdem musste eine Nested-PCR durchgeführt werden, da die Menge an *fpps2* Transkripten in sehr geringer Konzentration in der aus induzierten Blättern isolierten RNA vorlag. Die heterologe Expression erfolgte in *E. coli* mit anschließender Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie. Für die Aktivitätsbestimmungen wurden die gereinigten Proteine zusammen mit den Substraten IPP (60 μ M)

und DMAPP (30 μ M) inkubiert. Die Enzymprodukte wurden durch Säurehydrolyse in flüchtige Alkohole überführt, welche durch SPME isoliert und mittels GC-MS vermessen wurden. Mit diesem Assay konnten die Enzyme gleichzeitig auf Aktivität als Geranyl-, Farnesyl- und Geranylgeranyldiphosphat Synthase getestet werden, da sich diese Enzyme nur durch das Anhängen unterschiedlich vieler IPP-Einheiten an DMAPP unterscheiden (Abb. 3.32 A, D). Durch anschließende Zugabe von Salzsäure wurden die nicht leicht detektierbaren Prenyldiphosphate GPP/FPP/GGPP in Geraniol/Farnesol/Geranyllinalool überführt. Das aufgereinigte FPPS3 zeigte eine Aktivität als FPP-Synthase, so dass hohe Mengen an Farnesol gemessen werden konnten. Eine Aktivität als GPP-Synthase wurde unter diesen Bedingungen nicht festgestellt, da kein Geraniol, das entstehende Säurehydrolyseprodukt aus GPP, detektiert wurde. Allerdings wurden noch geringe Mengen des nur schwer flüchtigen Geranyllinalool auf der GC-MS identifiziert, wodurch eine geringe Aktivität als GGPP-Synthase gezeigt werden konnte (Abb. 3.32 D). In identischen Versuchen mit dem aufgereinigten Proteinextrakt von FPPS2 konnte gezeigt werden, dass FPPS2 keinerlei Aktivität als Prenyltransferase besitzt. Es konnte eine sehr geringe Menge an Farnesol gemessen werden. Allerdings entsprach diese Menge die der Negativkontrolle (Abb. 3.32 C), welche mit einem Leervektor durchgeführt wurde. Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der Enzyme nachzuweisen, ist das Zugeben eines Proteinextraktes mit einer Terpensynthase (Abb. 3.30 B). Damit kann das von FPPS3 synthetisierte FPP als Substrat für die Terpensynthase genutzt werden. Dafür wurde *tps23* aus der Maislinie Delprim verwendet. Im Ansatz von FPPS3 wurde (*E*)- β -Caryophyllen vermessen und somit die Biosynthese dieses Terpens *in vitro* nachgestellt. Mit FPPS2 wurde kein (*E*)- β -Caryophyllen gebildet¹⁶. Die Aktivitätsanalysen von FPPS3 verstärken die Theorie, dass *fpps3* das gesuchte Kandidatengen ist und mit dem QTL_{405/406} assoziiert sein könnte.

¹⁶(Daten nicht gezeigt)

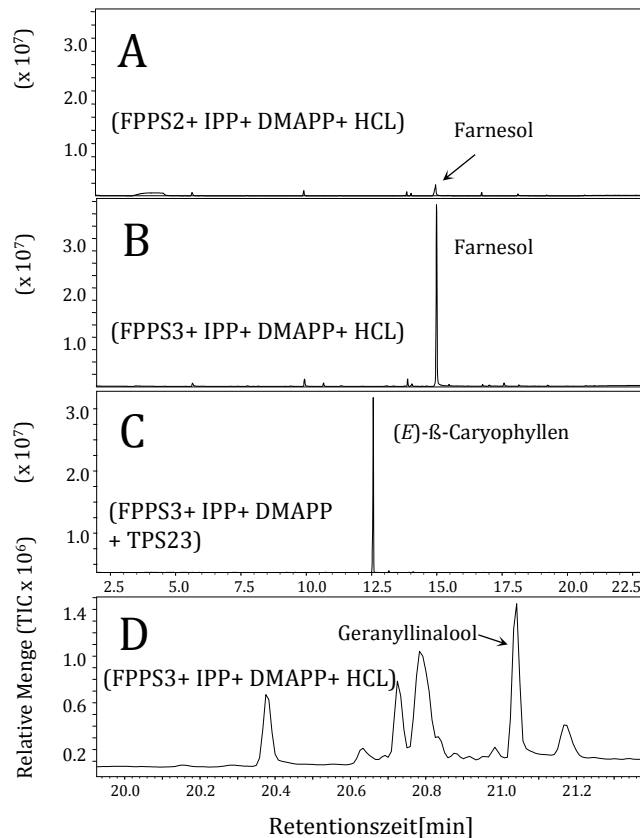


Abbildung 3.32 Aktivitätsbestimmungen der rekombinant exprimierten FPPS3-B73 und FPPS2-B73. Die heterolog in *E. coli* exprimierte Proteine wurden über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt.

(A) FPPS3-B73 wurde mit IPP (60 μ M) und DMAPP (30 μ M) inkubiert.

(B) Zusätzliche Zugabe der (*E*)- β -Caryophyllensynthase TPS23-Delprim.

(C) Aktivitätsbestimmung von FPPS2-B73 durch Zusatz von IPP und DMAPP.

(D) IPP (60 μ M) und DMAPP (30 μ M) liegen in höherer Menge im Assay von FPPS3-B73 vor.

(A-D) Die mittels SPME-Faser isolierten Terpene wurden gaschromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Terpenprodukte erfolgte durch ein Massenspektrometer, welches an die GC gekoppelt ist (GC-MS). Durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Standards, konnte Farnesol, (*E*)- β -Caryophyllen und Geranylinalool (GL) identifiziert werden.

3.3.4.6 Der QTL_{405/406} beruht auf einer Veränderung in der Elternlinie

Ky21 die nur eine geringere Menge von Sesquiterpenen emittiert

Nach der Charakterisierung der FPP-Synthase 3 sollte nun geklärt werden, welche der 26 Elternlinien für die Ausprägung des QTL verantwortlich sind. In diesen Linien sollte anschließend die Gensequenz von *fpps3* mit der von B73 auf mögliche Unterschiede verglichen werden. Dies könnte Hinweise darauf geben, ob *fpps3* das Kandidatengen ist und mit dem QTL assoziiert sein könnte. Die NAM-Kartierung wurde demzufolge mit dem SAS-Programm wiederholt, nur jeweils unter Ausschluss einer anderen Linie. Die Kalkulationen ohne die Inzuchtlinie Ky21 ergab keinen QTL₄₀₆ auf Chromosom 3 für die analysierten Terpene (Abb. 3.33). Stellt man die Berechnung so um, dass das

Mapping allein mit den Werten von B73 und Ky21 vollzogen wird, erhält man den QTL_{405/406} und zusätzlich einen QTL auf Chromosom 1. Dieser Locus ist allerdings nicht signifikant ($>0,00001$), wodurch er stark unter den verschiedenen Merkmalen variiert. So wurde der QTL₁₁₂ für (*E*)- α -Bergamoten, QTL₁₃₇ für (*E*)- β -Farnesen und QTL₁₄₄ für (*E*)-Nerolidol errechnet. Auf diese Loci soll in dieser Arbeit jedoch nicht genauer eingegangen werden.

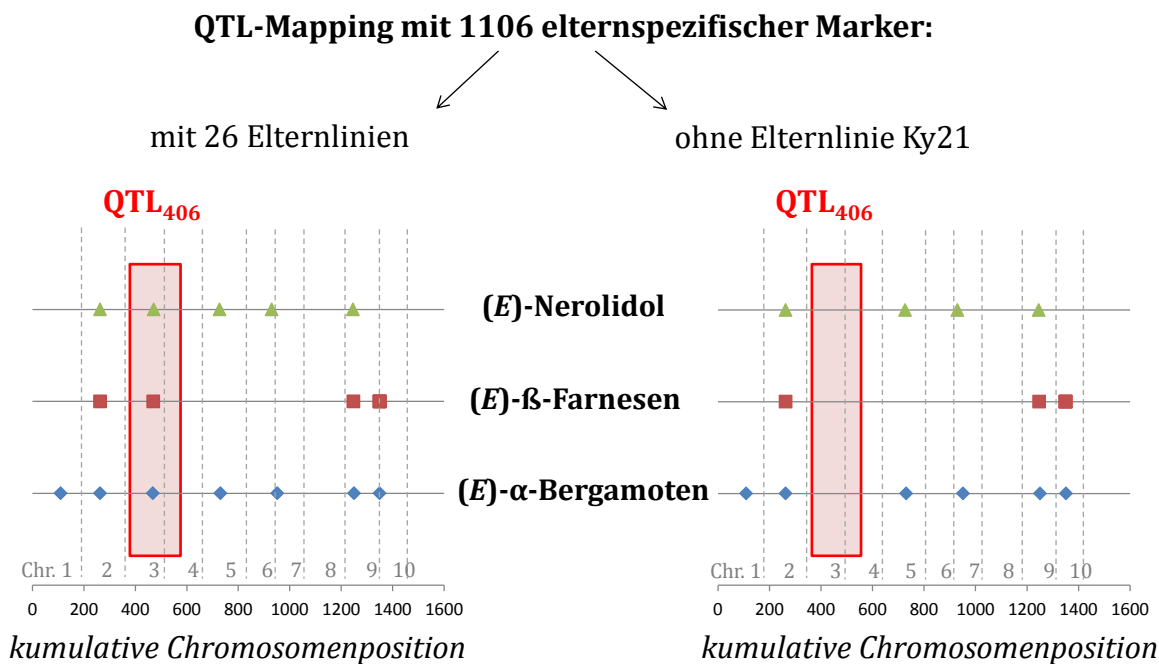


Abbildung 3.33 QTLs der Terpene (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten mit und ohne die Elternlinie Ky21. Es wurden die QTLs der zu untersuchenden Merkmale (y-Achse) mittels Assoziationskartierung berechnet. Für die Kalkulationen wurden 1106 elternspezifische Marker verwendet. Die QTLs wurden gegen die kumulative Chromosomenposition (x-Achse) aufgetragen (additive Chromosomenposition). Die gestrichelten Linien markieren jeweils die Grenzen der Chromosomen 1-10, wodurch ersichtlich ist auf welchem Chromosom die QTLs lokalisiert sind. Der rot umrahmte QTL ist der QTL₄₀₆ auf dem Chromosom 3.

Da der QTL_{405/406} einzig zwischen den Linien B73 und Ky21 berechnet werden konnte, wurden die Terpenspektren dieser beiden Maissorten miteinander verglichen (Abb. 3.18). Unter Abschnitt 3.3.1.10 wurde bereits festgestellt, dass die Linie Ky21 keine TPS2-Produkte akkumuliert. Zusätzlich ist in der Abbildung 3.18 eine verminderte Sesquiterpenemission in Ky21 im Vergleich zu B73 zu sehen. Diese Daten korrelieren auch mit dem Datensatz „Phänotypisierung der 26 NAM-Inzuchtlinien auf Terpenemission“, welcher unter Abschnitt 3.1.1 (Abb. 3.1) beschrieben wurde.

3.3.4.7 Das Strukturgen *fpps3* zeigt keine Unterschiede zwischen dem B73- und dem Ky21-Allel, jedoch ist die Transkriptmenge von *fpps3* in der Linie Ky21 verringert

Eine Ursache für die geringere Produktion aller volatilen Sesquiterpene in der Linie Ky21 könnte eine verringerte Aktivität der FPPS3 sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollten die *fpps3* Allele von Ky21 und B73 verglichen werden. Dafür sollte ein Sequenzvergleich der *fpps3* Allele zwischen den Elternlinien B73 und Ky21 durchgeführt werden. Das Allel von Ky21 wurde zuerst sequenziert, da für die Linie Ky21 keine Datenbank zur Verfügung steht. Die mRNA von *fpps3* wurde mittels RACE-PCR erfolgreich amplifiziert. Im anschließenden Sequenzvergleich wurden keinerlei Sequenzunterschiede im offenen Leserahmen identifiziert, wodurch folglich der Fokus auf die Induzierbarkeit des *fpps3*-Ky21 Allels nach Herbivorie gelegt wurde. Für die Expressionsanalysen wurden die gleichen Primer wie bereits unter Absatz 3.3.4.3 verwendet (Tabelle 5.4, siehe Anhang). Als Pflanzenmaterial wurden nicht-induzierte und 24 h Elicitor-induzierte Blätter eingesetzt, an denen quantitative RT-PCR durchgeführt wurde. Vergleicht man nun die Transkriptmenge zwischen unbehandelten und Elicitor-behandelten Maisblättern, ist eine deutlich signifikante Induktion ($P < 0,001$) für beide Linien erkennbar, wenn auch mit unterschiedlich starker Intensität (Abb. 3.34). Analog zu den Emissionswerten, ist in Ky21 nach Induktion eine viel geringere Expression an *fpps3* zu verzeichnen ($P < 0,001$, $t = 7,136$). Die Kontrollen sehen mit sehr geringen, kaum detektierbaren Transkriptmengen für beide Linien gleich aus.

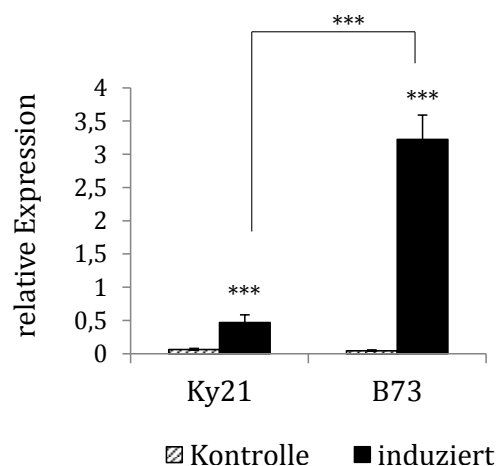


Abbildung 3.34 QRT Analyse von *fpps3* an unbehandelten und induzierten Pflanzenmaterial der Linien Ky21 und B73. Die Balken entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 3 biologischen Replikaten. Für das Blattmaterial wurden Blätter nachmittags in $2,37 \mu\text{M}$ Indanon (in Leitungswasser) für 24 h inkubiert. Die relative Expression wurde gegen das Referenzgen APT1 gerechnet (siehe Kapitel 2.2.8). Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Elicitor-behandelten Blättern wurden mittels einfaktorierter ANOVA berechnet und P-Werte $< 0,001$ (***) gekennzeichnet.

Um zu prüfen, ob die geringere Transkriptmenge von *fpps3* in Ky21 auf eine verringerte Promoteraktivität des Ky21-Allels zurückzuführen ist, sollte der Promoter mit dem des B73-Allels verglichen werden. Auch hier gab es keine Unterschiede in den ersten 500 bp stromaufwärts des Startcodons (Abschnitt 5.1, siehe Anhang). Das Amplifizieren des Promoters stromaufwärts von -500 bp in Ky21 war erfolglos. Allerdings ist dies notwendig um eine vollständige Aussage über die Funktionalität des Promoters treffen zu können. Aufgrund dessen wurde eine Datenbank von der Cornell University zu Hilfe gezogen. Auf dieser Webseite¹⁷ ist es möglich kurze Sequenzen der NAM-Linien zu erhalten. Demzufolge wurde eine Anfrage für Sequenzen bis zu 1000 bp stromaufwärts von *fpps3* gestellt. Der Bereich setzte sich aus insgesamt 34 Sequenzen, bestehend aus jeweils 61 bp, zusammen. Durch Ermitteln der korrekten Orientierung und multiplen Sequenzvergleich konnte festgestellt werden, dass die Promotoren der beiden Linien nur kleine Unterschiede aufweisen (Abschnitt 5.1, siehe Anhang). Allerdings überlappen die Sequenzen nicht in allen Bereichen, so dass die Promotersequenz in Ky21 nicht ganz geklärt werden konnte. Die Sequenzvergleiche zwischen dem *fpps3*-Ky21 Allel und dem B73-Allel konnten keine Unterschiede im Strukturgen und nur wenige im Promoter nachweisen. Somit liegt kein Unterschied in der Enzymaktivität von FPPS3 in beiden Elternlinien vor. Unterschiede in der Promoteraktivität zwischen beiden Allelen können nicht ganz ausgeschlossen werden, wodurch in nachfolgenden Experimenten die Expression von Terpenbiosynthesegenen analysiert werden sollte.

3.3.4.8 Weitere Gene der Terpenbiosynthese zeigen eine verminderte Expression in Ky21

Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob eine verminderte Induktion allein für *fpps3* in Ky21 vorliegt oder auch andere Gene der Terpenbiosynthese betroffen sind. Diese Fragestellung sollte klären, ob der QTL direkt mit *fpps3* oder mit einem anderen regulatorischen Faktor in dieser Chromosomenregion assoziiert ist. Weitere Gene der Terpenbiosynthese, welche sich zur Expressionsanalyse eignen, sind Schlüsselenzyme wie *tps10*, *tps2*, *cyp92c5* und *cyp92c6*. Unter der Annahme dass diese Gene über die gleiche Signalkaskade reguliert werden wie *fpps3*, könnte eine QRT-Analyse Aufschluss geben, ob ein regulatorischer Faktor oder eine geringere Promoteraktivität von *fpps3* für den Phänotyp in Ky21 verantwortlich ist. Die Expressionsanalysen für die Gene der Schlüsselenzyme wurden an Elicitor-behandelten Blättern der Elternlinien B73 und Ky21 durchgeführt (Abb. 3.35). So konnte für B73 ein viel stärkerer Expressionsanstieg der getesteten Gene gemessen werden als in Ky21. Nur *tps2* scheint eine Ausnahme zu sein. Während in Ky21 erhöhte Transkriptmengen

¹⁷<http://www.biotech.cornell.edu>

für *tps10*, *cyp92c5* und *cyp92c6* nach Elicitor-Behandlung festgestellt wurde, konnte kein Anstieg der Transkriptmenge von *tps2* (Abb. 3.35; Abb. 3.19) in dieser Linie detektiert werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem geringeren Terpenmengen an (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen und dem Fehlen der TPS2-Produkte in der Inzuchtlinie Ky21 (Abb. 3.1; Abb. 3.18).

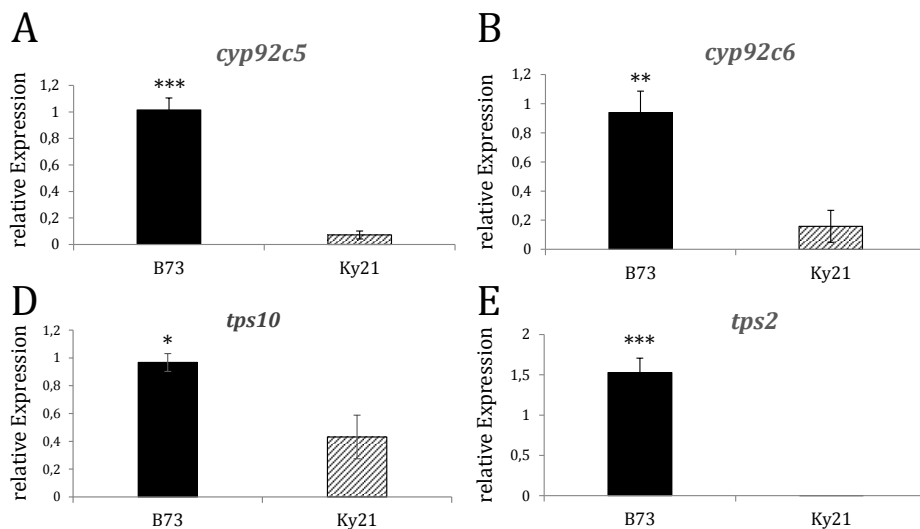


Abbildung 3.35 QRT Analyse von *cyp92c5*, *cyp92c6*, *tps2* und *tps10* an Elicitor-induzierten Pflanzenmaterial der Linien Ky21 und B73. Die Balken entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 3 biologischen Replikaten. Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen B73 und Ky21 wurden mittels einfaktorier ANOVA berechnet und P-Werte sind wie folgt: P=0,039 (*), P=0,013 (**), und P<0,001 (***) gekennzeichnet. Terpeninduktion erfolgte wie in Abb. 3.15 beschrieben.

3.3.4.9 Ein bHLH-Transkriptionsfaktor könnte für den Phänotyp von Ky21 verantwortlich sein

Die Tatsache, dass nicht nur *fpps3*, sondern auch *tps10* und die beiden P450 Gene eine ähnlich geringe Transkriptmenge nach Elicitor-Behandlung in Ky21 zeigen, deutet auf Unterschiede in der Signalkaskade zwischen Ky21 und B73 hin. Demzufolge wurde nach weiteren Kandidatengenen gesucht, die einen Einfluß auf die Regulation der Terpenbiosynthese haben könnten. Dabei wurde speziell nach regulatorischen Genen wie Transkriptionsfaktoren oder Kinasen gesucht. Ein Transkriptionsfaktor, bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) liegt bei 202,8 Mb zwischen dem QTL₄₀₅ und QTL₄₀₆ (Abb. 3.36). Die Lokalisation des bHLHs zwischen beiden QTL-Markern würde erklären, weshalb zwei QTLs berechnet wurden.

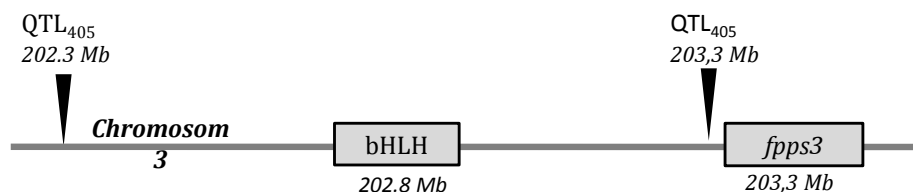


Abbildung 3.36 Lokalisation von QTL₄₀₅, QTL₄₀₆, *fpps3* und *bHLH* im Bereich 202–203 Mb auf Chromosom 3. Die QTLs wurden mittels Assoziationskartierung unter Verwendung 1106 elternspezifischer Marker errechnet. Durch eine BLAST-Suche auf <http://www.maizesequence.org> konnten die Marker und die beiden Gene auf Chromosom 3 lokalisiert werden.

Vorexperimente zeigten eine deutliche Induktion des Transkriptionsfaktors *bHLH* (GRMZM2G159937) nach Behandlung mit dem Indanon-Derivat¹⁸. Daraufhin wurde die Expression dieses Gens zwischen B73 und Ky21 verglichen (Abb. 3.37 B). Beide Linien zeigten eine starke Transkriptakkumulation dieses TFs nach Elicitor-Behandlung. Innerhalb von 4 Stunden nach Fraß von *Spodoptera littoralis* konnte festgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor bereits nach einer halben Stunde das Expressionsmaximum erreichte (Abb. 3.37 A). Wenig später, nach weiteren 30 Minuten wurde ein Rückgang der Transkriptmenge des TFs gemessen.

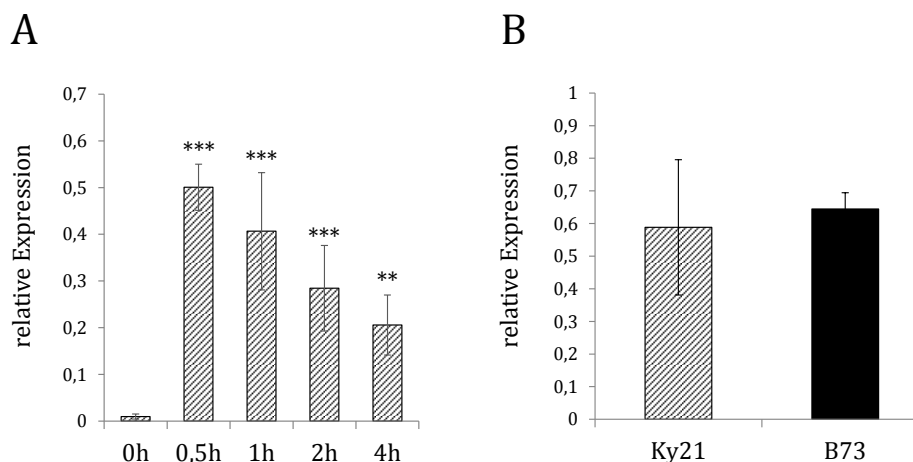


Abbildung 3.37 QRT Analyse von *bHLH* an induzierten Pflanzenmaterial der Linien Ky21 und B73 und an einem B73-Zeitkurs über 4 Stunden. Die Balken entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 3 biologischen Replikaten. Zusätzlich wurde der Standardfehler berechnet.

(A) Zeitkurs über 4 Stunden nach Fraß von *Spodoptera littoralis* in der Linie B73.

(B) Expressionsvergleich des *bHLH* Transkriptionsfaktors zwischen den Elternlinien Ky21 und B73 nach Indanon-Behandlung.

Mittels einfaktorieller ANOVA wurde die Signifikanz der Expressionswerte im Zeitkurs berechnet. Dabei wurden alle Zeitwerte mit dem Null-Stundenwert verglichen. $P < 0,001$ (***) ; $P = 0,002$ (**).

Ein Sequenzvergleich zwischen den Eltern B73 und Ky21 sollte letztlich die Frage klären, ob dieser *bHLH*-Bindefaktor verantwortlich für den QTL₄₀₆ sein könnte. Da

¹⁸(Daten nicht gezeigt)

die Expression scheinbar unverändert in Ky21 ist, wurde das Gen auf Sequenzunterschiede analysiert, welche die Funktionalität des Transkriptionsfaktors beeinflussen könnten. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen in Abb. 3.38 zeigt das Fehlen von 41 Aminosäuren im Ky21-Allel im Vergleich zum B73-Allel, während die restlichen Aminosäuren identisch sind. Diese relativ große Deletion liegt jedoch nicht in der DNA-Binde- oder Dimerisierungsregion (rote Aminosäuren in Abb. 3.38). Allerdings ist das N-terminale Ende wichtig für die Interaktion des AtMYC2 (bHLH) Transkriptionsfaktors mit dem JAZ-Protein (Chini *et al.* [2007]; Niu & Figueroa [2011]; Abb. 3.38). Da bHLH Transkriptionsfaktoren als Homo- oder Heterodimere aktiv vorkommen, ist die Dimerisierungsregion dieses TFs eine ebenso wichtige Region wie die DNA-Binderegion. Ein Leucin (mit Dreieck unterlegte AS in Abb. 3.38) in der ersten Helix-Domäne kommt in allen bHLH Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis vor und scheint unter anderen sehr wichtig für den Dimerisierungsprozess zu sein (Brownlie *et al.* [1997]; Toledo-Ortiz *et al.* [2003]). Die 13. und 16. Aminosäure der Basic-Domäne geben an, ob ein bHLH an E-Boxen (CANNTG) binden kann, welche in Promotoren vorkommen (Fisher & Goding [1992]; Littlewood & Evan [1998]; Atchley *et al.* [1999]). Zwischen denjenigen die in der Lage sind, wird weiterhin unterschieden, ob diese E-Boxen (CAGCTG) oder G-Boxen (CACGTG) binden. Dafür sind die Aminosäuren an Position 9, 13 und 17 in der Basic-Domäne entscheidend (Atchley *et al.* [1999]; Toledo-Ortiz *et al.* [2010]). Kommen wie in dem identifizierten bHLH in Abb. 3.38 ein His/Lys-9, Glu-13 und Arg-17 vor, so bindet diese Gruppe der bHLHs an G-Boxen (grün hinterlegte AS in Abb. 3.38). Die blau dargestellten Aminosäuren stellen das typische N-terminale Ende von bHLH-MYC Transkriptionsfaktoren dar.

	1		70
B73	MAWSETDAALFAAVLGRDAAHHLSTTPPHQDAPAASAPELQARLQDLVERGGAWTYGIFWQESCAGGRAV		
Ky21	MAWSETDAALFAAVLGRDAAHHLSTTPPHQDAPAASAPELQARLQDLV-----		
	71		140
B73	LGWGDGHCRDGGAPHHDDADRSVARKRALLRLHALYGGGDDEGADYALRLDRVTAEMYFLASMYFSFPE		
Ky21	-----DRSVARKRALLRLHALYGGGDDEGADYALRLDRVTAEMYFLASMYFSFPE		
	141		210
B73	GAGGPGHALATARHAWATVDPAPGWYVRASLAQSAGLRTVVFLPCKGGVLELGSAVPVRETPELRLALQT		
Ky21	GAGGPGHALATARHAWATVDPAPGWYVRASLAQSAGLRTVVFLPCKGGVLELGSAVPVRETPELRLALQT		
	211		280
B73	ALAVARPPAREECMRIFGQDLSPGGSARAPRSVDNWAPHPHLAAQATAASALASKEAAAGHKAPEPPRSI		
Ky21	ALAVARPPAREECMRIFGQDLSPGGSARAPRSVDNWAPHPHLAAQATAASALASKEAAAGHKAPEPPRSI		
	281		350
B73	DFSKPGKPGHGQAGGEERRPRKRGRKPAN GREEPLN VEA RQR TEKLNQR FYALRAVVPKISKMDKASL	<u>Basic</u> <u>Helix</u> <u>Loop</u>	
Ky21	DFSKPGKPGHGQAGGEERRPRKRGRKPAN GREEPLN VEA RQR TEKLNQR FYALRAVVPKISKMDKASL	* * ▲	
	351	<u>Helix</u>	420
B73	LSDAIAYIQELEDRLRGGGGGGGCSAARPDSPDVEVKAMQDEVVLRVTTPLYAHPVSRVFHAIRDAELI		
Ky21	LSDAIAYIQELEDRLRGGGGGGGCSAARPDSPDVEVKAMQDEVVLRVTTPLYAHPVSRVFHAIRDAELI		
	421		467
B73	VAASDVAVADEAVTHTLVLRSPGPEQLTAETVLAAMSRGMTSATPSP		
Ky21	VAASDVAVADEAVTHTLVLRSPGPEQLTAETVLAAMSRGMTSATPSP		

Abbildung 3.38 Vergleich der Aminosäuresequenzen von bHLH-B73 und bHLH-Ky21. In dem multiplen Alignment sind Unterschiede in den Aminosäuresequenzen grau hinterlegt. Die rot dargestellten AS definieren die basic-Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH) einschließlich der DNA-Binde- und Dimerisierungsregion. Die Sternchen-markierten Aminosäuren an der 13. und 16. Stelle der Basic-Domäne sind charakteristisch für E-Box bindende bHLHs. Die grün hinterlegten Aminosäuren sind typisch für G-Box bindende bHLHs. Das Leucin in der Helix-Domäne, welches mit einem Dreieck unterlegt ist, scheint wichtig für die Dimerisierung zu sein. Blaue Aminosäuren zeigen das typische N-terminale Ende von bHLH-MYC Transkriptionsfaktoren. Die schwarz unterlegten Aminosäuren werden in dem bHLH Transkriptionsfaktor AtMYC2 für Interaktionen mit JAZ-Proteinen benötigt.

3.3.4.10 Pflanzenhormone wie JA, OPDA und ABA sind in Ky21 stark reduziert nach der Behandlung mit einem Indanon-Derivat

Pflanzeigene Hormone wie Abscisinsäure (ABA), Salicylsäure (SA), Ethylen (ET) und Jasmonsäure (JA) sind unter anderen wichtig für die biotische und abiotische Stressantwort (Adie *et al.* [2007]; Bari & Jones [2009]). Diese Hormone bilden ein regulatorisches Netzwerk, wodurch die Pflanze in der Lage ist, gezielt auf die unterschiedlichen Pflanzenfeinde zu reagieren. Als weiterführendes Experiment wurden Pflanzenhormone zwischen den beiden Elternlinien B73 und Ky21 nach Herbivor-Imitation verglichen. Da eine sehr frühe Induktion des bHLHs in den Expressionsanalysen im

Zeitkurs gezeigt werden konnte, wurde eine Funktion noch vor der Jasmonsäure oder bei der Aktivierung von Jasmonsäure zu JA-Ile vermutet. Darüber sollte eine Messung der JA- und JA-Ile (Jasmonsäureisoleucin) Mengen Aufschluss geben. Induzierte Pflanzenproben von Ky21 und B73 wurden aufbereitet und schließlich von Sandra Irmisch am Max-Planck-Institut Jena auf der LC-MS vermessen. Dabei konnten signifikante Unterschiede von ABA (Abscisinsäure), JA und *cis*-OPDA (*cis*-(+)-12-Oxophytodiensäure) zwischen den beiden Eltern detektiert werden (Abb. 3.39). In Ky21 wurden für jedes der gemessenen Hormone signifikant geringe Mengen akkumuliert. Die aktive Form der Jasmonsäure (+)-iso-JA-Ile aber auch (-)-JA-Ile konnten in B73 in nur sehr geringen Mengen detektiert werden, während in Ky21 alle Messwerte um die Null lagen. Die geringen Mengen an Pflanzenhormonen in Ky21 vergleichsweise zu B73 verdeutlichen, dass die Signaltransduktionskaskade in Ky21 verändert ist und folglich zu einer geringeren Terpenbiosynthese in dieser Linie führt. Die Ergebnisse lassen eine Rolle des bHLHs in der Signalkaskade vermuten, weshalb dieser als Kandidatengen mit dem QTL_{405/406} assoziiert sein könnte.

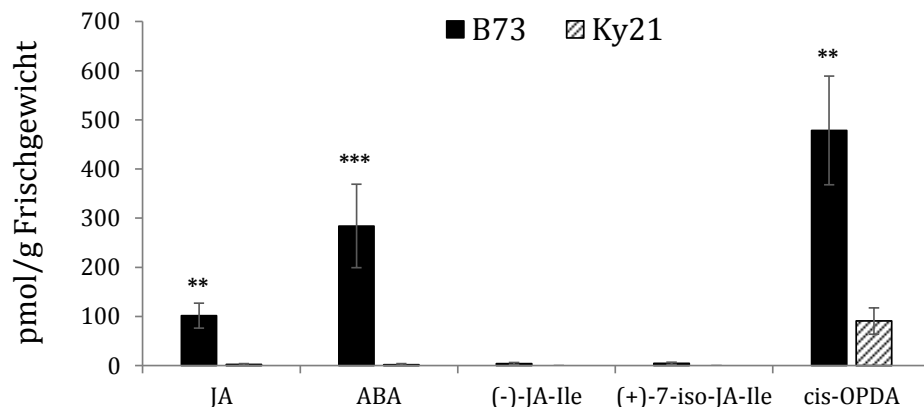


Abbildung 3.39 Vergleich der Phytohormonmengen in induziertem Pflanzenmaterial der Linien Ky21 und B73. Die Induktion erfolgte durch ein Indanon-Derivat wie in Abb. 3.15 beschrieben. Die Gehälter der Hormone wurde in pmol g^{-1} Frischgewicht auf der LC-MS gemessen. Die Mittelwerten und Standardfehler wurden aus jeweils 4 biologischen Replikaten berechnet. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe der einfaktorischen ANOVA. $P < 0,001$ (***); $P = 0,005$ (**).

