

Molekulare Mechanismen der Ausprägung von Chemotypen in *Thymus vulgaris*

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Jette Schimmel

geb. am 19.06.1984 in Halle (Saale)

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Degenhardt
2. Gutachterin: Prof. Dr. Bettina Hause
3. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Novak

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.07.2014

Zusammenfassung

Die Ausprägung von chemischen Polymorphismen ist in der Pflanzenwelt und besonders bei ätherisches Öl produzierenden Pflanzen weitverbreitet. Diese Ausprägung von Chemotypen ist eine infraspezifische Variation von Individuen einer Art. Ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der Chemotypbildung ist der echte Thymian (*Thymus vulgaris*), von dem sechs Chemotypen aus Südfrankreich beschrieben wurden. Ihr ätherisches Öl ist jeweils durch ein dominierendes Monoterpen charakterisiert, das in den anderen Chemotypen gar nicht oder nur in Spuren vorkommt. Die Ausprägung der Chemotypen ist epigenetisch festgelegt. Obwohl eine quantitative Variation der Zusammensetzung des ätherischen Öls in den Pflanzen möglich ist, sind die Individuen generell nicht in der Lage, ihren Chemotyp zu wechseln. Zwischen den einzelnen Chemotypen gibt es keine deutlichen Unterschiede in der Anatomie und Morphologie der Pflanzen. In Kreuzungsversuchen zeigte sich, dass die sechs Chemotypen in einem dominant-rezessiven Verhältnis zueinander stehen und eine epistatische Reihe bilden. Der Geranioltyp (G) ist dominant über alle anderen Chemotypen. Es folgen mit dem α -Terpineoltyp (A), dem *trans*-Sabinenhydrattyp (U) und dem Linalooltyp (L) weitere Chemotypen, die durch ein nicht-phenolisches Hauptmonoterpen charakterisiert sind. Am Ende der epistatischen Reihe stehen mit dem Carvacroltyp (C) und dem Thymoltyp (T) zwei Chemotypen, die phenolische Hauptmonoterpene bilden. Der Thymoltyp als rezessiver Chemotyp entsteht demnach nur bei der Kreuzung zweier T-Typen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, molekulare Mechanismen zu identifizieren, die zu der Ausprägung der Chemotypen führen. Für die Synthese der Monoterpene sind Enzyme aus der Familie der Terpensynthasen verantwortlich. Aus den Chemotypen isolierte Monoterpensynthasen wurden hinsichtlich ihres Produktspektrums charakterisiert und die Expression der zugehörigen Gene in den verschiedenen Chemotypen untersucht. Die identifizierten Enzyme produzierten Hauptmonoterpene sowie Hauptbestandteile des ätherischen Öls der Chemotypen. Ihre Gene wurden nahezu ausschließlich in den Chemotypen transkribiert, in denen die Enzymprodukte einen hohen Anteil am Gesamtterpenegehalt haben. Damit konnte gezeigt werden, dass die differentielle Expression der Terpensynthasegene den gebildeten Chemotyp bestimmt.

Weitergehend wurde untersucht, welche molekularen Mechanismen die Expression der Gene steuern. Das Strukturgen der γ -Terpinensynthase TvTPS2 wurde aus allen Chemotypen isoliert. Zusätzlich wurde die zum Gen gehörige Promotorregion über Genome Walking identifiziert und hinsichtlich ihrer regulatorischen Elemente untersucht. Da in der

genomischen Sequenz des Gens und in dessen Promotorregion keine Erklärung für die differentielle Expression in den Chemotypen gefunden werden konnte, wurde nach weiteren Regulationsmechanismen gesucht. Die DNA-Methylierung ist ein epigenetischer Regulationsmechanismus, der einen Chemotyp dauerhaft festlegen, aber dennoch die benötigten Informationen für die Bildung eines anderen Chemotyps speichern kann. Mittels Bisulfitsequenzierung wurden erste Untersuchungen zum Methylierungsgrad der Promotorregion des γ -Terpinensynthasegens durchgeführt. Diese erhaltenen Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Regulation der Genexpression und damit der Ausprägung der Chemotypen über die Methylierung der Promotorregion des jeweiligen Terpensynthasegens erfolgt. Eine Verifizierung der erhaltenen Daten ist jedoch dringend notwendig. Ebenso kann in weiterführenden Experimenten zur DNA-Methylierung das Verständnis dieser Regulation in den Thymian-Chemotypen noch verbessert werden.

Summary

Chemical phenotypes are widespread throughout the plant kingdom and especially known for the production of secondary metabolites. The formation of so-called chemotypes is an infraspecific variation that exists between individuals belonging to the same species. There are six chemotypes of common thyme (*Thymus vulgaris*) from the South of France which serve as a model system for studying the chemotype formation. Their essential oil is characterized by one major monoterpene that is nearly absent in the other chemotypes. The formation of these chemotypes is regulated by epigenetic mechanisms. Individuals are not able to change their chemotype during their life cycle, although there may be a quantitative variation of the amount of terpenes in their essential oil. In addition, there are no visible differences in the anatomy and morphology of the six chemotypes. Crossing experiments showed that the thyme chemotypes form an epistatic row and display a clear dominant-recessive segregation. The geraniol type (G) is dominant over all other chemotypes. The three following chemotypes also produce a non-phenolic major monoterpene: the α -terpineol type (A), the *trans*-sabinene hydrate type (U) and the linalool type (L). The two chemotypes at the end of the epistatic row produce major monoterpenes with a phenolic nature: the carvacrol type (C) and the thymol type (T). The thymol type is recessive to all others and only formed when two thymol types are crossed.

The aim of this work was the identification of the molecular mechanisms that lead to chemotype formation. The enzymes that are responsible for the synthesis of monoterpenes belong to the family of the terpene synthases. The product specificity of the terpene synthases from all chemotypes has been studied. Most of the enzymes produced major monoterpenes of the essential oil. Their genes were nearly exclusively expressed in chemotypes that had a high amount of the enzyme's products in their essential oil. These results showed that the differential expression of the terpene synthase genes determines the respective chemotype.