4 Diskussion

4.1 Eine hohe genetische Diversität in der NAM-Population ist für quantitative Unterschiede in deren Terpenakkumulation verantwortlich

Die Elternlinien der NAM-Population sind durch eine besonders hohe genetische Diversität bzw. Allelvielfalt gekennzeichnet und aus diesen Gründen für das NAM ausgewählt worden (Burstin *et al.* [1994]; Liu *et al.* [2003]; Buckler *et al.* [2009]; McMullen *et al.* [2009]). Wie zu erwarten spiegelt sich diese Diversität innerhalb der Population auch in der Terpenakkumulation nach Elicitor-Behandlung wieder. So sind beispielsweise einige Linien durch eine besonders hohe Terpenakkumulation gekennzeichnet (B97, CML288, IL14H und Tx303). Andere Linien wiederum produzieren nur geringe Terpenmengen (CML247, Ki3, Ky21, NC350 und P39). Neben quantitativen Unterschieden konnten jedoch auch qualitative Unterschiede in den Terpenspektren der einzelnen Linien gemessen werden. (*E*)- β -Caryophyllen ist beispielsweise ein nur selten detektiertes Terpen innerhalb der Population, währenddessen (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten in allen Linien, mit Ausnahme von CML247, vorkamen. Ähnliches wurde schon in anderen Maislinien beobachtet (Turlings *et al.* [1998]; Gouinguéné *et al.* [2001]; Degen *et al.* [2004]). So konnten Degen *et al.* [2004] Unterschiede in der genetischen Variabilität in 31 untersuchten Maisinzuchtlinien und demzufolge im Terpenprofil bzw. in der totalen Terpenemission nach Herbivorie feststellen. Unter den 23 analysierten Terpenen befanden sich auch die in dieser Arbeit gemessenen Mono-, Sesqui- und Homoterpene. Die Sesquiterpene (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten, welche in der NAM-Population konstant akkumuliert wurden, waren auch in 30 von 31 der von Degen *et al.* [2004] analysierten Linien durch Mengenunterschiede, aber nicht durch Abwesenheit gekennzeichnet. Bezüglich anderer Terpene, wie (*E*)-Nerolidol, Linalool, DMNT und TMTT gab es ebenso Übereinstimmungen mit Daten von Degen *et al.* [2004] und den Ergebnissen dieser Arbeit. Degen *et al.* [2004] konnte einen Zusammenhang zwischen diesen vier Terpenen mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl.: *Principal Component Analysis*) feststellen. Dies korreliert mit einem für die vier Terpene gemeinsamen QTL auf Chromosom 5, wodurch die Linalool/(*E*)-Nerolidol/Geranylinalool-Synthase TPS2 identifiziert wurde. Aktivitätsbestimmungen mit dem rekombinanten TPS2-Proteinextrakt bestätigten, dass

das Multiproduktenzym in der Biosynthese von (*E*)-Nerolidol, Linalool, Geranylinalool, DMNT und TMTT involviert ist, wodurch der Zusammenhang für diese Terpene zu erklären ist. Die gemeinsame Elternlinie B73 nimmt eine besondere Position beim „Nested Association Mapping“ ein, da diese Linie mit jeder der anderen 25 Elternlinien gekreuzt wurde und somit das Terpenspektrum jeder RIL-Population mitbestimmt. Das Duftspektrum der gemeinsamen NAM-Elternlinie B73 ist bereits in früheren Untersuchungen analysiert worden (Schnee *et al.* [2002]; Köllner *et al.* [2004]). Die Hauptterpenkomponenten Linalool, DMNT, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und geringfügig (*E*)- β -Caryophyllen konnten übereinstimmend identifiziert werden. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit zwei weitere Hauptterpene, (*E*)-Nerolidol und TMTT, identifiziert. Den Großteil des Duftspektrums in B73 bilden jedoch wie in Schnee *et al.* [2006] beschrieben, (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen. Ein entscheidender Grund, warum B73 als gemeinsame Elternlinie für die NAM-Kartierung eingesetzt wurde, ist das bereits vollständig sequenzierte Genom und die verfügbaren Datenbanken (Liu *et al.* [2003]; Buckler *et al.* [2009]; Hung *et al.* [2012]). Hinzu kommen agronomische und physiologische Betrachtungen, denn B73 ist eine der wichtigsten und meist eingesetzten Inzuchtlinien in der Maiszüchtung und ist zudem extensives Untersuchungsobjekt in der Genetik und von molekularen Studien (Stuber *et al.* [1992]; Morgante *et al.* [2005]; Yu *et al.* [2007]). Die quantitativen und qualitativen Unterschiede in den untersuchten Terpenmerkmalen sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Kartierungsanalyse. Diese unterschiedlichen Merkmalsausprägungen sind auf die genetische Vielfalt der Elternlinien zurückzuführen (Burstin *et al.* [1994]) und ermöglichen zusammen mit einer hohen Markerdichte und den Sequenzinformationen der Elternlinien ein effizientes Berechnen von QTLs (Buckler *et al.* [2009]; Kump *et al.* [2011]; Tian *et al.* [2011]; Hung *et al.* [2012]).

4.1.1 Die Identifikation der Loci von Terpensynthasegenen durch NAM und GWAS bestätigt die Effizienz der Kombination beider Methoden

Zur Validierung der Kartierungsmethode eigneten sich QTLs, welche in der Nähe von bereits bekannten Genen liegen, wie z. B. den beiden Terpensynthasegenen *tps10* und *tps23*. Wie zu erwarten, wurde ein QTL (QTL₁₀₅₆) in der Nähe von *tps10* für die Merkmale (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten berechnet, da beide Terpene Produkte dieser Terpensynthese sind (Köllner *et al.* [2004]). Währenddessen wurde der QTL₁₀₅₀ nur für (*E*)- β -Caryophyllen kalkuliert und liegt in der Nähe des Gens *tps23*, welches für die (*E*)- β -Caryophyllensynthese kodiert (Köllner *et al.* [2008a]). Die Expression von *tps23* wurde von Köllner *et al.* [2008a] in den NAM-Elternlinien

4.1 Eine hohe genetische Diversität in der NAM-Population ist für quantitative Unterschiede in deren Terpenakkumulation verantwortlich

nach Herbivorie analysiert, mit dem Ergebnis dass die meisten Inzuchtlinien dieses Gen nicht exprimieren. Möglicherweise ist die Promoteraktivität von *tps23* in diesen Linien verändert. Sequenzvergleiche des *tps23*-Promoters in diesen NAM-Linien ist notwendig um diese Hypothese zu bestätigen. Experimente, welche eine Assoziation der Kandidatengene *tps10* und *tps23* mit den jeweiligen QTLs bestätigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Vielmehr war von Interesse, ob mit dem NAM QTLs berechnet werden können, die den Kandidatengen am nächsten lokalisiert sind und wie groß der einzugrenzende Bereich ist, in denen die zu identifizierenden Kandidatengene liegen. Dies wurde für QTL₁₀₅₆ und QTL₁₀₅₀ unter Annahme einer Assoziation mit *tps10* bzw. *tps23* betrachtet. Der Chromosomenbereich zwischen *tps10* und dem QTL-Marker (m1056) ist mit 1,74 Mb sehr klein, wodurch eine Eingrenzung auf wenige Kandidatengene möglich war. Durch eine sehr geringe Markerdichte im Bereich von *tps23* war der Abstand vom Marker zum Gen mit 3,7 Mb etwas größer, wodurch eine größere Anzahl an Kandidatengen zur Auswahl stand. Die Feinkartierung mittels GWAS konnte jedoch den Locus bis auf 0,4 Mb eingrenzen. Auch bei der Kartierung von unbekanntem Kandidatengen zeigte GWAS Effektivität. In der Nähe des für Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT kalkulierten QTL₆₀₆ wurden die beiden Kandidatengene *tps2* und *tps3* identifiziert. Mit Hilfe von GWAS konnte der quantitative Locus bis auf ein Kandidatengen eingegrenzt werden, da ein SNP-Marker direkt im Promoter von *tps2* kalkuliert wurde. Aktivitätsbestimmungen korrelieren mit dem Kartierungsergebnis und identifizierten *tps2* als aktive Terpensynthase in B73. Die Validierung der Kartierungsmethode NAM zeigte, dass ein quantitativer Locus auf wenige Mb eingegrenzt werden kann. Weiterhin ist GWAS eine gute Möglichkeit den quantitativen Locus auf unter 1 Mb bis hin zum Kandidatengen zu verifizieren, auch wenn dieser Teil der Kartierung auf Statistik beruht.

4.1.2 Die Signifikanz von QTLs, die mit Biosynthesegenen assoziiert sind, ist höher als von QTLs die mit regulatorischen Elementen assoziiert sind

Analysen der QTLs deuten darauf hin, dass QTLs mit den höchsten F-Werten meistens mit Biosynthesegenen, wie den Terpensynthasen oder P450 Monooxygenasen, assoziiert zu sein scheinen. Die beiden signifikantesten quantitativen Bereiche auf Chromosom 10, QTL₁₀₅₀ und QTL₁₀₅₆, sind zwei Beispiele, welche vermutlich mit den Terpensynthasegenen *tps10* und *tps23* assoziiert sind. Auch die in dieser Arbeit charakterisierte Terpensynthase 2 ist sehr wahrscheinlich mit dem QTL₆₀₆ assoziiert, welcher den Marker mit dem höchsten F-Wert für (*E*)-Nerolidol, DMNT

und TMTT darstellt. Ein weiteres Beispiel ist der QTL₂₉₈, welcher mit einem P450 (CYP92C6) assoziiert sein könnte. Dieser QTL ist der zweitsignifikanteste Locus für TMTT und folgt in der Rangliste dem zuvor genannten QTL₆₀₆. Die Beobachtung, dass Schlüsselenzyme mit den signifikantesten QTL-Markern assoziiert zu sein scheinen, könnte durch die eindeutig identifizierbaren Phänotypen zu erklären sein. Das heißt, wenn Mutationen in einem Gen der Terpenbiosynthese oder dessen Promoter auftreten, ist folglich mit einem veränderten Phänotyp zu rechnen, der einen QTL ausprägt. Regulatorische Gene wie Transkriptionsfaktoren können redundant sein, um die Funktionalität einer Signalkaskade sicherzustellen, wodurch Mutationen dieser Gene einen nicht so starken Effekt auf einen Phänotyp haben müssen. Einige Beispiele bezüglich der Redundanz von regulatorischen Faktoren bzw. mehrerer unabhängiger Faktoren in Signalkaskaden der Pflanzenabwehr sind bekannt. In Tabak (*Nicotiana attenuata*) hat das Stilllegen des Transkriptionsfaktors NaMYC2 nur einen geringfügigen Einfluss auf die Akkumulation von Pflanzenabwehrmetaboliten, woraufhin eine Redundanz vermutet wurde (Woldemariam *et al.* [2013]). Die Aktivatoren, TGA2, TGA5 und TGA6, welche die Expression von PR-1 (Pathogenesis-Related 1) für die Pathogenabwehr induzieren, sind redundant und zeigen nur eine geringfügig geringere Expression von PR-1 in einer Triple-Mutante (Zhang *et al.* [2003]). Erst das zusätzliche Ausschalten des TGA3 Transkriptionsfaktors setzt die PR-1 Expression effektiv herab (Kesarwani *et al.* [2007]). Ebenso ist bekannt, dass in Mais viele Gene durch Genomduplikation entstanden sind, wie beispielsweise die beiden OPR-Gene (OPR-Reduktase), OPR7 und OPR8 (Zhang *et al.* [2005]), welche für einen Biosyntheseschritt des Pflanzenhormons Jasmonsäure verantwortlich sind. Erst eine Doppelmutante ermöglichte eine stark reduzierte Jasmonsäurebiosynthese, wodurch beide Gene eine redundante Funktion in Mais besitzen (Yan *et al.* [2012]). Diese Beispiele sollen verdeutlichen, dass das Identifizieren von regulatorischen Elementen mit Hilfe der NAM-Kartierung eine Herausforderung zu sein scheint. Trotz dessen konnte ein quantitativer Locus, QTL₄₀₅ bzw. QTL₄₀₆, auf Chromosom 3 identifiziert werden, welcher mit einem bHLH Transkriptionsfaktor assoziiert sein könnte. Dieser Transkriptionsfaktor liegt zwischen den beiden QTL-Markern m405 und m406, welche für mehrere Terpene, (*E*)-Nerolidol, (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen, kalkuliert wurde. Die Kalkulation dieses QTLs für mehrere Terpene lässt vermuten, dass einzelne Abschnitte einer Signaltransduktionskaskade für mehrere Terpene identisch sein können. Weitere QTLs, in deren Nähe keine putativen Terpenbiosynthesegene liegen, aber ebenfalls für mehrere Terpenmerkmale berechnet wurden, sind QTL₂₁₅, QTL₈₉ und QTL₉₉₅. Diese könnten ebenso mit regulatorischen Elementen, welche für mehrere Terpene eine Rolle spielen, assoziiert sein. Ebenso besteht die Möglichkeit von regulatorischen Elementen, welche eine Rolle für jeweils ein Terpenmerkmal spielen.

Mehrere dieser potentiellen QTLs, stehen ebenso für weitere Analysen zur Verfügung.

4.2 Charakterisierung der mittels QTL_{606/607} identifizierten TPS2 und TPS3

Mit dem QTL_{606/607} auf Chromosom 5 war es möglich, die TPS2 und TPS3 zu identifizieren. Die beiden QTL-Marker m606 bzw. m607, welche für die Terpene Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT kalkuliert wurden, grenzten den Chromosomenbereich ein. Zwischen beiden Markern befinden sich beide Terpensynthasegene. Die Gene *tps2* und *tps3* liegen mit einem geringen Abstand von nur 0,06 Mb voneinander entfernt, wodurch eine genauere Eingrenzung des gesuchten Kandidatengens für die jeweiligen Terpene mittels QTL-Marker nicht möglich war. QRT-Analysen zeigten einen starken Expressionsanstieg beider Gene nach Behandlung von Maisblättern mit einem Elicitor, sodass beide Gene als Kandidaten in Frage kamen. Die anschließende Feinkartierung mit Hilfe von GWAS berechnete einen sehr signifikanten SNP-Marker (95%) 160 bp stromaufwärts des Translationsstarts von *tps2* und gaben den Hinweis auf *tps2* als einziges Kandidatengen, was durch Aktivitätsstudien bestätigt werden konnte.

4.2.1 TPS2-B73 kodiert für ein Multiproduktenzym, während das Allel TPS3-B73 inaktiv ist

Aktivitätsbestimmungen korrelierten mit den GWAS-Resultaten und wiesen TPS2 als aktives Enzym nach, welches *in vitro* die Terpene Linalool, (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool, ein Zwischenprodukt der TMTT-Biosynthese, synthetisierte. Aus der Literatur ist bekannt, dass Terpensynthasen ausgehend von einem Substrat mehrere Produkte synthetisieren können, weshalb sie als Multiproduktenzyme bezeichnet werden (Crock *et al.* [1997]; Cane [1999]; Wise *et al.* [1998]; Steele *et al.* [1998]). Weniger häufig beobachtet wurde, dass Terpensynthasen wie TPS2 Substrate mit einer unterschiedlichen Anzahl von C5-Einheiten akzeptieren. Eine Publikation mit ähnlichen Ergebnissen identifizierte MtTPS3 in *Medicago truncatula*, welches GPP, FPP und GGPP bindet und daraus Geranylinalool sowie (*E*)-Nerolidol als Hauptterpene und zusätzlich geringe Mengen Linalool bilden kann (Arimura *et al.* [2008]). Autoren zeigten auch, dass eine Terpensynthase aus Reis (Os02g02930) sowohl (*E*)-Nerolidol als auch Linalool aus FPP bzw. GPP synthetisieren kann (Yuan *et al.* [2008]). Weitere Beispiele sind AmNES/LIS1 und AmNES/LIS2 in Löwenmäulchen (Nagegowda *et al.* [2008]), LeMTPS1 in Tomate (van Schie *et al.* [2007]) und FaNES1 in der Wilderdbeere (Aharoni *et al.* [2004]). Die Tatsache, dass diese Terpensynthasen Prenyldiphospha-

te mit unterschiedlichen C5-Einheiten akzeptieren, könnte durch ein zweites DDxxD-Motiv zu erklären sein, welches auch in TPS2 identifiziert werden konnte. Studien von Little & Croteau [2002] lassen vermuten, dass durch die zwei DDxxD-Motive Substrate in unterschiedlicher Orientierung gebunden werden können und somit eine alternative Bindestelle für Substrate gegeben sein könnte. Mutationsanalysen ergaben tatsächlich Hinweise auf Substratbindung durch beide DDxxD-Motive (Little & Croteau [2002]). Während TPS2 in der Lage war GPP, FPP und GGPP als Substrate zu akzeptieren, konnte für TPS3 unter Zugabe aller drei Substrate keine Produktbildung nachgewiesen werden. Des Weiteren bestand die Möglichkeit, dass TPS3 eine plastidäre Lokalisation besitzt und ohne die Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids nicht aktiv ist. Eine Aktivität von TPS3-B73 durch Trunkieren des postulierten Signalpeptids nachzuweisen war jedoch ebenso erfolglos, wie die Zugabe von (*Z,Z*)-FPP, welches von einigen wenigen Terpensynthasen als Substrat akzeptiert wird (Sallaud *et al.* [2009]; Tissier *et al.* [2013]). Demzufolge könnte *tps3*-B73 ein Pseudogen darstellen, was bereits für verschiedene Allele der Terpensynthasen TPS4 und TPS5 in bestimmten Maislinien gezeigt wurde (Köllner *et al.* [2004]). Köllner *et al.* [2004] führten Studien an diesen Terpensynthasen in den Maiskultivaren B73 und Delprim durch. In jeder Linie ist jeweils nur eines der beiden Enzyme aktiv. Während B73 ein funktionelles *tps4*-Allel und ein inaktives *tps5*-Allel besitzt, liegt in Delprim der umgekehrte Fall vor. Auch für TPS2 konnte ein inaktives *tps2*-Allel in Tzi8 identifiziert werden. Möglicherweise kodiert *tps3*-Tzi8 für ein aktives, jedoch schwach exprimiertes Protein¹, was in zukünftigen Experimenten geklärt werden soll. Eine Aktivität bzw. Inaktivität von TPS2 und TPS3 in anderen Maislinien kann ebenso auf Grund des hohen Polymorphismus von Mais nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Die Gene *tps2*-B73 und *tps3*-B73 sind durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden

Sowohl für das Genpaar *tps4*/*tps5* (Köllner *et al.* [2004]) als auch für *tps2*/*tps3* konnte eine sehr hohe Identität (98 % bzw. 92,5 %) festgestellt werden. Auch liegen die jeweiligen Genpaare jeweils auf demselben Chromosom mit einem Abstand von $\sim 0,2$ Mb (*tps4*/*tps5*) bzw. 0,06 Mb (*tps2*/*tps3*) nicht weit voneinander entfernt. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind beide Genpaare durch Duplikation eines Vorläufers entstanden. Während eine der Genkopien vermutlich die ursprüngliche Funktion beibehalten hat, entstand aus der anderen Genkopie ein Pseudogen ohne Funktion. Köllner *et al.* [2004] schätzten unter Annahme der von Gaut & Doebley [1997] angegebenen Mutationsrate von $6,5 \times 10^{-9}$ synonymen Substitutionen pro synonymen

¹(Daten nicht gezeigt)

Positionen pro Jahr in Mais, dass *tps4* vor ~ 3 Millionen Jahren von *tps5* als Genkopie entstanden ist. Bezieht man die Annahme von Gaut & Doebley auf *tps2* und *tps3*, ergibt sich eine Divergenzzeit von ca. 8,8 Millionen Jahren. Auch in anderen Pflanzen wie z. B. Tabak wurden zwei Sesquiterpenzyklen (EAS) als Genduplikate gefunden, welche nur 6 kb voneinander entfernt liegen (Facchini & Chappell [1992]). Genduplikationen sind offensichtlich eine wichtige Grundlage für die Mannigfaltigkeit der Terpenbiosynthese (Ober [2005]; Pichersky *et al.* [2006]; Trapp & Croteau [2001]).

4.2.3 *TPS2* könnte sowohl im Cytosol als auch in den Chloroplasten lokalisiert sein

Viele wissenschaftliche Veröffentlichungen haben bereits gezeigt, dass GPP und GG-PP sowie Mono- und Diterpensynthesen hauptsächlich in Plastiden vorliegen (Kleinig [1989]; Aharoni *et al.* [2005]; Tholl & Lee [2011]; Soler *et al.* [1992]), während FPP und die daraus folgenden Sesquiterpene im Cytosol synthetisiert werden (Aharoni *et al.* [2005]; Tholl & Lee [2011]). Die zelluläre Lokalisation von *TPS2* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch deuten Vorhersagen mit Programmen wie SignalP oder ChloroP auf das Vorhandensein eines Signalpeptides hin, was durch die gezeigte Aktivität von *TPS2* ohne Signalpeptid möglich wäre. Eine Lokalisation von *TPS2* in den Chloroplasten würde allerdings nur die Terpenproduktion von Linalool und Geranylinalool in B73 Pflanzen erklären. Die Synthese von (*E*)-Nerolidol im Cytosol würde laut den oben genannten Literaturangaben nicht möglich sein. Eine Lokalisation von *TPS2* im Cytosol wäre gleichfalls möglich, da auch der Vollängenversion eine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Unabhängig von der Lokalisation kann auf Grund des errechneten $QTL_{606/607}$ davon ausgegangen werden, dass *TPS2* für die Biosynthese von Linalool, (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool verantwortlich ist. In Arabidopsis wurde eine Möglichkeit von Cunillera *et al.* [1996] gezeigt, bei der unterschiedliche Transkriptionsstarts für eine FPP-Synthase festgestellt wurden. Bedingt durch diese alternativen Starts entsteht zusätzlich zur Vollängenversion (FPS1L) ein verkürztes Protein ohne Signalpeptid (FPS1S). Durch die folglich unterschiedlichen Kompartimentierungen in Mitochondrium und Cytosol kann FPP für verschiedene Metaboliten bereitgestellt werden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine verkürzte Version von *TPS2* mit nur 488 AS anstatt der Vollängenversion von 587 AS isoliert. Allerdings konnte keine Aktivität des verkürzten Proteins *in vitro* nachgewiesen werden. Außerdem publizierten Aharoni *et al.* [2004] eine Linalool/(*E*)-Nerolidol-Synthase (FaNES1) aus der kultivierten Erdbeere (*F. ananassa*), bei der ein Stop-Codon im N-terminus zur Translation einer kürzeren Version ohne Signalpeptid führt. Trotz der nachweislichen Lokalisation dieser Synthase im Cytosol bilden so-

wohl Linalool als auch (*E*)-Nerolidol die Hauptterpene in der kultivierten Erdbeere. Die Wilderdbeere dagegen enthält kein homologes Gen zu FaNES1, wodurch diese durch ein differentielles Terpenspektrum ohne Linalool und (*E*)-Nerolidol gekennzeichnet ist. Dies zeigt, dass FaNES1 allein für Linalool und (*E*)-Nerolidol in der kultivierten Erdbeere verantwortlich ist und es ist zu vermuten, dass Linalool und (*E*)-Nerolidol aus GPP und FPP im Cytosol der kultivierten Erdbeere synthetisiert werden. Weitere Publikation verstärken diese Vermutung, da ein Austausch von Prenyldiphosphaten zwischen Plastiden in das Cytosol gezeigt werden konnte (Adam & Zapp [1998]; Dudareva *et al.* [2005]). Wenn man die Ergebnisse auf TPS2 bezieht, wäre eine Synthese von Linalool, (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool im Cytosol möglich, unter der Voraussetzung, dass TPS2 kein Signalpeptid enthält. Andererseits wurden FPP-Synthasen auch bereits in den Chloroplasten lokalisiert, wie z. B. die FPPS1 in Reis (Sanmiya *et al.* [1999]). Dies wiederum würde die Biosynthese aller TPS2-Produkte, inklusive des Sesquiterpens (*E*)-Nerolidol, in den Chloroplasten ermöglichen. Letztendlich ist die Aufklärung der Lokalisation von TPS2 und auch von FPPS3 unumgänglich und kann zum einen durch transgene Maispflanzen, welche das Gen gekoppelt an ein detektierbares Reportergen überexprimieren, ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine transiente Expression eines Fusionsproteins von TPS2 und einem fluoreszierenden Markerproteins in Mais-Protoplasten (Klein *et al.* [1988]; Oard *et al.* [1989]; Shumskaya *et al.* [2012]) oder Zellen von Maisblättern (Kirienko *et al.* [2012]). Analysen mit Antikörper können ausgeschlossen werden, da TPS3 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu TPS2 besitzt und vermutlich kein Antikörper spezifisch TPS2 oder TPS3 detektieren würde.

4.2.4 TPS2 ist mit dem QTL_{606/607} assoziiert

Mit Hilfe des quantitativen Lokus auf Chromosom 5 (QTL_{606/607}) wurde die aktive Terpensynthase 2 identifiziert. Weitere Versuche folgten, um eine Assoziation dieses QTLs mit dem Terpensynthasegen nachzuweisen. Erwartungsgemäß wurde der QTL_{606/607} für die nachgewiesenen TPS2-Produkte (*E*)-Nerolidol, Linalool, DMNT und TMTT berechnet. Außer der inaktiven Terpensynthase 3, sind in B73 keine weiteren Terpensynthasen in diesem quantitativen Chromosomenbereich lokalisiert. Ein weiterer Hinweis ist die stark erhöhte Genexpression von *tps2* in Elicitor-behandelten Pflanzenmaterial, wie es bereits für andere Terpensynthasegene gezeigt wurde (Schnee *et al.* [2002]; Arimura *et al.* [2004]; Mercke *et al.* [2004]; Gomez *et al.* [2005]; Tholl [2006]). Für einen weiteren Nachweis einer Assoziation von *tps2*-B73 mit dem QTL sollten *tps2*-Mutanten untersucht werden. Eine einfach und schnell zur Verfügung stehende Lösung waren NAM-Inzuchtlinien, welche durch eine geringe Akkumulation von Linalool, (*E*)-Nerolidol, DMNT und TMTT gekennzeichnet sind.

Die beiden Linien Tzi8 und Ky21 sind durch das Fehlen von $TPS2$ -Produkten gekennzeichnet. Diese Linien sollten – wenn die Assoziation besteht – ein defektes oder gering exprimiertes Allel von $tps2$ tragen bzw. ein $TPS2$ -Protein mit einer verringerten Aktivität enthalten. Die QRT-Ergebnisse zeigten für die Linie Tzi8 eine stark verminderte Expression von $tps2$ im Vergleich zu B73 nach Herbivor-Imitation und in Ky21 war die Transkriptmenge dieses Gens kaum detektierbar. Weiterhin war es gelungen, $tps2$ aus der Linie Tzi8 zu klonieren und heterolog zu exprimieren. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses Allel für ein inaktives Protein kodiert. Man kann daher schlussfolgern, dass $tps2$ sehr wahrscheinlich für die zu untersuchenden Merkmale verantwortlich ist und eng mit den $QTL_{606/607}$ assoziiert ist.

Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde versucht, RILs dieser Elternlinien zu identifizieren, die in der Nähe des QTLs Rekombinationsereignisse zwischen Markern zeigten. Je näher die Marker an $tps2$ liegen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass $tps2$ mit den Merkmalen assoziiert ist. Einige RILs aus Kreuzungen von B73 und Ky21 wiesen eine chromosomale Rekombination direkt an diesem Locus auf, so dass die angrenzenden Marker auf beiden Seiten unterschiedlichen Eltern, Ky21 bzw. B73, zuzuordnen sind. In diesen RILs korreliert der Genotyp von $tps2$ jeweils mit dem Phänotyp. Das bedeutet dass jene RILs welche ein Ky21-Allel von $tps2$ enthalten, keine Expression des Gens aufwiesen, während B73-Allele nach Elicitor-Behandlung eine verstärkte Expression zeigten. Diese Beobachtungen stärken die Hypothese, dass $tps2$ das gesuchte Kandidatengen ist. Eine der RILs ist besonders für weiterführende Experimente von Interesse. Die RIL Z14E0085 enthält den Marker m606 vom Elter B73, während der Marker m607 heterozygot ist. Die Genotypisierung für $tps2$ mittels PCR identifizierte diesen Locus ebenfalls als heterozygot. Während der Locus heterozygot ist, ist das restliche Genom nahezu homozygot. Solche Linien bezeichnet man auch als HIFs („Heterogenous Inbred Family“; Allard [1960]; Fehr [1987]; Haley *et al.* [1994]). Durch Selbstung dieser rekombinanten Inzuchtlinie erhält man Nachkommen, sogenannte NILs („Near Isogenic Lines“), welche für diesen Locus segregieren. Somit kann man NILs genotypisieren, welche ein B73-Allel für $tps2$ enthalten und wiederum andere NILs mit dem gleichen genetischen Hintergrund, jedoch einem $tps2$ -Ky21 Allel. Dadurch ist es möglich, Einflüsse anderer Loci auf das zu untersuchende Merkmal auszuschließen und nur den Einfluss von $tps2$, je nachdem von welchem Elter das Allel stammt, zu analysieren. Das Nutzen solcher NILs zum Studieren von Phänotypen, welche mit einem QTL assoziiert sind, wurde in Mais z. B. von Szalma *et al.* [2007] durchgeführt. Weiterhin ist es möglich transgene Linien herzustellen, in denen $tps2$ stillgelegt ist. Hierbei werden mittels Agrobakterium transgene Maislinien hergestellt². Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse von Mutanten-Linien auf der

²(„Iowa State University“; <http://agron-www.agron.iastate.edu/ptf/>)

Internetseite von <http://gbrowse.maizegdb.org>. Jedoch ist für dieses Gen zurzeit keine Mutante erhältlich.

4.2.5 TPS2 ist an der Biosynthese der Homoterpene DMNT und TMTT beteiligt

Degenhardt & Gershenzon [2000] vermuteten bereits, dass (*E*)-Nerolidol in Mais zu DMNT umgewandelt wird. Nach Inkubation eines zellfreien Extraktes aus Maisblättern mit Deuterium-markierten (*E*)-Nerolidol konnte dessen Umwandlung in das Homoterpen DMNT festgestellt werden. Der quantitative Locus QTL₆₀₆ konnte wie zuvor beschrieben sowohl für (*E*)-Nerolidol als auch für DMNT kalkuliert werden. Dass das Homoterpen TMTT aus dem Diterpen Geranylinalool entsteht, wurde von Lee *et al.* [2010] in *Arabidopsis* gezeigt. Schwieriger waren die Voraussetzungen für die Kalkulierung des QTLs, welcher mit einer Geranylinalool-Synthase assoziiert sein könnte. Das Diterpen Geranylinalool konnte nicht für die NAM-Population phänotypisiert werden, da es mittels GC-MS nur schwer detektiert werden kann. Eine direkte Kartierung der Geranylinalool-Synthase war deshalb nicht möglich. Die Beobachtung, dass der QTL_{606/607} als signifikantester Marker auch für TMTT kalkuliert wurde, deutete darauf hin, dass die Geranylinaloolsynthase-Aktivität auch mit *tps2/3* assoziiert ist. Die biochemische Charakterisierung zeigte dann, dass TPS2 neben Linalool und (*E*)-Nerolidol auch Geranylinalool produzierte und somit einen wichtigen Kontrollpunkt für die Homoterpenbiosynthese in B73 darstellt.

4.3 Charakterisierung der mittels QTL₇₆₄ und QTL₂₉₈ identifizierten P450 Enzyme CYP92C5 und CYP92C6

Die beiden Homoterpene DMNT und TMTT dienen nicht nur zur Anlockung von Blütenbestäubern, sondern werden in vielen Mono- und Dikotyledonen nach Herbivorie gebildet, wie z. B. in der Limabohne (Dicke *et al.* [1990]), Reis (Lou & Baldwin [2006]), Weizen (Tooker & De Moraes [2007]), der europäischen Ulme (Wegener & Schulz [2002]), Baumwolle (Paré & Tumlinson [1997]) und *Arabidopsis* (Herde *et al.* [2008]). Auch die meisten NAM-Inzuchtlinien sind in der Lage DMNT und TMTT zu produzieren, nachdem sie mit dem Elicitor Indanon behandelt wurden. Obwohl es noch nicht viele Studien gibt, wird vermutet, dass die Homoterpene wichtig für die indirekte Abwehr sind. Kappers *et al.* [2005] inserierten eine Linalool/(*E*)-Nerolidol-Synthase aus der Erdbeere in *Arabidopsis*. Die resultierenden transgenen Pflanzen

bildeten sowohl (*E*)-Nerolidol als auch DMNT und waren für Raubmilben attraktiver als die Wildtyppflanzen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Pflanzen welche entweder (*E*)-Nerolidol oder DMNT alleine produzierten, eine anlockende Wirkung auf die Raubmilben besaßen (Dicke *et al.* [1990]; De Boer *et al.* [2004]). In Arabidopsis konnten Lee *et al.* [2010] eine P450 Monooxygenase isolieren, welche in der Lage ist beide Homoterpene, DMNT und TMTT, *in vitro* zu synthetisieren. Mit Hilfe des „Nested Association Mapping“ konnten zwei P450 Enzyme lokalisiert werden, welche für die Synthese der beiden Homoterpene verantwortlich sind. Durch anfängliche Schwierigkeiten ein QTL für DMNT in der Nähe eines P450 zu identifizieren, wurde nach einer Alternative gesucht. Unter der Annahme, dass (*E*)-Nerolidol das Vorläufersubstrat für DMNT auch in Mais darstellt (Degenhardt & Gershenzon [2000]; Lee *et al.* [2010]), wurde eine Kartierungsanalyse aus dem Verhältnis beider Terpene durchgeführt. Mit Hilfe des Verhältnisses von zwei Terpenen und anschließender Kartierungsanalyse, ist es möglich QTLs für späte Biosynthesegene zu identifizieren. Das Ergebnis war ein Locus auf dem Chromosom 7, QTL₇₆₄, in dessen Chromosomenbereich ein P450 Gen (CYP92C5) lokalisiert werden konnte. Eine mögliche Erklärung, weshalb der QTL nicht signifikant genug war um für das Merkmal DMNT berechnet zu werden, könnten geringe DMNT-Mengen in der NAM-Population sein. Wenn ein Merkmal in relativ geringen Mengen detektiert wurde, könnte es schwieriger sein auf Grund der geringen phänotypischen Unterschiede quantitative Loci zu identifizieren. Hinzu kommt, dass sich das Gen am Anfang von Chromosom 7 (6,4 Mb) befindet und folglich kaum Rekombinationsereignissen innerhalb der NAM-Population unterlegen ist. Dies ist aber notwendig für Kopplungskartierungen, welche auf familiäre Neuvererbung durch Rekombinationsereignisse basieren. Ein weiterer Grund könnte eine konservierte aktive Funktion dieses Enzyms innerhalb dieser NAM-Linien sein. Wenn nur wenige Linien für dieses Gen defekt sind, erschwert das die Berechnungen von signifikanten QTLs. Eine weitere Rolle spielt die Terpensynthese 2. Einige Linien (CML322, CML277, Ki3, M37W, Mo18W, Oh7b, Tzi8) sind durch eine geringe Akkumulation von (*E*)-Nerolidol gekennzeichnet, wodurch folglich auch kein DMNT gemessen werden kann und die Berechnung des QTLs zusätzlich erschwert. Biochemische Analysen konnten schließlich die Assoziation des QTL₇₆₄ mit CYP92C5 bestätigen. Nach Zugabe des Substrates (*E*)-Nerolidol zum heterolog in Hefe exprimierten Proteinextrakt (CYP92C5) konnte wie erwartet die Biosynthese des Homoterpens DMNT *in vitro* nachgestellt werden. Obwohl der QTL₇₆₄ nicht für TMTT kalkuliert wurde, ist das Protein zusätzlich in der Lage das Homoterpene TMTT zu synthetisieren. Auch wenn die Kartierungsergebnisse nicht darauf hindeuteten, so korreliert dieses Resultat mit den Angaben in Lee *et al.* [2010], in denen ein P450 Enzym (CYP82G1) aus Arabidopsis beschrieben wurde, welches ebenso in der Lage ist beide Homoterpene

zu produzieren. In Arabidopsis wird allerdings im Gegensatz zum Mais nur TMTT emittiert, da das Substrat (*E*)-Nerolidol nicht in der Pflanze vorliegt. Mögliche Erklärungen weshalb QTL₇₆₄ nicht mit dem Merkmal TMTT korreliert, könnten zum Teil die Gleichen wie für DMNT sein.

Das Gen *cyp92c6*, welches für das zweite P450 kodiert, liegt mit einem Abstand von nur 0,2 Mb in direkter Nähe von QTL₂₉₈ und konnte einfach identifiziert werden. Enzymassays bestätigten die Kartierungsergebnisse für das Terpen TMTT und zeigten, dass das heterolog exprimierte P450, CYP92C6, Geranylinalool als Substrat bindet und in TMTT umwandelt. Jedoch ist es nicht in der Lage, im Gegensatz zu CYP92C5 und dem von Lee *et al.* [2010] identifizierten Protein aus Arabidopsis, beide Homoterpene *in vitro* zu bilden, weshalb der QTL₂₉₈ nicht zusätzlich für DMNT sichtbar war. Eine *dmnt*-Mutante (MuIII; Pioneer) unterstützt die Kartierungs-Resultate für DMNT und TMTT. Die in dieser Mutantenlinie nachweislich nicht funktionelle Version von CYP92C5 korreliert mit dem Fehlen des Homoterpens DMNT und einer höheren Akkumulation dessen Substrates (*E*)-Nerolidol (Abb. 3.23) Auch die stark verminderte Akkumulation von TMTT könnte durch die stark verkürzte Version von CYP92C5 zu erklären sein. Allerdings konnte TMTT weiterhin in MuIII gemessen werden, welches auf die Expression und Aktivität eines zweiten P450 Enzym, in dem Falle CYP92C6, hindeutet. Des Weiteren korreliert das Terpenspektrum der *dmnt*-Mutante mit der Erkenntnis, dass CYP92C6 nicht in der Lage ist, DMNT *in vitro* zu synthetisieren, da weder dieses P450 noch ein anderes Protein die Funktion von CYP92C5 in MuIII kompensieren konnte. Zusätzlich bestärkt eine erhöhte Akkumulation von (*E*)-Nerolidol in MuIII, dass das Sesquiterpen auch *in vivo* als Substrat für die DMNT-Biosynthese genutzt wird, wie es bereits von Degenhardt & Gershenzon [2000] in Mais sowie Lee *et al.* [2010] in Arabidopsis beschrieben wurde.

Für das Enzym CYP92C6 gibt es derzeit noch keine Mutante, welche die Funktionalität dieses Proteins als TMTT-Synthase eindeutig beweisen könnte. Möglichkeiten dies zu umgehen, wäre das Nutzen der genetischen Ressourcen von Mais. Einige NAM-Elternlinien (CML277, HP301, Oh7b, und Tx303) produzieren kaum detektierbare Mengen TMTT. Aus diesen Linien könnte man CYP92C6 sequenzieren und bei Abweichungen der Aminosäuresequenz für Aktivitätsbestimmungen isolieren. Die Funktionalität von Terpensynthase 2 muss allerdings immer in diesen Linien berücksichtigt werden. Für den Fall, dass diese kein Geranylinalool in einer der Linien synthetisiert, ist auch kein TMTT zu erwarten.