To study how the expression of the terpene synthase genes is controlled, the structural gene of the γ -terpinene synthase TvTPS2 was isolated from all chemotypes and its corresponding promoter region was identified using Genome Walking. The regulatory elements of the promoter were identified and compared between the chemotypes. No explanation for the differential expression of the terpene synthase could be found in the genomic sequence of *Tvtps2* and its promoter region. Therefore, the presence of an epigenetic mechanism was expected. An epigenetic mechanism that is able to ensure an established chemotype without deleting the necessary information for another one is the DNA-methylation. By using bisulfite

sequencing the degree of methylation of the promoter region of *Tvtps2* in the different chemotypes has been calculated and compared. Although the results have to be confirmed, they suggest that the expression of the terpene synthases and therefore the formation of the chemotypes is controlled by the DNA-methylation patterns of the promoter region. Additional experiments have to be performed to improve the understanding of the regulation of the chemotype formation in thyme.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Chemotypbildung in der Pflanzenwelt	1
1.2 Chemischer Polymorphismus in der Gattung <i>Thymus</i>	3
1.3 Charakteristiken der sechs <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen aus Südfrankreich.....	5
1.4 Terpene und ihre Biosynthese	7
1.5 Monoterpensynthesen.....	11
1.6 Die Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung.....	13
1.7 Ziel der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht.....	19
2.2 Mikrobiologische Methoden	20
2.2.1 Bakterienstamm und Bakterienanzucht.....	20
2.2.2 Antibiotika	20
2.2.3 Medien	21
2.2.4 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	21
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.3.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial.....	22
2.3.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial.....	23
2.3.3 DNA-Verdau	23
2.3.4 cDNA-Synthese	23
2.3.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR.....	23
2.3.6 Real-time PCR.....	25
2.3.7 RACE-PCR und Erstellen von RACE-cDNA.....	25
2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen	27

2.3.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.3.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
2.3.12	Restriktion von DNA.....	28
2.3.13	Ligation von PCR-Produkten.....	28
2.3.14	Genome Walking.....	29
2.3.15	Bisulfitsequenzierung.....	29
2.3.16	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	31
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.4.1	Heterologe Expression von Terpensynthasegenen in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der rekombinanten Proteine.....	32
2.4.2	Herstellung hochreiner Proteine.....	33
2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
2.4.4	Biochemische Charakterisierung.....	34
2.5	Chromatographische Methoden.....	35
2.5.1	Enzymassays mit SPME.....	35
2.5.2	Hexanextrakte.....	35
2.5.3	Gaschromatographische Trennung mittels GC/MS.....	36
2.5.4	Gaschromatographische Trennung mittels GC/FID.....	37
2.6	Mikroskopie.....	37
2.7	Statistische Methoden.....	38
2.7.1	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient.....	38
2.7.2	Signifikanztests.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Charakterisierung der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen aus Südfrankreich.....	40
3.1.1	Die sechs <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen sind durch ihr Terpenspektrum identifizierbar.....	40
3.1.2	Die sechs Chemotypen besitzen eine ähnliche Blattmorphologie.....	42
3.1.2.1	Variation der Anzahl der Drüsenhaare.....	43
3.1.2.2	Zählung und Größenmessung der glandulären Trichome.....	44
3.1.2.3	Vermessung der Blätter.....	46
3.1.3	Die Akkumulation von Terpenen der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen im Feldversuch.....	47
3.1.3.1	Wetterdaten zur Zeit des Feldversuchs.....	47
3.1.3.2	Bestimmung des Terpengehalts der Chemotypen in der Freilandkultur.....	49
3.1.4	Korrelation des Gesamtterpengehalts der Chemotypen mit den Wetterparametern.....	52
3.1.5	Der Terpengehalt korreliert nicht mit der Anzahl der Drüschuppen.....	53
3.2	Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Monoterpensynthasen aus <i>Thymus vulgaris</i>	54
3.2.1	Identifizierung der Terpensynthasegene.....	54
3.2.2	Funktionelle Analyse der identifizierten Terpensynthasen.....	58

3.3	Die mögliche Bildung von Geraniol durch Phosphatasen.....	60
3.4	Die Chemotypbildung in <i>Thymus vulgaris</i>	61
3.4.1	<i>Tvtps2g</i> ist eine typische Terpensynthase der Klasse III und liegt im Genom jedes Chemotyps vor	61
3.4.2	Biochemische Charakterisierung von TvTPS2	63
3.4.3	Transkriptanalyse der Monoterpensynthasegene aus <i>Thymus vulgaris</i>	64
3.4.3.1	Die Expression der isolierten Terpensynthasegene erfolgt spezifisch in den verschiedenen Chemotypen	64
3.4.3.2	Die Transkriptmengen der Terpensynthasen korrelieren mit dem Auftreten ihrer Enzymprodukte <i>in planta</i>	66
3.5	Die Regulation der Chemotypbildung in <i>Thymus vulgaris</i>	70
3.5.1	Analyse der regulatorischen Elemente im Promotor von <i>Tvtps2</i>	70
3.5.2	Die Methylierungsmuster des γ -Terpinensynthasepromotors geben Hinweise auf die Regulation der Chemotypbildung.....	75
4	Diskussion.....	79
4.1	Charakterisierung der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.....	79
4.1.1	Die Terpenprofile der Chemotypen zeigen nur eine geringe Variabilität	79
4.1.2	Der Standort der Chemotypen hat nur einen geringen Einfluss auf die Zusammensetzung ihres ätherischen Öls.....	80
4.1.3	Die saisonale Variation des Terpengehalts in <i>Thymus vulgaris</i>	83
4.1.4	Die Unterschiede im Gesamtterpengehalt der Chemotypen beruhen nicht auf der Anzahl der glandulären Trichome	85
4.2	Monoterpenbiosynthese in <i>Thymus vulgaris</i>	87
4.2.1	Die identifizierten Terpensynthasegene besitzen typische Merkmale der Monoterpensynthasen.....	87
4.2.2	Die identifizierten Monoterpensynthasen bilden Hauptmonoterpene der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.....	90
4.2.3	Die Bildung von Geraniol erfolgt in <i>Thymus vulgaris</i> möglicherweise durch Phosphatasen	91
4.2.4	Die Biosynthese von Thymol und Carvacrol erfolgt über das Zwischenprodukt γ -Terpinen.....	91
4.3	Mechanismen der Chemotypbildung.....	93
4.3.1	Die Expressionsmuster der Terpensynthasen führen zu einem neuen Modell der Chemotypbildung in <i>Thymus vulgaris</i>	93
4.3.2	Die Ausprägung der Chemotypen erfolgt über die epigenetische Regulation der Expression der Terpensynthasegene durch DNA-Methylierung.....	99
5	Literaturverzeichnis	102

6	Anhang.....	115
6.1	Verwendete Oligonukleotide	115
6.2	Sequenzen der Terpensynthesen	117
6.2.1	cDNA-Sequenzen der charakterisierten Monoterpensynthesen	117
6.2.2	Genomische Sequenz <i>Tvtps2g</i>	120
6.2.3	Vergleich der Proteinsequenzen TvTPS2-T und TvTPS2-C	126
6.3	Zähl- und Messdaten der Bonitierung von Thymian	127
6.3.1	Anzahl Drüsenhaare	127
6.3.2	Anzahl Drüsenschuppen	128
6.3.3	Blattabmessungen	129
6.4	Promotorelemente des <i>Tvtps2</i> -Promotors	130
6.5	Methylierungsgrade der Promotorfragmente	134
6.5.1	Thymoltyp	135
6.5.2	Carvacroltyp	138
6.5.3	Linalooltyp	140
6.5.4	<i>trans</i> -Sabinenhydrattyp	144
6.5.5	α -Terpineoltyp	147
6.5.6	Geranioltyp	153
6.6	Wetterdaten des Feldversuchs	157
6.7	Terpengehalte der Chemotypen im Feldversuch	157

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Die Hauptmonoterpene und die epistatische Hierarchie der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.....	5
Abbildung 1.2:	Übersicht über den Mevalonat- (MVA) und Methylerythritolbiosyntheseweg (MEP) zur Produktion von IPP und DMAPP.....	9
Abbildung 1.3:	Die Bildung von GPP aus DMAPP und IPP.	10
Abbildung 1.4:	Die Bildung von Monoterpenen aus GPP.....	12
Abbildung 1.5:	Strukturformeln der methylierten Basen der DNA.....	14
Abbildung 1.6:	Bildung von 5-Methylcytosin aus Cytosin.	15
Abbildung 1.7:	Schema der Cytosinmethylierung für den symmetrischen (links) und asymmetrischen (rechts) Sequenzkontext.	16
Abbildung 2.1:	Strukturformeln von Cytosin, Uracil und 5m-Cytosin.	30
Abbildung 2.2:	Methodik der Bisulfitsequenzierung.	31
Abbildung 3.1:	GC/MS-Chromatogramme von Hexanextrakten der <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.....	41
Abbildung 3.2:	Ein Blatt des A-Chemotyps unter dem Binokularmikroskop bei ca. 60-facher Vergrößerung.....	43
Abbildung 3.3:	Anzahl der Drüsenhaare in den Thymian-Chemotypen.	44
Abbildung 3.4:	Anzahl der Drüsenschuppen auf den Blättern der Chemotypen.....	45
Abbildung 3.5:	Durchmesser der Drüsenschuppen auf den Blattober- (dunkelgrau) und Blattunterseiten (hellgrau) der Chemotypen.....	46
Abbildung 3.6:	Länge und Breite der Blätter der Chemotypen in mm.....	46
Abbildung 3.7:	Monatliche Wetterdaten, gemessen von der Wetterstation im IPK Gatersleben.....	48
Abbildung 3.8:	Terpengehalt der Thymian-Chemotypen im Feldversuch.	51
Abbildung 3.9:	Vergleich der Proteinsequenzen der sechs aus den <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen isolierten Terpensynthasegene aus Tabelle 3.5.	57
Abbildung 3.10:	Monoterpenprodukte der Terpensynthasen TvTPS2 (A), TvTPS3 (B), TvTPS4 (C), TvTPS5 (D), TvTPS6 (E) und TvTPS7 (F) aus <i>Thymus vulgaris</i>	59
Abbildung 3.11:	Vergleich der GC-Chromatogramme eines Aktivitätsassays des Leervektors (A) und eines Hexanextrakts des G-Typs (B).	60

Abbildung 3.12: Struktur des γ -Terpinensynthasegens <i>Tvtps2</i>	62
Abbildung 3.13: Vergleich der Produkte der Allele TvTPS2-C (A) und TvTPS2-T (B) gemessen mit SPME.	63
Abbildung 3.14: Transkriptionsmuster der identifizierten Monoterpensynthasegene <i>Tvtps2</i> (A), <i>Tvtps3</i> (B), <i>Tvtps4</i> (C), <i>Tvtps5</i> (D), <i>Tvtps6</i> (E) und <i>Tvtps7</i> (F) in allen sechs <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.	65
Abbildung 3.15: Vergleich des Gehalts an Linalool in den verschiedenen Chemotypen (A) und den Transkriptmengen der Linaloolsynthasen <i>Tvtps3</i> und <i>Tvtps4</i> (B).	68
Abbildung 3.16: Vergleich zwischen dem Gehalt an <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Sabinenhydrat in den verschiedenen Chemotypen (A) und den Transkriptmengen der <i>cis</i> -Sabinenhydratsynthase <i>Tvtps6</i> und der <i>trans</i> -Sabinenhydratsynthase <i>Tvtps7</i> (B)....	69
Abbildung 3.17: Alignment der verschiedenen Varianten der Promotorregion der γ -Terpinensynthase <i>Tvtps2</i> aus den <i>Thymus vulgaris</i> -Chemotypen.	74
Abbildung 3.18: Das Methylierungsmuster des <i>Tvtps2</i> -Promotors am Beispiel des A-Chemotyps. ..	76
Abbildung 3.19: Methylierungsgrad der zwei Fragmente BS1 (A) und BS2 (B) der Promotorvariante P1.	77
Abbildung 4.1: Phylogenetischer Baum der Thymian-Terpensynthasen und ausgewählter repräsentativer Terpensynthasen anderer Pflanzenfamilien.	89
Abbildung 4.2: Modell der Chemotypbildung in <i>Thymus vulgaris</i>	96
Abbildung 4.3: Modell der Biosynthese der Hauptmonoterpene in <i>Thymus vulgaris</i> nach Jean Passet.....	97
Abbildung 4.4: Bildung der Hauptmonoterpene aus GPP.....	98
Abbildung 6.1: Vergleich der genomischen Sequenzen <i>Tvtps2g</i> aus allen sechs Chemotypen.	125
Abbildung 6.2: Vergleich der Proteinsequenzen von TvTPS2-C und TvTPS2-T.	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über ausgewählte Pflanzenfamilien und deren Arten, in denen die Bildung von Chemotypen bekannt ist.....	2
Tabelle 1.2: Übersicht über die verschiedenen Klassen der Terpene.....	7
Tabelle 2.1: Beschreibung des in der Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials.....	19
Tabelle 2.2: Eigenschaften des verwendeten Bakterienstamms.....	20
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen.....	21
Tabelle 2.4: Zur Amplifikation von DNA verwendete Polymerasen.....	24
Tabelle 2.5: Bakterielle Klonierungsvektoren und ihre Verwendung.....	29
Tabelle 2.6: Für die Auftrennung genutzte Temperaturprogramme.....	37
Tabelle 3.1: Gehalt der Hauptmonoterpene und γ -Terpinen in allen sechs Chemotypen.....	42
Tabelle 3.2: Spearman's Korrelationskoeffizient für die Wetterparameter des Feldversuchs.....	49
Tabelle 3.3: Mittelwerte des Gesamtterpenegehalts aller Chemotypen über den Zeitraum des Feldversuchs und Anteil des jeweiligen Hauptmonoterpens am Gesamtterpenegehalt....	52
Tabelle 3.4: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient für den Gesamtterpenegehalt der Chemotypen und die Wetterparameter.....	53
Tabelle 3.5: Merkmale der isolierten Terpensynthasen.....	55
Tabelle 3.6: Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen aus Abbildung 3.9.....	58
Tabelle 3.7: Größe der Exons und Introns von <i>Tvtps2g</i> in bp.....	63
Tabelle 3.8: Biochemische Daten für TvTPS2-T und TvTPS2-C.....	64
Tabelle 3.9: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient.....	67
Tabelle 3.10: Methylierungsgrad der Fragmente des Promotors von <i>Tvtps2</i>	78
Tabelle 4.1: Anteil der Hauptmonoterpene am Gesamtterpenegehalt der Chemotypen im Gewächshaus und in der Freilandkultur.....	81
Tabelle 4.2: Anteil der Hauptmonoterpene am Gesamtterpenegehalt der Chemotypen im Gewächshaus und in der Freilandkultur verglichen mit Angaben aus der Literatur.....	82
Tabelle 6.1: Auflistung der Primer.....	115
Tabelle 6.2: Auflistung aller im Promotor von <i>Tvtps2</i> gefundenen Promotorelemente.....	130
Tabelle 6.3: Monatliche Mittelwerte des Feldversuchs, dargestellt in Abbildung 3.7.....	157