Des Weiteren ist von großem Interesse, wodurch es CYP92C5 und CYP82G1 ermöglicht verschiedene Produkte zu bilden bzw. welche Domänen oder Aminosäuren für das Binden unterschiedlicher Substrate verantwortlich sind. Für das CYP82G1 wurden insgesamt 10 mögliche Aminosäurereste (Phe113, Leu126, Tyr222, Phe251,

Leu308, Leu312, Thr312, Ile320, Leu491 und Ala492) für die Substratbindung verifiziert (Lee *et al.* [2010]). Vergleicht man diese Positionen des CYP82G1 aus Arabidopsis mit denen von CYP92C5 und CYP92C6 aus Mais, ist jeweils nur die Aminosäure Leu491 identisch. Außerdem gibt es von den insgesamt 10 möglichen Aminosäurepositionen nur zwei Aminosäureaustausche (Position 222 und 251) zwischen den in dieser Arbeit charakterisierten P450s. Weiterhin zeigten Vergleiche der Aminosäuresequenzen von AtCYP82G1 (Arabidopsis) und CYP92C5, welche in der Lage sind beide Homoterpene zu synthetisieren, dass sich beide Proteine in nur 8 Aminosäuren von CYP92C6 unterscheiden, welches nur TMTT bildet. Aus diesen Gründen würden sich die beiden aus Mais identifizierten P450-Proteine gut für Mutationsstudien eignen, um herauszufinden, welche Aminosäuren für die Substratspezifität verantwortlich sind.

4.3.1 Die Funktion von Mitgliedern der CYP92-Familie wurde zuerst in *Zea mays* identifiziert

Die beiden identifizierten Monooxygenaseproteine gehören zur Gruppe der CYP92 Familie und somit nicht zur selben Gruppe wie das von Lee *et al.* [2010] isolierte CYP71G1 aus Arabidopsis. Die CYP92 Familie kommt nicht in Arabidopsis vor, die in der letzten Zeit als Modellorganismus zum Studieren von P450 Enzymen genutzt wird (Nelson *et al.* [1996]; Bak *et al.* [2011]; Ma *et al.* [2013]). Die Funktion der CYP92 Familie ist bisher noch ungeklärt (Bak *et al.* [2011]), da mit Ausnahme eines P450 Proteins aus Tabak noch kein weiteres Enzym dieser CYP-Familie isoliert wurde. In *Nicotiana tabacum* wurde aus Elicitor-behandelten Pflanzenmaterial ein P450 Enzym der CYP92 Gruppe kloniert (Ralston *et al.* [2001]), welches als 5-epi-Aristolochinoxidase (EAS) postuliert wurde. Die Enzymaktivität konnte für CYP92A5 jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass dessen Funktion weiterhin ungeklärt bleibt. RNA-Blot Analysen an einem Elicitor-behandelten (Paraciticein) Pflanzenmaterial konnten eine deutliche Induktion dieser Monooxygenase nachweisen (Ralston *et al.* [2001]). Auch die beiden P450 Enzyme aus der Maiselternlinie B73 sind in Elicitor-behandelten (Indanon) Pflanzen signifikant stärker induziert als in Kontrollpflanzen. Die hohe Ähnlichkeit von CYP92A5 mit CYP92C5 und CYP92C6 ($\sim 45-48\%$) und dessen Induzierbarkeit lassen Spekulationen hinsichtlich einer DMNT/TMTT-Synthasefunktion in Tabak zu.

4.4 Charakterisierung der Farnesyldiphosphatsynthase 3 (FPPS3), die aus QTL_{405/406} identifiziert wurde

Die Isoprenoidbiosynthese stellt einen wichtigen Kontrollpunkt im Primär- und Sekundärmetabolismus dar. Das Isoprenoid FPP dient in der Pflanze als Zweigstelle für die Farnesylierung von Proteinen (Galichet & Gruissem [2003]), die Bildung von Steroiden, Triterpenoiden (Popjak *et al.* [1962]) und für die Biosynthese von Sesquiterpenen. Daher wurde nach QTLs gesucht, welche mit einer Farnesyldiphosphatsynthase (FPPS) assoziiert sein könnten und somit den ersten Schritt der Biosynthese der oben genannten Verbindungen katalysieren. Der QTL_{405/406} schien dafür sehr passend, da dieser spezifisch für die Sesquiterpene, darunter (*E*)-Nerolidol, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten, bestimmt wurde. Das FPP-Synthasegen, *fpps3*, welches vorerst als Kandidatengen von QTL_{405/406} galt, ist eines von insgesamt drei Genen im Maisgenom. Vor einigen Jahren publizierten Li & Larkins [1996] die erste FPP-Synthase in Mais (FPPS1), welche hauptsächlich FPP und in geringeren Mengen GGPP *in vitro* synthetisiert. Mittels BLAST-Suche konnte schließlich ein weiteres FPP-Synthasegen, *fpps2*, in Mais lokalisiert werden (Abb. 4.1). Die FPPS-Familie in anderen Pflanzen besteht ähnlich wie in Mais aus einer geringen Anzahl von Genen. Sowohl in Reis (Sanmiya *et al.* [1997, 1999]) als auch in Arabidopsis (Cunillera *et al.* [1996]) oder *Artemisia tridentata* (Hemmerlin *et al.* [2003]) wurden jeweils zwei aktive FPP-Synthasen identifiziert. Die für ZmFPPS1 nachgewiesene *in vitro* Aktivität (Cervantes-Cervantes *et al.* [2006]) konnte in dieser Arbeit ebenso für die heterolog in *E. coli* exprimierte FPPS3 gezeigt werden. FPPS2 hingegen hatte keine FPP-Synthaseaktivität. Daher scheinen in Mais ebenfalls nur zwei FPP-Synthasen den FPP-Haushalt zu regulieren. Obwohl FPPS2 eine sehr hohe Sequenzidentität von 92% auf Aminosäureebene zu FPPS3 aufweist, sind die entsprechenden Gene vermutlich nicht durch eine einfache Genduplikation, sondern im Rahmen der Bildung eines Tetraploiden Genoms in Mais entstanden. Darauf deuten Syntenie-Studien zwischen dem Reis Chromosom 1 und den Mais Chromosomen 3, 6 und 8 hin (Salse *et al.* [2004]; Odland *et al.* [2006]; Gale & Devos [1998]; Ahn *et al.* [1993]; Helentjaris *et al.* [1988]; Wilson *et al.* [1999]; Wei *et al.* [2007]). Syntenische Bereiche sind Chromosomenabschnitte, in denen homologe Gene kollinear auf verschiedenen Chromosomen angeordnet sind und vermutlich von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen (Odland *et al.* [2006]; Gaut [2001]; Wei *et al.* [2007]). Ein Chromosomenabschnitt auf Chromosom 3, indem *fpps3* lokalisiert ist, ist umgekehrt syntenisch zu der *fpps2* enthaltenden Region auf dem Chromosom 8, welches wiederum syntenisch zu

dem Reis Chromosom 1 ist. In diesem Chromosomenabschnitt ist die FPP-Synthase *fpps1* aus Reis lokalisiert (Sanmiya *et al.* [1997], Sanmiya *et al.* [1999]). Beide FPP-Synthasegene aus Mais und das Homologe in Reis könnten von einem gemeinsamen Vorfahren von vor 50-70 Millionen Jahren abstammen.

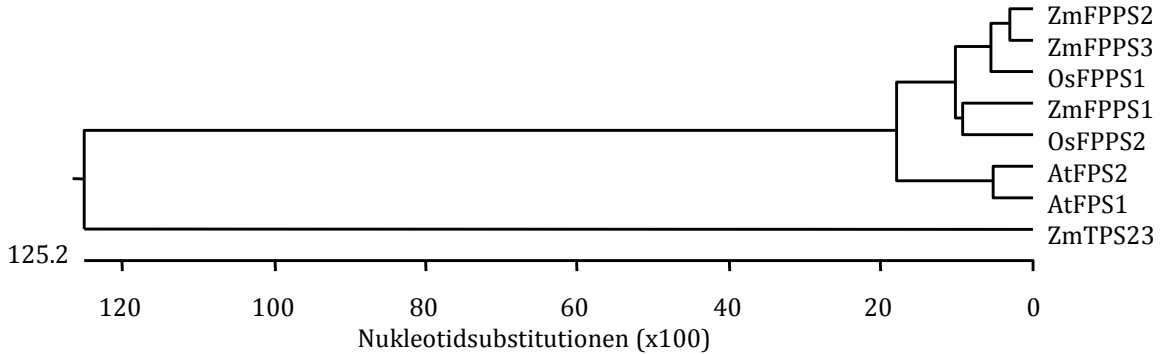


Abbildung 4.1 Dendrogramm von Aminosäuresequenzen von FPPS aus Mais und ausgewählter repräsentativer FPP-Synthasen aus anderen Pflanzenfamilien. Ein multipler Sequenzvergleich wurde mit ClustalW (LaserGene Software) (Thompson *et al.* [1994]) durchgeführt und anschließend mit „TreeView“ visualisiert.

4.4.1 Die FPPS3 Expression korreliert mit der Terpenakkumulation in Mais

Die Emission volatiler Terpene in Maisblättern erfolgt als Antwort auf Herbivorie. Dabei werden viele Terpene bereits 2 Stunden und andere, wie Sesquiterpene, meist 4 Stunden nach Raupenfraß abgegeben (Turlings *et al.* [1998]). Dies korreliert mit der analysierten Expression der Terpensynthasegene *tps10* und *tps23*, deren Expression kontinuierlich ansteigt und nach ca. 4 h das Maximum erreicht (Seidl-Adams *et al.* [2014]; Richter *et al.* [subm]). Die in dieser Arbeit identifizierte FPP-Synthase (FPPS3) wurde ebenfalls auf Expression nach Herbivorie getestet und ist durch einen stark signifikanten Anstieg in den Blättern von B73 und Delprim gekennzeichnet. Auch die alleinige Verwundung führt zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptakkumulation, allerdings um ein vielfaches niedriger als Verwundung unter Zusatz eines Elicitors (Indanon-Derivat). Diese Resultate korrelieren mit den Literaturangaben, in denen gezeigt wurde, dass die Terpenantwort durch Herbivorie stärker ist als nach alleiniger Verwundung (Alborn *et al.* [1997]; Spiteller *et al.* [2000]; Tumlinson & Lait [2005]; Turlings *et al.* [1990]; Schmelz *et al.* [2001]; Yoshinaga *et al.* [2010]). Die von Li & Larkins [1996] identifizierte FPP-Synthase 1 wurde ebenfalls als Herbivor-induzierbar charakterisiert (Cervantes-Cervantes *et al.* [2006]). Allerdings zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche der Expressionswerte eine vielfach höhere Induktion von *fpps3* im Vergleich zu *fpps1*. Selbst die Kontroll-

werte von *fpps3* lagen sowohl in Delprim als auch in B73 über denen von *fpps1*. Somit kann spekuliert werden, dass besonders nach Herbivorie der FPP-Haushalt in Blättern hauptsächlich durch FPPS3 sichergestellt wird. Im Gegensatz dazu scheint FPPS1 in der Wurzel eine bedeutendere Rolle zu spielen und übertrifft die Expression von *fpps3* sowohl im Kontrollmaterial als auch nach mechanischer Verwundung. Einzig nach Herbivorie durch *Diabrotica virgifera virgifera* ist ein signifikanter Anstieg der *fpps3* Expression in der Wurzel zu verzeichnen gewesen, während ein leichter nicht signifikanter Rückgang an *fpps1* Transkript detektiert wurde.

Eine ähnliche Regulation in Blatt und Wurzel wurde für zwei DXP-Synthasegene (1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase = DXS) beobachtet, welche den ersten Schritt im MEP-Weg katalysieren und IPP in den Plastiden bereitstellen. Walter *et al.* [2002] zeigten, dass das *MtDXS1* Gen aus *Medicago truncatula*, Mais und Tabak jeweils im Blatt exprimiert wird, während *MtDXS2* Transkripte hauptsächlich in der Wurzel vorkommen. Die unterschiedliche Expression von *fpps1* und *fpps3* in Wurzel und Blatt könnte ein Hinweis sein, dass beide Enzyme den FPP-Flux für die Bildung verschiedener Isoprenoidendprodukte regeln. Weitere Beispiele für unterschiedlich regulierte Prenyltransferasen sind aus der Literatur bekannt. Sanmiya *et al.* [1997, 1999] zeigten in Reis, dass FPPS1 im Blatt exprimiert ist, während FPPS2 in den Wurzeln vorkommt. Auch Prenyltransferasen für länger-kettige Prenyldiphosphate, wie die Solanesyldiphosphat-Synthasen aus Reis, wiesen ein organspezifisches Expressionsmuster auf. Diese Enzyme bilden Prenyldiphosphate für die Ubichinon-Biosynthese. Während *OsSPS1* hauptsächlich in den Wurzeln vorkommt, wurden *OsSPS2* Transkripte in Wurzel und Blatt gefunden (Ohara *et al.* [2010]). Der Einfluss von Pflanzenhormonen oder Herbivorie scheint auch für Prenyltransferasen in anderen Pflanzenorganismen eine Rolle zu spielen. Eine erhöhte Expression von Prenyltransferasen nach Imitierung von Herbivorie konnte neben *fpps3* auch in Pflanzen wie z. B. in *Withania somnifera* (Gupta *et al.* [2011]), *Picea abies* (*PaDS1*, Schmidt *et al.* [2010a]) oder *Hedychium coronarium* (*HcFPPS*, Lan *et al.* [2013]) gezeigt werden. Nach Verwundung oder Behandlung mit Methyljasmonat wurden erhöhte Transkriptmengen einer FPP-Synthase in *W. somnifera* detektiert (Gupta *et al.* [2011]). Auch in Ginseng konnte eine FPP-Synthase nach Behandlung mit Methyljasmonat induziert werden (Kim *et al.* [2010]). Jasmonsäurederivate gehören zur Gruppe der Pflanzenhormone und sind in der Regulation der Herbivorie-Antwort involviert (Howe & Jander [2008]) und werden somit häufig als Elicitor eingesetzt.

4.4.2 FPPS3 ist sehr wahrscheinlich nicht mit dem QTL_{405/406} assoziiert

Die Aktivität von FPPS3 konnte *in vitro* nachgewiesen werden. Wie für die anderen QTLs galt es, die Assoziation dieses Gens mit dem QTL_{405/406} nachzuweisen. Dafür wurde vorerst ermittelt, welche Elternlinien für den QTL verantwortlich sind bzw. welche scheinbar ein defizientes oder nicht exprimiertes *fpps3* Gen enthalten. Durch Entnahme einiger und anschließend einzelner Elternlinien für die NAM-Kalkulationen mittels des SAS-Programms, können jene Linien identifiziert werden welche für den QTL verantwortlich sind. Für QTL_{405/406} konnte schließlich nur eine Linie, Ky21, ermittelt werden. Allerdings wurden nach dem Sequenzieren von *fpps3*-Ky21 keine Unterschiede zum B73-Allel festgestellt, so dass eine Inaktivität oder veränderte Aktivität des kodierten Proteins ausgeschlossen werden konnte. QRT-Analysen zeigten zwar Unterschiede in der Expression von *fpps3* zwischen B73 und Ky21, allerdings auch für andere Gene der Terpenbiosynthese. Entgegen den Erwartungen wiesen auch Gene wie *tps10* oder die beiden P450-Gene *cyp92c5* und *cyp92c6* eine stark reduzierte Expression im Vergleich zu den B73-Werten auf. Mögliche Erklärungen könnten eine rückkoppelnde Wirkung der *fpps3* Expression auf jene der Terpenbiosynthesegene sein oder ein defektes regulatorisches Element in diesem quantitativen Locus. Da die Sequenzvergleiche der Promotorregion von *fpps3* zwischen B73 und Ky21 keine großen Unterschiede zeigten, wurde *fpps3* als Kandidatengen vorläufig ausgeschlossen. Um einen direkten Nachweis zu liefern, müssten weitere Analysen mit RILs der Eltern B73 und Ky21 folgen. Dies ist allerdings schwierig, da in diesen Linien scheinbar mehrere Gene, mitunter *tps2*, inaktiv oder nicht exprimiert sind. Die NAM-Kalkulation wurde auch umgekehrt mit den Elternlinien Ky21 und B73 unter Ausschluss aller anderen Linien durchgeführt. Neben QTL_{405/406} wurden weitere weniger signifikante QTLs berechnet³, was auf zusätzlich defekte Gene hindeutet. Diese Problematik verdeutlicht, dass die NAM-Kartierung besonders leistungsfähig ist, wenn mehrere Linien zu einem QTL führen. Eine Feinkartierung könnte in dieser Situation einen Hinweis auf das Gen geben, das mit dem QTL-Marker assoziiert ist. Jedoch ist es gerade für diesen auf evolutionäre Vererbung basierten Kartierungsschritt wichtig, dass mehrere Linien für einen quantitativen Locus verantwortlich sind. Eine Möglichkeit eine endgültige Antwort auf die Frage nach einer Assoziation von *fpps3* mit dem quantitativen Locus zu erhalten, wäre die *fpps3* Expression in RILs zu analysieren, welche Transkriptmengen von *tps10*, *cyp92c5* oder *cyp92c6* homolog zu den B73-Allelen aufweisen. Nur so kann ermittelt werden, ob die *fpps3* Expression in Zusammenhang mit den anderen Genen steht oder nicht.

³(Daten nicht gezeigt)

4.5 Die Biosynthesewege von DMNT und TMTT wurden mit drei quantitativen Loci identifiziert

Die mittels NAM identifizierte QTLs verhalfen die Biosynthesegene von Linalool, DMNT und TMTT aufzuklären. Diese Gene, *fpps3*, *tps2*, *cyp92c5* und *cyp92c6*, sind in Abb. 4.2 farblich hinterlegt. Einzig die GGPP-Synthase und die GPP-Synthase konnten derzeit nicht weiter identifiziert werden. In Abb. 4.2 ist ein Übersichtsmodell dargestellt, welche Enzyme, ausgehend von den aktiven Isoprenmolekülen DMAPP und IPP, für die Synthese von Linalool, DMNT und TMTT eine Rolle spielen. Die nachgewiesenen Aktivitäten der einzelnen Proteine sowie die erhöhten Transkriptmengen der identifizierten Gene nach Elicitor-Behandlung geben genug Hinweise, um ein Modell der einzelnen Biosyntheseschritte wie in Abb. 4.2 zu erstellen.

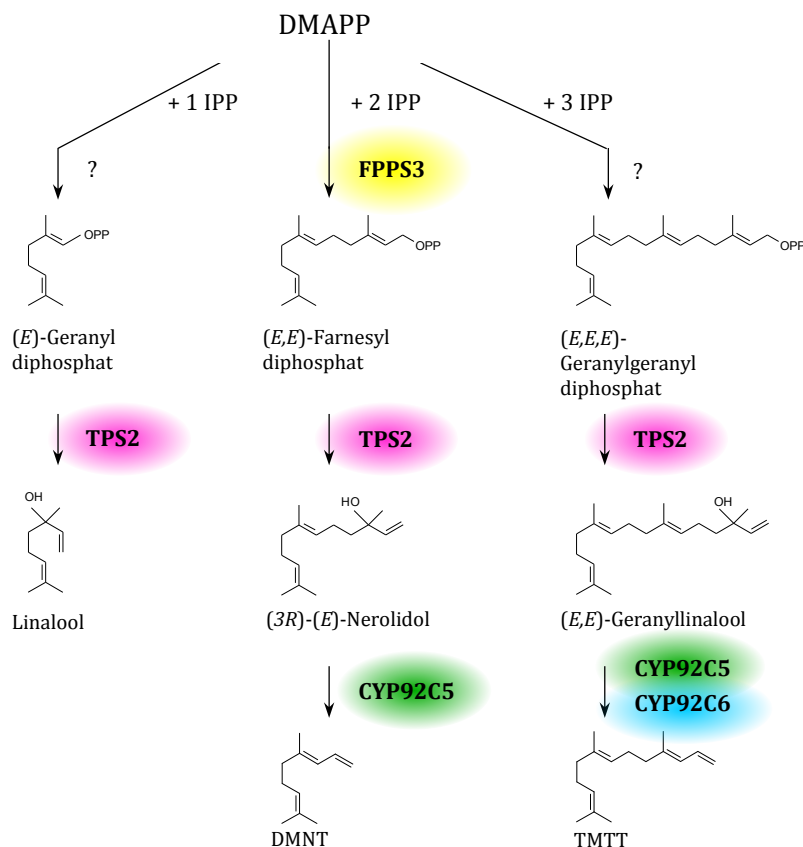


Abbildung 4.2 Modell der Terpenbiosynthese von Linalool, DMNT und TMTT in B73. Ausgehend von den aktiven Isoprenoidvorläufern DMAPP und IPP erfolgt die Synthese der kurzketigen Isoprenoide mittels Prenyltransferasen. Terpensynthasen modifizieren die Substrate GPP, FPP und GGPP. (E)-Nerolidol und (E,E)-Geranylinalool können durch Monooxygenasenenzyme weiter zu Homoterpenen modifiziert werden. Farblich hinterlegte Proteine wurden mittels „Nested Association Mapping“ identifiziert und deren Enzymaktivität *in vitro* nachgewiesen.

Während in B73 die Assoziation der Monooxygenase CYP92C5 mit dem QTL₇₆₄ mittels der *dmnt*-Mutante (MuIII) eindeutig gezeigt werden konnte, steht der direkte Nachweis einer Assoziation der anderen Kandidatengene mit den jeweiligen QTLs noch aus. Unabhängig von der Assoziation mit den QTLs, korrelieren die *in vitro* Produkte aller Proteinextrakte der identifizierten Kandidatengenen mit dem Terpenspektrum der Elternlinie B73 überein, so dass die Biosyntheseschritte in Abb. 4.2 auch ein möglicher Weg *in vivo* sein könnte.

4.6 Ein bHLH Transkriptionsfaktor ist ein mögliches Kandidatengen für den QTL_{405/406}

Die verminderte Expression verschiedener Biosynthesegene in Ky21 nach Herbivor-Imitation gibt Anlass zur Vermutung, dass ein regulatorisches Element mit dem QTL_{405/406} assoziiert sein könnte und Einfluss auf die Regulation der Terpenbiosynthese hat. Demzufolge wurde nach Transkriptionsfaktoren oder Kinasen gesucht, welche mit dem QTL assoziiert sein könnten. Ein zwischen beiden QTL-Markern (m405, m406) liegender bHLH Transkriptionsfaktor kam aus zwei Gründen als Kandidatengen in Frage. Zum einen ist dessen Genexpression nach Elicitor-Behandlung hochreguliert und wies auch keine Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen der Linie Ky21 und B73 auf, währenddessen Gene wie *fpps3*, *tps10* oder die beiden *cyp92* Gene eine verminderte Transkriptmenge in Ky21 zeigten. Der zweite Grund der für den bHLH als Kandidatengen spricht, ist eine Lücke von 41 Aminosäuren in dessen Protein in der Linie Ky21. Dies könnte eine eingeschränkte Funktionalität des Transkriptionsfaktors und somit eine verminderte Induktion der nachfolgenden Signaltransduktion zur Folge haben. Die Tatsache dass der bHLH Herbivorie-reguliert ist, jedoch keine Expressionsunterschiede zwischen B73 und Ky21 aufweist und zusätzlich 41 Aminosäuren kürzer ist, deuten auf eine Funktion in der Signalkaskade die die Terpenbiosynthese steuert, hin.

4.6.1 Ein bHLH Transkriptionsfaktor könnte eine Funktion als positiver Regulator in der Jasmonatantwort in *Zea mays* besitzen

Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren umfasst eine sehr große Anzahl an Genen und gehört zu einer der größten Familien der Transkriptionsfaktoren. In Arabidopsis wurden allein 148 der Basic-HLH Transkriptionsfaktoren identifiziert (Toledo-Ortiz *et al.* [2003]; Heim *et al.* [2003]; Riechmann *et al.* [2000]). Der bHLH auf Chro-

mosom 3 besitzt die typische Basic-Helix-Loop-Helix-Domäne am C-terminalen Ende. Diese Domäne ist entscheidend für die Homo- oder Heterodimerisierung und auch für die Bindung an E-Boxen (CANNTG), welche in Promotoren von Zielgenen als *cis*-Elemente vorkommen und nochmals in G- und E-Boxen unterscheidbar sind. Laut der in diesem Transkriptionsfaktor vorkommenden Aminosäuren an Position 9, 13 und 17 in der Basic-Domäne, scheint der bHLH bevorzugt G-Boxen (CACGTG) zu binden (Atchley & Fitch [1997]; Atchley *et al.* [1999]; Toledo-Ortiz *et al.* [2010]). G-Boxen liegen meist in Promotoren von Genen, welche in die Jasmonatantwort und Verwundung involviert sind (Menke *et al.* [1999]; Delessert *et al.* [2004]; Kim *et al.* [1992]). Solche bekannten G-Box-enthaltende Promotoren sind die von *AtPDF1* (Lorenzo *et al.* [2004]), von *PI-II* aus der Kartoffel (Kim *et al.* [1992]) und von *JAZ2* (Figueroa [2012]). Terpensynthasegene (*tps10*, *tps23*) in Mais besitzen ebenfalls einige G-Boxen über die gesamte Promotorregion verteilt (Lenk [2012]). Auch *fpps3*, *tps2*, *tps3* und die beiden P450 Gene wurden auf Promotorelemente untersucht (PLACE⁴) und besitzen mehrere E-Boxen im Promotor (siehe Anhang 5.6), wodurch sie als potentielle Bindepartner des bHLHs in Frage kommen könnten. BLAST-Ergebnisse auf der Internetseite von Tair⁵ zeigten die höchsten Homologien von diesem bHLH zu AtJAM3 und AtJAM2⁶ und nachfolgend zu AtMYC3 und AtMYC2. Für die BLAST-Suche wurde vorerst das Arabidopsis-Genom verwendet, da in diesem Pflanzenorganismus die meisten bHLHs charakterisiert wurden. Die BLAST-Ergebnisse können Hinweise auf mögliche homologe Funktionen in Mais geben, sollten allerdings kritisch betrachtet werden, da im Beispiel von CYP92C5 gezeigt werden konnte, dass dieses P450, trotz homologer Funktion zum CYP82G1 aus Arabidopsis, nicht die höchste Sequenzidentität zu diesem Enzym im Maisgenom aufweist.

In der Literatur werden gegensätzliche regulatorische Effekte der AtMYCs und der AtJAMs beschrieben. So sind JAM1, JAM2 und JAM3 negativ regulierende Faktoren (Sasaki-Sekimoto *et al.* [2013]). Die Dreifach-Mutante *jam1jam2jam3* zeigt nach Methyljasmonat-Behandlung ein verkürztes Wurzelwachstum, erhöhte Akkumulation an Anthocyanin und Jasmonsäure (Sasaki-Sekimoto *et al.* [2013]). Außerdem sind Transkriptionsfaktoren, welche im JA-Metabolismus involviert sind, in *jam1jam2jam3* negativ reguliert. Diese Resultate verdeutlichen eine negativ regulierende Jasmonatantwort. Auch wenn der bHLH aus Mais eine hohe Identität zu den JAMs besitzt, korreliert der in Ky21 beobachtete Phänotyp nicht mit dem von Sasaki-Sekimoto *et al.* in der Dreifachmutante beschriebenen Phänotyp. Zum einem konnten in Ky21 geringere Mengen an Jasmonsäure, Abscisinsäure (ABA) und *cis*-OPDA im Vergleich zu B73 detektiert werden. Zum anderen wurden in Ky21 weniger

⁴<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

⁵<http://www.arabidopsis.org>

⁶JASMONATE ASSOCIATED MYC2 LIKE

Terpene akkumuliert als in B73, was durch eine verminderte Expression der Biosynthesegene in Ky21 zu erklären ist. Die geringere Terpenproduktion in Ky21 korreliert vielmehr mit dem Phänotyp der *myc2* Mutanten in Arabidopsis (Boter *et al.* [2004]; Lorenzo *et al.* [2004]). Zwei unabhängige Mutanten in denen neben EIN3 (ethylene-responsive3), MYC2 mutiert ist, zeigten eine verminderte Inhibierung des Wurzelwachstums, mit einem typisch Jasmonsäure-resistenten Phänotyp. AtMYC2 ist bekannt dafür die Expression von Pathogen-Abwehrgenen wie *PDF1.2*, *CHIB/PR3* und *HEL/PR4* negativ zu regulieren. Demzufolge werden diese Gene in der *myc2* Mutante nicht weiter reprimiert und sind durch eine gesteigerte Resistenz gegen Pilzpathogene gekennzeichnet (Anderson *et al.* [2004]; Lorenzo *et al.* [2004]). Dadurch dass der *myc2*-Phänotyp nur mit dem zusätzlich mutierten EIN3 zu sehen ist, ist ein Vergleich mit dem Phänotyp der Ky21-Linie vorsichtig zu betrachten. Allerdings deuten die Hormonmengen sowie die Expressionsdaten der Terpenbiosynthesegene in Ky21 auf einen Jasmonsäure-defizienten Phänotyp hin.

In Mais konnte eine gesteigerte Pilzresistenz in Korrelation mit einer gesteigerten Menge an Zealexinen identifiziert werden (Huffaker *et al.* [2011]). Interessanterweise beobachteten Huffaker *et al.* eine signifikant höhere Menge an Zealexinen unter anderen in Ky21 vergleichsweise zu B73. Zealexine sind sesquiterpenoide Phytoalexine, welche mitunter durch verschiedene Pilze induzierbar sind und eine antimykotische Wirkung aufweisen. Interessant wäre es zu klären, ob die gesteigerte Konzentration an Zealexinen im Zusammenhang mit der verkürzten Version des bHLH-Ky21 steht, d. h. ob der bHLH ebenso wie AtMYC2 eine negativ regulierende Funktion auf die Pathogenabwehr ausübt. Dazu könnte man die Expression für die Zealexinbiosynthese verantwortlichen Gene, *tps6* und *tps11* (Köllner *et al.* [2008b]; Huffaker *et al.* [2011]), in Ky21 vergleichsweise zu B73 analysieren und auch die Menge an Salicylsäure bestimmen, welche nach Befall mit Pathogenen vermehrt gebildet wird (Klessig & Malamy [1994]; Durner *et al.* [1997]; Shah [2003]; Vlot *et al.* [2009]; Rivas-San Vicente & Plasencia [2011]; Wang *et al.* [2007]).

4.6.2 Der bHLH Faktor ist ein früh regulierter Transkriptionsfaktor

Das Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA) bzw. JA-Ile wird in Mais genau wie in Arabidopsis nach Verwundung oder Induktion mit einem Elicitor sehr schnell akkumuliert. Dadurch, dass JA eine regulatorische Funktion besitzt, ist bereits 10 Minuten nach mechanischer Verwundung oder Elicitorbehandlung ein Anstieg an Jasmonsäure zu verzeichnen und erreicht Maximalwerte nach 30-60 Minuten (Engelberth *et al.* [2007]; Chung *et al.* [2008]). QRT-Experimente an einem Zeitkurs über vier Stunden nach

Beginn der Herbivorie, sollten Hinweise geben, wie früh die Expression des in dieser Arbeit identifizierten bHLHs hochreguliert ist. Die höchsten Transkriptmengen nach einer halben Stunde, deuten auf eine sehr frühe Expression des bHLHs hin, während die Biosynthesegene von Terpenen erst nach zwei bis vier Stunden vermehrt exprimiert werden (*tps10* und *tps23*, Lenk *et al.* [2012]; *fpps3* und *tps10*, Seidl-Adams *et al.* [2014]; *fpps3* und *tps23*, Richter *et al.* [subm]).

Ein putatives Ortholog zu AtMYC2 wurde in Mais als MYC7 identifiziert (Engelberth *et al.* [2012]), welches die höchste Identität zu AtMYC2 im Maisgenom besitzt. Allerdings unterscheidet sich die Expression von MYC7 im Vergleich zu AtMYC2 (Lorenzo *et al.* [2004]; Chung *et al.* [2008]; Engelberth *et al.* [2012]). Während AtMYC2 in Arabidopsis bereits 15 Minuten nach Herbivorie induziert ist (Chung *et al.* [2008]), wurde für MYC7 keine erhöhten Expressionswerte in den frühen Zeitrahmen nachgewiesen (Engelberth *et al.* [2012]). Die mRNA-Menge von MYC7 scheint mit 60 Minuten nach Elicitor-Behandlung viel später anzusteigen. Gegensätzlich zu AtMYC2 konnte für MYC7 nach mechanischer Verwundung keine Erhöhung an Transkripten gemessen werden. Einzig Elicitor-Behandlung ergaben einen Anstieg an MYC7 Transkriptmengen (Engelberth *et al.* [2012]). Die beschriebene Transkription von AtMYC2 korreliert also vielmehr mit der frühen Induktion des bHLHs in dieser Arbeit. Ebenso besteht ein größerer Zusammenhang zwischen dem frühen Anstieg der Jasmonsäuremenge und dem Expressionsmuster des bHLHs dieser Arbeit als mit der Expression von ZmMYC7.

Die Frage ob der bHLH in der Signalkaskade der Jasmonsäurebiosynthese eine Rolle spielt oder erst durch JA-Ile seine Funktion erhält, konnte nicht geklärt werden. Allerdings zeigen die Hormongehalt-Messungen reduzierte Mengen in der Ky21 Linie im Vergleich zu B73, was auf eine Funktion des bHLHs noch vor der Jasmonsäure hindeuten würde. Weiterführend könnte die Expression von Genen, welche in der Biosynthese von Jasmonsäure involviert sind, in Ky21 vergleichsweise zu B73 getestet werden. Solche Gene wurden in Mais bereits identifiziert, von denen unter anderen ZmOPR7 und ZmOPR8 (Yan *et al.* [2012]), LOX8 und LOX10 (Christensen *et al.* [2013]) analysiert werden könnten. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der bHLH einen positiven Rückkopplungseffekt auf die JA-Biosynthese bewirkt.

4.7 Zusammenfassender Überblick der kartierten Kandidatengene in einem Modell

Im abschließenden Kapitel soll ein Übersichtsmodell die Ergebnisse des „Nested Association Mapping“ und der „Genome Wide Association Study“ zeigen (Abb. 4.3).

Mit insgesamt 4 QTLs war es möglich 5 verschiedene Gene zu identifizieren, welche eine Rolle in der Terpenbiosynthese oder in dessen Signaltransduktion spielen. Der bHLH als Transkriptionsfaktor ist vermutlich in der Signalkaskade involviert und wurde durch QTL_{405/406} ermittelt. Für den Fall dass der Transkriptionsfaktor mit dem QTL assoziiert ist, sind weitere Analysen notwendig, um genauer zu bestimmen, an welcher Position der bHLH die Signaltransduktion der Terpenbiosynthese reguliert. In der Nähe desselben QTLs wurde das Gen *fpps3* identifiziert, dessen Protein *in vitro* die Synthese von FPP katalysiert. Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass *fpps3* wahrscheinlich nicht mit dem quantitativen Lokus (QTL_{405/406}) assoziiert ist. Allerdings korreliert das Expressionsmuster von *fpps3* sehr stark mit denen von Terpensynthasen wie *tps10* und *tps23* nach Verwundung und Herbivorie in Blättern und lässt eine Bereitstellung von FPP für die Sesquiterpenbiosynthese durch FPPS3 vermuten. Im Beispiel von QTL_{405/406} war es somit möglich zwei Gene zu identifizieren, welche in der Terpenbiosynthese eine Rolle spielen.

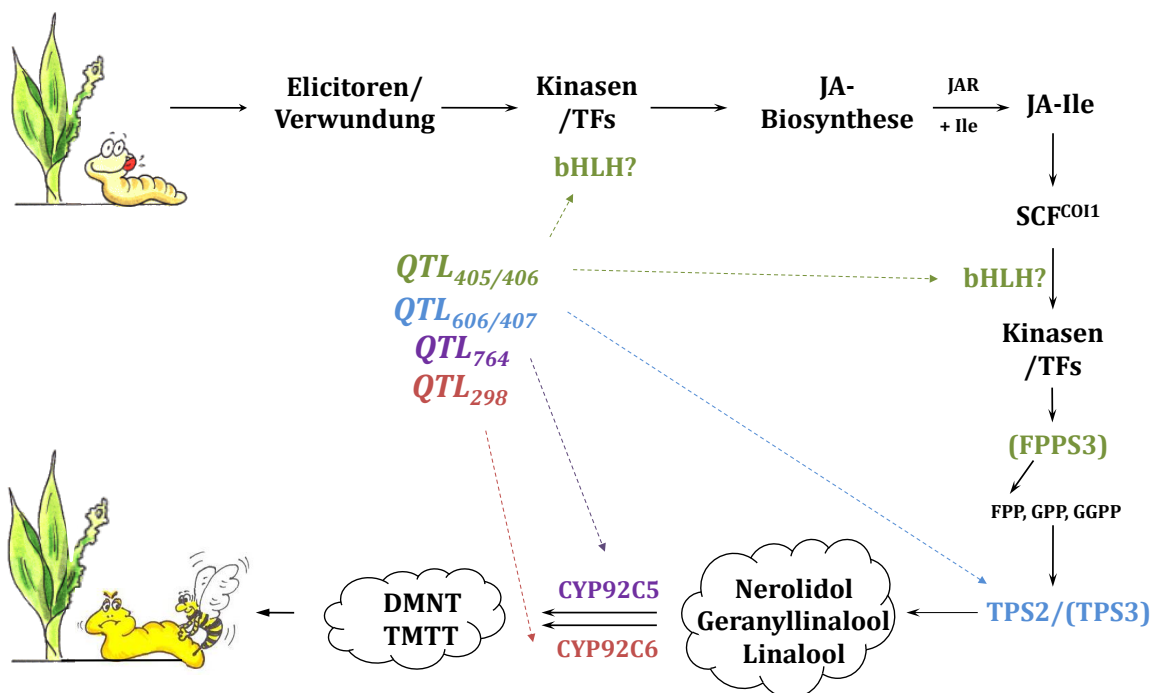


Abbildung 4.3 Übersichtmodell der Signalkaskade nach Herbivorie einschließlich der Terpenbiosyntheseschritte der mittels QTL-identifizierten Kandidatenzymen. Die in dieser Arbeit analysierten QTLs sind mittig in verschiedenen Farben dargestellt. Die dadurch identifizierten Kandidatengene sind in derselben Farbe gekennzeichnet. In Klammern dargestellte Gene, sind als Kandidatengene ausgeschlossen worden.

Zwischen QTL₆₀₆ und QTL₆₀₇ konnte *tps2* lokalisiert werden. Diese Terpensynthase synthetisiert *in vitro* das Monoterpen Linalool, das Sesquiterpen (*E*)-Nerolidol sowie das Diterpen Geranylinalool. Niedrige Expressionswerte in Ky21 sowie ein inaktives

tps2-Tzi8 Allel korrelieren mit einer geringen Emission an TPS2-Produkten und deuten auf eine Assoziation von *tps2* mit dem QTL hin.

QTL₂₉₈ und QTL₇₆₄ identifizierten schließlich zwei Monooxygenaseenzyme, welche (*E*)-Nerolidol und Geranylinalool *in vitro* modifizieren und durch eine oxidative Spaltung der C-C-Bindungen in DMNT und TMTT umwandeln. Dabei ist die Monooxygenase CYP92C5 in der Lage beide Homoterpene zu bilden, während der anderen Monooxygenase, CYP92C6, nur die Biosynthese von TMTT nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen von DMNT und eine geringere Akkumulation von TMTT in der *dmnt*-Mutante (MuIII) sind auf ein nichtfunktionelles CYP92C5 Protein zurückzuführen. TMTT welches weiterhin in der *dmnt*-Mutante gebildet wird, gibt zusammen mit den Expressions- und Aktivitätsstudien Hinweise, dass *cyp92c6* mit dem QTL₂₉₈ assoziiert ist.

Mit Hilfe des „Nested Association Mapping“ in Kombination mit „Genome Wide Association Study“ war es in dieser Arbeit möglich den Biosyntheseweg beginnend bei den Isopreneinheiten IPP und DMAPP über die Zwischenprodukte (*E*)-Nerolidol bzw. Geranylinalool bis hin zu den Endprodukten DMNT und TMTT vollständig aufzuklären. Die beiden Terpensynthasen, *tps10* sowie *tps23*, konnten durch QTL₁₀₅₀ bzw. QTL₁₀₅₆ lokalisiert werden, auch wenn beide Gene bereits in vorigen Studien identifiziert wurden (Schnee *et al.* [2006]; Köllner *et al.* [2008a]). Diese Resultate verdeutlichen die enorme Effizienz dieser Kartierungsmethode, welche die Vorteile der Assoziations- und Kopplungskartierung vereinigt.

5 Anhang

5.1 Sequenzvergleich *fpps3*-B73 und *fpps3*-Ky21

	1		70
<i>fpps3</i> -Ky21			
B73	TGTGATTGCACTGTTTTCTC	GAGTTGGCGCTCCATATTCC	AATTAACAAAATAATCTTA
HAPMAP	TGTGATTGCACTGTTTTCTC	GAGTTGGCGCTCCATATTCC	AATTAACAAAATAATCTTA
	71		140
<i>fpps3</i> -Ky21			
B73	TAATAAATCGAACAAATAGTG	ATAAGGCATGATCATAGTTC	AAATATAATATTAATTCATC
HAPMAP	TAATAAATCGAACAAATA		TAATATTAATTCATC
	141		210
<i>fpps3</i> -Ky21			
B73	AGCAATAGCAATACTACCAA	ATAATTCATTGTATGCAAG	ATGTAGGGTAAACAAAATTA
HAPMAP	AGCAATAGCAATACTACCAA	ATAATTCATTGTATGCAAG	ATGTAGGGTAAACAAAATTA
	211		280
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	TAGGTTGCCCAACAATTTAA	CTTGACAGTACATTATGTGA	TTAACAAAATCACAATATTT
HAPMAP	TAGGTTGCCCAACAATTTAA	CTTGACAGTACATTATGTGA	TTAACAAAATCACAATATTT
	281		350
<i>fpps3</i> -Ky21			
B73	AGAATGTGATCAAGGACACA	ACTTGCCTTTTACTTGCAAA	TCCAATGCTCAGATACTTC
HAPMAP	AGAATGTGATC	ACA	ACTTGCCTTTTACTTGCAAA
	351		420
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	GGCTTCAGATTTCTGGTCTG	AACCTTCGTTTCTATTACAA	CAATACATACAGATAGATA
HAPMAP	GGCTTCAGATTTCTGGTCTG	AACCTTCGTTTCTATT	
	421		490
<i>fpps3</i> -Ky21			
B73	CAAATAACATTACACAACAA	CATGAAAACAATTTTAAAGG	GTGTTGACGTTCTGAGCAAT
HAPMAP		ACAA	CATGAAAACAATTTTAAAGG
	491		560
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	AATAAATACCATTACACAACA	TGATCACATTCTTATATTGC	ACAAATAACATAATAAATTG
HAPMAP	AATAAATACCATTACACAACA	TGATCAC	
	561		630
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	ATATAGCCTAAAAATACATA	AAAATCAATTTTCATCCGCTG	CACTCAATAAATTTAAGATA
HAPMAP	AAAATACATA	AAAATCAATTTTCATCCCTG	CACTCAATAAATTTAAGATA
	631		700
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	GAACATTGTAAGTGGCCAA	ATATGAAATCTAAGCTAAA	TAGCCTATCCAAAATAAAG
HAPMAP	GAACATTGTAAGTGGCGAA	ATATGAAATCTAAGCTAAA	TATCCTATCCAAAATAAAG
	701		770
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73		GATCTTATCTA	ATATCTATACGATTAGTGA
HAPMAP	GGCCTTAAGATCTTATCTA	ATATCTATACGATTAGTGA	TAGAAAACACTGTCACAT
		AGCCT	
	771		840
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	GAGTAGATTTAGGAGCTGTT	TGTTTTAGATTATATAATTT	TATAATTTTTAAATTAAGTG
HAPMAP	GAGTAGATTTAGGAGCTGTT	TGTTTTAGATTATATAATTT	TATAATTTTTAAATTAAGTG
	841		910
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	ATTTATTAGATCATATAATC	TTGATAGATTATAACCCAAA	TAAACAGACACTTACTGTT
HAPMAP	ATTTATTAGATCATATAATC	TTGATAGATTATAACCCAAA	TAAACAGACACTTACTGTT
	911		980
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	TAACCTTAATAAAAAATAAAC	TCTGTTATGTTCTGCAGAGA	TAGGGTTACGAGCTAGAGTT
HAPMAP	TAACCTTAATAAAAAATAAAC	TCTGTTATGTTCTGCAGAGA	TAGGGTTACGAGCTAGAGTT
	981		1050
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	TTACAGCACGCAGTTGTCGT	CGTCATTGTCTTCGACTCTT	CGTGGCACCTCCCGTCCATA
HAPMAP	TTACAGCACGCAGTTGTCGT	CGTCATTGTCTTCGACTCTT	CGTGGCACCTCCCGTCCATA
	1051		1120
<i>fpps3</i> -Ky21			
<i>fpps3</i> -B73	TGTGCCCCACAAATCTGTTCG	CTCGCATTGGCAACTGAACC	GCACCAGGCACCACAGTCCC
	TGTGCCCCACAAATCTGTTCG	CTCGCATTGGCAACTGAACC	GCACCAGGCACCACAGTCCC

Abbildung 5.1 Sequenzvergleich des B73-Allels und Ky21-Allels von *fpps3*. Die Promotersequenz des *fpps3* B73-Allels wurde aus der Datenbank von maizesequence.org entnommen. Das Ky21-Allel von *fpps3* konnte bis 548 bp stromaufwärts vom Startcodon sequenziert werden. Zusätzlich wurden kurze HapMap-Sequenzen (je 61 bp) der Linie Ky21 von der Seite www.biotech.cornell.edu angefordert und in der richtigen Orientierung zusammengefügt.

5.2 Genotypisierung von *tps2* in den RILs der Linien B73 und Ky21

	1			70
Z14E0124	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0085_2	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
<i>tps2</i>	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
<i>tps3</i>	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0145	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGT-----	-AGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0145_2	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGT-----	-AGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0124	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0012	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0085	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGT-----	-AGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
Z14E0012_2	CGACGGACGTCAAACGGATG	CTGCGTCAGCGTCAGAAGAA	GAGCGGCGGGCGGGGAGG	TGCTGGTCAC
	71			140
Z14E0124	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0085_2	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
<i>tps2</i>	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
<i>tps3</i>	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0145	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0145_2	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0124	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0012	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0085	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
Z14E0012	CATCGACAACCTCAAGCGCC	TCTGCATCGACCACTACTTC	GAGGAAGAGATCGAGGGGCGC	CATGGCGACG
	209			210
Z14E0124	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0085_2	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
<i>tps2</i>	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
<i>tps3</i>	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0145	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0145_2	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0124	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0012	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCC
Z14E0085	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG
Z14E0012	GGCGCCTGCACGCGTCTCCT	CCACAGCGACGACCTCTTCG	ACGCAACCCTCGCGTTCAGG	CTCCTGAGAG

Abbildung 5.2 Genotypisierung von *tps2* in den RILs der beiden Elternlinien Ky21 und B73. Durch einzelne Nukleotide (grau hinterlegt) konnte zwischen *tps2* und *tps3* sowie zwischen dem B73-Allel und dem Ky21-Allel unterschieden werden. Beispielhaft wurden von jeder RIL jeweils zwei Sequenzen gegen das B73-Allel aligniert. Entweder entsprechen die RILs entweder dem B73-Allel oder dem Ky21-Allel. Eine Ausnahme bildet die RIL Z140085, da eine Sequenz dem B73-Allel und die zweite dem Ky21-Allel entspricht. Somit ist diese RIL heterozygot, während die anderen homozygot für *tps2* sind.

5.3 Phänotypisierung von *tps10* und *tps2* in Ky21 und B73

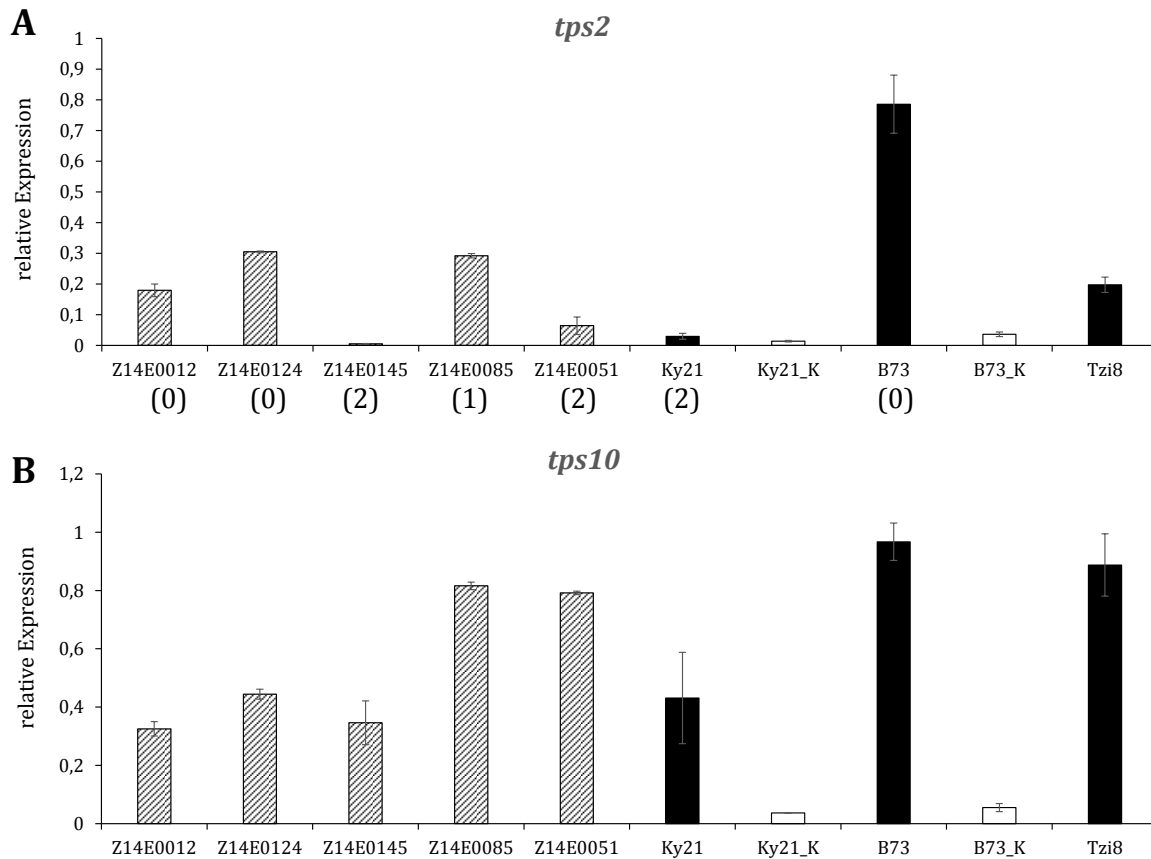


Abbildung 5.3 Phänotypisierung der Expression von *tps10* und *tps2* in den Elternlinien Ky21, B73 und Tzi8 sowie der RILs von Ky21 und B73. Die relativen Expressionswerte der Elternlinien wurden als schwarze Balken dargestellt und deren Kontrollwerte als weiße Balken. Die RILs der Elternlinien Ky21 und B73 sind als Balken mit gestreifter Markierungsfüllung dargestellt. Mit Hilfe der *tps10* Expression wird deutlich, dass in der Elternlinie Ky21 zusätzlich zum *tps2*-Lokus ein weiterer Locus Einfluss auf die Expression von *tps2* ausübt. Die RILs Z14E0085 und Z14E0051 zeigen eine *tps10* Expression ähnlich wie in B73, so dass hier kein zweiter Locus Einfluss auf die *tps2* Expression haben sollte. Währenddessen Z14E0051 eine sehr geringe Expression ähnlich wie der Elter Ky21 aufweist, liegen die Expressionswerte von Z14E0085 zwischen den beiden Elternlinien Ky21 und B73. Dies korreliert mit dem Genotyp, welcher mit einer „0“ (B73) oder „2“ (Ky21) gekennzeichnet ist.

5.4 Phänotypisierung der Terpenemission in Ky21

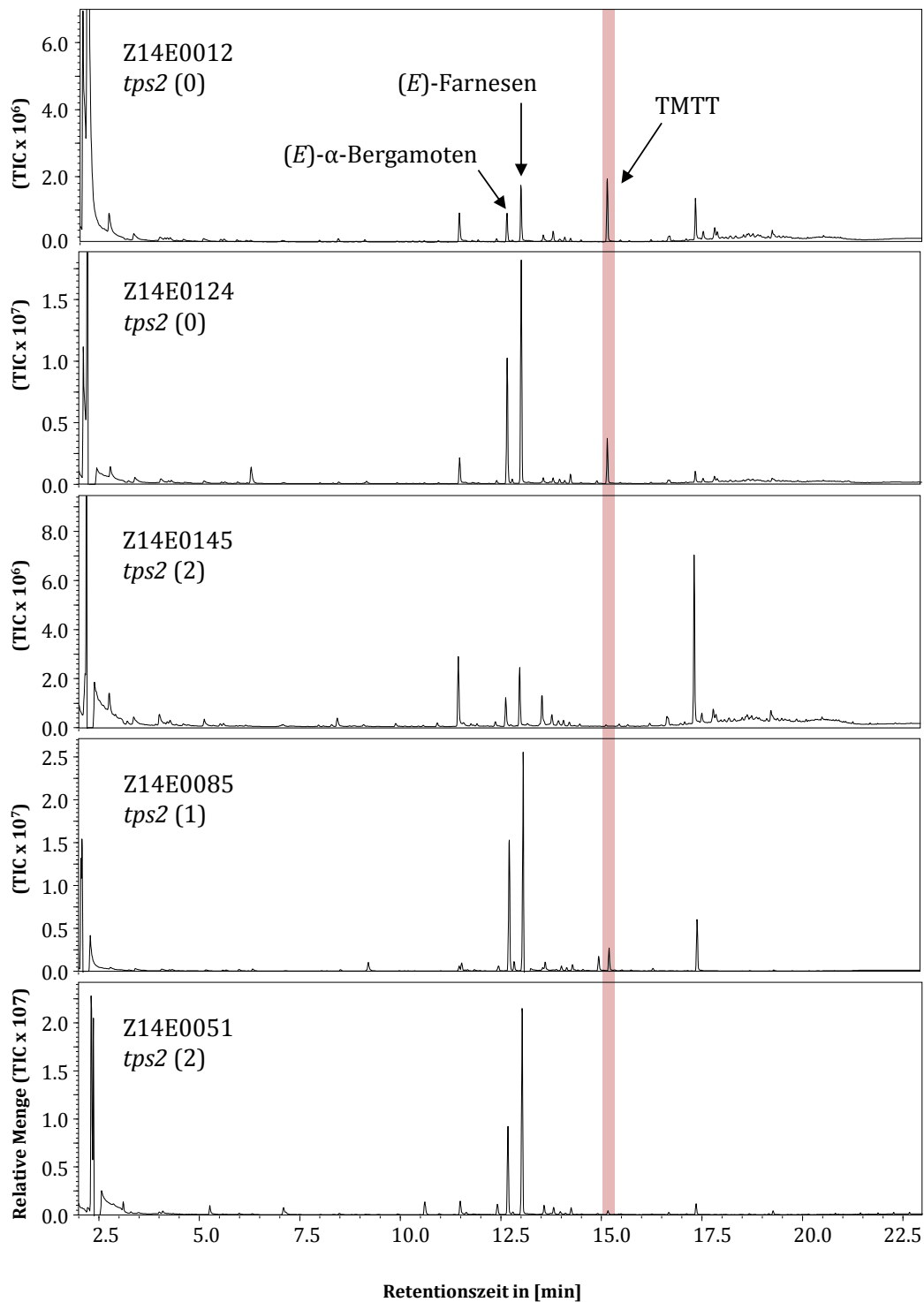


Abbildung 5.4 Terpenspektren der RILs der beiden Elternlinien B73 und Ky21. Der Genotyp von *tps2* in den jeweiligen RILs ist durch eine „0“ (B73), „1“ (heterozygot) oder „2“ (Ky21) gekennzeichnet. Die Terpenemission von TMTT ist gut erkennbar und korreliert mit dem Genotyp von *tps2* und auch mit der in Abb. 5.3 gezeigten Genexpression von *tps2*. Die Terpenemission von *E*-β-Farnesen und *E*-α-Bergamoten korrelieren ebenfalls in der Menge mit der in Abb. 5.3 gezeigten Genexpression von *tps10*.

5.5 Verteilung der Terpenakkumulation vor und nach Transformation

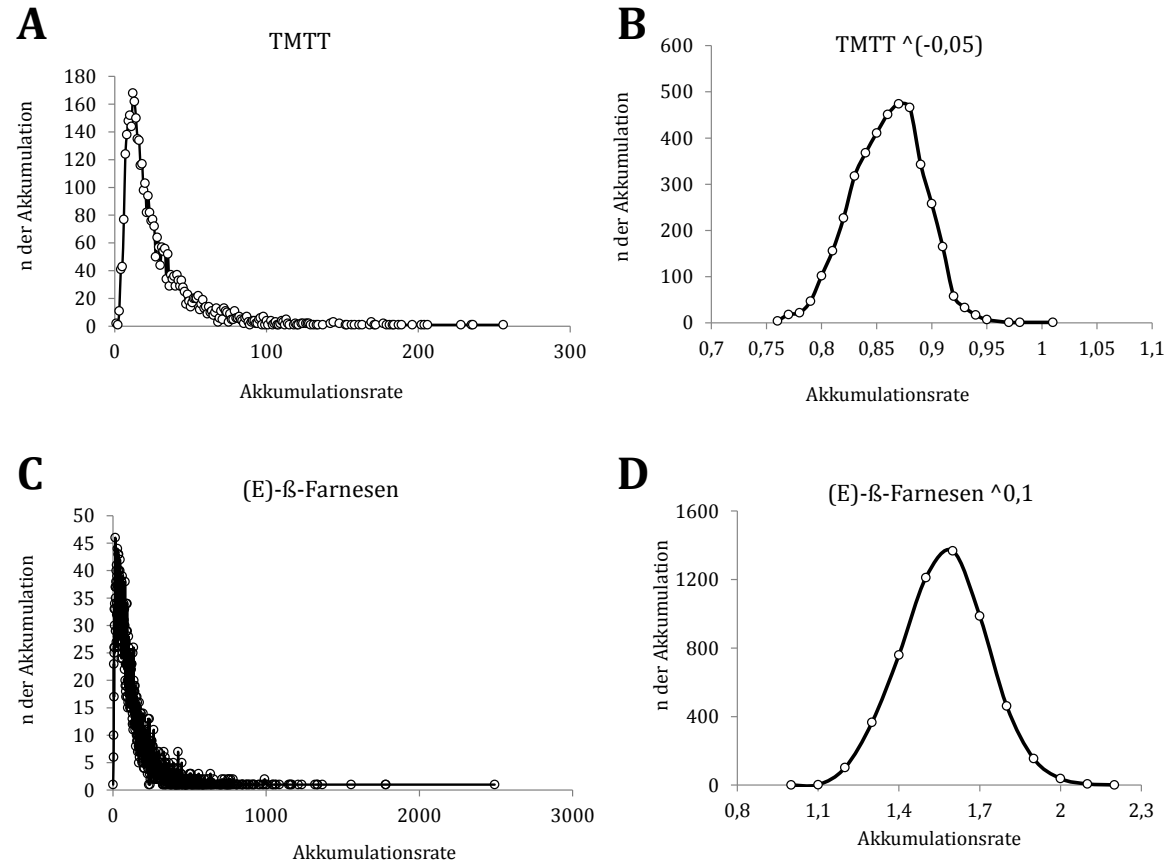


Abbildung 5.5 Verteilung der Akkumulation von TMTT und (E)- β -Farnesen vor und nach der Transformation. Nachdem die Messdaten von TMTT mit $x^{(-0,05)}$ (A) und die Messdaten von (E)- β -Farnesen (C) mit $x^{0,1}$ gerechnet wurden, konnte mit Hilfe einer Pivot-Tabelle eine Normalverteilung erreicht werden (B, D).

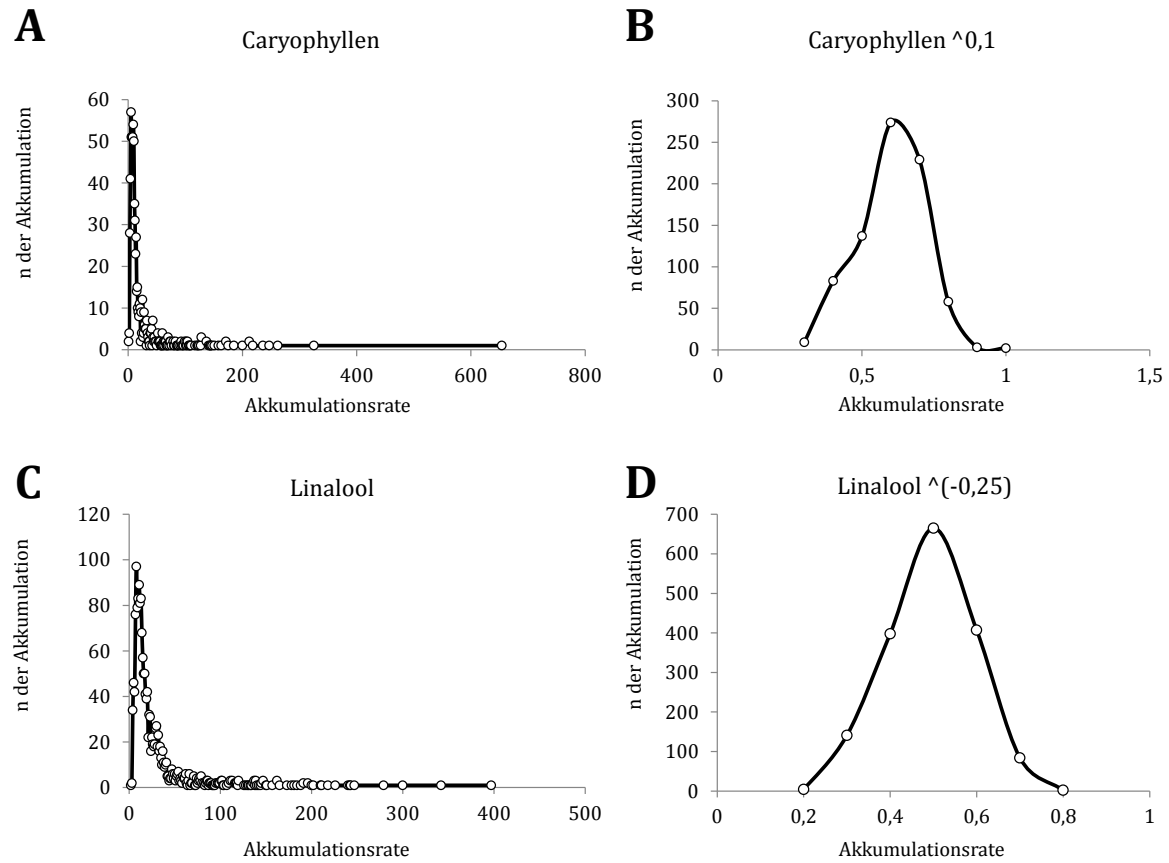


Abbildung 5.6 Verteilung der Akkumulation von (*E*)- β -Caryophyllen und Linalool vor und nach der Transformation. Nachdem die Messdaten von Linalool mit $x^{(-0,25)}$ (C) und die Messdaten von (*E*)- β -Caryophyllen (A) mit $x^{0,1}$ gerechnet wurden, konnte mit Hilfe einer Pivot-Tabelle eine Normalverteilung erreicht werden (B, D).

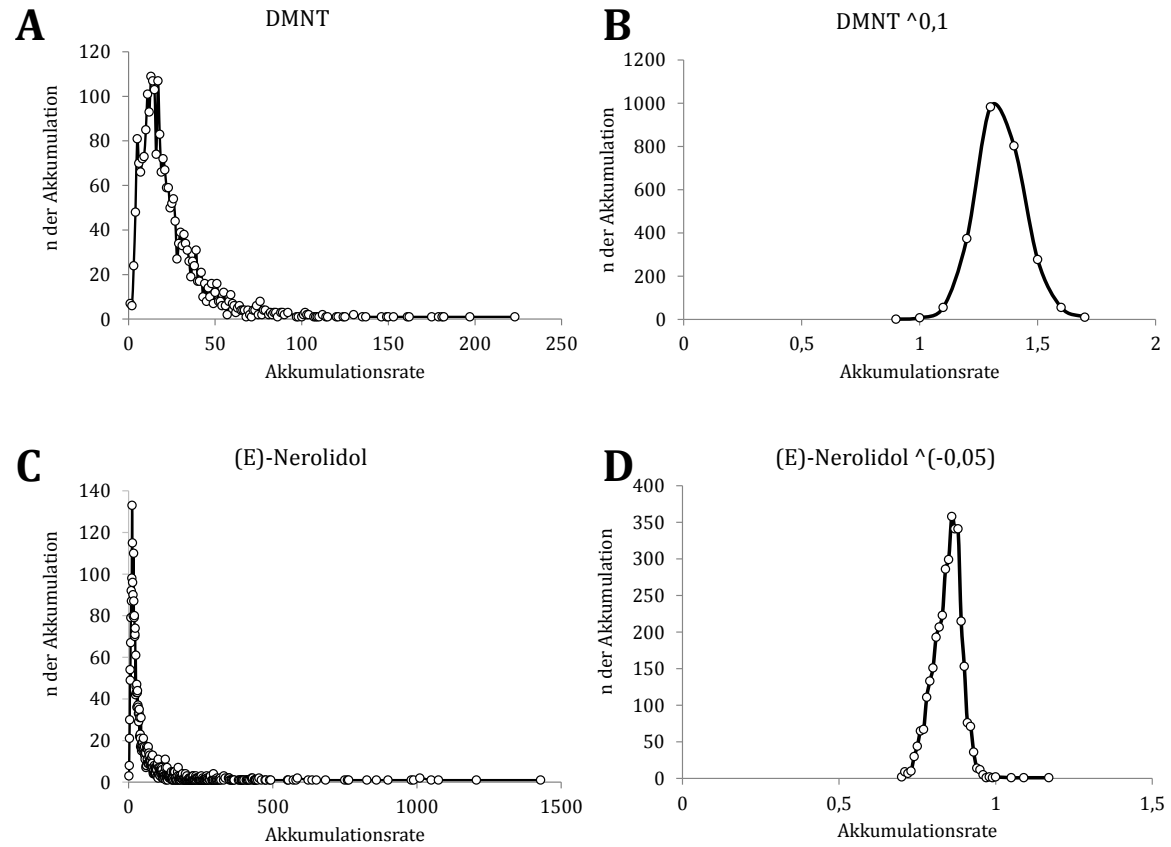


Abbildung 5.7 Verteilung der Akkumulation von (*E*)-Nerolidol und DMNT vor und nach der Transformation. Nachdem die Messdaten von DMNT mit $x^{(0,1)}$ (C) und die Messdaten von (*E*)-Nerolidol (D) mit $x^{-0,05}$ gerechnet wurden, konnte mit Hilfe einer Pivot-Tabelle eine Normalverteilung erreicht werden (B, D).

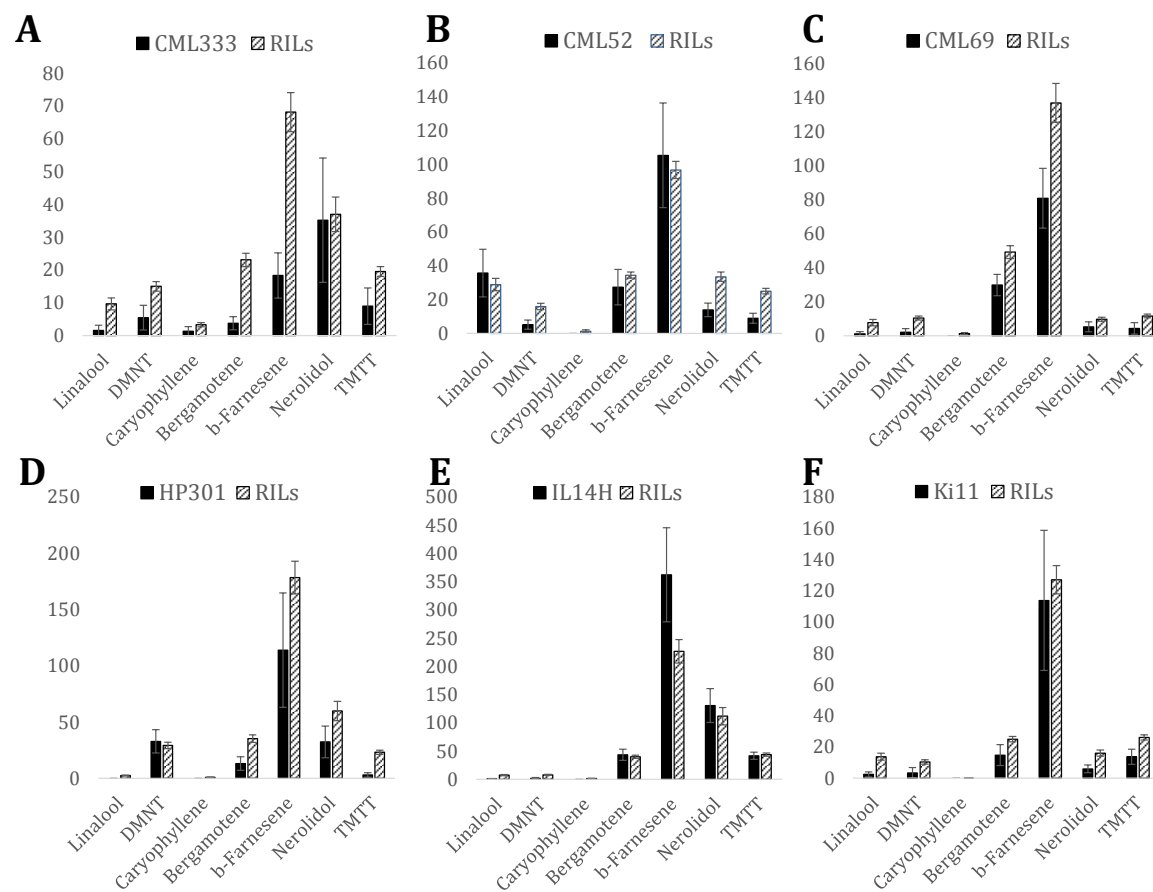


Abbildung 5.9 Terpenakkumulation der NAM-Elternlinien nach Behandlung mit dem Indanon-Elicitor. Zwei Wochen alte Keimlinge von Elternlinien der NAM Population (A-F) wurden nach Behandlung mit einem Elicitor auf die Akkumulation von dem Monoterpen Linalool, den Sesquiterpenen (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)-Nerolidol sowie den Homoterpenen DMNT und TMTT vermessen.

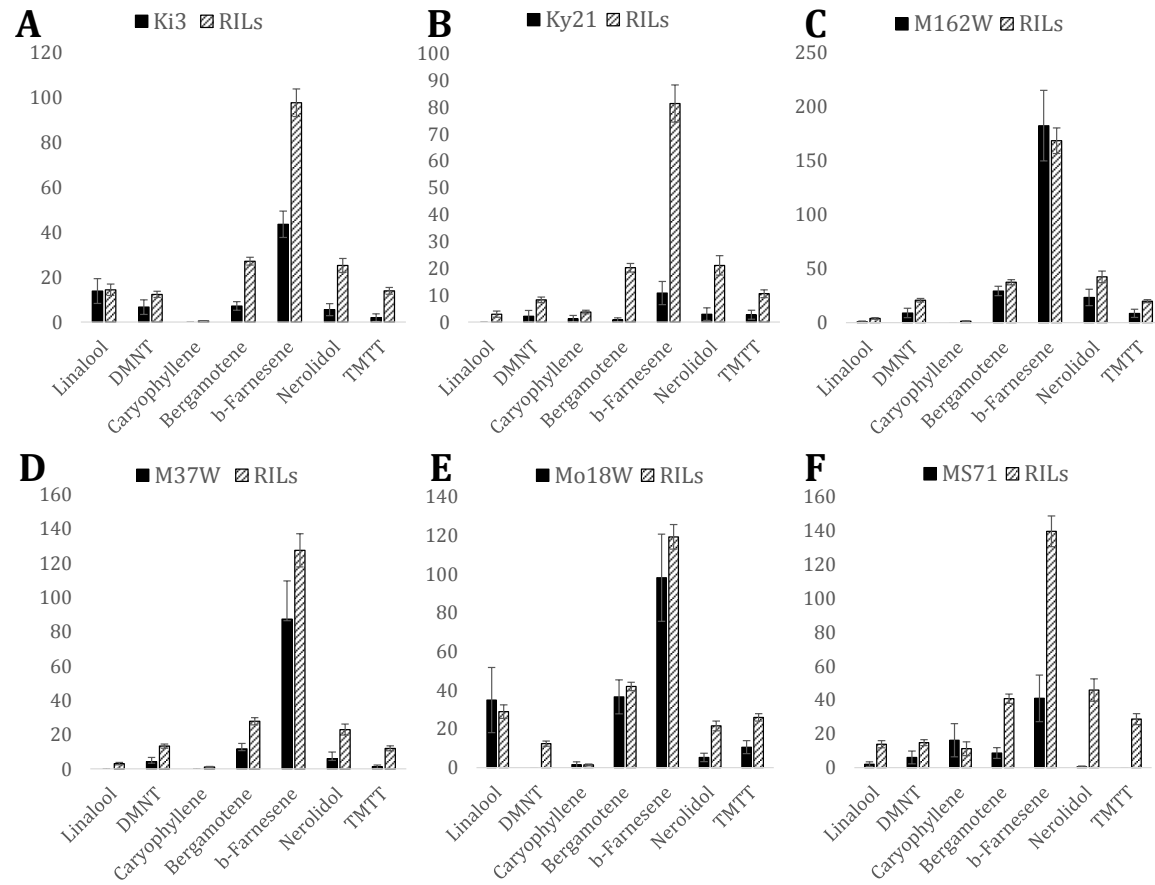


Abbildung 5.10 Terpenakkumulation der NAM-Elternlinien nach Behandlung mit dem Indanon-Elicitor. Zwei Wochen alte Keimlinge von Elternlinien der NAM Population (A-F) wurden nach Behandlung mit einem Elicitor auf die Akkumulation von dem Monoterpen Linalool, den Sesquiterpenen (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)-Nerolidol sowie den Homoterpene DMNT und TMTT vermessen.