Abkürzungsverzeichnis

5mC	5-methyl-Cytosin
<i>a.dest</i>	destilliertes Wasser
aa	„amino acid“, dt.: Aminosäure
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ANOVA	„Analysis of Variance“, dt.: Varianzanalyse
A-Typ	α -Terpineoltyp
BLAST	„Basic Local Aligment Tool“, Programm zum Sequenzvergleich
bp	Basenpaar
BSA	„bovine serum albumin“, dt. Rinderserumalbumin
Carb ^r	Carbenicillinresistenz
cDNA	„complementary DNA“, dt.: komplementäre DNA
CMT	Chromomethyltransferase
CoA	Coenzym A
C-Typ	Carvacroltyp
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	„deoxyribonucleic acid“, dt.: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FPP	Farnesyldiphosphat
GC	Gaschromatographie
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldiphosphat
GPPS	GPP-Synthase
G-Typ	Geranioltyp
IPP	Isopentenylidiphosphat
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobasenpaar
K _m	Michaeliskonstante (beschreibt die Affinität eines Enzyms zum Substrat)

Km ^r	Kanamycinresistenz
LB	Lysogeny Broth (ein Nährmedium)
L-Typ	Linalooltyp
MEP	Methylerythritol
MET	Methyltransferase
mRNA	„messenger RNA“, dt.: Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
ORF	„open reading frame“, dt.: offener Leserahmen
PCR	„polymerase chain reaction“, dt.: Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RACE-PCR	„rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction“
RdDM	„RNA-mediated DNA methylation“, dt. RNA-vermittelte-DNA-Methylierung
RNA	„ribonucleic acid“, dt. Ribonukleinsäure
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, dt.: Natriumdodecylsulfat
SOC	„Super Optimal broth with Catabolite repression“ (ein Nährmedium)
SPME	„solid phase micro extraction“
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TPS	Terpensynthase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Typ	Thymoltyp
Tv	<i>Thymus vulgaris</i>
UTR	„untranslated region“, dt.: nicht-translatierte Region
U-Typ	<i>trans</i> -Sabinenhydrattyp
UV	Ultraviolett
V _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit

1 Einleitung

1.1 Chemotypbildung in der Pflanzenwelt

Pflanzen als sessile Organismen haben viele Strategien entwickelt, sich den Herausforderungen, die ihre Umgebung an sie stellt, anzupassen. Im Sekundärstoffwechsel produzieren sie viele chemische Verbindungen, die nicht lebensnotwendig sind, aber wichtige ökologische Aufgaben übernehmen. So spielen sekundäre Pflanzenstoffe eine Rolle bei der Pathogen- und Herbivorabwehr (Bennett et al., 1994) und der Anlockung von Bestäubern (Pichersky et al., 2002). Zusätzlich schützen sie die Pflanzen bei hoher Sonneneinstrahlung und Trockenheit (Grassmann et al., 2002; Loreto et al., 2004; de Abreu et al., 2005; Zobayed et al., 2007).

In verschiedenen Pflanzenarten werden unterschiedliche Sekundärmetabolite gebildet, weshalb wissenschaftliche Gebiete wie die Chemotaxonomie und Chemosystematik versuchen, Organismen hinsichtlich ihrer enthaltenen Naturstoffe zu klassifizieren bzw. deren stammesgeschichtliche Entwicklung zu untersuchen. Aber auch innerhalb einer Art besteht in der Bildung sekundärer Pflanzenstoffe eine große Variabilität. Der chemische Phänotyp eines Organismus, der auf den gebildeten sekundären Metaboliten beruht, wird mit dem Begriff Chemotyp beschrieben. Chemotypen unterscheiden sich selten in der Morphologie und Anatomie der einzelnen Individuen und sind sich auch genetisch sehr ähnlich. Daher werden Chemotypen als polymorphe Ausbildung innerhalb einer Art betrachtet (infraspezifische Variation). Im Pflanzenreich ist die Ausprägung chemischer Polymorphismen weit verbreitet (Tabelle 1.1), aber auch in Algen und niederen Tieren wie Schwämmen sind Chemotypen bekannt (Roviroso et al., 1988; Faulkner et al., 1994; Masuda et al., 1997; Rohde et al., 2012). Der Begriff Chemotyp findet sich auch bei Bakterien, bezieht sich dort allerdings meist auf die chemische Zusammensetzung der Zellmembranen (Hitchcock et al., 1986; Magnet et al., 2007).

Tabelle 1.1: Übersicht über ausgewählte Pflanzenfamilien und deren Arten, in denen die Bildung von Chemotypen bekannt ist. Zusätzlich ist die Stoffgruppe der sekundären Pflanzenstoffe angegeben, in der der chemische Polymorphismus ausgeprägt ist.

Familie	Art/Gattung	Chemischer Polymorphismus	Referenz
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Terpene	(Granger et al., 1973)
	<i>Ocimum basilicum</i>	Terpene	(Grayer et al., 1996; Hiltunen et al., 1999)
	<i>Salvia officinalis</i>	Terpene	(Kintzios, 2000; Mockute et al., 2003; Novak et al., 2006)
	<i>Mentha spicata</i>	Terpene	(Kokkini et al., 1989; Lawrence, 2006)
	<i>Origanum vulgare</i>	Terpene	(Vokou et al., 1993; Kintzios, 2004)
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Terpene	(Tucker et al., 1986; Pintore et al., 2002; Angioni et al., 2004)
	<i>Lavandula stoechas</i>	Terpene	(Lis-Balchin, 2002)
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	Terpene	(Coppen, 2002)
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia annua</i>	Terpene	(Wallaart et al., 2000)
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Terpene	(Chalchat et al., 1985)
	<i>Abies grandis</i>	Terpene	(Zavarin et al., 1977)
<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus ilex</i>	Terpene	(Fischbach et al., 2002)
<i>Lauraceae</i>	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Terpene/ Phenylpropanoide	(Cheng et al., 2006; Lin et al., 2007)
<i>Cannabaceae</i>	<i>Cannabis sativa</i>	Terpenphenole (Cannabinoiden)	(Small et al., 1973; Fournier et al., 1987; de Meijer et al., 2003)
<i>Apiaceae</i>	<i>Carum copticum</i>	Terpene	(Mohagheghzadeh et al., 2007)
<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperus rotundus</i>	Terpene	(Komai et al., 1991)
<i>Piperaceae</i>	<i>Piper methysticum</i>	Lactone	(Lebot et al., 1996)
<i>Myrtaceae</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpene	(Butcher et al., 1994; Homer et al., 2000; Keszei et al., 2010)
<i>Solanaceae</i>	<i>Withania somnifera</i>	Terpene	(Abraham et al., 1968)
	<i>Capsicum chacoense</i>	Alkaloide	(Tewksbury et al., 2006)

Schon vor über vierzig Jahren wurden bereits 750 Pflanzenarten aus 106 Familien als chemisch polymorph beschrieben (Tetenyi, 1970). Den Beginn der Untersuchungen zum Polymorphismus in der Gattung der Thymiane markiert man heute mit den ersten Publikationen von Granger und Passet, die sechs Chemotypen innerhalb der Art *Thymus vulgaris* in Südfrankreich identifizieren konnten (Granger et al., 1973).

1.2 Chemischer Polymorphismus in der Gattung *Thymus*

Der echte Thymian (*Thymus vulgaris*) ist eine Art aus der Familie der Lippenblütengewächse (*Lamiaceae*). Der Halbstrauch stammt aus dem westlichen europäischen Mittelmeerraum, ist aber mittlerweile auch in Deutschland als Varietät „Deutscher Winter“ heimisch. Thymian wird als Gewürz und als pharmazeutisch nutzbare Pflanze sehr geschätzt. So wählte der Verband der Heilkräuterfreunde Deutschlands Thymian zur „Heilpflanze des Jahres 2001“. Wenige Jahre später, 2006, wurde *Thymus vulgaris* von dem interdisziplinären Studienkreis Entwicklungsgeschichte der Arzneipflanzen von der Universität Würzburg zur „Arzneipflanze des Jahres“ gekürt. Thymian ist offizinell. Er ist durch eine Monographie im Europäischen Arzneibuch (*European pharmacopoeia*) charakterisiert und wird bei Atemwegserkrankungen, Erkältungskrankheiten und Bronchitis angewendet. Er ist deshalb Bestandteil von verschiedenen Gesundheitstees und Lutschpastillen sowie von Mundwässern und Gurgelmitteln. Außerdem wirkt er durchblutungsfördernd und regt die Magensaftproduktion an. Durch seinen herben Geschmack wird Thymian in Kräutermischungen als Gewürz in der Lebensmittelzubereitung eingesetzt. Die Wirkung des Thymians beruht vor allem auf den antimikrobiellen und spasmolytischen Eigenschaften von Thymol und Carvacrol. Diese zwei Monoterpene sind Bestandteile des ätherischen Öls des Thymians, das in glandulären Trichomen auf der Ober- und Unterseite seiner Blätter produziert und gespeichert wird. Die Zusammensetzung des Öls variiert in verschiedenen Thymianpflanzen, ist aber stets durch ein Monoterpen, welches Hauptbestandteil des Öls ist, charakterisiert. Diese Möglichkeit der Ausprägung verschiedener ätherischer Öle wird als chemischer Polymorphismus bezeichnet. Thymian bildet mit der Gynodiözie auch noch einen zweiten Polymorphismus aus (Belhassen et al., 1991; Thompson et al., 1998). Individuen derselben Art, und sogar derselben Population, können entweder männlich-sterile oder hermaphrodite Blüten ausbilden. Zwitterige Blüten sind dabei selbstkompatibel und können sich selbst bestäuben.

Die Ausbildung von Chemotypen innerhalb der Familie der Lippenblütengewächse ist seit längerem bekannt und wurde für verschiedene Arten beschrieben (siehe 1.1). Die ersten Charakterisierungen von Chemotypen des echten Thymians stammen aus den 70er- und 80er-Jahren des letzten Jahrhunderts. Doch auch in den letzten Jahren war das Interesse an Thymian-Chemotypen groß. Robert Granger und Jean Passet gelten als Pioniere der Chemotypforschung an Thymian. Bereits 1963 beschrieben sie die Vielfältigkeit des

ätherischen Öls des Thymians (Granger et al., 1963). Zehn Jahre später charakterisierten sie sechs Chemotypen der Art *Thymus vulgaris*, die in natürlichen Populationen in Südfrankreich auftreten (Granger et al., 1973). Jeder der Chemotypen zeichnet sich durch einen Monoterpenalkohol aus, der im ätherischen Öl dominierend ist. Nach diesem Monoterpen wurde der jeweilige Chemotyp auch benannt: Geraniol (G), α -Terpineol (A), *trans*-Sabinenhydrat (U), Linalool (L), Carvacrol (C) und Thymol (T). Chemotypen des Thymians kommen jedoch nicht nur in Südfrankreich vor. Fünf der sechs genannten Chemotypen findet man auch in spanischen Populationen. Einzig der Geranioltyp ist dort nicht präsent. Dafür fand man in Spanien einen anderen Chemotyp, den 1,8-Cineoltyp (Adzet et al., 1977; Torras et al., 2007). Lange Zeit dachte man, dass dieser Typ gar nicht in französischen Populationen auftritt. Ken Keefover-Ring und seine Mitarbeiter konnten 2009 jedoch zeigen, dass der 1,8-Cineoltyp auch in Frankreich vertreten ist (Keefover-Ring et al., 2009).

Die Bildung von Chemotypen wurde in den verschiedenen Thymianarten und -populationen beobachtet (Stahl-Biskup, 2002). *Thymus caespititius* aus Portugal bildet ähnlich wie *Thymus vulgaris* Thymol-, Carvacrol- und α -Terpineol-Chemotypen aus. Zusätzlich existiert bei dieser Art ein Sabinen-Chemotyp, der bisher in keinen anderen Populationen gefunden wurde (Salgueiro et al., 1997; Trindade et al., 2008). Ähnlich weit verbreitet wie *Thymus vulgaris* ist *Thymus pulegioides*, der breitblättrige Thymian. In ganz Europa findet man auch bei dieser Art die „typischen“ Chemotypen, deren Hauptmonoterpene Thymol, Carvacrol, Linalool, Geraniol und α -Terpinylacetat sind (Stahl-Biskup, 1986; Mockute et al., 1999, 2001). In slowakischen Populationen wurden außerdem Fenchon-Chemotypen charakterisiert (Mártonfi, 1992; Mártonfi et al., 1994). Untersuchungen zeigten, dass auch der im europäischen Arzneibuch beschriebene *Thymus zygis* in seinen Unterarten verschiedenste Chemotypen ausbildet. Beobachtet wurden vorwiegend Thymol-, Carvacrol- und Linalooltypen (Adzet et al., 1977; Sáez, 1995), weswegen er neben *Thymus vulgaris* von besonderem Interesse für die pharmazeutische Forschung ist.

1.3 Charakteristiken der sechs *Thymus vulgaris*-Chemotypen aus Südfrankreich

Die Chemotypen des französischen Thymians waren seit ihrer Entdeckung immer wieder Gegenstand der Forschung. Während verschiedenste Eigenschaften beobachtet und charakterisiert wurden, ist die genetische Grundlage der Chemotypbildung bislang weitgehend ungeklärt. Die Chemotypen verhalten sich bei Kreuzungsversuchen dominant-rezessiv und bilden eine epistatische Reihe (Vernet et al., 1986). Der Geranioltyp ist dominant gegenüber den anderen fünf Chemotypen, der Thymoltyp rezessiv (Abbildung 1.1). Vernet schlug zur Erklärung der epistatischen Rolle für jeden Chemotyp mindesten einen Locus im Genom vor, der die Ausprägung des jeweiligen Chemotyps kontrolliert.