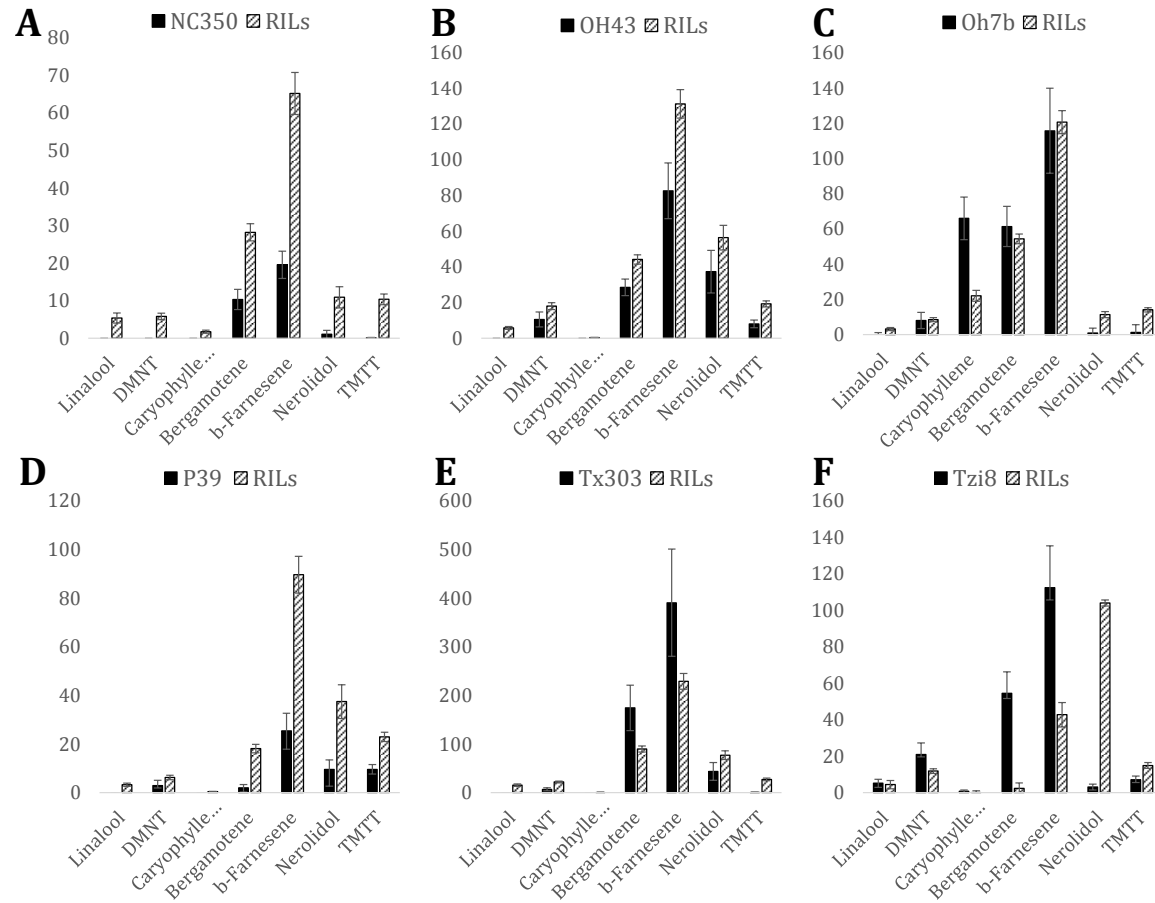


Abbildung 5.11 Terpenakkumulation der NAM-Elternlinien nach Behandlung mit dem Indanon-Elicitor. Zwei Wochen alte Keimlinge von Elternlinien der NAM Population (A-F) wurden nach Behandlung mit einem Elicitor auf die Akkumulation von dem Monoterpen Linalool, den Sesquiterpenen (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)-Nerolidol sowie den Homoterpenen DMNT und TMTT vermessen.

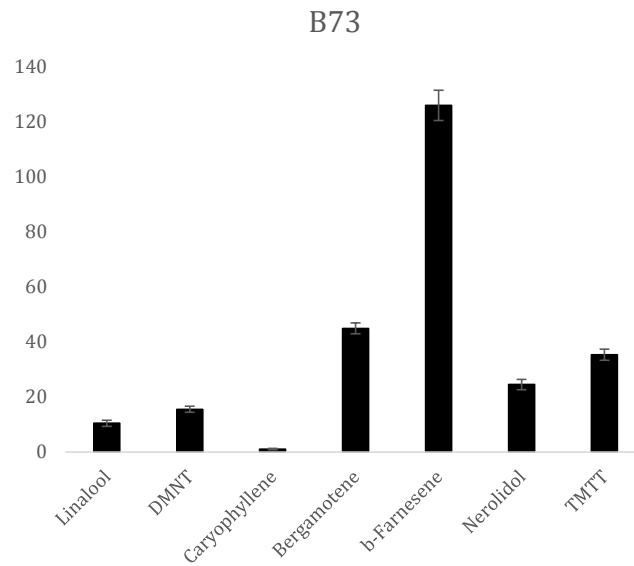


Abbildung 5.12 Terpenakkumulation der gemeinsamen NAM-Elternlinie B73 nach Behandlung mit dem Indanon-Elicitor. Zwei Wochen alte Keimlinge dieser Elternlinie wurde nach Behandlung mit einem Elicitor auf die Akkumulation von dem Monoterpen Linalool, den Sesquiterpenen (*E*)- β -Caryophyllen, (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und (*E*)-Nerolidol sowie den Homoterpene DMNT und TMTT vermessen.

5.7 Promoterelemente

<i>tps2</i>				<i>tps3</i>			
Element	Pos	Str	Sequenz	Element	Pos	Str	Sequenz
-10PEHVPSBD	526	(-)	TATTCT	2SSEEDPROTBANAPA	120	(+)	CAAACAC
-10PEHVPSBD	759	(-)	TATTCT	2SSEEDPROTBANAPA	56	(-)	CAAACAC
-300ELEMENT	643	(-)	TGHAAARK	ABRELATERD1	279	(+)	ACGTG
2SSEEDPROTBANAPA	865	(+)	CAAACAC	ABRELATERD1	102		
ABRELATERD1	193	(+)	ACGTG	ABRELATERD1	5	(+)	ACGTG
ABRELATERD1	573	(+)	ACGTG	ABRELATERD1	278	(-)	ACGTG
ABRELATERD1	572	(-)	ACGTG	ABRELATERD1	102		
ABRERATCAL	192	(+)	MACGYGB	ABREMOTIFAOSOSEM	4	(+)	TACGTGTC
ABRERATCAL	572	(+)	MACGYGB	ABRERATCAL	278	(+)	MACGYGB
ABRERATCAL	572	(+)	MACGYGB	ABRERATCAL	277	(-)	MACGYGB
ABRERATCAL	571	(-)	MACGYGB	ABRERATCAL	102		
ACGTABOX	317	(+)	TACGTA	ACGTABREMOTIFA2OSEM	5	(+)	ACGTGKC
ACGTABOX	317	(-)	TACGTA	ACGTABREMOTIFA2OSEM	102		
ACGTATERD1	193	(+)	ACGT	ACGTATERD1	4	(+)	TACGTGTC
ACGTATERD1	318	(+)	ACGT	ACGTATERD1	279	(+)	ACGT
ACGTATERD1	535	(+)	ACGT	ACGTATERD1	348	(+)	ACGT
ACGTATERD1	573	(+)	ACGT	ACGTATERD1	102		
ACGTATERD1	193	(-)	ACGT	ACGTATERD1	5	(+)	ACGT
ACGTATERD1	318	(-)	ACGT	ACGTATERD1	279	(-)	ACGT
ACGTATERD1	535	(-)	ACGT	ACGTATERD1	348	(-)	ACGT
ACGTATERD1	573	(-)	ACGT	ACGTATERD1	102		
AMYBOX1	178	(-)	TAACARA	ACGTATERD1	5	(-)	ACGT
AMYBOX2	592	(+)	TATCCAT	ACGTTBOX	347	(+)	AACGTT
ANAERO1CONSENSUS	65	(-)	AAACAAA	ACGTTBOX	347	(-)	AACGTT
ANAERO2CONSENSUS	688	(+)	AGCAGC	AMYBOX1	781	(+)	TAACARA
ANAERO2CONSENSUS	691	(+)	AGCAGC	AMYBOX1	707	(-)	TAACARA
ANAERO2CONSENSUS	100			AMYBOX2	298	(+)	TATCCAT
ANAERO2CONSENSUS	2	(+)	AGCAGC	ANAERO1CONSENSUS	155	(+)	AAACAAA
ANAERO2CONSENSUS	964	(-)	AGCAGC	ANAERO1CONSENSUS	896	(-)	AAACAAA
ARR1AT	797	(+)	NGATT	ANAERO1CONSENSUS	119		
ARR1AT	102			ANAERO2CONSENSUS	9	(+)	AGCAGC
ARR1AT	4	(+)	NGATT	ANAERO2CONSENSUS	143		
ARR1AT	102			ANAERO2CONSENSUS	4	(+)	AGCAGC
ARR1AT	8	(+)	NGATT	ARR1AT	758	(+)	NGATT
ARR1AT	347	(-)	NGATT	ARR1AT	789	(+)	NGATT
ARR1AT	629	(-)	NGATT	ARR1AT	28	(-)	NGATT
ARR1AT	777	(-)	NGATT	ARR1AT	335	(-)	NGATT
ASF1MOTIFCAMV	826	(+)	TGACG	BIHD10S	184	(+)	TGTCA
BIHD10S	481	(+)	TGTCA	BIHD10S	102		
BIHD10S	247	(-)	TGTCA	CAATBOX1	0	(+)	CAAT
BIHD10S	544	(-)	TGTCA	CAATBOX1	111		
CAATBOX1	111	(+)	CAAT	CAATBOX1	5	(+)	CAAT
CAATBOX1	346	(+)	CAAT	CAATBOX1	225	(-)	CAAT
CAATBOX1	624	(+)	CAAT	CAATBOX1	303	(-)	CAAT
				CAATBOX1	810	(-)	CAAT
				CAATBOX1	956	(-)	CAAT
				CAATBOX1	977	(-)	CAAT
				CACGTGMOTIF	278	(+)	CACGTG
				CACGTGMOTIF	278	(-)	CACGTG
				CACFTTPPCA1	260	(+)	YACT

CAATBOX1	59	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	356	(+)	YACT
CAATBOX1	84	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	600	(+)	YACT
CAATBOX1	89	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	612	(+)	YACT
CAATBOX1	258	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	622	(+)	YACT
CAATBOX1	302	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	703	(+)	YACT
CAATBOX1	386	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	764	(+)	YACT
CAATBOX1	597	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	55	(-)	YACT
CAATBOX1	897	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	426	(-)	YACT
CAATBOX1	102						
CAATBOX1	6	(-)	CAAT	CACTFTPPCA1	475	(-)	YACT
CACGTGMOTIF	572	(+)	CACGTG	CACTFTPPCA1	686	(-)	YACT
CACGTGMOTIF	572	(-)	CACGTG	CANBNNAPA	120	(+)	CNAACAC
CACTFTPPCA1	201	(+)	YACT	CANBNNAPA	56	(-)	CNAACAC
CACTFTPPCA1	556	(+)	YACT	CARGCW8GAT	41	(+)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	786	(+)	YACT	CARGCW8GAT	187	(+)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	929	(+)	YACT	CARGCW8GAT	624	(+)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	933	(+)	YACT	CARGCW8GAT	41	(-)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	937	(+)	YACT	CARGCW8GAT	187	(-)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	458	(+)	YACT	CARGCW8GAT	624	(-)	CWXXXXXXXXXX G
CACTFTPPCA1	52	(-)	YACT	CATATGGMSAUR	5	(+)	CATATG
CACTFTPPCA1	77	(-)	YACT	CATATGGMSAUR	5	(-)	CATATG
CACTFTPPCA1	93	(-)	YACT	CBFHV	246	(+)	RYCGAC
CACTFTPPCA1	245	(-)	YACT	CBFHV	246	(-)	RYCGAC
CACTFTPPCA1	268	(-)	YACT	CCAATBOX1	225	(-)	CCAAT
CACTFTPPCA1	507	(-)	YACT	CELLCYCLESC	569	(+)	CACGAAAA
CACTFTPPCA1	878	(-)	YACT	CGCGBOXAT	264	(+)	VCGCGB
CACTFTPPCA1	105				122		
CACTFTPPCA1	8	(-)	YACT	CGCGBOXAT	7	(+)	VCGCGB
CACTFTPPCA1	106						
CACTFTPPCA1	1	(-)	YACT	CGCGBOXAT	264	(-)	VCGCGB
CANBNNAPA	865	(+)	CNAACAC	CPBCSPOR	99	(-)	TATTAG
CARGCW8GAT	891	(+)	CWXXXXXXXXXX G	CRTDREHVCBF2	246	(+)	GTCGAC
CARGCW8GAT	994	(+)	CWXXXXXXXXXX G	CRTDREHVCBF2	246	(-)	GTCGAC
CARGCW8GAT	891	(-)	CWXXXXXXXXXX G	CURECORECR	340	(+)	GTAC
CARGCW8GAT	994	(-)	CWXXXXXXXXXX G	CURECORECR	392	(+)	GTAC
CARGNCAT	890	(+)	CCXXXXXXXXXX G	CURECORECR	621	(+)	GTAC
CARGNCAT	890	(-)	CCXXXXXXXXXX G	CURECORECR	116		
CBFHV	5	(+)	RYCGAC	CURECORECR	4	(+)	GTAC
CCAATBOX1	302	(-)	CCAAT	CURECORECR	340	(-)	GTAC
CCAATBOX1	897	(-)	CCAAT	CURECORECR	392	(-)	GTAC
CGACGOSAMY3	7	(+)	CGACG	CURECORECR	621	(-)	GTAC
CGACGOSAMY3	871	(+)	CGACG	CURECORECR	116		
CGACGOSAMY3	145	(-)	CGACG	CURECORECR	4	(-)	GTAC
CGACGOSAMY3	341	(-)	CGACG	DOFCOREZM	20	(+)	AAAG
CIACADIANLELHC	111	(+)	CAANNNNATC	DOFCOREZM	68	(+)	AAAG
CURECORECR	53	(+)	GTAC	DOFCOREZM	235	(+)	AAAG
CURECORECR	78	(+)	GTAC	DOFCOREZM	315	(+)	AAAG
CURECORECR	98	(+)	GTAC	DOFCOREZM	499	(+)	AAAG
CURECORECR	198	(+)	GTAC	DOFCOREZM	564	(+)	AAAG
				DOFCOREZM	574	(+)	AAAG
				DOFCOREZM	630	(+)	AAAG

5.6 Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs

CURECORECR	316 (+)	GTAC	DOFCOREZM	639 (+)	AAAG
CURECORECR	621 (+)	GTAC	DOFCOREZM	145 (-)	AAAG
CURECORECR	634 (+)	GTAC	DOFCOREZM	614 (-)	AAAG
CURECORECR	879 (+)	GTAC	DOFCOREZM	624 (-)	AAAG
CURECORECR	53 (-)	GTAC	DOFCOREZM	675 (-)	AAAG
CURECORECR	78 (-)	GTAC	DOFCOREZM	705 (-)	AAAG
CURECORECR	98 (-)	GTAC	DOFCOREZM	745 (-)	AAAG
CURECORECR	198 (-)	GTAC	DOFCOREZM	768 (-)	AAAG
CURECORECR	316 (-)	GTAC	DOFCOREZM	850 (-)	AAAG
CURECORECR	621 (-)	GTAC	DOFCOREZM	886 (-)	AAAG
CURECORECR	634 (-)	GTAC	DOFCOREZM	112	
CURECORECR	879 (-)	GTAC	DOFCOREZM	5 (-)	AAAG
DOFCOREZM	125 (+)	AAAG	DPBFCOREDCDC3	133 (+)	ACACNNG
DOFCOREZM	278 (+)	AAAG	DPBFCOREDCDC3	122	
DOFCOREZM	531 (+)	AAAG	DPBFCOREDCDC3	5 (+)	ACACNNG
DOFCOREZM	609 (+)	AAAG	DOFCOREZM	53 (-)	ACACNNG
DOFCOREZM	231 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	5 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	369 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	134 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	439 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	158 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	472 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	278 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	643 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	395 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	101		EBOXBNNAPA	406 (+)	CANNTG
DOFCOREZM	4 (-)	AAAG	EBOXBNNAPA	121	
DPBFCOREDCDC3	427 (+)	ACACNNG	EBOXBNNAPA	2 (+)	CANNTG
DPBFCOREDCDC3	945 (+)	ACACNNG	EBOXBNNAPA	5 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	63 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	134 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	176 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	158 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	331 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	278 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	408 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	395 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	572 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	406 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	649 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	121	
EBOXBNNAPA	914 (+)	CANNTG	EBOXBNNAPA	2 (-)	CANNTG
EBOXBNNAPA	63 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	942 (+)	GANTTNC
EBOXBNNAPA	176 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	961 (+)	GANTTNC
EBOXBNNAPA	331 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	980 (+)	GANTTNC
EBOXBNNAPA	408 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	110	
EBOXBNNAPA	572 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	5 (-)	GANTTNC
EBOXBNNAPA	649 (-)	CANNTG	EBOXBNNAPA	855 (-)	TTGACC
EBOXBNNAPA	914 (-)	CANNTG	ELRECOREPCRP1	108	
ELRECOREPCRP1	137 (+)	TTGACC	ERELEE4	1 (+)	AWTTCAAA
GAREAT	178 (-)	TAACAAR	ERELEE4	110	
GATABOX	456 (+)	GATA	ERELEE4	7 (+)	AWTTCAAA
GATABOX	514 (+)	GATA	ERELEE4	676 (-)	AWTTCAAA
GATABOX	321 (-)	GATA	ERELEE4	901 (-)	AWTTCAAA
GATABOX	592 (-)	GATA	ERELEE4	102	
GATABOX	739 (-)	GATA	GADOWNAT	5 (+)	ACGTGTC
GATABOX	926 (-)	GATA	GAREAT	781 (+)	TAACAAR
GMHDLGMVSPB	994 (+)	CATTAATTAG	GAREAT	707 (-)	TAACAAR
			GATABOX	238 (+)	GATA
			GATABOX	326 (+)	GATA
			GATABOX	450 (+)	GATA
			GATABOX	455 (+)	GATA
			GATABOX	545 (+)	GATA
			GATABOX	648 (+)	GATA
			GATABOX	723 (+)	GATA

GT1CONSENSUS	275 (+)	GRWAAW	GATABOX	803 (+)	GATA
GT1CONSENSUS	514 (+)	GRWAAW	GATABOX	298 (-)	GATA
GT1CONSENSUS	606 (+)	GRWAAW	GT1CONSENSUS	431 (+)	GRWAAW
GT1CONSENSUS	442 (-)	GRWAAW	GT1CONSENSUS	432 (+)	GRWAAW
GT1CONSENSUS	590 (-)	GRWAAW	GT1CONSENSUS	648 (+)	GRWAAW
GT1CONSENSUS	644 (-)	GRWAAW	GT1CONSENSUS	723 (+)	GRWAAW
GT1GMSCAM4	275 (+)	GAAAAA	GT1CONSENSUS	458 (-)	GRWAAW
GT1GMSCAM4	442 (-)	GAAAAA	GT1CONSENSUS	146 (-)	GRWAAW
GT1GMSCAM4	644 (-)	GAAAAA	GT1CONSENSUS	296 (-)	GRWAAW
GTGANTG10	246 (+)	GTGA	GT1CONSENSUS	772 (-)	GRWAAW
GTGANTG10	508 (+)	GTGA	GT1CORE	109	
GTGANTG10	725 (+)	GTGA	GT1CORE	8 (-)	GGTTAA
GTGANTG10	483 (-)	GTGA	GT1GMSCAM4	432 (+)	GAAAAA
GTGANTG10	648 (-)	GTGA	GT1GMSCAM4	146 (-)	GAAAAA
GTGANTG10	913 (-)	GTGA	GT1GMSCAM4	772 (-)	GAAAAA
GTGANTG10	928 (-)	GTGA	GTGANTG10	10 (+)	GTGA
GTGANTG10	932 (-)	GTGA	GTGANTG10	691 (+)	GTGA
GTGANTG10	936 (-)	GTGA	GTGANTG10	921 (+)	GTGA
GTGANTG10	940 (-)	GTGA	GTGANTG10	940 (+)	GTGA
GTGANTG10	969 (-)	GTGA	GTGANTG10	959 (+)	GTGA
HEXAMERATH4	144 (+)	CCGTCG	GTGANTG10	355 (-)	GTGA
HEXAMERATH4	871 (-)	CCGTCG	GTGANTG10	609 (-)	GTGA
IBOXCORE	514 (+)	GATAA	IBOXCORE	648 (+)	GATAA
IBOXCORE	591 (-)	GATAA	IBOXCORE	723 (+)	GATAA
INTRONLOWER	207 (+)	TGCAGG	IBOXCORE	297 (-)	GATAA
MYB1AT	502 (+)	WAACCA	INRNTPSADB	603 (+)	YTCANTYY
MYB1AT	101		INRNTPSADB	729 (-)	YTCANTYY
MYB1AT	7 (-)	WAACCA	INRNTPSADB	975 (-)	YTCANTYY
MYB1LEPR	104		INRNTPSADB	113	
MYB26PS	9 (+)	GTTAGTT	INRNTPSADB	1 (-)	YTCANTYY
MYB2AT	537 (+)	GTTAGTT	INRNTPSADB	997 (-)	YTCANTYY
MYB2AT	708 (+)	TAACTG	LECPLEACS2	42 (-)	TAAAATAT
MYB2AT	704 (-)	TAACTG	LECPLEACS2	188 (-)	TAAAATAT
MYB2AT	104		LECPLEACS2	468 (-)	TAAAATAT
MYB2AT	7 (-)	TAACTG	LECPLEACS2	874 (-)	TAAAATAT
MYB2CONSENSUSAT	331 (+)	YAACKG	LECPLEACS2	463 (+)	CCGAAA
MYB2CONSENSUSAT	708 (+)	YAACKG	LTRE1HVBLT49	495 (+)	CCGAAA
MYB2CONSENSUSAT	704 (-)	YAACKG	LTRE1HVBLT49	995 (+)	CCGAAA
MYB2CONSENSUSAT	104		LTRE1HVBLT49	110	
MYB2CONSENSUSAT	7 (-)	YAACKG	LTRE1HVBLT49	3 (+)	CCGAAA
MYBCORE	704 (+)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	945 (-)	CCGAAA
MYBCORE	104		LTRE1HVBLT49	964 (-)	CCGAAA
MYBCORE	7 (+)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	983 (-)	CCGAAA
MYBCORE	241 (-)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	478 (-)	CCGAC
MYBCORE	264 (-)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	102	
MYBCORE	331 (-)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	9 (-)	CCGAC
MYBCORE	578 (-)	CNGTTR	LTRE1HVBLT49	174 (+)	TTWTWTTWTT
MYBCORE	601 (-)	CNGTTR	MARTBOX	206 (+)	WAACCA
MYBCORE	701 (-)	CNGTTR	MYB1AT	594 (+)	WAACCA
MYBCORE	708 (-)	CNGTTR	MYB1AT	116 (+)	WAACCA
MYBGAHV	178 (-)	TAACAAA	MYB1AT	330 (-)	TAACTG
MYBPLANT	537 (-)	MACCWAMC	MYB2AT	330 (-)	YAACKG
MYBST1	592 (-)	GGATA	MYB2CONSENSUSAT	330 (-)	YAACKG

5.6 Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs

MYCATERD1	649 (-)	CATGTG	MYBATRD22	115 (+)	CTAACCA
MYCATRD22	649 (+)	CACATG	MYBCORE	330 (+)	CNGTTR
MYCCONSENSUSAT	63 (+)	CANNTG	MYBCORE	284 (-)	CNGTTR
MYCCONSENSUSAT	176 (+)	CANNTG	MYBCOREATCYCB1	108	
MYCCONSENSUSAT	331 (+)	CANNTG	MYBCOREATCYCB1	7 (+)	AACGG
MYCCONSENSUSAT	408 (+)	CANNTG	MYBCOREATCYCB1	533 (-)	AACGG
MYCCONSENSUSAT	572 (+)	CANNTG	MYBGAHV	781 (+)	TAACAAA
MYCCONSENSUSAT	649 (+)	CANNTG	MYBGAHV	707 (-)	TAACAAA
MYCCONSENSUSAT	914 (+)	CANNTG	MYBPLANT	117 (+)	MACCWAMC
MYCCONSENSUSAT	63 (-)	CANNTG	MYBPZM	360 (-)	CCWACC
MYCCONSENSUSAT	176 (-)	CANNTG	MYBST1	298 (-)	GGATA
MYCCONSENSUSAT	331 (-)	CANNTG	MYCATERD1	134 (-)	CATGTG
MYCCONSENSUSAT	408 (-)	CANNTG	MYCATRD22	134 (+)	CACATG
MYCCONSENSUSAT	572 (-)	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	5 (+)	CANNTG
MYCCONSENSUSAT	649 (-)	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	134 (+)	CANNTG
MYCCONSENSUSAT	914 (-)	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	158 (+)	CANNTG
NODCON1GM	437 (-)	AAAGAT	MYCCONSENSUSAT	278 (+)	CANNTG
NONAMERATH4	3 (+)	AGATCGACG	MYCCONSENSUSAT	395 (+)	CANNTG
OSE1ROOTNODULE	437 (-)	AAAGAT	MYCCONSENSUSAT	406 (+)	CANNTG
POLASIG1	188 (+)	AATAAA	MYCCONSENSUSAT	5 (-)	CANNTG
POLASIG1	499 (+)	AATAAA	MYCCONSENSUSAT	134 (-)	CANNTG
POLASIG1	528 (+)	AATAAA	MYCCONSENSUSAT	158 (-)	CANNTG
POLASIG1	475 (-)	AATAAA	MYCCONSENSUSAT	278 (-)	CANNTG
POLASIG3	38 (+)	AATAAT	MYCCONSENSUSAT	395 (-)	CANNTG
POLASIG3	299 (-)	AATAAT	MYCCONSENSUSAT	406 (-)	CANNTG
POLASIG3	383 (-)	AATAAT		116	
POLLEN1LELAT52	274 (+)	AGAAA	NAPINMOTIFBN	5 (+)	TACACAT
POLLEN1LELAT52	638 (+)	AGAAA	NODCON1GM	235 (+)	AAAGAT
POLLEN1LELAT52	290 (-)	AGAAA	NODCON1GM	143 (-)	AAAGAT
POLLEN1LELAT52	444 (-)	AGAAA	NODCON2GM	766 (+)	CTCTT
POLLEN1LELAT52	102		NODCON2GM	644 (-)	CTCTT
POLLEN1LELAT52	0 (-)	AGAAA	NTBBF1ARROLB	623 (+)	ACTTTA
PRECONSCRHSP70A	127 (-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNNN HD	OSE1ROOTNODULE	235 (+)	AAAGAT
PYRIMIDINEBOXOSRAMY 1A	471 (+)	CCTTTT	OSE1ROOTNODULE	143 (-)	AAAGAT
QELEMENTZMZM13	752 (-)	AGGTCA	OSE2ROOTNODULE	766 (+)	CTCTT
RAV1AAT	241 (+)	CAACA	OSE2ROOTNODULE	644 (-)	CTCTT
RAV1AAT	264 (+)	CAACA	POLASIG1	203 (+)	AATAAA
RAV1AAT	425 (+)	CAACA	POLASIG1	726 (+)	AATAAA
RAV1AAT	578 (+)	CAACA	POLASIG1	178 (-)	AATAAA
RAV1AAT	601 (+)	CAACA	POLASIG1	862 (-)	AATAAA
RAV1AAT	696 (+)	CAACA	POLASIG1	878 (-)	AATAAA
RAV1AAT	701 (+)	CAACA	POLASIG1	887 (-)	AATAAA
RAV1AAT	943 (+)	CAACA	POLLEN1LELAT52	148 (-)	AGAAA
RAV1AAT	104		POLLEN1LELAT52	774 (-)	AGAAA
RAV1AAT	0 (-)	CAACA		100	
RAV1BAT	914 (+)	CACCTG	PREATPRODH	0 (-)	ACTCAT
REALPHALGLHCB21	328 (+)	AACCAA	PROXBNNAPA	120 (+)	CAAACACC
REALPHALGLHCB21	303 (-)	AACCAA	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	431 (-)	TTTTTTCC
REALPHALGLHCB21	101		PYRIMIDINEBOXOSRAMY 1A	67 (-)	CCTTTT
REALPHALGLHCB21	6 (-)	AACCAA	PYRIMIDINEBOXOSRAMY 1A	573 (-)	CCTTTT
RHERPATEXPA7	571 (+)	KCACGW	RAV1AAT	217 (+)	CAACA

RHERPATEXPA7	573 (-)	KCACGW	RAV1AAT	284 (+)	CAACA
ROOTMOTIFTAPOX1	57 (+)	ATATT	RAV1AAT	307 (+)	CAACA
ROOTMOTIFTAPOX1	82 (+)	ATATT	REALPHALGLHCB21	117 (+)	AACCAA
ROOTMOTIFTAPOX1	256 (+)	ATATT	RHERPATEXPA7	277 (+)	KCACGW
ROOTMOTIFTAPOX1	420 (+)	ATATT	RHERPATEXPA7	520 (+)	KCACGW
ROOTMOTIFTAPOX1	519 (+)	ATATT	RHERPATEXPA7	279 (-)	KCACGW
ROOTMOTIFTAPOX1	518 (-)	ATATT	ROOTMOTIFTAPOX1	42 (+)	ATATT
RYREPEATBNNAPA	678 (+)	CATGCA	ROOTMOTIFTAPOX1	102 (+)	ATATT
RYREPEATBNNAPA	817 (+)	CATGCA	ROOTMOTIFTAPOX1	188 (+)	ATATT
RYREPEATBNNAPA	861 (+)	CATGCA	ROOTMOTIFTAPOX1	223 (+)	ATATT
RYREPEATBNNAPA	859 (-)	CATGCA	ROOTMOTIFTAPOX1	456 (+)	ATATT
SEBFCONSTPR10A	480 (+)	YTGTCWC	ROOTMOTIFTAPOX1	468 (+)	ATATT
SEF4MOTIFGM7S	495 (-)	RTTTTTR	ROOTMOTIFTAPOX1	838 (+)	ATATT
SITEIIATCYTC	653 (+)	TGGGCY	ROOTMOTIFTAPOX1	874 (+)	ATATT
SORLIP2AT	654 (+)	GGGCC	ROOTMOTIFTAPOX1	101 (-)	ATATT
SORLIP2AT	661 (+)	GGGCC	ROOTMOTIFTAPOX1	222 (-)	ATATT
SORLIP2AT	903 (+)	GGGCC	ROOTMOTIFTAPOX1	467 (-)	ATATT
SORLIP5AT	931 (-)	GAGTGAG	ROOTMOTIFTAPOX1	837 (-)	ATATT
SORLIP5AT	935 (-)	GAGTGAG	SEF4MOTIFGM7S	343 (-)	RTTTTTR
SREATMSD	591 (+)	TTATCC	SEF4MOTIFGM7S	972 (-)	RTTTTTR
SURECOREATSULTR11	354 (+)	GAGAC	SEF4MOTIFGM7S	86 (-)	RTTTTTR
SURECOREATSULTR11	667 (-)	GAGAC	SITEIIATCYTC	363 (+)	TGGGCY
T/GBOXATPIN2	192 (+)	AACGTG	SITEIIATCYTC	491 (+)	TGGGCY
TAAAGSTKST1	530 (+)	TAAAG	SITEIIATCYTC	103	
TATABOX2	892 (+)	TATAAAT	SITEIIATCYTC	8 (+)	TGGGCY
TATABOX4	15 (+)	TATATAA	SITEIIATCYTC	107	
TATABOX5	476 (+)	TTATTT	SITEIIATCYTC	4 (-)	TGGGCY
TATABOX5	37 (-)	TTATTT	SORLIP1AT	990 (+)	GCCAC
TATABOX5	498 (-)	TTATTT	SORLIP2AT	364 (+)	GGGCC
TATAPVTRNALEU	15 (-)	TTTATATA	SORLIP2AT	371 (+)	GGGCC
TATCCAOSAMY	592 (+)	TATCCA	SORLIP2AT	481 (+)	GGGCC
TATCCAYMOTIFOSRAMY3 D	592 (+)	TATCCAY	SORLIP2AT	492 (+)	GGGCC
TGTCACACMCUCUMISIN	481 (+)	TGTCACA	SORLIP2AT	988 (+)	GGGCC
UPRMOTIFIIAT	194 (-)	CCNNNNNNNNNNCCACG	SORLIP2AT	103	
WBOXATNPR1	137 (+)	TTGAC	SORLIP2AT	9 (+)	GGGCC
WBOXATNPR1	543 (+)	TTGAC	SORLIP2AT	530 (-)	GGGCC
WBOXATNPR1	825 (+)	TTGAC	SORLIP2AT	931 (-)	GGGCC
WBOXNTCHN48	158 (+)	CTGACY	SORLIP2AT	106	
WBOXNTCHN48	751 (+)	CTGACY	SORLIP2AT	4 (-)	GGGCC
WBOXNTERF3	138 (+)	TGACY	SORLIP2AT	107	
WBOXNTERF3	159 (+)	TGACY	SORLIP2AT	4 (-)	GGGCC
WBOXNTERF3	752 (+)	TGACY	SREATMSD	297 (+)	TTATCC
WRKY710S	138 (+)	TGAC	SURECOREATSULTR11	81 (+)	GAGAC
WRKY710S	159 (+)	TGAC	SURECOREATSULTR11	95 (+)	GAGAC
WRKY710S	247 (+)	TGAC	SURECOREATSULTR11	377 (-)	GAGAC
WRKY710S	544 (+)	TGAC	TAAAGSTKST1	19 (+)	TAAAG
WRKY710S	752 (+)	TGAC	TAAAGSTKST1	563 (+)	TAAAG
WRKY710S	826 (+)	TGAC	TAAAGSTKST1	629 (+)	TAAAG
			TAAAGSTKST1	624 (-)	TAAAG
			TAAAGSTKST1	886 (-)	TAAAG
			TATABOX2	199 (+)	TATAAAT

WRKY710S	482 (-)	TGAC	TATABOX2	382 (-)	TATAAAT
WUSATAg	993 (-)	TTAATGG	TATABOX5	179 (+)	TTATTT
			TATABOX5	863 (+)	TTATTT
			TATABOX5	879 (+)	TTATTT
			TATABOX5	202 (-)	TTATTT
			TATCCAOSAMY	298 (+)	TATCCA
			TATCCAYMOTIFOSRAMY3		
			D	298 (+)	TATCCAY
			TBOXATGAPB	744 (+)	ACTTTG
				107	
			UP1ATMSD	4 (+)	GGCCCAWWW
			WBOXPCWRKY1	855 (-)	TTTGACY
			WBOXATNPR1	856 (-)	TTGAC
			WBOXHVIS01	540 (-)	TGACT
			WBOXHVIS01	806 (-)	TGACT
			WBOXNTCHN48	540 (-)	CTGACY
			WBOXNTERF3	540 (-)	TGACY
			WBOXNTERF3	806 (-)	TGACY
			WBOXNTERF3	855 (-)	TGACY
			WRKY710S	185 (-)	TGAC
			WRKY710S	541 (-)	TGAC
			WRKY710S	807 (-)	TGAC
			WRKY710S	856 (-)	TGAC

<i>cyp92c5</i>				<i>cyp92c6</i>			
Element	Pos	Str.	Sequenz	Element	Pos	Str.	Sequenz
-300ELEMENT	836	(-)	TGHAAARK	2SSEEDPROTBANAPA	669	(-)	CAAACAC
AACACOREOSGLUB1	906	(-)	AACAAAC	-300CORE	834	(-)	TGTAAAG TGHAAAR
ABRELATERD1	696	(-)	ACGTG	-300ELEMENT	10	(-)	K TGHAAAR
ABRELATERD1	697	(+)	ACGTG	-300ELEMENT	833	(-)	K
ABRERATCAL	695	(-)	MACGYGB	AACACOREOSGLUB1	671	(-)	AACAAAC
ABRERATCAL	696	(+)	MACGYGB	ABRELATERD1	325	(-)	ACGTG
ACGTATERD1	631	(+)	ACGT	ABRELATERD1	326	(+)	ACGTG
ACGTATERD1	631	(-)	ACGT	ABRELATERD1	368	(-)	ACGTG
ACGTATERD1	697	(+)	ACGT	ABRERATCAL	324	(-)	MACGYGB
ACGTATERD1	697	(-)	ACGT	ACGTABOX	908	(+)	TACGTA
ACGTTBOX	630	(+)	AACGTT	ACGTABOX	908	(-)	TACGTA
ACGTTBOX	630	(-)	AACGTT	ACGTATERD1	326	(+)	ACGT
ANAERO1CONSENSUS	604	(-)	AAACAAA	ACGTATERD1	326	(-)	ACGT
ANAERO1CONSENSUS	610	(-)	AAACAAA	ACGTATERD1	369	(+)	ACGT
ANAERO1CONSENSUS	907	(-)	AAACAAA	ACGTATERD1	369	(-)	ACGT
ANAERO3CONSENSUS	449	(+)	TCATCAC	ACGTATERD1	417	(+)	ACGT
ARFAT	730	(-)	TGTCTC	ACGTATERD1	417	(-)	ACGT
ARR1AT	64	(-)	NGATT	ACGTATERD1	909	(+)	ACGT
ARR1AT	103	(-)	NGATT	ACGTATERD1	909	(-)	ACGT
ARR1AT	243	(+)	NGATT	ACGTOSGLUB1	368	(-)	GTACGTG
ARR1AT	257	(-)	NGATT	AMYBOX1	971	(-)	TAACARA
ARR1AT	272	(+)	NGATT	AMYBOX2	917	(+)	TATCCAT
ARR1AT	447	(-)	NGATT	ANAERO1CONSENSUS	754	(+)	AAACAAA
ARR1AT	1013	(+)	NGATT	ANAERO1CONSENSUS	1019	(-)	AAACAAA
BIHD1OS	214	(-)	TGTCA	ARFAT	857	(+)	TGTCTC
BIHD1OS	959	(-)	TGTCA	ARR1AT	120	(-)	NGATT
BOXIINTPATPB	275	(-)	ATAGAA	ARR1AT	154	(+)	NGATT
BOXIINTPATPB	830	(-)	ATAGAA	ARR1AT	164	(+)	NGATT
BS1EGCCR	375	(+)	AGCGGG	ARR1AT	341	(-)	NGATT
CAATBOX1	217	(+)	CAAT	ARR1AT	442	(+)	NGATT
CAATBOX1	446	(+)	CAAT	ARR1AT	454	(+)	NGATT
CAATBOX1	902	(+)	CAAT	ARR1AT	698	(+)	NGATT
CACGTGMOTIF	696	(+)	CACGTG	ARR1AT	840	(+)	NGATT
CACGTGMOTIF	696	(-)	CACGTG	BIHD1OS	139	(+)	TGTCA
CACTFTPPCA1	134	(+)	YACT	BIHD1OS	202	(+)	TGTCA
CACTFTPPCA1	141	(+)	YACT	BOXLCOREDPCAL	684	(-)	ACCWWCC
CACTFTPPCA1	145	(+)	YACT	CAATBOX1	137	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	155	(-)	YACT	CAATBOX1	156	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	190	(-)	YACT	CAATBOX1	166	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	198	(-)	YACT	CAATBOX1	200	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	236	(+)	YACT	CAATBOX1	254	(+)	CAAT
CACTFTPPCA1	365	(-)	YACT	CAATBOX1	487	(+)	CAAT
CACTFTPPCA1	398	(-)	YACT	CAATBOX1	650	(-)	CAAT

5.6 Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs

CACTFTPPCA1	414	(-)	YACT	CAATBOX1	855	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	417	(-)	YACT	CAATBOX1	937	(-)	CAAT
CACTFTPPCA1	434	(-)	YACT	CACGTGMOTIF	325	(+)	CACGTG
CACTFTPPCA1	453	(+)	YACT	CACGTGMOTIF	325	(-)	CACGTG
CACTFTPPCA1	461	(+)	YACT	CACTFTPPCA1	8	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	494	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	318	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	507	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	336	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	510	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	372	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	513	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	386	(-)	YACT
CACTFTPPCA1	545	(+)	YACT	CACTFTPPCA1	392	(-)	YACT
CACTFTPPCA1	561	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	562	(-)	YACT
CACTFTPPCA1	675	(-)	YACT	CACTFTPPCA1	599	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	771	(+)	YACT	CACTFTPPCA1	617	(+)	YACT
CACTFTPPCA1	965	(+)	YACT	CACTFTPPCA1	729	(-)	YACT
CAREOSREP1	713	(+)	CAACTC	CACTFTPPCA1	796	(-)	YACT
CGACGOSAMY3	531	(-)	CGACG	CACTFTPPCA1	802	(+)	YACT
CTRMCAMV35S	725	(-)	TCTCTCTCT	CACTFTPPCA1	832	(+)	YACT
CURECORECR	235	(+)	GTAC	CACTFTPPCA1	995	(+)	YACT
CURECORECR	235	(-)	GTAC	CANBNNAPA	669	(-)	CNAACAC
CURECORECR	380	(+)	GTAC	CATATGGMSAUR	956	(+)	CATATG
CURECORECR	380	(-)	GTAC	CATATGGMSAUR	956	(-)	CATATG AAMAATC T
DOFCOREZM	36	(-)	AAAG	CCA1ATLHCB1	154	(-)	
DOFCOREZM	49	(+)	AAAG	CGACGOSAMY3	418	(-)	CGACG CAANNNN ATC
DOFCOREZM	121	(-)	AAAG	CIACADIANLELHC	811	(+)	
DOFCOREZM	424	(-)	AAAG	CPBCSPOR	97	(-)	TATTAG
DOFCOREZM	582	(-)	AAAG	CPBCSPOR	398	(+)	TATTAG
DOFCOREZM	683	(-)	AAAG	CPBCSPOR	528	(+)	TATTAG
DOFCOREZM	751	(+)	AAAG	CURECORECR	371	(+)	GTAC
DOFCOREZM	812	(+)	AAAG	CURECORECR	371	(-)	GTAC
DOFCOREZM	920	(+)	AAAG	CURECORECR	376	(+)	GTAC
DOFCOREZM	1018	(+)	AAAG	CURECORECR	376	(-)	GTAC
EBOXBNNAPA	696	(+)	CANNTG	CURECORECR	653	(+)	GTAC
EBOXBNNAPA	696	(-)	CANNTG	CURECORECR	653	(-)	GTAC
EBOXBNNAPA	894	(+)	CANNTG	CURECORECR	661	(+)	GTAC
EBOXBNNAPA	894	(-)	CANNTG	CURECORECR	661	(-)	GTAC
EECCRCAH1	341	(+)	GANTTNC	DOFCOREZM	10	(-)	AAAG
EECCRCAH1	467	(+)	GANTTNC	DOFCOREZM	72	(+)	AAAG
EECCRCAH1	712	(-)	GANTTNC	DOFCOREZM	177	(-)	AAAG
ERELEE4	338	(-)	AWTTCAAA	DOFCOREZM	279	(+)	AAAG
GAREAT	555	(-)	TAACAAR	DOFCOREZM	434	(-)	AAAG
GATABOX	24	(-)	GATA	DOFCOREZM	447	(-)	AAAG
GATABOX	84	(+)	GATA	DOFCOREZM	452	(+)	AAAG
GATABOX	86	(-)	GATA	DOFCOREZM	560	(+)	AAAG
GATABOX	319	(+)	GATA	DOFCOREZM	834	(-)	AAAG
GATABOX	371	(-)	GATA	DOFCOREZM	941	(-)	AAAG

GATABOX	639	(-)	GATA	DRE1COREZMRAB17	49	(-)	ACCGAGA
GT1CONSENSUS	353	(-)	GRWAAW	E2FCONSENSUS	115	(-)	WTTSSCSS
GT1CONSENSUS	678	(-)	GRWAAW	E2FCONSENSUS	555	(-)	WTTSSCSS
GT1CONSENSUS	778	(+)	GRWAAW	EBOXBNNAPA	184	(+)	CANNTG
GT1CONSENSUS	801	(-)	GRWAAW	EBOXBNNAPA	184	(-)	CANNTG
GT1CONSENSUS	837	(-)	GRWAAW	EBOXBNNAPA	205	(+)	CANNTG
GT1CONSENSUS	974	(-)	GRWAAW	EBOXBNNAPA	205	(-)	CANNTG
GT1GMSCAM4	837	(-)	GAAAAA	EBOXBNNAPA	219	(+)	CANNTG
GTGANTG10	82	(+)	GTGA	EBOXBNNAPA	219	(-)	CANNTG
GTGANTG10	133	(-)	GTGA	EBOXBNNAPA	325	(+)	CANNTG
GTGANTG10	452	(-)	GTGA	EBOXBNNAPA	325	(-)	CANNTG
GTGANTG10	544	(-)	GTGA	EBOXBNNAPA	344	(+)	CANNTG
GTGANTG10	867	(-)	GTGA	EBOXBNNAPA	344	(-)	CANNTG
IBOXCORE	23	(-)	GATAA	EBOXBNNAPA	606	(+)	CANNTG
INRNTPSADB	543	(+)	YTCANTYY	EBOXBNNAPA	606	(-)	CANNTG
INRNTPSADB	849	(-)	YTCANTYY	EBOXBNNAPA	625	(+)	CANNTG
LECPLEACS2	320	(-)	TAAAATAT	EBOXBNNAPA	625	(-)	CANNTG
MARABOX1	282	(-)	AATAAAYAAA	EBOXBNNAPA	656	(+)	CANNTG
MARTBOX	596	(+)	TTWTWTTWTT	EBOXBNNAPA	656	(-)	CANNTG
MARTBOX	597	(+)	TTWTWTTWTT	EBOXBNNAPA	956	(+)	CANNTG
MYBCORE	410	(-)	CNGTTR	EBOXBNNAPA	956	(-)	CANNTG
MYBPLANT	993	(-)	MACCWAMC	EECCRCAH1	105	(-)	GANTTNC
MYBST1	86	(-)	GGATA	EECCRCAH1	169	(+)	GANTTNC
MYCCONSENSUSAT	696	(+)	CANNTG	EECCRCAH1	455	(+)	GANTTNC
MYCCONSENSUSAT	696	(-)	CANNTG	EMHVCHORD	833	(-)	TGTAAAGT
MYCCONSENSUSAT	894	(+)	CANNTG	GAREAT	971	(-)	TAACAAR
MYCCONSENSUSAT	894	(-)	CANNTG	GATABOX	32	(-)	GATA
NAPINMOTIFBN	381	(+)	TACACAT	GATABOX	228	(+)	GATA
NODCON1GM	920	(+)	AAAGAT	GATABOX	388	(-)	GATA
NODCON2GM	393	(-)	CTCTT	GATABOX	406	(-)	GATA
NODCON2GM	489	(-)	CTCTT	GATABOX	427	(-)	GATA
NODCON2GM	540	(+)	CTCTT	GATABOX	469	(-)	GATA
NODCON2GM	580	(+)	CTCTT	GATABOX	490	(-)	GATA
NODCON2GM	624	(+)	CTCTT	GATABOX	499	(-)	GATA
NTBBF1ARROLB	1017	(-)	ACTTTA	GATABOX	507	(-)	GATA
OSE1ROOTNODULE	920	(+)	AAAGAT	GATABOX	533	(+)	GATA
OSE2ROOTNODULE	393	(-)	CTCTT	GATABOX	805	(-)	GATA
OSE2ROOTNODULE	489	(-)	CTCTT	GATABOX	817	(-)	GATA
OSE2ROOTNODULE	540	(+)	CTCTT	GATABOX	868	(-)	GATA
OSE2ROOTNODULE	580	(+)	CTCTT	GATABOX	894	(-)	GATA
OSE2ROOTNODULE	624	(+)	CTCTT	GATABOX	917	(-)	GATA
POLASIG1	282	(-)	AATAAA	GATABOX	988	(-)	GATA
POLASIG1	286	(-)	AATAAA	GT1CONSENSUS	11	(-)	GRWAAW
POLASIG1	304	(-)	AATAAA	GT1CONSENSUS	30	(-)	GRWAAW
POLASIG2	1	(-)	AATTTAAA	GT1CONSENSUS	41	(+)	GRWAAW
POLASIG2	684	(-)	AATTTAAA	GT1CONSENSUS	45	(-)	GRWAAW

5.6 Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs

POLASIG3	165	(+)	AATAAT	GT1CONSENSUS	171	(-)	GRWAAW
POLASIG3	334	(-)	AATAAT	GT1CONSENSUS	234	(-)	GRWAAW
POLLEN1LELAT52	123	(-)	AGAAA	GT1CONSENSUS	456	(-)	GRWAAW
POLLEN1LELAT52	470	(-)	AGAAA	GT1CONSENSUS	947	(-)	GRWAAW
POLLEN1LELAT52	577	(-)	AGAAA	GT1CORE	620	(-)	GGTTAA
POLLEN1LELAT52	753	(+)	AGAAA	GT1GMSCAM4	11	(-)	GAAAAA
POLLEN1LELAT52	829	(-)	AGAAA	GT1GMSCAM4	234	(-)	GAAAAA
PYRIMIDINEBOXOSRAM Y1A	120	(+)	CCTTTT	GTGANTG10	2	(+)	GTGA
RAV1AAT	499	(-)	CAACA	GTGANTG10	66	(+)	GTGA
REALPHALGLHCB21	485	(+)	AACCAA	GTGANTG10	87	(-)	GTGA
REALPHALGLHCB21	995	(-)	AACCAA	GTGANTG10	295	(-)	GTGA
RHERPATEXPA7	80	(-)	KCACGW	GTGANTG10	328	(+)	GTGA
RHERPATEXPA7	695	(+)	KCACGW	GTGANTG10	335	(-)	GTGA
RHERPATEXPA7	697	(-)	KCACGW	GTGANTG10	347	(+)	GTGA
RHERPATEXPA7	706	(-)	KCACGW	GTGANTG10	361	(-)	GTGA
ROOTMOTIFTAPOX1	320	(+)	ATATT	GTGANTG10	367	(-)	GTGA
ROOTMOTIFTAPOX1	834	(+)	ATATT	GTGANTG10	609	(+)	GTGA
SEBFCONSSTPR10A	730	(-)	YTGTCWC	GTGANTG10	616	(-)	GTGA
SEF4MOTIFGM7S	279	(+)	RTTTTTR	GTGANTG10	628	(+)	GTGA
SEF4MOTIFGM7S	289	(+)	RTTTTTR	GTGANTG10	678	(+)	GTGA
SEF4MOTIFGM7S	607	(+)	RTTTTTR	HDZIP2ATATHB2	394	(-)	TAATMAT TA CNNGAAN NNTTCNN G
SORLIP1AT	790	(-)	GCCAC	HSELIKENTACIDICPR1	39	(+)	CNNGAAN NNTTCNN G
SORLIP1AT	933	(+)	GCCAC	HSELIKENTACIDICPR1	39	(-)	CNNGAAN NNTTCNN G
SP8BFIBSP8BIB	195	(-)	TACTATT	IBOXCORE	31	(-)	GATAA
SURECOREATSULTR11	730	(+)	GAGAC	IBOXCORE	506	(-)	GATAA
TAAAGSTKST1	48	(+)	TAAAG	INRNTPSADB	164	(-)	YTCANTYY
TAAAGSTKST1	683	(-)	TAAAG	IRO2OS	324	(-)	CACGTGG
TAAAGSTKST1	1017	(+)	TAAAG	LECPLEACS2	912	(+)	TAAAATAT
TATABOX2	225	(+)	TATAAAT	MYB1AT	503	(-)	WAACCA
TATABOX5	283	(+)	TTATTT	MYB1AT	621	(+)	WAACCA
TATABOX5	287	(+)	TTATTT	MYB2CONSENSUSAT	205	(+)	YAACKG
TATABOX5	305	(+)	TTATTT	MYBCORE	205	(-)	CNGTTR
TATABOX5	335	(+)	TTATTT	MYBCOREATCYCB1	27	(-)	AACGG
TATCCAOSAMY	86	(+)	TATCCA	MYBGAHV	971	(-)	TAACAAA
WBOXPCWRKY1	747	(-)	TTTGACY	MYBPZM	810	(+)	CCWACC
WBOXATNPR1	213	(+)	TTGAC	MYBST1	32	(-)	GGATA
WBOXATNPR1	748	(-)	TTGAC	MYBST1	469	(-)	GGATA
WBOXHVIS01	131	(-)	TGACT	MYBST1	490	(-)	GGATA
WBOXHVIS01	747	(-)	TGACT	MYBST1	917	(-)	GGATA
WBOXNTERF3	131	(-)	TGACY	MYCATERD1	219	(-)	CATGTG
WBOXNTERF3	747	(-)	TGACY	MYCATERD1	344	(+)	CATGTG
WRKY71OS	132	(-)	TGAC	MYCATERD1	606	(+)	CATGTG
WRKY71OS	214	(+)	TGAC	MYCATERD1	625	(+)	CATGTG

WRKY710S	748	(-)	TGAC	MYCATRD22	219	(+)	CACATG
WRKY710S	959	(+)	TGAC	MYCATRD22	344	(-)	CACATG
				MYCATRD22	606	(-)	CACATG
				MYCATRD22	625	(-)	CACATG
				MYCCONSENSUSAT	184	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	184	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	205	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	205	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	219	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	219	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	325	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	325	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	344	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	344	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	606	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	606	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	625	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	625	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	656	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	656	(-)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	956	(+)	CANNTG
				MYCCONSENSUSAT	956	(-)	CANNTG
				NODCON1GM	452	(+)	AAAGAT
				NODCON2GM	432	(+)	CTCTT
				NTBBF1ARROLB	833	(+)	ACTTTA
				OSE1ROOTNODULE	452	(+)	AAAGAT
				OSE2ROOTNODULE	432	(+)	CTCTT
				POLASIG3	396	(-)	AATAAT
				POLASIG3	934	(-)	AATAAT
				POLLEN1LELAT52	47	(-)	AGAAA
				POLLEN1LELAT52	74	(+)	AGAAA
				POLLEN1LELAT52	104	(+)	AGAAA
				POLLEN1LELAT52	574	(-)	AGAAA
				POLLEN1LELAT52	694	(-)	AGAAA
				RAV1AAT	193	(+)	CAACA
				RAV1AAT	674	(-)	CAACA
				RAV1AAT	877	(+)	CAACA
				RAV1AAT	882	(+)	CAACA
				REBETALGLHCB21	32	(-)	CGGATA
				RHERPATEXPA7	64	(-)	KCACGW
				RHERPATEXPA7	326	(-)	KCACGW
				RHERPATEXPA7	367	(+)	KCACGW
				ROOTMOTIFTAPOX1	488	(-)	ATATT
				ROOTMOTIFTAPOX1	520	(-)	ATATT
				ROOTMOTIFTAPOX1	521	(+)	ATATT
				ROOTMOTIFTAPOX1	527	(+)	ATATT

5.6 Terpenakkumulation der 25 Elternlinien und deren RILs

	ROOTMOTIFTAPOX1	774	(-)	ATATT
	ROOTMOTIFTAPOX1	775	(+)	ATATT
	ROOTMOTIFTAPOX1	915	(-)	ATATT
	ROOTMOTIFTAPOX1	922	(+)	ATATT
	ROOTMOTIFTAPOX1	928	(-)	ATATT
	ROOTMOTIFTAPOX1	986	(-)	ATATT
	RYREPEATBNNAPA	379	(+)	CATGCA
	RYREPEATGMGY2	379	(+)	CATGCAT
	RYREPEATLEGUMINBOX	379	(+)	CATGCAY
	SEBFCONSSTPR10A	856	(+)	YTGTCWC ATATTTA
	SEF1MOTIF	516	(-)	WW ATATTTA
	SEF1MOTIF	924	(-)	WW
	SEF4MOTIFGM7S	731	(-)	RTTTTTR
	SEF4MOTIFGM7S	751	(-)	RTTTTTR
	SORLIP1AT	217	(+)	GCCAC
	SORLIP2AT	132	(+)	GGGCC
	SREATMSD	31	(+)	TTATCC
	SURECOREATSULTR11	858	(-)	GAGAC
	TAAAGSTKST1	447	(-)	TAAAG
	TAAAGSTKST1	834	(-)	TAAAG
	TAAAGSTKST1	941	(-)	TAAAG
	TATABOXOSPAL	517	(-)	TATTTAA
	TATABOXOSPAL	925	(-)	TATTTAA
	TATABOXOSPAL	983	(-)	TATTTAA
	TATCCAOSAMY	917	(+)	TATCCA
	TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	917	(+)	TATCCAY
	TBOXATGAPB	559	(-)	ACTTTG
	TE2F2NTPCNA	115	(-)	ATTCCCGC AMNAUGG
	TRANSINITDICOTS	134	(-)	C RMNAUGG
	TRANSINITMONOCOTS	134	(-)	C
	WBOXPCWRKY1	1023	(+)	TTTGACY
	WBOXATNPR1	203	(-)	TTGAC
	WBOXATNPR1	901	(+)	TTGAC
	WBOXATNPR1	1024	(+)	TTGAC
	WBOXHVIS01	462	(-)	TGACT
	WBOXHVIS01	679	(+)	TGACT
	WBOXHVIS01	902	(+)	TGACT
	WBOXHVIS01	1025	(+)	TGACT
	WBOXNTCHN48	181	(-)	CTGACY
	WBOXNTCHN48	641	(+)	CTGACY
	WBOXNTERF3	181	(-)	TGACY
	WBOXNTERF3	462	(-)	TGACY
	WBOXNTERF3	642	(+)	TGACY
	WBOXNTERF3	679	(+)	TGACY

	WBOXNTERF3	902	(+)	TGACY
	WBOXNTERF3	1025	(+)	TGACY
	WRKY710S	140	(-)	TGAC
	WRKY710S	182	(-)	TGAC
	WRKY710S	203	(-)	TGAC
	WRKY710S	463	(-)	TGAC
	WRKY710S	642	(+)	TGAC
	WRKY710S	679	(+)	TGAC
	WRKY710S	902	(+)	TGAC

5.8. Verwendete Primer

Gene	Name	SEQUENCE	Application
	UPM_long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAT CAACGCAGAGT	Sequenzieren RACE
	UPM_short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenzieren RACE
	MuTIR	AGAGAAGCCA-ACGCCAWCGCCTCYATTTCGTC	PCR Mu- Transposon
	MuTIR2	TCGTGGAATCCCBTYCBCTCTTCKTCYATAAT	nested PCR Mu- Transposon
	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Sequenzieren nested RACE
GRMZM2G131907	APT1_F	AGGCGTCCGTGACACCATC	APT1 QRT fwd
	APT1_R	CTGGCAACTTCTTCGGCTTCC	APT1 QRT rev
GRMZM2G147721	FPPS3F	CCTGGCTAGTTGTGCAAGCT	FPPS2 QRT fwd
	FPPS8R	GAAAACACTCTGGACTGCCT	FPPS2 QRT rev
	FPPS2_R	GTCGACGGAGCAGCTTCTTC	FPPS2 cloning fwd
	FPPS2_pASK- IBA33_F	ATGGTAGGTCTCAAATGGCGACGGTGGAGGTGGT GGT	FPPS2 cloning (pASK- IBA33+) fwd
	FPPS2_pASK- IBA33_R	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCTTGTCCTCTTGTAG ATCTTGTG	FPPS2 cloning (pASK- IBA33+) rev
	FPPS2_pASK- IBA37_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCGACGGTGGAGGT GGTG	FPPS2 cloning (pASK- IBA37+) fwd
	FPPS2_pASK- IBA37_R	ATGGTAGGTCTCATATCACTTGTCCCTCTTGTAG ATCTTGTG	FPPS2 cloning (pASK- IBA37+) rev
	FPPS2_F	CGAGGCCGCAATGGCGACGGT	FPPS2 cloning rev
GRMZM2G168681	FPPS8.1F	CATGGCTAGTTGTGCAAGCC	FPPS1 QRT fwd
	FPPS8.1R	CAGCACTTCTGAACCGCAA	FPPS1 QRT rev
GRMZM2G098569	FPPS3F	CCTGGCTAGTTGTGCAAGCT	FPPS3 QRT fwd
	FPPS3R	GAAAACAGTTTGGACTGCCT	FPPS3 QRT rev
	FPPS3_F	CGAGGCCGCAATGGCGACAGC	FPPS3 cloning fwd
	FPPS3_R	GTCGATGGAGCAGCTTGTGCG	FPPS3

	FPPS3_pASK-IBA33_F	ATGGTAACCTGCATTAAATGGCGACAGCGGAGGTGGTGGT	cloning rev FPPS3 cloning (pASK-IBA33+) fwd
	FPPS3_pASK-IBA33_R	ATGGTAACCTGCATTAGCGCTCTTGTCCTCTTGTAGATCTTGTG	FPPS3 cloning (pASK-IBA33+) rev
	FPPS3_pASK-IBA37_F	ATGGTAACCTGCATTAGCGCATGGCGACAGCGGAGGTGGTG	FPPS3 cloning (pASK-IBA37+) fwd
	FPPS3_pASK-IBA37_R	ATGGTAACCTGCATTATATCACTTGTCCCTCTTGTAGATCTTGTG	FPPS3 cloning (pASK-IBA37+) rev
	FPPS3_pr_F1	GAG GCC TTT ACA AAG CTC CA	Sequenzieren Promoter fwd
	FPPS3_pr_F2	TCA AGG ACA CAA CTT GCC TTT	Sequenzieren Promoter fwd
	FPPS3_pr_R1	ACT CCA CCT CAC CTC ACC AC	Sequenzieren Promoter rev
	219_FPPS3_P1_R	CCACCACCACCTCCGCTG	Sequenzieren Promoter rev
	220_FPPS3_P2_F	GCAGTGGCAGACGCACAG	Sequenzieren Promoter fwd
	221_FPPS3_P3_F	CAGCACGCAGTTGTGTCGTCG	Sequenzieren Promoter fwd
	222_FPPS3_P4_F	GATCTTATCTAATATCTATAC	Sequenzieren Promoter fwd
GRMZM2G102079	Cyt_P450_F	ACGACCTTACGACCATTTC	CYP92C5 QRT fwd
	Cyt_P450_R	CGATGATGCCTGGATGAGG	CYP92C5 QRT rev
	P450_start	CAATGGAGCTGGCATCAACAAT	CYP92C5 Sequenzieren fwd
	P450_ende	GAGACCCTGGTTTTTCATTTCG	CYP92C5 Sequenzieren rev
	167_pESC_1_F	TCCGGATCCGAGCATGGAGCTGGCATCAA	CYP92C5 Klonieren fwd
	168_pESC_1_R	CTACTCGAGTCATTCCGGTCGCGCTGTAG	CYP92C5 Klonieren rev

GRMZM2G139467	169_pESC_2_F	TCCGGATCCGAGCATGCACCACGAAACAC	CYP92C6 Klonieren fwd
	170_pESC_2_R	GCCAAGCTTTCAGAACACGAGCTTGTAC	CYP92C6 Klonieren rev
	155_Cyt2_F	AGAAGTGGTCGGGCTGCTAC	CYP92C6 QRT fwd
	156_Cyt2_R	CTCGAAGAAGCGGTCGTACT	CYP92C6 QRT rev
GRMZM2G046615	S53	CCGGGTCGAGATCACCAAGATA	TPS2 RT- PCR fwd B73-Allel
	S54	GGGAAGTGAATCAGCAGCCA	TPS2 RT- PCR rev B73-Allel
	TPS2_- 1000_F	CAGCGCTTTCAAATTCAACA	TPS2 Promoter F
	TPS2_-150_F	GCAAACACGACGGTAGTACG	TPS2 Promoter F
	TPS2_-500_F	CAGACTCGACACTACG	TPS2 Promoter F
	S56	GGACTTGGTGGTGGCTGTTTG	TPS2 Promoter R
	S44	ATGGTAGAAGACAAGCGCATGTACTCTCTACCAG GAGCAAC	Klonierung tps2 in IBA7 mit BbsI fwd
	S45	ATGGTAGAAGACAATATCAAAGCACCAACATCAT CGCCGCG	Klonierung tps2 in IBA7 mit BbsI rev
	339_TPS2_k urz_iba7_f	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCTTCGTGGAGCCTCT TCTCC	Klonierung tps2 in IBA7 fwd ohne Signalpeptid
	398_TPS2_ib a_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGCTGGTCACCATCGA CAACC	Klonierung tps2 in IBA7 für alternative Start
	S33	AAGCAGACCTGCACGAGGTT	TPS2 Genotypisierung B73- Ky21 Allel in RILS rev
	S35	GAAGGAGCATGGATCTAACCATG	TPS2 Genotypisierung B73- Ky21 Allel in RILS fwd
GRMZM2G064406	S55	GCATCATCTCTTCTCCTCCTTCG	TPS3 RT- PCR fwd B73-Allel
	S56	GGACTTGGTGGTGGCTGTTTG	TPS3 RT-

			PCR rev B73-Allel
	338_TPS3_k urz_iba7_f	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCTCCTCCTTCGTGGAG CCT	Klonierung tps3 in IBA7 fwd ohne Signalpeptid
	S62	GCGCATCGCCATTAATTAG	TPS3 Sequenzieren und Klonieren B73-Allel
	470_S33_Ky_ R	AAGCAGACCTGCGCGAGGTC	TPS3 Genotypisierung B73- Ky21 Allel in RILS rev
	S36	CAAGGAGCATGGATCTAACCCCTA	TPS3 Genotypisierung B73- Ky21 Allel in RILS fwd
GRMZM2G179092	AM120	AGGGAACCTTCGTGGTGGATGATAC	TPS10 QRT fwd
	AM121	TGGCGTCTGGTGAAGGTAATGG	TPS10 QRT rev
GRMZM2G127336	BH51	TCTGGATGATGGGAGTCTTCTTTG	TPS23 QRT fwd
	BH52	GCGTTGCCTTCCTCTGTGG	TPS23 QRT rev
GRMZM2G159937	223_HLH_TF _F	GTGGACGTACGGCATCTTCT	bHLH QRT fwd
	224_HLH_TF _R	CATGGACGCCAGAAAGTACA	bHLH QRT R
	232_HLH_St art2	CAAGGCATGGCGTGGTCCGGAG	bHLH Sequenzierung fwd
	234_HLH_en de3	GTAGGTTGGGAAAGCAACAAAC	bHLH Sequenzierung rev

Literaturverzeichnis

- [Achard *et al.* 2006] ACHARD, Patrick ; CHENG, Hui ; DE GRAUWE, Liesbeth ; DECAT, Jan ; SCHOUTTETEN, Hermien ; MORITZ, Thomas ; VAN DER STRAETEN, Dominique ; PENG, Jinrong ; HARBERD, Nicholas P.: Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. In: *Science* 311 (2006), Nr. 5757, S. 91–94 pages
- [Adam & Zapp 1998] ADAM, Klaus-Peter ; ZAPP, Josef: Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. In: *Phytochemistry* 48 (1998), Nr. 6, S. 953–959 pages
- [Adie *et al.* 2007] ADIE, Bruce A. ; PÉREZ-PÉREZ, Julián ; PÉREZ-PÉREZ, Manuel M. ; GODOY, Marta ; SÁNCHEZ-SERRANO, José-J ; SCHMELZ, Eric A. ; SOLANO, Roberto: ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. In: *The Plant Cell Online* 19 (2007), Nr. 5, S. 1665–1681 pages
- [Agrawal 1998] AGRAWAL, Anurag A.: Induced responses to herbivory and increased plant performance. In: *Science* 279 (1998), Nr. 5354, S. 1201–1202 pages
- [Aharoni *et al.* 2004] AHARONI, Asaph ; GIRI, Ashok P. ; VERSTAPPEN, Francel W. ; BERTEA, Cinzia M. ; SEVENIER, Robert ; SUN, Zhongkui ; JONGSMA, Maarten A. ; SCHWAB, Wilfried ; BOUWMEESTER, Harro J.: Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 11, S. 3110–3131 pages
- [Aharoni *et al.* 2005] AHARONI, Asaph ; JONGSMA, Maarten A. ; BOUWMEESTER, Harro J.: Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. In: *Trends in plant science* 10 (2005), Nr. 12, S. 594–602 pages
- [Ahn *et al.* 1993] AHN, S ; ANDERSON, JA ; SORRELLS, ME ; TANKSLEY, SD 1.: Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. In: *Molecular and General Genetics MGG* 241 (1993), Nr. 5-6, S. 483–490 pages
- [Alborn *et al.* 1997] ALBORN, HT ; TURLINGS, TCJ ; JONES, TH ; STENHAGEN, G ; LOUGHRIN, JH ; TUMLINSON, JH: An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. In: *Science* 276 (1997), Nr. 5314, S. 945–949 pages
- [Allard 1960] ALLARD, In: Principles of Plant Breeding, Chapter 6 through Chapter 9, University of California, Davis. (1960) pages
- [Anderson *et al.* 2004] ANDERSON, Jonathan P. ; BADRUZSAUFARI, Ellet ; SCHENK, Peer M. ; MANNERS, John M. ; DESMOND, Olivia J. ; EHLERT, Christina ; MACLEAN, Donald J. ; EBERT, Paul R. ; KAZAN, Kemal: Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 12, S. 3460–3479 pages

- [Ankala *et al.* 2009] ANKALA, A ; LUTHE, DS ; WILLIAMS, WP ; WILKINSON, JR: Integration of ethylene and jasmonic acid signaling pathways in the expression of maize defense protein Mir1-CP. In: *Molecular plant-microbe interactions* 22 (2009), Nr. 12, S. 1555–1564 pages
- [Ankala *et al.* 2013] ANKALA, Arunkanth ; KELLEY, Rowena Y. ; ROWE, Dennis E. ; WILLIAMS, William P. ; LUTHE, Dawn S.: Foliar herbivory triggers local and long distance defense responses in maize. In: *Plant Science* 199 (2013), S. 103–112 pages
- [Arimura *et al.* 2008] ARIMURA, Gen-ichiro ; GARMS, Stefan ; MAFFEI, Massimo ; BOSSI, Simone ; SCHULZE, Birgit ; LEITNER, Margit ; MITHÖFER, Axel ; BOLAND, Wilhelm: Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. In: *Planta* 227 (2008), Nr. 2, S. 453–464 pages
- [Arimura *et al.* 2004] ARIMURA, Gen-ichiro ; HUBER, Dezene P. ; BOHLMANN, Jörg: Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. In: *The Plant Journal* 37 (2004), Nr. 4, S. 603–616 pages
- [Ashby & Edwards 1990] ASHBY, Matthew N. ; EDWARDS, PA: Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nr. 22, S. 13157–13164 pages
- [Atchley & Fitch 1997] ATCHLEY, William R. ; FITCH, Walter M.: A natural classification of the basic helix–loop–helix class of transcription factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), Nr. 10, S. 5172–5176 pages
- [Atchley *et al.* 1999] ATCHLEY, William R. ; TERHALLE, Werner ; DRESS, Andreas: Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. In: *Journal of Molecular Evolution* 48 (1999), Nr. 5, S. 501–516 pages
- [Bak *et al.* 2011] BAK, Søren ; BEISSON, Fred ; BISHOP, Gerard ; HAMBERGER, Björn ; HÖFER, René ; PAQUETTE, Suzanne ; WERCK-REICHHART, Danièle: Cytochromes P450. In: *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 9 (2011) pages
- [Bari & Jones 2009] BARI, Rajendra ; JONES, Jonathan D.: Role of plant hormones in plant defence responses. In: *Plant molecular biology* 69 (2009), Nr. 4, S. 473–488 pages
- [Bernasconi *et al.* 1998] BERNASCONI, Marco L. ; TURLINGS, Ted C. ; AMBROSETTI, Lara ; BASSETTI, Paolo ; DORN, Silvia: Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 87 (1998), Nr. 2, S. 133–142 pages