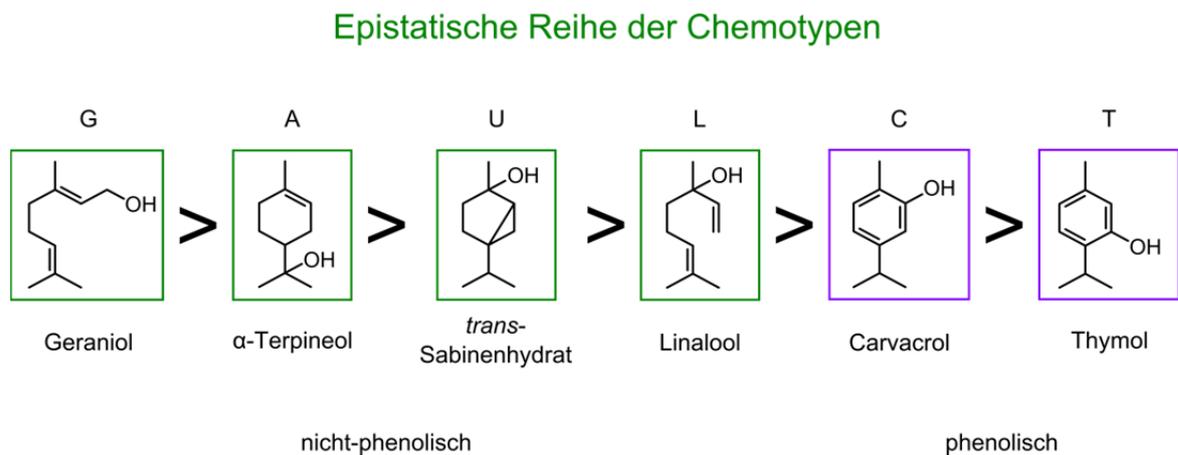


Abbildung 1.1: Die Hauptmonoterpene und die epistatische Hierarchie der *Thymus vulgaris*-Chemotypen. Die nicht-phenolischen Chemotypen sind grün hinterlegt, die phenolischen Chemotypen lila. Die dargestellte epistatische Reihe beginnt mit dem dominanten (G, Geraniol) und endet mit dem rezessiven Chemotyp (T, Thymol).

Die sechs beschriebenen Chemotypen können außerdem in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Hauptmonoterpene von vier Typen sind nicht-phenolischer Natur. Carvacrol und Thymol hingegen sind phenolische Monoterpenalkohole. Ihre Synthese erfordert einen zusätzlichen Schritt im Biosyntheseweg. Heute geht man davon aus, dass P450-Monooxygenasen für die Hydroxylierung des aromatischen Grundgerüsts verantwortlich sind, wie es bereits für andere hydroxylierte Mono- und Sesquiterpene gezeigt wurde (Crocoll, 2011; Weitzel et al., 2012). Betrachtet man die nicht-phenolischen Typen ist der Geranioltyp dominant über alle anderen

und der Linalooltyp rezessiv. Innerhalb der zwei phenolischen Chemotypen ist der Carvacroltyp dominant gegenüber dem Thymoltyp.

Da Robert Granger und Jean Passet die sechs südfranzösischen Chemotypen in wilden Populationen gefunden hatten, versuchten sie den Chemotypen verschiedene Wachstumsbedingungen (geographische und klimatische Faktoren, Bodenbedingungen) zuzuordnen, wiesen aber auch auf intrinsische Ursachen zur Chemotypbildung hin (sexueller Polymorphismus, genetische Mechanismen) (Granger et al., 1973). Die phenolischen Chemotypen sowie den Linalooltyp fanden die Forscher in den meisten Populationen, während die anderen drei Chemotypen nur in deutlich abgegrenzten Gebieten auftraten. Eine größere Bedeutung maßen Granger und Passet jedoch den klimatischen Faktoren Temperatur und Sonneneinstrahlung zu. Den Geranioltyp fanden sie an nur einer Stelle, in etwa 1000 m Höhe. Dort trat er gemeinsam mit den Typen Linalool und α -Terpineol auf. Diese beiden Typen etablierten sich gut in einer Höhe von 500 m bis 1000 m in relativ feuchten Zonen mit wenig intensiver Sonneneinstrahlung. Die phenolischen Chemotypen wuchsen bevorzugt an trockenen und sonnigen Plätzen. Wärme und Licht schienen das Wachstum des Carvacroltyps besonders günstig zu beeinflussen, denn er wurde an Hängen bis 1400 m Höhe mit besonders intensiver Sonneneinstrahlung gefunden. Der *trans*-Sabinenhydrattyp bildet ein Bindeglied zwischen den beiden Extremen. Er trat gemeinsam mit den anderen Chemotypen jeweils an den Randgebieten ihrer bevorzugten Wachstumsplätze auf. Vergleichbare Beobachtungen machten auch Gouyon und Thompson (Gouyon et al., 1986; Thompson et al., 2003). Letztere verglichen zusätzlich die Variabilität der Chemotypen in Populationen, die sie dominierten, und in solchen, in denen ein Chemotyp als Nebenpopulation auftrat. Sie fanden heraus, dass ein Chemotyp größere Mengen seines Hauptmonoterpens produziert, wenn er in einer gemischten Population der vorherrschende Chemotyp ist. Tritt er in einer gemischten Population nur als Minderheit auf, sinkt der Anteil des Hauptmonoterpens signifikant (Thompson et al., 2003). Thompson beobachtete auch, dass der U-Typ der einzige zu sein scheint, der nur in Mischpopulationen mit anderen Chemotypen wächst (Thompson, 2002).

1.4 Terpene und ihre Biosynthese

Die Hauptbestandteile fast aller ätherischen Öle sind die flüchtigen Mono- und Sesquiterpene und -terpenoide. Terpene sind natürlich vorkommende sekundäre Pflanzenstoffe, deren Grundgerüst aus Isopreneinheiten besteht. Nach der Definition der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) unterscheiden sich Terpene und Terpenoide hinsichtlich des Auftretens funktioneller Gruppen (<http://goldbook.iupac.org/>). So sind Terpene laut Definition reine Kohlenwasserstoffe, deren Kohlenstoffgerüst sich von Isopren ableitet. Terpenoide hingegen sind Isoprenoide mit funktionellen Gruppen, die Sauerstoff enthalten. Die sechs namensgebenden Monoterpenalkohole des Thymians zählen streng genommen also zu den Terpenoiden. Meist werden die Begriffe Terpene und Terpenoide jedoch synonym gebraucht.

Die Klassifizierung der Terpene erfolgt nach der Anzahl der enthaltenen Kohlenstoffatome. So enthalten Monoterpene beispielsweise zehn Kohlenstoffatome, Sesquiterpene 15 und Diterpene 20 (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Übersicht über die verschiedenen Klassen der Terpene.