- [Bick & Lange 2003] BICK, Julie A. ; LANGE, B M.: Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415 (2003), Nr. 2, S. 146–154 pages
- [Blechert *et al.* 1999] BLECHERT, S ; BOCKELMANN, C ; FÜSSLEIN, M ; SCHRADER, T v. ; STELMACH, B ; NIESEL, U ; WEILER, EW: Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. In: *Planta* 207 (1999), Nr. 3, S. 470–479 pages
- [Boff *et al.* 2001] BOFF, Mari I. ; ZOON, Frans C. ; SMITS, Peter H.: Orientation of *Heterorhabditis megidis* to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98 (2001), Nr. 3, S. 329–337 pages
- [Boland *et al.* 1998] BOLAND, Wilhelm ; GÄBLER, Andreas ; GILBERT, Matthias ; FENG, Zhuofu: Biosynthesis of C₁₁ and C₁₆ homoterpenes in higher plants; stereochemistry of the C-C-bond cleavage reaction. In: *Tetrahedron* 54 (1998), Nr. 49, S. 14725–14736 pages
- [Bonaventure *et al.* 2007] BONAVENTURE, Gustavo ; GFELLER, Aurélie ; PROEBSTING, William M. ; HÖRTENSTEINER, Stefan ; CHÉTELAT, Aurore ; MARTINOIA, Enrico ; FARMER, Edward E.: A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 49 (2007), Nr. 5, S. 889–898 pages
- [Boter *et al.* 2004] BOTER, Marta ; RUÍZ-RIVERO, Omar ; ABDEEN, Ashraf ; PRAT, Salomé: Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. In: *Genes & Development* 18 (2004), Nr. 13, S. 1577–1591 pages
- [Bouvier *et al.* 2005] BOUVIER, Florence ; RAHIER, Alain ; CAMARA, Bilal: Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. In: *Progress in lipid research* 44 (2005), Nr. 6, S. 357–429 pages
- [Box & Cox 1964] BOX, George E. ; COX, David R.: An analysis of transformations. In: *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 26 (1964), Nr. 2, S. 211–252 pages
- [Brandstädter *et al.* 1993] BRANDSTÄDTER, Jörg ; ROSSBACH, Claus ; THERES, Klaus: The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. In: *Planta* 192 (1993), Nr. 1, S. 69–74 pages
- [Broadway 1996] BROADWAY, Roxanne M.: Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. In: *Archives of insect biochemistry and physiology* 32 (1996), Nr. 1, S. 39–53 pages
- [Brownlie *et al.* 1997] BROWNLIE, P ; CESKA, TA ; LAMERS, M ; ROMIER, C ; STIER, G ; TEO, H ; SUCK, D: The crystal structure of an intact human Max–DNA

- complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. In: *Structure* 5 (1997), Nr. 4, S. 509–520 pages
- [Buckler *et al.* 2009] BUCKLER, Edward S. ; HOLLAND, James B. ; BRADBURY, Peter J. ; ACHARYA, Charlotte B. ; BROWN, Patrick J. ; BROWNE, Chris ; ERSOZ, Elhan ; FLINT-GARCIA, Sherry ; GARCIA, Arturo ; GLAUBITZ, Jeffrey C. *et al.*: The genetic architecture of maize flowering time. In: *Science* 325 (2009), Nr. 5941, S. 714–718 pages
- [Burke *et al.* 1999] BURKE, Charles C. ; WILDUNG, Mark R. ; CROTEAU, Rodney: Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), Nr. 23, S. 13062–13067 pages
- [Burstin *et al.* 1994] BURSTIN, J ; DE VIENNE, D ; DUBREUIL, P ; DAMERVAL, C: Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize. I. Genetic diversity among 21 inbred lines. In: *Theoretical and applied genetics* 89 (1994), Nr. 7-8, S. 943–950 pages
- [Cane 1999] CANE, DAVID E.: Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. In: *Comprehensive natural products chemistry* 2 (1999), S. 155–200 pages
- [Cervantes-Cervantes *et al.* 2006] CERVANTES-CERVANTES, Miguel ; GALLAGHER, Cynthia E. ; ZHU, Changfu ; WURTZEL, Eleanore T.: Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity. In: *Plant physiology* 141 (2006), Nr. 1, S. 220–231 pages
- [Chaykin *et al.* 1958] CHAYKIN, S ; LAW, J ; PHILLIPS, AH ; TCHEN, TT ; BLOCH, K: Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44 (1958), Nr. 10, S. 998 pages
- [Chen *et al.* 2003] CHEN, Feng ; THOLL, Dorothea ; D'AURIA, John C. ; FAROOQ, Afgan ; PICHERSKY, Eran ; GERSHENZON, Jonathan: Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 2, S. 481–494 pages
- [Chen 2008] CHEN, Ming-Shun: Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. In: *Insect science* 15 (2008), Nr. 2, S. 101–114 pages
- [Chen XY 1995] CHEN XY, Heinstein P Davisson V. Chen Y Y. Chen Y: Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324 (1995), S. 255–266 pages
- [Chini *et al.* 2007] CHINI, A ; FONSECA, S ; FERNANDEZ, G ; ADIE, B ; CHICO, JM ; LORENZO, O ; GARCIA-CASADO, G ; LOPEZ-VIDRIERO, I ; LOZANO, FM ; PONCE, MR *et al.*: The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. In: *Nature* 448 (2007), Nr. 7154, S. 666–671 pages

- [Christensen *et al.* 2013] CHRISTENSEN, Shawn A. ; NEMCHENKO, Andriy ; BORREGO, Eli ; MURRAY, Ian ; SOBHY, Islam S. ; BOSAK, Liz ; DEBLASIO, Stacy ; ERB, Matthias ; ROBERT, Christelle A. ; VAUGHN, Kathy A. *et al.*: The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. In: *The Plant Journal* 74 (2013), Nr. 1, S. 59–73 pages
- [Chung *et al.* 2008] CHUNG, Hoo S. ; KOO, Abraham J. ; GAO, Xiaoli ; JAYANTY, Sastry ; THINES, Bryan ; JONES, A D. ; HOWE, Gregg A.: Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. In: *Plant Physiology* 146 (2008), Nr. 3, S. 952–964 pages
- [Connolly & Hill 1991] CONNOLLY, Joseph D. ; HILL, Robert A.: Dictionary of terpenoids. (1991) pages
- [Corder *et al.* 1993] CORDER, EH ; SAUNDERS, AM ; STRITTMATTER, WJ ; SCHMECHEL, DE ; GASKELL, PC ; SMALL, GWet ; ROSES, AD ; HAINES, JL ; PERICAK-VANCE, M A.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. In: *Science* 261 (1993), Nr. 5123, S. 921–923 pages
- [Crock *et al.* 1997] CROCK, John ; WILDUNG, Mark ; CROTEAU, Rodney: Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), Nr. 24, S. 12833–12838 pages
- [Croteau *et al.* 2000] CROTEAU, Rodney ; KUTCHAN, Toni M. ; LEWIS, Norman G.: Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and molecular biology of plants* 24 (2000), S. 1250–1319 pages
- [Cunillera *et al.* 1996] CUNILLERA, Núria ; ARRÓ, Montserrat ; DELOURME, Didier ; KARST, Francis ; BORONAT, Albert ; FERRER, Albert: Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 13, S. 7774–7780 pages
- [Daniel Gietz & Woods 2002] DANIEL GIETZ, R ; WOODS, Robin A.: Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In: *Methods in enzymology* 350 (2002), S. 87–96 pages
- [De Boer *et al.* 2004] DE BOER, Jetske G. ; POSTHUMUS, Maarten A. ; DICKE, Marcel: Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. In: *Journal of chemical ecology* 30 (2004), Nr. 11, S. 2215–2230 pages
- [Degen *et al.* 2004] DEGEN, Thomas ; DILLMANN, Christine ; MARION-POLL, Frédéric ; TURLINGS, Ted C.: High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. In: *Plant Physiology* 135 (2004), Nr. 4, S. 1928–1938 pages

- [Degenhardt & Gershenzon 2000] DEGENHARDT, Jörg ; GERSHENZON, Jonathan: Demonstration and characterization of (*E*)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (3*E*)-4, 8-dimethyl-1, 3, 7-nonatriene biosynthesis. In: *Planta* 210 (2000), Nr. 5, S. 815–822 pages
- [Degenhardt *et al.* 2009] DEGENHARDT, Jörg ; KÖLLNER, Tobias G. ; GERSHENZON, Jonathan: Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. In: *Phytochemistry* 70 (2009), Nr. 15, S. 1621–1637 pages
- [Delessert *et al.* 2004] DELESSERT, Christian ; WILSON, Iain ; VAN DER STRAETEN, Dominique ; DENNIS, Elizabeth ; DOLFERUS, Rudy: Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. In: *Plant molecular biology* 55 (2004), Nr. 2, S. 165–181 pages
- [Denis Pompon & Waterman 1996] DENIS POMPON, Alexis Bronine Philippe Urban Eric F. J. Benedicte Louerat L. Benedicte Louerat ; WATERMAN, Michael R.: Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. 272 (1996), Nr. 6, S. 51–64 pages
- [Dewick 1999] DEWICK, Paul M.: The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. In: *Natural product reports* 16 (1999), Nr. 1, S. 97–130 pages
- [Dicke & Sabelis 1988] DICKE, Marcel ; SABELIS, Maurice W.: Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? In: *Functional Ecology* 2 (1988), Nr. 2, S. 131–139 pages
- [Dicke *et al.* 1990] DICKE, Marcel ; SABELIS, Maurice W. ; TAKABAYASHI, Junji ; BRUIN, Jan ; POSTHUMUS, Maarten A.: Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. In: *Journal of Chemical Ecology* 16 (1990), Nr. 11, S. 3091–3118 pages
- [Dicke *et al.* 1993] DICKE, Marcel ; VAN BAARLEN, Peter ; WESSELS, Rob ; DIJKMAN, Herman: Herbivory induces systemic production of plant volatiles that attract predators of the herbivore: extraction of endogenous elicitor. In: *Journal of Chemical Ecology* 19 (1993), Nr. 3, S. 581–599 pages
- [Doebley *et al.* 1997] DOEBLEY, John ; STEC, Adrian ; HUBBARD, Lauren: The evolution of apical dominance in maize. (1997) pages
- [Donath & Boland 1994] DONATH, Jens ; BOLAND, Wilhelm: Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher plants parallels steroid hormone metabolism. In: *Journal of plant physiology* 143 (1994), Nr. 4, S. 473–478 pages
- [Dudareva *et al.* 2005] DUDAREVA, Natalia ; ANDERSSON, Susanna ; ORLOVA, Irina ; GATTO, Nathalie ; REICHELDT, Michael ; RHODES, David ; BOLAND, Wilhelm ; GERSHENZON, Jonathan: The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Nr. 3, S. 933–938 pages

- [Dudareva *et al.* 2003] DUDAREVA, Natalia ; MARTIN, Diane ; KISH, Christine M. ; KOLOSOVA, Natalia ; GORENSTEIN, Nina ; FÄLDT, Jenny ; MILLER, Barbara ; BOHLMANN, Jörg: (*E*)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 5, S. 1227–1241 pages
- [Durner *et al.* 1997] DURNER, Jörg ; SHAH, Jyoti ; KLESSIG, Daniel F.: Salicylic acid and disease resistance in plants. In: *Trends in Plant Science* 2 (1997), Nr. 7, S. 266–274 pages
- [Durst & Nelson 1995] DURST, Francis ; NELSON, David R.: Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. In: *Drug metabolism and drug interactions* 12 (1995), Nr. 3-4, S. 189–206 pages
- [Duvick 2005] DUVICK, DN: Genetic progress in yield of United States maize (*Zea mays* L.). In: *Maydica* 50 (2005), Nr. 3/4, S. 193 pages
- [Eisenreich *et al.* 1998] EISENREICH, Wolfgang ; SCHWARZ, Matthias ; CARTAYRADE, Alain ; ARIGONI, Duilio ; ZENK, Meinhart H. ; BACHER, Adelbert: The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. In: *Chemistry & biology* 5 (1998), Nr. 9, S. R221–R233 pages
- [Elena Hoballah *et al.* 2004] ELENA HOBALLAH, Maria ; G KÖLLNER, Tobias ; DEGENHARDT, Jörg ; CJ TURLINGS, Ted: Costs of induced volatile production in maize. In: *Oikos* 105 (2004), Nr. 1, S. 168–180 pages
- [Emanuelsson *et al.* 1999] EMANUELSSON, Olof ; NIELSEN, Henrik ; HEIJNE, Gunnar V.: ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. In: *Protein Science* 8 (1999), Nr. 5, S. 978–984 pages
- [Engelberth *et al.* 2012] ENGELBERTH, Jürgen ; CONTRERAS, Claudia F. ; VISWANATHAN, Sriram: Transcriptional analysis of distant signaling induced by insect elicitors and mechanical wounding in *Zea mays*. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 4, S. e34855 pages
- [Engelberth *et al.* 2007] ENGELBERTH, Jürgen ; SEIDL-ADAMS, Irmgard ; SCHULTZ, Jack C. ; TUMLINSON, James H.: Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially upregulate major octadecanoids and transcripts of 12-oxo-phytodienoic acid reductases in *Zea mays*. In: *Molecular plant-microbe interactions* 20 (2007), Nr. 6, S. 707–716 pages
- [Facchini & Chappell 1992] FACCHINI, Peter J. ; CHAPPELL, Joseph: Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992), Nr. 22, S. 11088–11092 pages
- [Faraldos *et al.* 2012] FARALDOS, Juan A. ; MILLER, David J. ; GONZA´LEZ, Verónica ; YOOSUF-ALY, Zulfa ; CASCO´N, Oscar ; LI, Amang ; ALLEMANN, Rudolf K.: A 1, 6-ring closure mechanism for (+)- δ -cadinene synthase? In: *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012), Nr. 13, S. 5900–5908 pages

- [Fehr 1987] FEHR, Walter R.: Principles of cultivar development. Volume 2. Crop species. In: *Principles of cultivar development. Volume 2. Crop species.* (1987) pages
- [Figueroa 2012] FIGUEROA, Pablo: The Arabidopsis JAZ2 Promoter Contains a G-Box and Thymidine-Rich Module that are Necessary and Sufficient for Jasmonate-Dependent Activation by MYC Transcription Factors and Repression by JAZ Proteins. In: *Plant and Cell Physiology* 53 (2012), Nr. 2, S. 330–343 pages
- [Fisher & Goding 1992] FISHER, F ; GODING, CR: Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. In: *The EMBO journal* 11 (1992), Nr. 11, S. 4103 pages
- [van der Fits & Memelink 2000] FITS, Leslie van d. ; MEMELINK, Johan: ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. In: *Science* 289 (2000), Nr. 5477, S. 295–297 pages
- [Flint-Garcia *et al.* 2003] FLINT-GARCIA, Sherry A. ; THORNSBERRY, Jeffrey M. ; IV, Buckler: Structure of Linkage Disequilibrium in Plants*. In: *Annual Review of Plant Biology* 54 (2003), Nr. 1, S. 357–374 pages
- [Foard *et al.* 1983] FOARD, DE ; MURDOCK, LL ; DUNN, PE: Engineering of crop plants with resistance to herbivores and pathogens: an approach using primary gene products. In: *Cellular and molecular biology of plant stress* 12 (1983) pages
- [Fraga 2006] FRAGA, Braulio M.: Natural sesquiterpenoids. In: *Natural product reports* 23 (2006), Nr. 6, S. 943–972 pages
- [Gäbler *et al.* 1991] GÄBLER, Andreas ; BOLAND, Wilhelm ; PREISS, Ute ; SIMON, Helmut: Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants; mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. In: *Helvetica Chimica Acta* 74 (1991), Nr. 8, S. 1773–1789 pages
- [Gale & Devos 1998] GALE, Michael D. ; DEVOS, Katrien M.: Comparative genetics in the grasses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998), Nr. 5, S. 1971–1974 pages
- [Galichet & Grissem 2003] GALICHET, Arnaud ; GRISSEM, Wilhelm: Protein farne-sylation in plants—conserved mechanisms but different targets. In: *Current opinion in plant biology* 6 (2003), Nr. 6, S. 530–535 pages
- [Gaut 2001] GAUT, Brandon S.: Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. In: *Genome research* 11 (2001), Nr. 1, S. 55–66 pages
- [Gaut & Doebley 1997] GAUT, Brandon S. ; DOEBLEY, John F.: DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), Nr. 13, S. 6809–6814 pages
- [Gaut & Long 2003] GAUT, Brandon S. ; LONG, Anthony D.: The lowdown on linkage disequilibrium. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 7, S. 1502–1506 pages

- [Geldermann 1975] GELDERMANN, H: Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. In: *Theoretical and Applied Genetics* 46 (1975), Nr. 7, S. 319–330 pages
- [Glazebrook 2001] GLAZEBROOK, Jane: Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* 2001 status. In: *Current opinion in plant biology* 4 (2001), Nr. 4, S. 301–308 pages
- [Glazebrook 2005] GLAZEBROOK, Jane: Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. In: *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 (2005), S. 205–227 pages
- [Gomez *et al.* 2005] GOMEZ, Susana K. ; COX, Mandy M. ; BEDE, Jacqueline C. ; INOUE, Kentaro ; ALBORN, Hans T. ; TUMLINSON, James H. ; KORTH, Kenneth L.: Lepidopteran herbivory and oral factors induce transcripts encoding novel terpene synthases in *Medicago truncatula*. In: *Archives of insect biochemistry and physiology* 58 (2005), Nr. 2, S. 114–127 pages
- [Gouinguéné *et al.* 2001] GOUINGUENÉ, Sandrine ; DEGEN, Thomas ; TURLINGS, Ted C.: Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). In: *Chemoecology* 11 (2001), Nr. 1, S. 9–16 pages
- [Gupta *et al.* 2011] GUPTA, Parul ; AKHTAR, Nehal ; TEWARI, Shri K. ; SANGWAN, Rajender S. ; TRIVEDI, Prabodh K.: Differential expression of farnesyl diphosphate synthase gene from *Withania somnifera* in different chemotypes and in response to elicitors. In: *Plant Growth Regulation* 65 (2011), Nr. 1, S. 93–100 pages
- [Haley *et al.* 1994] HALEY, SD ; AFANADOR, LK ; MIKLAS, PN ; STAVELY, JR ; KELLY, JD: Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. In: *Theoretical and Applied Genetics* 88 (1994), Nr. 3-4, S. 337–342 pages
- [Halitschke & Baldwin 2003] HALITSCHKE, Rayko ; BALDWIN, Ian T.: Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. In: *The Plant Journal* 36 (2003), Nr. 6, S. 794–807 pages
- [Hampel *et al.* 2005] HAMPEL, Daniela ; MOSANDL, Armin ; WÜST, Matthias: Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. In: *Phytochemistry* 66 (2005), Nr. 3, S. 305–311 pages
- [Hannemann *et al.* 2007] HANNEMANN, Frank ; BICHET, Andreas ; EWEN, Kerstin M. ; BERNHARDT, Rita: Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770 (2007), Nr. 3, S. 330–344 pages
- [Hanson 2000] HANSON, James R.: Diterpenoids. In: *Nat. Prod. Rep.* 17 (2000), Nr. 2, S. 165–174 pages

- [Hao *et al.* 2008] HAO, Peiying ; LIU, Caixiang ; WANG, Yuanyuan ; CHEN, Rongzhi ; TANG, Ming ; DU, Bo ; ZHU, Lili ; HE, Guangcun: Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. In: *Plant physiology* 146 (2008), Nr. 4, S. 1810–1820 pages
- [Heim *et al.* 2003] HEIM, Marc A. ; JAKOBY, Marc ; WERBER, Martin ; MARTIN, Cathie ; WEISSHAAR, Bernd ; BAILEY, Paul C.: The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. In: *Molecular biology and evolution* 20 (2003), Nr. 5, S. 735–747 pages
- [Helentjaris *et al.* 1988] HELENTJARIS, T ; WEBER, D ; WRIGHT, S: Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. In: *Genetics* 118 (1988), Nr. 2, S. 353–363 pages
- [Hemmerlin *et al.* 2003] HEMMERLIN, Andréa ; RIVERA, Susan B. ; ERICKSON, Hans K. ; POULTER, C D.: Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 34, S. 32132–32140 pages
- [Hemmi *et al.* 2003] HEMMI, Hisashi ; NOIKE, Motoyoshi ; NAKAYAMA, Toru ; NISHINO, Tokuzo: An alternative mechanism of product chain-length determination in type III geranylgeranyl diphosphate synthase. In: *European Journal of Biochemistry* 270 (2003), Nr. 10, S. 2186–2194 pages
- [Herde *et al.* 2008] HERDE, Marco ; GÄRTNER, Katrin ; KÖLLNER, Tobias G. ; FODE, Benjamin ; BOLAND, Wilhelm ; GERSHENZON, Jonathan ; GATZ, Christiane ; THOLL, Dorothea: Identification and regulation of TPS04/GES, an Arabidopsis geranylgeranyl synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. In: *The Plant Cell Online* 20 (2008), Nr. 4, S. 1152–1168 pages
- [Hiltpold *et al.* 2011] HILTPOLD, Ivan ; ERB, Matthias ; ROBERT, Christelle A. ; TURLINGS, Ted C.: Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. In: *Plant, cell & environment* 34 (2011), Nr. 8, S. 1267–1275 pages
- [Hoballah *et al.* 2002] HOBALLAH, Maria Elena F. ; TAMÒ, Cristina ; TURLINGS, Ted C.: Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? In: *Journal of chemical ecology* 28 (2002), Nr. 5, S. 951–968 pages
- [Howe & Jander 2008] HOWE, Gregg A. ; JANDER, Georg: Plant immunity to insect herbivores. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008), S. 41–66 pages
- [Huffaker *et al.* 2011] HUFFAKER, Alisa ; KAPLAN, Fatma ; VAUGHAN, Martha M. ; DAFOE, Nicole J. ; NI, Xinzhi ; ROCCA, James R. ; ALBORN, Hans T. ; TEAL, Peter E. ; SCHMELZ, Eric A.: Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. In: *Plant physiology* 156 (2011), Nr. 4, S. 2082–2097 pages

- [Hung *et al.* 2012] HUNG, HY ; BROWNE, Christopher ; GUILL, Katherine ; COLES, Nathan ; ELLER, Magen ; GARCIA, Arturo ; LEPAK, Nicholas ; MELIA-HANCOCK, Susan ; OROPEZA-ROSAS, Marco ; SALVO, Stella *et al.*: The relationship between parental genetic or phenotypic divergence and progeny variation in the maize nested association mapping population. In: *Heredity* 108 (2012), Nr. 5, S. 490–499 pages
- [Ichikawa & Yamano 1967] ICHIKAWA, Yoshiyuki ; YAMANO, Toshio: Reconversion of detergent-and sulfhydryl reagent-produced P-420 to P-450 by polyols and glutathione. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 131 (1967), Nr. 3, S. 490–497 pages
- [Jensen & Møller 2010] JENSEN, Kenneth ; MØLLER, Birger L.: Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. In: *Phytochemistry* 71 (2010), Nr. 2, S. 132–141 pages
- [Kalde *et al.* 2003] KALDE, Monika ; BARTH, Meike ; SOMSSICH, Imre E. ; LIPPOK, Bernadette: Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. In: *Molecular plant-microbe interactions* 16 (2003), Nr. 4, S. 295–305 pages
- [Kappers *et al.* 2005] KAPPERS, Iris F. ; AHARONI, Asaph ; VAN HERPEN, Teun W. ; LUCKERHOFF, Ludo L. ; DICKE, Marcel ; BOUWMEESTER, Harro J.: Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. In: *Science* 309 (2005), Nr. 5743, S. 2070–2072 pages
- [Karban & Baldwin] KARBAN, R ; BALDWIN, IT: Induced responses to herbivory, 1997. In: *Chicago: Univ Chicago Pr.* 319p pages
- [Kellogg & Poulter 1997] KELLOGG, Brenda A. ; POULTER, C D.: Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. In: *Current opinion in chemical biology* 1 (1997), Nr. 4, S. 570–578 pages
- [Kesarwani *et al.* 2007] KESARWANI, Meenu ; YOO, Jungmin ; DONG, Xinnian: Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 144 (2007), Nr. 1, S. 336–346 pages
- [Kim *et al.* 2010] KIM, Ok T. ; KIM, Sun H. ; OHYAMA, Kiyoshi ; MURANAKA, Toshiya ; CHOI, Yong E. ; LEE, Hyeon Y. ; KIM, Min Y. ; HWANG, Baik: Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase. In: *Plant cell reports* 29 (2010), Nr. 4, S. 403–411 pages
- [Kim *et al.* 1992] KIM, Seong-Ryong ; CHOI, Jung-Lim ; COSTA, Michael A. ; AN, Gynheung: Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. In: *Plant physiology* 99 (1992), Nr. 2, S. 627–631 pages
- [Kiriienko *et al.* 2012] KIRIENKO, Daniel R. ; LUO, Anding ; SYLVESTER, Anne W.: Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study. In: *Plant physiology* 159 (2012), Nr. 4, S. 1309–1318 pages

- [Klein *et al.* 1988] KLEIN, Theodore M. ; FROMM, Michael ; WEISSINGER, Arthur ; TOMES, Dwight ; SCHAAF, Steve ; SLETTEN, Margit ; SANFORD, John C.: Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (1988), Nr. 12, S. 4305–4309 pages
- [Kleinig 1989] KLEINIG, H: The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. In: *Annual Review of Plant Biology* 40 (1989), Nr. 1, S. 39–59 pages
- [Klessig & Malamy 1994] KLESSIG, Daniel F. ; MALAMY, Jocelyn: The salicylic acid signal in plants. In: *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants* (1994), S. 203–222 pages
- [Köllner *et al.* 2009] KÖLLNER, Tobias G. ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense. In: *Phytochemistry* 70 (2009), Nr. 9, S. 1139–1145 pages
- [Köllner *et al.* 2008a] KÖLLNER, Tobias G. ; HELD, Matthias ; LENK, Claudia ; HILTPOLD, Ivan ; TURLINGS, Ted C. ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: A maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. In: *The Plant Cell Online* 20 (2008), Nr. 2, S. 482–494 pages
- [Köllner *et al.* 2013] KÖLLNER, Tobias G. ; LENK, Claudia ; SCHNEE, Christiane ; KÖPKE, Sabrina ; LINDEMANN, Peter ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. In: *BMC plant biology* 13 (2013), Nr. 1, S. 15 pages
- [Köllner *et al.* 2004] KÖLLNER, Tobias G. ; SCHNEE, Christiane ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 5, S. 1115–1131 pages
- [Köllner *et al.* 2008b] KÖLLNER, Tobias G. ; SCHNEE, Christiane ; LI, Shenghong ; SVATOŠ, Aleš ; SCHNEIDER, Bernd ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: Protonation of a neutral (S)- β -bisabolene intermediate is involved in (S)- β -macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11. In: *Journal of biological chemistry* 283 (2008), Nr. 30, S. 20779–20788 pages
- [Koyama 1999] KOYAMA, Tanetoshi: Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. In: *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 63 (1999), Nr. 10, S. 1671–1676 pages
- [Koyama *et al.* 1995] KOYAMA, Tanetoshi ; TAJIMA, Masaya ; NISHINO, Tokuzo ; OGURA, Kyoza: Significance of Phe-220 and Gln-221 in the Catalytic Mechanism of Farnesyl Diphosphate Synthase of *Bacillus stearothermophilus*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 212 (1995), Nr. 2, S. 681–686 pages

- [Koyama *et al.* 1996] KOYAMA, Tanetoshi ; TAJIMA, Masaya ; SANO, Hiroaki ; DOI, Takashi ; KOIKE-TAKESHITA, Ayumi ; OBATA, Shusei ; NISHINO, Tokuzo ; OGURA, Kyozo: Identification of significant residues in the substrate binding site of *Bacillus stearothermophilus* farnesyl diphosphate synthase. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 29, S. 9533–9538 pages
- [Krumm *et al.* 1995] KRUMM, Thomas ; BANDEMER, Katja ; BOLAND, Wilhelm: Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. In: *FEBS letters* 377 (1995), Nr. 3, S. 523–529 pages
- [Kump *et al.* 2011] KUMP, Kristen L. ; BRADBURY, Peter J. ; WISSER, Randall J. ; BUCKLER, Edward S. ; BELCHER, Araby R. ; OROPEZA-ROSAS, Marco A. ; ZWONITZER, John C. ; KRESOVICH, Stephen ; MCMULLEN, Michael D. ; WARE, Doreen *et al.*: Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. In: *Nature genetics* 43 (2011), Nr. 2, S. 163–168 pages
- [Kusano *et al.* 2001] KUSANO, Kazutomi ; SAKAGUCHI, Masao ; KAGAWA, Norio ; WATERMAN, Michael R. ; OMURA, Tsuneo: Microsomal P450s Use Specific Proline—Rich Sequences for Efficient Folding, but Not for Maintenance of the Folded Structure. In: *Journal of biochemistry* 129 (2001), Nr. 2, S. 259–269 pages
- [Lan *et al.* 2013] LAN, Jian-bin ; YU, Rang-cai ; YU, Yun-yi ; FAN, Yan-ping: Molecular cloning and expression of *Hedychium coronarium* farnesyl pyrophosphate synthase gene and its possible involvement in the biosynthesis of floral and wounding/herbivory induced leaf volatile sesquiterpenoids. In: *Gene* 518 (2013), Nr. 2, S. 360–367 pages
- [Laule *et al.* 2003] LAULE, Oliver ; FÜRHOLOZ, Andreas ; CHANG, Hur-Song ; ZHU, Tong ; WANG, Xun ; HEIFETZ, Peter B. ; GRUISSEM, Wilhelm ; LANGE, Markus: Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Nr. 11, S. 6866–6871 pages
- [Lawrence & Novak 2004] LAWRENCE, Susan D. ; NOVAK, Nicole G.: Maize genes induced by herbivory and volicitin. In: *Journal of chemical ecology* 30 (2004), Nr. 12, S. 2543–2557 pages
- [Lee *et al.* 2010] LEE, Sungbeom ; BADIEYAN, Somayesadat ; BEVAN, David R. ; HERDE, Marco ; GATZ, Christiane ; THOLL, Dorothea: Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010), Nr. 49, S. 21205–21210 pages
- [Lenk 2012] LENK, Claudia: *Identification of regulatory factors in the signal transduction pathway in herbivore-induced maize*, Diss., 2012 pages

- [Lenk *et al.* 2012] LENK, Claudia ; KÖLLNER, Tobias G. ; ERB, Matthias ; DEGENHARDT, Jörg: Two enzymes responsible for the formation of herbivore-induced volatiles of maize, the methyltransferase AAMT1 and the terpene synthase TPS23, are regulated by a similar signal transduction pathway. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 144 (2012), Nr. 1, S. 86–92 pages
- [Li & Larkins 1996] LI, Chun P. ; LARKINS, Brian A.: Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. In: *Gene* 171 (1996), Nr. 2, S. 193–196 pages
- [Little & Croteau 2002] LITTLE, Dawn B. ; CROTEAU, Rodney B.: Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases δ -selinene synthase and γ -humulene synthase. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 402 (2002), Nr. 1, S. 120–135 pages
- [Littlewood & Evan 1998] LITTLEWOOD, Trevor D. ; EVAN, Gerard I.: Helix-loop-helix transcription factors. (1998) pages
- [Liu *et al.* 2003] LIU, Kejun ; GOODMAN, Major ; MUSE, Spencer ; SMITH, J S. ; BUCKLER, Ed ; DOEBLEY, John: Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. In: *Genetics* 165 (2003), Nr. 4, S. 2117–2128 pages
- [Lorenzo *et al.* 2004] LORENZO, Oscar ; CHICO, Jose M. ; SÁNCHEZ-SERRANO, Jose J. ; SOLANO, Roberto: JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 7, S. 1938–1950 pages
- [Lorenzo & Solano 2005] LORENZO, Oscar ; SOLANO, Roberto: Molecular players regulating the jasmonate signalling network. In: *Current opinion in plant biology* 8 (2005), Nr. 5, S. 532–540 pages
- [Lorito *et al.* 1994] LORITO, M ; BROADWAY, RM ; HAYES, CK ; WOO, SL ; NOVIELLO, C ; WILLIAMS, DL ; HARMAN, GE: Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. In: *Molecular plant-microbe interactions: MPMI (USA)* (1994) pages
- [Lou & Baldwin 2006] LOU, Yonggen ; BALDWIN, Ian T.: Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. In: *Plant Physiology* 140 (2006), Nr. 3, S. 1126–1136 pages
- [Lynen & Graßl 1958] LYNEN, Feodor ; GRASSL, Marianne: Zur Biosynthese der Terpene, II. Darstellung von (—)-Mevalonsäure durch bakterielle Racematsspaltung. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 313 (1958), Nr. 1, S. 291–295 pages
- [Ma *et al.* 2013] MA, Bi ; LUO, Yiwei ; JIA, Ling ; QI, Xiwu ; ZENG, Qiwei ; XIANG, Zhonghuai ; HE, Ningjia: Identification and characterization of cytochrome P450 genes in the mulberry, *Morus notabilis*. In: *Journal of integrative plant biology* (2013) pages

- [Mackay 2001] MACKAY, Trudy F.: Quantitative trait loci in *Drosophila*. In: *Nature Reviews Genetics* 2 (2001), Nr. 1, S. 11–20 pages
- [Mansuri *et al.* 1998] MANSURI, Muzammil M. ; MURTHI, Krishna K. ; PAL, Kollol: Inhibitors of cyclin dependent kinases. (1998) pages
- [Marrero *et al.* 1992] MARRERO, PF ; POULTER, CD ; EDWARDS, PA: Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 30, S. 21873–21878 pages
- [Martin *et al.* 2010] MARTIN, Diane M. ; AUBOURG, Sébastien ; SCHOUWEY, Marina B. ; DAVIET, Laurent ; SCHALK, Michel ; TOUB, Omid ; LUND, Steven T. ; BOHLMANN, Jörg: Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. In: *BMC Plant Biology* 10 (2010), Nr. 1, S. 226 pages
- [Martin *et al.* 2003] MARTIN, Gail S. ; LIU, Jinggao ; BENEDICT, Chauncey R. ; STIPANOVIC, Robert D. ; MAGILL, Clint W.: Reduced levels of cadinane sesquiterpenoids in cotton plants expressing antisense (+)- δ -cadinene synthase. In: *Phytochemistry* 62 (2003), Nr. 1, S. 31–38 pages
- [Matsuoka *et al.* 2002] MATSUOKA, Yoshihiro ; VIGOUROUX, Yves ; GOODMAN, Major M. ; SANCHEZ, Jesus ; BUCKLER, Edward ; DOEBLEY, John: A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002), Nr. 9, S. 6080–6084 pages
- [McMullen *et al.* 2009] MCMULLEN, Michael D. ; KRESOVICH, Stephen ; VILLEDIA, Hector S. ; BRADBURY, Peter ; LI, Huihui ; SUN, Qi ; FLINT-GARCIA, Sherry ; THORNSBERRY, Jeffry ; ACHARYA, Charlotte ; BOTTOMS, Christopher *et al.*: Genetic properties of the maize nested association mapping population. In: *Science* 325 (2009), Nr. 5941, S. 737–740 pages
- [Menke *et al.* 1999] MENKE, Frank L. ; CHAMPION, Anthony ; KIJNE, Jan W. ; MEMELINK, Johan: A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. In: *The EMBO journal* 18 (1999), Nr. 16, S. 4455–4463 pages
- [Mercke *et al.* 2004] MERCKE, Per ; KAPPERS, Iris F. ; VERSTAPPEN, Francel W. ; VORST, Oscar ; DICKE, Marcel ; BOUWMEESTER, Harro J.: Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. In: *Plant Physiology* 135 (2004), Nr. 4, S. 2012–2024 pages
- [Morgante *et al.* 2005] MORGANTE, Michele ; BRUNNER, Stephan ; PEA, Giorgio ; FENGLER, Kevin ; ZUCCOLO, Andrea ; RAFALSKI, Antoni: Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. In: *Nature genetics* 37 (2005), Nr. 9, S. 997–1002 pages

- [Nagegowda *et al.* 2008] NAGEGOWDA, Dinesh A. ; GUTENSOHN, Michael ; WILKERSON, Curtis G. ; DUDAREVA, Natalia: Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. In: *The Plant Journal* 55 (2008), Nr. 2, S. 224–239 pages
- [Nei & Gojobori 1986] NEI, Masatoshi ; GOJOBORI, Takashi: Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. In: *Molecular biology and evolution* 3 (1986), Nr. 5, S. 418–426 pages
- [Nelson & Werck-Reichhart 2011] NELSON, David ; WERCK-REICHHART, Danièle: A P450-centric view of plant evolution. In: *The Plant Journal* 66 (2011), Nr. 1, S. 194–211 pages
- [Nelson *et al.* 1996] NELSON, David R. ; KOYMANS, Luc ; KAMATAKI, Tetsuya ; STEGEMAN, John J. ; FEYEREISEN, René ; WAXMAN, David J. ; WATERMAN, Michael R. ; GOTOH, Osamu ; COON, Minor J. ; ESTABROOK, Ron W. *et al.*: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. In: *Pharmacogenetics and Genomics* 6 (1996), Nr. 1, S. 1–42 pages
- [Nelson *et al.* 2004] NELSON, David R. ; ZELDIN, Darryl C. ; HOFFMAN, Susan M. ; MALTAIS, Lois J. ; WAIN, Hester M. ; NEBERT, Daniel W.: Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. In: *Pharmacogenetics and Genomics* 14 (2004), Nr. 1, S. 1–18 pages
- [Nielsen *et al.* 1997] NIELSEN, Henrik ; ENGELBRECHT, Jacob ; BRUNAK, Søren ; HEIJNE, Gunnar von: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein engineering* 10 (1997), Nr. 1, S. 1–6 pages
- [Niu & Figueroa 2011] NIU, Yajie ; FIGUEROA, Pablo: Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. In: *Journal of experimental botany* 62 (2011), Nr. 6, S. 2143–2154 pages
- [Nordborg *et al.* 2002] NORDBORG, Magnus ; BOREVITZ, Justin O. ; BERGELSON, Joy ; BERRY, Charles C. ; CHORY, Joanne ; HAGENBLAD, Jenny ; KREITMAN, Martin ; MALOOF, Julin N. ; NOYES, Tina ; OEFNER, Peter J. *et al.*: The extent of linkage disequilibrium in Arabidopsis thaliana. In: *Nature genetics* 30 (2002), Nr. 2, S. 190–193 pages
- [Oard *et al.* 1989] OARD, JH ; PAIGE, D ; DVORAK, J: Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat. In: *Plant cell reports* 8 (1989), Nr. 3, S. 156–160 pages
- [Ober 2005] OBER, Dietrich: Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. In: *Trends in plant science* 10 (2005), Nr. 9, S. 444–449 pages
- [Odland *et al.* 2006] ODLAND, Wade ; BAUMGARTEN, Andrew ; PHILLIPS, Ronald: Ancestral rice blocks define multiple related regions in the maize genome. In: *Crop science* 46 (2006), Nr. Supplement_1, S. S–41 pages