Isopreneinheiten	Kohlenstoffatome	Name	Beispiele
1	5	Hemiterpene	Isopren
2	10	Monoterpene	Linalool
3	15	Sesquiterpene	Caryophyllen
4	20	Diterpene	Taxadien
6	30	Triterpene	Squalen
8	40	Tetraterpene	Carotinoide
>9	>40	Polyterpene	Kautschuk

Terpene spielen in der Pflanzenwelt eine große Rolle. Aufgrund ihrer Wirkungen als Gifte und Wachstumsinhibitoren dienen sie oft zur Abwehr gegen Fraßfeinde. Verschiedene Monoterpene sind giftig für Insekten, Pilze und Bakterien und dienen so der Verteidigung der Pflanzen (Hammer et al., 1999; Dorman et al., 2000; Hammer et al., 2003). Auf der anderen Seite spielen Terpene aber auch als Botenstoffe jeglicher Art eine Rolle (Dudareva et al., 2006). Als endogene Signalmoleküle sind sie an Kaskaden beteiligt, als Elizitoren locken sie

Feinde ihrer Feinde an (Degenhardt et al., 2000; Kappers et al., 2005; Schnee et al., 2006; Dicke et al., 2009).

Die Synthese und Lagerung der pflanzlichen Terpene findet vorwiegend in spezialisierten sekretorischen Strukturen wie Harzgängen (*Pinus*), Ölzellen (*Laurus*) und glandulären Trichomen (*Lamiaceae*, *Asteraceae*) statt (Fahn, 1988). Die glandulären Trichome des Thymians besitzen meist zwölf sekretorische Zellen, die das ätherische Öl in den Subkutikularraum abgeben. Die sekretorischen Zellen sind über eine Stielzelle mit der epidermalen Basalzelle verbunden (Stahl-Biskup, 2002). Die Zerstörung der Kutikula setzt das ätherische Öl frei.

Das Kohlenstoffgerüst der Terpene ist aus mehreren Isopreneinheiten aufgebaut, die regelmäßig oder unregelmäßig miteinander verknüpft sind. Diese „Isoprenregel“ wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts aufgestellt und später verfeinert und hat bis heute Gültigkeit (Wallach, 1914; Ruzicka, 1953). Die Bedeutung der Terpene und deren Biosynthese wird daraus ersichtlich, dass Nobelpreise für Forschungen auf diesem Gebiet vergeben wurden. Den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ bekamen 1964 beispielsweise Feodor Lynen und Konrad Bloch für „ihre Entdeckungen bezüglich des Mechanismus und der Regulation von Cholesterol und des Fettsäuremetabolismus“ zugesprochen, die unabhängig voneinander die Existenz von „aktivierten Isopreneinheiten“ und deren Synthese aus Mevalonsäure postulierten (Bloch, 1965; Lynen, 1967).

Die gesamte Terpenbiosynthese kann in vier Prozesse eingeteilt werden. Im ersten Schritt wird der Grundbaustein Isopentenylidiphosphat (IPP) synthetisiert. Prenyltransferasen bilden aus den IPP-Einheiten die Terpengrundgerüste Geranylidiphosphat (GPP), Farnesylidiphosphat (FPP) und Geranylgeranylidiphosphat (GGPP), die zu den größeren Sterol- und Carotinoidgrundgerüsten (C_{30} , C_{40}) kondensieren können. Die erhaltenen C-Körper durchlaufen meist verschiedene Reaktionen (Oxidation, Reduktion, Isomerisation, Konjugation), wodurch eine Vielzahl an verschiedenen Terpenen generiert wird.

Grundbaustein aller Terpene sind die C_5 -Verbindungen Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). In Pflanzen gibt es zwei verschiedene Biosynthesewege zur Herstellung von IPP und DMAPP (Abbildung 1.2). Diese sind in den Zellen strikt kompartimentiert.

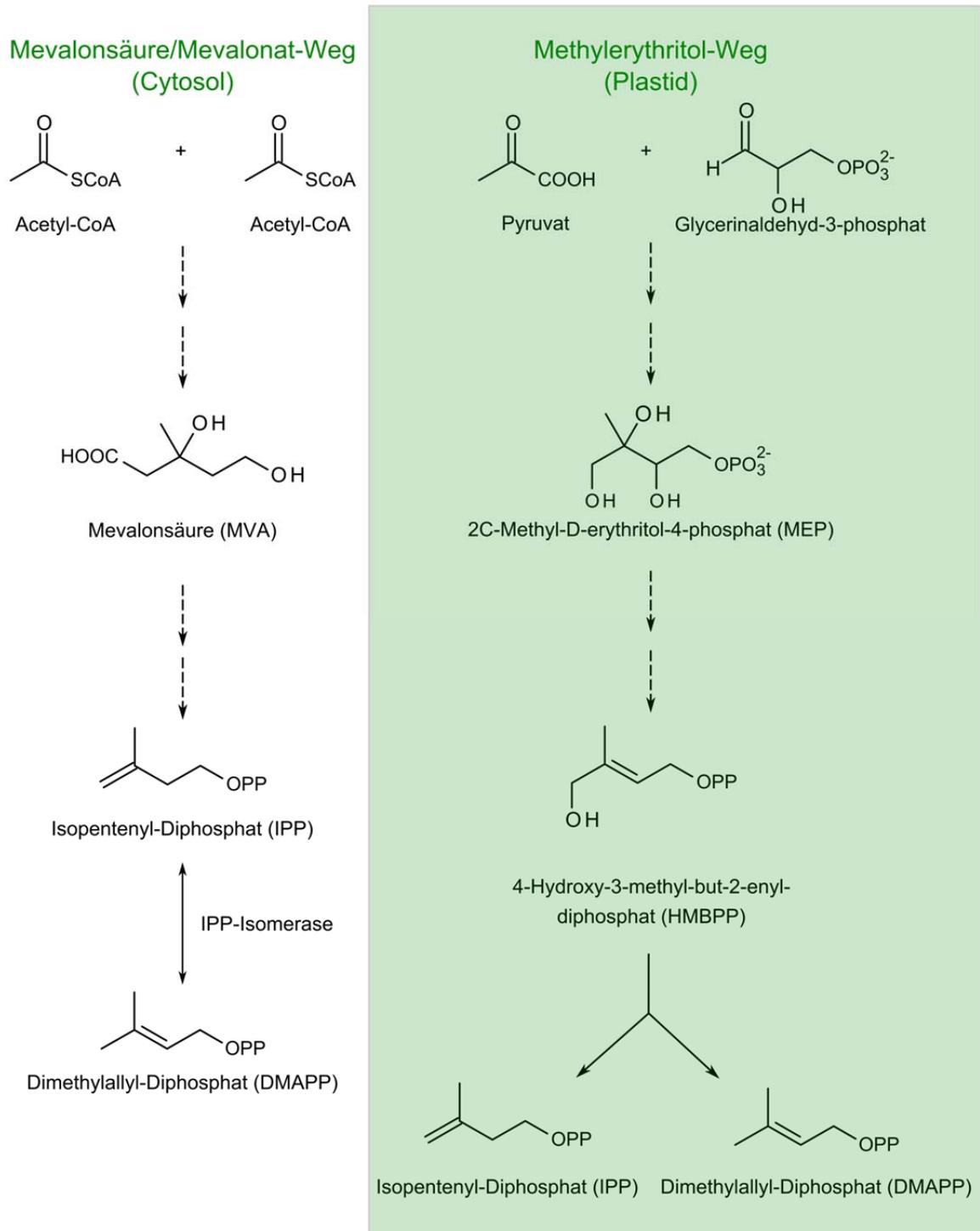


Abbildung 1.2: Übersicht über den Mevalonat- (MVA) und Methylerythritolbiosyntheseweg (MEP) zur Produktion von IPP und DMAPP. Dargestellt sind die jeweiligen Ausgangsprodukte Acetyl-Coenzym A, sowie Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat, und Zwischenprodukte der jeweiligen Synthesewege. Beim plastidären MEP-Weg entsteht ein Gemisch aus DMAPP und IPP, während im MVA-Weg zuerst IPP gebildet wird.