-
- [Ogura & Koyama 1998] OGURA, Kyozo ; KOYAMA, Tanetoshi: Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. In: *Chemical Reviews* 98 (1998), Nr. 4, S. 1263–1276 pages
- [Ohara *et al.* 2010] OHARA, Kazuaki ; SASAKI, Kanako ; YAZAKI, Kazufumi: Two solanesyl diphosphate synthases with different subcellular localizations and their respective physiological roles in *Oryza sativa*. In: *Journal of experimental botany* 61 (2010), Nr. 10, S. 2683–2692 pages
- [Ohnuma *et al.* 1996] OHNUMA, Shin-ichi ; HIROOKA, Kazutake ; HEMMI, Hisashi ; ISHIDA, Chika ; OHTO, Chikara ; NISHINO, Tokuzo: Conversion of product specificity of archaeobacterial geranylgeranyl-diphosphate synthase Identification of essential amino acid residues for chain length determination of prenyltransferase reaction. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 31, S. 18831–18837 pages
- [Ortiz-Monasterio *et al.* 2007] ORTIZ-MONASTERIO, JI ; PALACIOS-ROJAS, N ; MENG, E ; PIXLEY, K ; TRETOWAN, R ; PENA, RJ: Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. In: *Journal of Cereal Science* 46 (2007), Nr. 3, S. 293–307 pages
- [Palaisa *et al.* 2003] PALAISA, Kelly A. ; MORGANTE, Michele ; WILLIAMS, Mark ; RAFALSKI, Antoni: Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 8, S. 1795–1806 pages
- [Paré & Tumlinson 1997] PARÉ, Paul W. ; TUMLINSON, James H.: De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. In: *Plant Physiology* 114 (1997), Nr. 4, S. 1161–1167 pages
- [Van de Peer & De Wachter 1994] PEER, Yves Van d. ; DE WACHTER, Rupert: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. In: *Computer applications in the biosciences: CABIOS* 10 (1994), Nr. 5, S. 569–570 pages
- [Phillips *et al.* 1999] PHILLIPS, Michael A. ; SAVAGE, Thomas J. ; CROTEAU, Rodney: Monoterpene Synthases of Loblolly Pine (*Pinus taeda*) Produce Pinene Isomers and Enantiomers. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 372 (1999), Nr. 1, S. 197–204 pages
- [Pichersky *et al.* 1995] PICHERSKY, Eran ; LEWINSOHN, Efraim ; CROTEAU, Rodney: Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri*. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 316 (1995), Nr. 2, S. 803–807 pages
- [Pichersky *et al.* 2006] PICHERSKY, Eran ; NOEL, Joseph P. ; DUDAREVA, Natalia: Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. In: *Science* 311 (2006), Nr. 5762, S. 808–811 pages
- [Piperno & Flannery 2001] PIPERNO, Dolores R. ; FLANNERY, Kent V.: The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass

- spectrometry dates and their implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), Nr. 4, S. 2101–2103 pages
- [Plomin 2001] PLOMIN, Robert: The genetics of g in human and mouse. In: *Nature Reviews Neuroscience* 2 (2001), Nr. 2, S. 136–141 pages
- [Popjak *et al.* 1962] POPJAK, G ; CORNFORTH, JW ; CORNFORTH, Rita H. ; RYHAGE, R ; GOODMAN, DeWitt S.: Studies on the biosynthesis of cholesterol. XVI. Chemical synthesis of 1-H²-3-²-C-14-and 1-D²-2-C-14-trans-trans-farnesyl pyrophosphate and their utilization in squalene biosynthesis. In: *The Journal of biological chemistry* 237 (1962), S. 56 pages
- [Price *et al.* 1980] PRICE, Peter W. ; BOUTON, Carl E. ; GROSS, Paul ; MCPHERON, Bruce A. ; THOMPSON, John N. ; WEIS, Arthur E.: Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. In: *Annual Review of Ecology and systematics* 11 (1980), Nr. 1, S. 41–65 pages
- [Rafalski & Morgante 2004] RAFALSKI, Antoni ; MORGANTE, Michele: Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. In: *TRENDS in Genetics* 20 (2004), Nr. 2, S. 103–111 pages
- [Rahman *et al.* 2011] RAHMAN, H ; PEKIC, S ; LAZIC-JANCIC, V ; QUARRIE, SA ; SHAH, SMA ; PERVEZ, A ; SHAH, MM: Molecular mapping of quantitative trait loci for drought tolerance in maize plants. In: *Genet. Mol. Res* 10 (2011), S. 889–901 pages
- [Ralston *et al.* 2001] RALSTON, Lyle ; KWON, Soon T. ; SCHOENBECK, Mark ; RALSTON, Jennifer ; SCHENK, David J. ; COATES, Robert M. ; CHAPPELL, Joe: Cloning, Heterologous Expression, and Functional Characterization of 5-*epi*-Aristolochene-1, 3-Dihydroxylase from Tobacco (*Nicotiana tabacum*). In: *Archives of biochemistry and biophysics* 393 (2001), Nr. 2, S. 222–235 pages
- [Ramos-Valdivia *et al.* 1997] RAMOS-VALDIVIA, Ana C. ; HEIJDEN, Robert van d. ; VERPOORTE, Robert: Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. In: *Planta* 203 (1997), Nr. 2, S. 155–161 pages
- [Rasmann *et al.* 2005] RASMANN, Sergio ; KÖLLNER, Tobias G. ; DEGENHARDT, Jörg ; HILTPOLD, Ivan ; TOEPFER, Stefan ; KUHLMANN, Ulrich ; GERSHENZON, Jonathan ; TURLINGS, Ted C.: Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. In: *Nature* 434 (2005), Nr. 7034, S. 732–737 pages
- [Reich *et al.* 2001] REICH, David E. ; CARGILL, Michele ; BOLK, Stacey ; IRELAND, James ; SABETI, Pardis C. ; RICHTER, Daniel J. ; LAVERY, Thomas ; KOUYOUMJIAN, Rose ; FARHADIAN, Shelli F. ; WARD, Ryk *et al.*: Linkage disequilibrium in the human genome. In: *Nature* 411 (2001), Nr. 6834, S. 199–204 pages

- [Remington *et al.* 2001] REMINGTON, David L. ; THORNSBERRY, Jeffrey M. ; MATSUOKA, Yoshihiro ; WILSON, Larissa M. ; WHITT, Sherry R. ; DOEBLEY, John ; KRESOVICH, Stephen ; GOODMAN, Major M. ; BUCKLER, Edward S.: Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), Nr. 20, S. 11479–11484 pages
- [Reymond & Farmer 1998] REYMOND, Philippe ; FARMER, Edward E.: Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. In: *Current opinion in plant biology* 1 (1998), Nr. 5, S. 404–411 pages
- [Richter *et al.* subm] RICHTER, Annett ; SEIDL-ADAMS, Irmgard ; KÖLLNER, Tobias ; TUMLINSON, Jim ; DEGENHARDT, Joerg: A maize (*Zea mays*) herbivore-induced farnesyl diphosphate synthase supports the sesquiterpene synthesis in leaves. In: *Planta* (submitted 2014) pages
- [Riechmann *et al.* 2000] RIECHMANN, JL ; HEARD, J ; MARTIN, G ; REUBER, L ; KEDDIE, J ; ADAM, L ; PINEDA, O ; RATCLIFFE, OJ ; SAMAHA, RR ; CREELMAN, R *et al.*: Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. In: *Science* 290 (2000), Nr. 5499, S. 2105–2110 pages
- [Rivas-San Vicente & Plasencia 2011] RIVAS-SAN VICENTE, Mariana ; PLASENCIA, Javier: Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. In: *Journal of Experimental Botany* 62 (2011), Nr. 10, S. 3321–3338 pages
- [Ro *et al.* 2008] RO, Dae-Kyun ; OUELLET, Mario ; PARADISE, Eric M. ; BURD, Helcio ; ENG, Diana ; PADDON, Chris J. ; NEWMAN, Jack D. ; KEASLING, Jay D.: Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. In: *BMC biotechnology* 8 (2008), Nr. 1, S. 83 pages
- [Russell 1991] RUSSELL, Scott D.: Isolation and characterization of sperm cells in flowering plants. In: *Annual review of plant biology* 42 (1991), Nr. 1, S. 189–204 pages
- [Ryan *et al.* 1981] RYAN, CA *et al.*: Proteinase inhibitors. In: *The biochemistry of plants* 6 (1981), Nr. 351-370, S. 6 pages
- [Sallaud *et al.* 2009] SALLAUD, Christophe ; RONTEIN, Denis ; ONILLON, Sandrine ; JABÈS, Françoise ; DUFFÉ, Philippe ; GIACALONE, Cécile ; THORAVAL, Samuel ; ESCOFFIER, Camille ; HERBETTE, Gaëtan ; LEONHARDT, Nathalie *et al.*: A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. In: *The Plant Cell Online* 21 (2009), Nr. 1, S. 301–317 pages
- [Salse *et al.* 2004] SALSE, Jérôme ; PIÉGU, Benoit ; COOKE, Richard ; DELSENY, Michel: New in silico insight into the synteny between rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) highlights reshuffling and identifies new duplications in the rice genome. In: *The Plant Journal* 38 (2004), Nr. 3, S. 396–409 pages

- [Sanmiya *et al.* 1997] SANMIYA, Kazutsuka ; IWASAKI, Toshisuke ; MATSUOKA, Makoto ; MIYAO, Mitsue ; YAMAMOTO, Naoki: Cloning of a cDNA that encodes farnesyl diphosphate synthase and the blue-light-induced expression of the corresponding gene in the leaves of rice plants. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1350 (1997), Nr. 3, S. 240–246 pages
- [Sanmiya *et al.* 1999] SANMIYA, Kazutsuka ; UENO, Osamu ; MATSUOKA, Makoto ; YAMAMOTO, Naoki: Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. In: *Plant and cell physiology* 40 (1999), Nr. 3, S. 348–354 pages
- [Sasaki *et al.* 2001] SASAKI, Yuko ; ASAMIZU, Erika ; SHIBATA, Daisuke ; NAKAMURA, Yasukazu ; KANEKO, Takakazu ; AWAI, Koichiro ; AMAGAI, Masayuki ; KUWATA, Chikara ; TSUGANE, Taneaki ; MASUDA, Tatsuru *et al.*: Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. In: *Dna Research* 8 (2001), Nr. 4, S. 153–161 pages
- [Sasaki-Sekimoto *et al.* 2013] SASAKI-SEKIMOTO, Yuko ; JIKUMARU, Yusuke ; OBA-YASHI, Takeshi ; SAITO, Hikaru ; MASUDA, Shinji ; KAMIYA, Yuji ; OHTA, Hiroyuki ; SHIRASU, Ken: Basic Helix-Loop-Helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 163 (2013), Nr. 1, S. 291–304 pages
- [Schaller 2001] SCHALLER, Michael D.: Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1540 (2001), Nr. 1, S. 1–21 pages
- [van Schie *et al.* 2007] SCHIE, Chris C. ; HARING, Michel A. ; SCHUURINK, Robert C.: Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. In: *Plant molecular biology* 64 (2007), Nr. 3, S. 251–263 pages
- [Schilmiller *et al.* 2009] SCHILMILLER, Anthony L. ; SCHAUVINHOLD, Ines ; LARSON, Matthew ; XU, Richard ; CHARBONNEAU, Amanda L. ; SCHMIDT, Adam ; WILKERSON, Curtis ; LAST, Robert L. ; PICHESKY, Eran: Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009), Nr. 26, S. 10865–10870 pages
- [Schmelz *et al.* 2001] SCHMELZ, Eric A. ; ALBORN, Hans T. ; TUMLINSON, James H.: The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. In: *Planta* 214 (2001), Nr. 2, S. 171–179 pages
- [Schmelz *et al.* 2003] SCHMELZ, Eric A. ; ALBORN, Hans T. ; TUMLINSON, James H.: Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. In: *Physiologia plantarum* 117 (2003), Nr. 3, S. 403–412 pages

- [Schmidt *et al.* 2010a] SCHMIDT, Axel ; WÄCHTLER, Betty ; TEMP, Ulrike ; KREKLING, Trygve ; SÉGUIN, Armand ; GERSHENZON, Jonathan: A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. In: *Plant physiology* 152 (2010), Nr. 2, S. 639–655 pages
- [Schmidt *et al.* 2010b] SCHMIDT, Thomas ; HILLEBRAND, Andrea ; WURBS, David ; WAHLER, Daniela ; LENDERS, Malte ; GRONOVER, Christian S. ; PRÜFER, Dirk: Molecular cloning and characterization of rubber biosynthetic genes from *Taraxacum koksaghyz*. In: *Plant molecular biology reporter* 28 (2010), Nr. 2, S. 277–284 pages
- [Schnee *et al.* 2002] SCHNEE, Christiane ; KÖLLNER, Tobias G. ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)- β -farnesene, (*E*)-nerolidol, and (*E*, *E*)-farnesol after herbivore damage. In: *Plant physiology* 130 (2002), Nr. 4, S. 2049–2060 pages
- [Schnee *et al.* 2006] SCHNEE, Christiane ; KÖLLNER, Tobias G. ; HELD, Matthias ; TURLINGS, Ted C. ; GERSHENZON, Jonathan ; DEGENHARDT, Jörg: The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 4, S. 1129–1134 pages
- [Schüler *et al.* 2001] SCHÜLER, Göde ; GÖRLS, Helmar ; BOLAND, Wilhelm: 6-Substituted indanoyl isoleucine conjugates mimic the biological activity of coronatine. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2001 (2001), Nr. 9, S. 1663–1668 pages
- [Seidl-Adams *et al.* 2014] SEIDL-ADAMS, Irmgard ; RICHTER, Annett ; BOOMERKB ; YOSHINAGA, Naoko ; DEGENHARDT JOERGAND TUMLINSON, James T.: Emission of herbivore elicitor-induced sesquiterpenes is regulated by stomatal aperture in maize (*Zea mays*) seedlings. In: *Plant, cell & environment* (2014) pages
- [Shah 2003] SHAH, Jyoti: The salicylic acid loop in plant defense. In: *Current opinion in plant biology* 6 (2003), Nr. 4, S. 365–371 pages
- [Shinoda 1993] SHINODA, T: Callose reaction induced in melon leaves by feeding of melon aphid, *Aphis gossypii* Glover, as possible aphid-resistant factor. In: *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 37 (1993) pages
- [Shivaji *et al.* 2010] SHIVAJI, Renuka ; CAMAS, Alberto ; ANKALA, Arunkanth ; ENGELBERTH, Jurgen ; TUMLINSON, James H. ; WILLIAMS, W P. ; WILKINSON, Jeff R. ; LUTHE, Dawn S.: Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. In: *Journal of chemical ecology* 36 (2010), Nr. 2, S. 179–191 pages
- [Shumskaya *et al.* 2012] SHUMSKAYA, Maria ; BRADBURY, Louis M. ; MONACO, Regina R. ; WURTZEL, Eleanore T.: Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. In: *The Plant Cell Online* 24 (2012), Nr. 9, S. 3725–3741 pages

- [Soderberg *et al.* 2001] SODERBERG, Tim ; CHEN, Anjun ; POULTER, C D.: Geranylgeranylgeranyl glyceryl phosphate synthase. Characterization of the recombinant enzyme from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 49, S. 14847–14854 pages
- [Soler *et al.* 1992] SOLER, E ; FERON, G ; CLASTRE, M ; DARGENT, R ; GLEIZES, M ; AMBID, C: Evidence for a geranyl-diphosphate synthase located within the plastids of *Vitis vinifera* L. cultivated in vitro. In: *Planta* 187 (1992), Nr. 2, S. 171–175 pages
- [Spiteller *et al.* 2000] SPITELLER, Dieter ; DETTNER, Konrad ; BOLAND, Wilhelm: Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. In: *Biological chemistry* 381 (2000), Nr. 8, S. 755–762 pages
- [Stanley Fernandez *et al.* 2000] STANLEY FERNANDEZ, Suzanne M. ; KELLOGG, Brenda A. ; POULTER, C D.: Farnesyl diphosphate synthase. Altering the catalytic site to select for geranyl diphosphate activity. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 50, S. 15316–15321 pages
- [Staswick & Tiryaki 2004] STASWICK, Paul E. ; TIRYAKI, Iskender: The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 8, S. 2117–2127 pages
- [Steele *et al.* 1998] STEELE, Christopher L. ; CROCK, John ; BOHLMANN, Jörg ; CROTEAU, Rodney: Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of δ -selinene synthase and γ -humulene synthase. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 4, S. 2078–2089 pages
- [Stuber *et al.* 1992] STUBER, Charles W. ; LINCOLN, Stephen E. ; WOLFF, DW ; HELENTJARIS, T ; LANDER, ES: Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. In: *Genetics* 132 (1992), Nr. 3, S. 823–839 pages
- [Szalma *et al.* 2007] SZALMA, SJ ; HOSTERT, BM ; LEDEAUX, JR ; STUBER, CW ; HOLLAND, JB: QTL mapping with near-isogenic lines in maize. In: *Theoretical and Applied Genetics* 114 (2007), Nr. 7, S. 1211–1228 pages
- [Takabayashi & Dicke 1996] TAKABAYASHI, Junji ; DICKE, Marcel: Plant—carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. In: *Trends in Plant Science* 1 (1996), Nr. 4, S. 109–113 pages
- [Tan *et al.* 2000] TAN, Xiao-Ping ; LIANG, Wan-Qi ; LIU, Chang-Jun ; LUO, Ping ; HEINSTEIN, Peter ; CHEN, Xiao-Ya: Expression pattern of (+)- δ -cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L. In: *Planta* 210 (2000), Nr. 4, S. 644–651 pages
- [Tarshis *et al.* 1996] TARSHIS, LC ; PROTEAU, Philip J. ; KELLOGG, Brenda A. ; SACCHETTINI, James C. ; POULTER, C D.: Regulation of product chain length

- by isoprenyl diphosphate synthases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), Nr. 26, S. 15018–15023 pages
- [Tarshis *et al.* 1994] TARSHIS, LC ; YAN, Mujing ; POULTER, C D. ; SACCHETTINI, James C.: Crystal Structure of Recombinant Farnesyl Diphosphate Synthase at 2.6-Å Resolution. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 36, S. 10871–10877 pages
- [Tenailon *et al.* 2001] TENAILLON, Maud I. ; SAWKINS, Mark C. ; LONG, Anthony D. ; GAUT, Rebecca L. ; DOEBLEY, John F. ; GAUT, Brandon S.: Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), Nr. 16, S. 9161–9166 pages
- [Thines *et al.* 2007] THINES, Bryan ; KATSIR, Leron ; MELOTTO, Maeli ; NIU, Yajie ; MANDAOKAR, Ajin ; LIU, Guanghui ; NOMURA, Kinya ; HE, Sheng Y. ; HOWE, Gregg A. ; BROWSE, John: JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. In: *Nature* 448 (2007), Nr. 7154, S. 661–665 pages
- [Tholl 2006] THOLL, Dorothea: Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. In: *Current opinion in plant biology* 9 (2006), Nr. 3, S. 297–304 pages
- [Tholl *et al.* 2004] THOLL, Dorothea ; KISH, Christine M. ; ORLOVA, Irina ; SHERMAN, Debra ; GERSHENZON, Jonathan ; PICHESKY, Eran ; DUDAREVA, Natalia: Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. In: *The Plant Cell Online* 16 (2004), Nr. 4, S. 977–992 pages
- [Tholl & Lee 2011] THOLL, Dorothea ; LEE, Sungbeom: Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 9 (2011) pages
- [Thompson *et al.* 1994] THOMPSON, Julie D. ; HIGGINS, Desmond G. ; GIBSON, Toby J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic acids research* 22 (1994), Nr. 22, S. 4673–4680 pages
- [Thornsberry *et al.* 2001] THORNSBERRY, Jeffrey M. ; GOODMAN, Major M. ; DOEBLEY, John ; KRESOVICH, Stephen ; NIELSEN, Dahlia ; BUCKLER, Edward S.: Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. In: *Nature genetics* 28 (2001), Nr. 3, S. 286–289 pages
- [Tian *et al.* 2011] TIAN, Feng ; BRADBURY, Peter J. ; BROWN, Patrick J. ; HUNG, Hsiaoyi ; SUN, Qi ; FLINT-GARCIA, Sherry ; ROCHEFORD, Torbert R. ; MCMULLEN, Michael D. ; HOLLAND, James B. ; BUCKLER, Edward S.: Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. In: *Nature genetics* 43 (2011), Nr. 2, S. 159–162 pages

- [Tishkoff & Verrelli 2003] TISHKOFF, Sarah A. ; VERRELLI, Brian C.: Patterns of human genetic diversity: implications for human evolutionary history and disease. In: *Annual review of genomics and human genetics* 4 (2003), Nr. 1, S. 293–340 pages
- [Tissier *et al.* 2013] TISSIER, Alain ; SALLAUD, Christophe ; RONTEIN, Denis: Tobacco trichomes as a platform for terpenoid biosynthesis engineering. In: *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* (2013), S. 271–283 pages
- [Toledo-Ortiz *et al.* 2003] TOLEDO-ORTIZ, Gabriela ; HUQ, Enamul ; QUAIL, Peter H.: The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 8, S. 1749–1770 pages
- [Toledo-Ortiz *et al.* 2010] TOLEDO-ORTIZ, Gabriela ; HUQ, Enamul ; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, Manuel: Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010), Nr. 25, S. 11626–11631 pages
- [Tooker & De Moraes 2007] TOOKER, John F. ; DE MORAES, Consuelo M.: Feeding by Hessian fly [*Mayetiola destructor* (Say)] larvae does not induce plant indirect defences. In: *Ecological entomology* 32 (2007), Nr. 2, S. 153–161 pages
- [Trapp & Croteau 2001] TRAPP, Susan C. ; CROTEAU, Rodney B.: Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. In: *Genetics* 158 (2001), Nr. 2, S. 811–832 pages
- [Troyer 1996] TROYER, A F.: Breeding widely adapted, popular maize hybrids. In: *Euphytica* 92 (1996), Nr. 1-2, S. 163–174 pages
- [Tumlinson & Lait 2005] TUMLINSON, James H. ; LAIT, Cameron G.: Biosynthesis of fatty acid amide elicitors of plant volatiles by insect herbivores. In: *Archives of insect biochemistry and physiology* 58 (2005), Nr. 2, S. 54–68 pages
- [Turlings & Benrey 1998] TURLINGS, Ted C. ; BENREY, Betty: Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps. In: *Ecoscience* (1998) pages
- [Turlings *et al.* 2005] TURLINGS, Ted C. ; JEANBOURQUIN, Philippe M. ; HELD, Mattias ; DEGEN, Thomas: Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. In: *Transgenic research* 14 (2005), Nr. 6, S. 807–816 pages
- [Turlings *et al.* 1998] TURLINGS, Ted C. ; LENGWILER, Urs B. ; BERNASCONI, Marco L. ; WECHSLER, Daniel: Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. In: *Planta* 207 (1998), Nr. 1, S. 146–152 pages
- [Turlings *et al.* 1990] TURLINGS, Ted C. ; TUMLINSON, James H. ; LEWIS, WJ: Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. In: *Science* 250 (1990), Nr. 4985, S. 1251–1253 pages

- [Turlings *et al.* 1993] TURLINGS, Ted C. ; WÄCKERS, Felix L. ; VET, Louise E. ; LEWIS, W J. ; TUMLINSON, James H.: Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: *Insect learning*. Springer, 1993, S. 51–78 pages
- [Turner *et al.* 1999] TURNER, Glenn ; GERSHENZON, Jonathan ; NIELSON, Erik E. ; FROEHLICH, John E. ; CROTEAU, Rodney: Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. In: *Plant Physiology* 120 (1999), Nr. 3, S. 879–886 pages
- [Van Tol *et al.* 2001] VAN TOL, Rob W. ; VAN DER SOMMEN, Anton T. ; BOFF, Mari I. ; VAN BEZOOIJEN, Jan ; SABELIS, Maurice W. ; SMITS, Peter H.: Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. In: *Ecology Letters* 4 (2001), Nr. 4, S. 292–294 pages
- [Vigouroux *et al.* 2005] VIGOUROUX, Yves ; MITCHELL, Sharon ; MATSUOKA, Yoshihiro ; HAMBLIN, Martha ; KRESOVICH, Stephen ; SMITH, J Stephen C. ; JAQUETH, Jennifer ; SMITH, Oscar S. ; DOEBLEY, John: An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. In: *Genetics* 169 (2005), Nr. 3, S. 1617–1630 pages
- [Vlot *et al.* 2009] VLOT, A C. ; DEMPSEY, D'Maris A. ; KLESSIG, Daniel F.: Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. In: *Annual review of phytopathology* 47 (2009), S. 177–206 pages
- [Vranová *et al.* 2012] VRANOVÁ, Eva ; COMAN, Diana ; GRUISSEM, Wilhelm: Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. In: *Molecular plant* 5 (2012), Nr. 2, S. 318–333 pages
- [Walter *et al.* 2002] WALTER, Michael H. ; HANS, Joachim ; STRACK, Dieter: Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. In: *The Plant Journal* 31 (2002), Nr. 3, S. 243–254 pages
- [Wang *et al.* 2007] WANG, Dong ; PAJEROWSKA-MUKHTAR, Karolina ; CULLER, Angela H. ; DONG, Xinnian: Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. In: *Current Biology* 17 (2007), Nr. 20, S. 1784–1790 pages
- [Wang & Dixon 2009] WANG, Guodong ; DIXON, Richard A.: Heterodimeric geranyl (geranyl) diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009), Nr. 24, S. 9914–9919 pages
- [Wang & Ohnuma 1999] WANG, Kevin ; OHNUMA, Shin-ichi: Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (1999), Nr. 11, S. 445–451 pages
- [Wegener & Schulz 2002] WEGENER, Robert ; SCHULZ, Stefan: Identification and synthesis of homoterpenoids emitted from elm leaves after elicitation by beetle eggs. In: *Tetrahedron* 58 (2002), Nr. 2, S. 315–319 pages

- [Wei *et al.* 2007] WEI, XL ; LI, YS ; LAM, KS ; WANG, AY ; WANG, TJ: Impact of biogenic VOC emissions on a tropical cyclone-related ozone episode in the Pearl River Delta region, China. In: *Atmospheric Environment* 41 (2007), Nr. 36, S. 7851–7864 pages
- [Weiler *et al.* 1994] WEILER, EW ; KUTCHAN, TM ; GORBA, T ; BRODSCHELM, W ; NIESEL, U ; BUBLITZ, F: The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. In: *FEBS letters* 345 (1994), Nr. 1, S. 9–13 pages
- [Wendt & Schulz 1998] WENDT, K U. ; SCHULZ, Georg E.: Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. In: *Structure* 6 (1998), Nr. 2, S. 127–133 pages
- [Wilson *et al.* 1999] WILSON, William A. ; HARRINGTON, Sandra E. ; WOODMAN, Wendy L. ; LEE, Michael ; SORRELLS, Mark E. ; MCCOUCH, Susan R.: Inferences on the genome structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and the domesticated panicoids. In: *Genetics* 153 (1999), Nr. 1, S. 453–473 pages
- [Wise *et al.* 1998] WISE, Mitchell L. ; SAVAGE, Thomas J. ; KATAHIRA, Eva ; CROTEAU, Rodney: Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1, 8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 24, S. 14891–14899 pages
- [Woldemariam *et al.* 2013] WOLDEMARIAM, Melkamu G. ; TR, Son ; OH, Youngjoo ; GAQUEREL, Emmanuel ; BALDWIN, Ian T. ; GALIS, Ivan: NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata*. In: *BMC plant biology* 13 (2013), Nr. 1, S. 73 pages
- [Yan *et al.* 2012] YAN, Yuanxin ; CHRISTENSEN, Shawn ; ISAKEIT, Tom ; ENGELBERTH, Jürgen ; MEELEY, Robert ; HAYWARD, Allison ; EMERY, RJ N. ; KOLOMIETS, Michael V.: Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. In: *The Plant Cell Online* 24 (2012), Nr. 4, S. 1420–1436 pages
- [Yin *et al.* 1997] YIN, Shaohui ; MEI, Leng ; NEWMAN, Jeffrey ; BACK, Kyoungwhan ; CHAPPELL, Joe: Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression (characterization of an elicitor-and pathogen-inducible promoter). In: *Plant physiology* 115 (1997), Nr. 2, S. 437–451 pages
- [Yoshinaga *et al.* 2010] YOSHINAGA, Naoko ; ALBORN, Hans T. ; NAKANISHI, Tomoaki ; SUCKLING, David M. ; NISHIDA, Ritsuo ; TUMLINSON, James H. ; MORI, Naoki: Fatty acid-amino acid conjugates diversification in lepidopteran caterpillars. In: *Journal of chemical ecology* 36 (2010), Nr. 3, S. 319–325 pages
- [Yu *et al.* 2007] YU, Y ; WANG, R ; SHI, Y ; SONG, Y ; WANG, T ; LI, Y: Genetic diversity and structure of the core collection for maize inbred lines in China. In: *Maydica* 52 (2007), Nr. 2, S. 181 pages

- [Yuan *et al.* 2008] YUAN, Joshua S. ; KÖLLNER, Tobias G. ; WIGGINS, Greg ; GRANT, Jerome ; DEGENHARDT, Jörg ; CHEN, Feng: Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. In: *The Plant Journal* 55 (2008), Nr. 3, S. 491–503 pages
- [Zhang *et al.* 2005] ZHANG, Jinglan ; SIMMONS, Carl ; YALPANI, Nasser ; CRANE, Virginia ; WILKINSON, Heather ; KOLOMIETS, Michael: Genomic analysis of the 12-oxo-phytodienoic acid reductase gene family of *Zea mays*. In: *Plant molecular biology* 59 (2005), Nr. 2, S. 323–343 pages
- [Zhang *et al.* 2003] ZHANG, Yuelin ; TESSARO, Mark J. ; LASSNER, Michael ; LI, Xin: Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. In: *The Plant Cell Online* 15 (2003), Nr. 11, S. 2647–2653 pages
- [Zhang *et al.* 1997] ZHANG, Zong-Ping ; KRUMM, Thomas ; BALDWIN, Ian T.: Structural requirements of Jasmonates and mimics for nicotine induction in *Nicotiana sylvestris*. In: *Journal of chemical ecology* 23 (1997), Nr. 12, S. 2777–2789 pages

Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit habe ich einige Unterstützung erhalten und möchte mich recht herzlich bedanken bei:

Prof. Dr. Degenhardt für die Überlassung des äußerst interessanten und erfolgreichen Themas, die Möglichkeit des Erlernens dieser Thematik im Ausland, dem Präsentieren lassen der wissenschaftlichen Ergebnisse auf internationalen Tagungen sowie dem sehr hilfreichen Entgegenlesen dieser Arbeit.

Ed Buckler, Zhiwu Zhan, Alex Lipka, Peter Bradbury, Feng Tian und den „ants“ aus dem Buckler-Labor danke ich für die schnelle Einführung in das „Nested Association Mapping“, „Genome Wide Association Study“, die dahinter stehende Statistik und das Programmieren in *SAS*.

Tobias Köllner möchte ich einen besonderen Dank für die unzähligen, interessanten Gespräche und hilfreichen Tipps, dem schnellen Korrekturlesen meiner Arbeit und die sehr schöne wenn auch kurze gemeinsame Zusammenarbeit im Labor des Hohen Weg 8 aussprechen.

Sandra Irmisch und Sandra Krause waren besonders hilfreich bei der Durchführung der Expressionsstudien im Hefesystem, sowie bei Messungen auf der GC- bzw. LC-MS. Natürlich bedanke ich mich auch für hilfreiche Diskussionen und für die angenehme Zusammenarbeit.

Claudia Lenk war für den Zeitraum der Anfertigung meiner Arbeit als wissenschaftlicher Diskussionspartner im Bereich Mais unverzichtbar. Außerdem möchte ich mich für das Gegenlesen und die hilfreiche Korrektur bedanken.

Irmgard Seidl stellte mir Primer für die QRT-Experimente der FPP-Synthesen in Mais bereit und gab wertvolle Information im bezüglich Real-Time-PCR an mich weiter. Vielen lieben Dank an eine tolle, liebenswerte Wissenschaftlerin.

Ingo Hofmann als ehemaliger Betreuer meiner Diplomarbeit hat mir bei scheinbar unlösbaren Problemen stets weiter helfen können. Vielen Dank für die immer guten Ratschläge und die sehr interessanten Diskussionsrunden.

Jette Schimmel danke ich als meine Büropartnerin für stets gute Laune und der Hilfe bei Computerproblemen sowie Google-Fragen.

Dem gesamten Labor der 7. Und 8. Etage danke ich für die gute Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren und das Gefühl ein tolles, erfolgreiches Team zu sein.

Meiner Familie danke ich für das Verständnis und die Unterstützung in jeder Hinsicht. Ein besonderer Dank geht an Jeanette Hartlapp, die als fachfremde Unterstützung meine Arbeit auf Grammatik und Rechtschreibfehler prüfte.

Meinem Freund und Lebenspartner Jörn Hartlapp gilt der allergrößte Dank, für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, so dass ich mich jederzeit meiner Arbeit widmen konnte. Während meiner Zeit als Doktorand hattest du immer ein Ohr für meine wissenschaftlichen Erfolge und auch Misserfolge. Das Anfertigen meiner Arbeit in \LaTeX wäre ohne deine Hilfe nicht möglich gewesen. Ich danke dir für alles und dafür, dass du immer für mich da bist.

Annett Richter

Curriculum Vitae

Liebenauer Str. 9
06110 Halle (Saale)



Persönliche Informationen

Geburtsdatum **10 Oktober 1981.**
Geburtsort **Halle (Saale).**
Familienstatus **unverheiratet.**
Staatsangehörigkeit **Bundesrepublik Deutschland.**
Geschlecht **weiblich.**

Entwicklung

Universitätsausbildung

- 02/2009 bis jetzt **Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg**, *Doktorand*, Institut für pharmazeutische Biotechnologie.
Prof. Dr. J. Degenhardt
- 01/2010 **Cornell University, Ithaca, NY**, *Akademische Studien als Doktorand*, Department of Research Plant Genetics, Studien von Nested Association Mapping (NAM) und Genome Wide Association Study (GWAS).
Dr. Edward Buckler
- 08/2008 – 01/2009 **Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg**, *Wissenschaftlicher Mitarbeiter*, Abteilung für Epigenetik.
Prof. Dr. G. Reuter
- 07/2008 **Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg**, *Diplom in Epigenetik*, Abteilung für Epigenetik, Prof. Dr. G. Reuter.
magna cum laude
- 10/2000 – 07/2007 **Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg**, *Biologiestudium*, Diplom.
Halle (Saale)
- 2004 **Scil Proteins GmbH**, *6-wöchiges Praktikum*.
Halle (Saale)
- #### Schulbildung
- 07/1992 – 07/2000 **Frieden Gymnasium**, Abschluss: Abitur.
Halle (Saale)
- 1988 – 1992 **Grundschule, Carl Friedrich Gauß**.
Halle (Saale)

Halle (Saale), 04. Juni 2014

Veröffentlichungen

Annett Richter

Liebenauer Str. 9
06110 Halle (Saale)

Publikationen

09/2013 **Seidl-Adams, Richter, Boomer, Yoshinaga, Degenhardt, Tumlinson**, *Maize (*Zea mays*) seedlings emit herbivore-induced volatile sesquiterpenes through open stomata*, Submission in PLANTPHYSIOL/2013/228494.

in Arbeit

eingereicht 2014 **Richter, Seidl-Adams, Köllner, Lenk, Degenhardt**, *The Maize farnesyldiphosphate synthase FPPS3 is involved in the sesquiterpene biosynthesis after herbivory*.

Manuskript 2014 **Richter, Zhang, Köllner, Buckler, Degenhardt**, *Identification of herbivore-regulated plant defense pathways by Nested Association Mapping (NAM) and Genome Wide Association Study (GWAS)*.

Präsentationen

Vorträge

2010, 2011, 2012, 2013 **SFB Meeting**, Wittenberg, .

2011, 2012 **SFB Meeting**, Halle (Saale), Deutschland.

03/2011 **53rd Annual Maize Genetic Conference (MGC)**, St. Charles, Illinois.

Poster

06/2013 **Terpnet Conference**, Crete, Greece.

03/2013 **55th Annual Maize Genetic Conference (MGC)**, St. Charles, Illinois.

03/2012 **54th Annual Maize Genetic Conference (MGC)**, Portland, Oregon.

05/2011 **International Meeting (SFB648)**, Halle (Saale), Deutschland.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde. Ferner erkläre ich, gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 04. Juni 2014