Der „klassische“ Acetat-Mevalonat-Weg (MVA) ist im Cytosol lokalisiert. In den Plastiden werden IPP und DMAPP über einen alternativen Weg, den Methylerythritol-Phosphat-Weg (MEP) synthetisiert. Trotz der strikten kompartimentären Trennung der beiden Synthesewege

ist offensichtlich ein Austausch von IPP und DMAPP zwischen den verschiedenen Kompartimenten möglich (Hemmerlin et al., 2003; Dudareva et al., 2005; Towler et al., 2007).

Geranyldiphosphat (GPP), der Grundbaustein der Monoterpene (C_{10}), wird durch die Verknüpfung eines Moleküls DMAPP mit einem Molekül IPP gebildet (Abbildung 1.3). Diese Reaktion wird von Geranyldiphosphatsynthasen (GPPS) katalysiert. Auf ähnliche Weise werden aus DMAPP und IPP auch Farnesyldiphosphat (FPP, C_{15}) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C_{20}), die Grundbausteine längererkettiger Terpene, hergestellt.

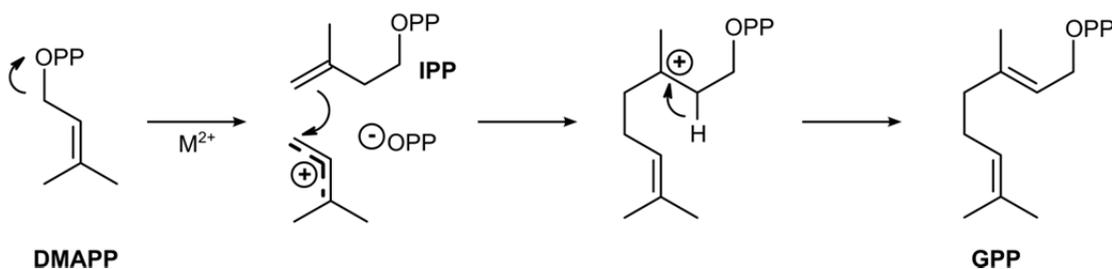


Abbildung 1.3: Die Bildung von GPP aus DMAPP und IPP. Durch die Abspaltung der Diphosphatgruppe durch das Enzym entsteht ein Kation, das von der nukleophilen Doppelbindung des IPP angegriffen wird. Die Bildung der neuen C-C-Bindung führt zur Bildung einer neuen Doppelbindung. Abbildung nach (McGarvey et al., 1995)

GPP-Synthasen aus verschiedenen Pflanzen wurden identifiziert und charakterisiert, darunter auch GPPS aus Minze und Salbei (Croteau et al., 1989; Endo et al., 1992; Burke et al., 1999; Bouvier et al., 2000; Tholl et al., 2001; Burke et al., 2002). Die Enzyme benötigen ein divalentes Metallion wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} für ihre Aktivität und besitzen wie alle Prenyltransferasen zwei DDxxD-Motive für die Prenyl-Substratbindung. Sie kommen als Dimere vor. Dabei wurden sowohl homodimere Strukturen mit zwei identischen Untereinheiten als auch Heterodimere mit einer großen und einer kleinen Untereinheit gefunden. Inzwischen wurde die Struktur einer heterotetrameren GPP-Synthase aus der Pfefferminze veröffentlicht (Chang et al., 2010).

Die von den Prenyltransferasen bereitgestellten Grundbausteine GPP, FPP und GGPP dienen als Substrat für Terpensynthasen, die die linearen Grundgerüste in die verschiedensten Terpene umbauen können und für die große strukturelle Vielfalt der Terpene mitverantwortlich sind (Tholl, 2006; Degenhardt et al., 2009).

1.5 Monoterpensynthesen

Terpensynthesen, die GPP zu verschiedenen C₁₀-Körpern umbauen, werden Monoterpensynthesen genannt. Sie sind Enzyme mit einer durchschnittlichen Länge von 600 bis 650 Aminosäuren. Generell bestehen die Enzyme aus zwei Domänen: Die C-terminale Domäne enthält das aktive Zentrum und ist für die Katalyse der chemischen Reaktionen zuständig, die Funktion der N-terminalen Domäne ist bisher unbekannt. In der Regel besitzen Monoterpensynthesen ein N-terminales Signalpeptid, das ihren Transport in die Plastiden steuert (Turner et al., 1999). Diese Signalpeptide sind durch einen hohen Anteil an Serinen und Threoninen und einen geringen Anteil an sauren Aminosäuren charakterisiert (Bohlmann et al., 1997). Terpensynthesen besitzen eine Reihe an hochkonservierten Motiven, die für die Aktivität der Enzyme unerlässlich sind. Das im N-terminalen Bereich des Enzyms gelegene RR(x)₈W-Motiv ist für die Proteinfunktion essentiell und scheint für die Isomerisierung von GPP benötigt zu werden (Williams et al., 1998). Während die Aminosäuren vor dem RR(x)₈W-Motiv nicht für die Funktion des Enzyms benötigt werden, sind die nachfolgenden Aminosäuren in den Terpensynthesen hochkonserviert (Colby et al., 1993; Williams et al., 1998). Monoterpensynthesen benötigen für ihre Aktivität ein divalentes Metallion wie Mg²⁺ oder Mn²⁺ als Cofaktor. Dieses wird durch zwei weitere hochkonservierte Motive gebunden, dem DDxxD-Motiv (Cane et al., 1996) und dem DTE-Motiv (Cane et al., 2000; Christianson, 2006).

Der Reaktionsmechanismus der Monoterpensynthesen wurde bereits intensiv untersucht (Degenhardt et al., 2009). Im ersten Schritt wird GPP durch Abspaltung der Diphosphatgruppe in das Geranylkatation umgewandelt. Aus diesem können verschiedene azyklische Monoterpene wie Geraniol und Linalool gebildet werden (Abbildung 1.4A). Zyklische Monoterpene wie Limonen und γ -Terpinen werden aus dem α -Terpinylkation synthetisiert. Dieses entsteht durch Ringschluss des Linalylkations, welches wiederum durch Isomerisierung aus dem Geranylkatation entsteht (Abbildung 1.4B). Durch Oxidationen, Reduktionen und Umlagerungen können weitere Monoterpene entstehen, die in nachfolgenden Reaktionen beispielsweise durch Cytochrom-P450-Enzyme weiter verändert werden können. Alle diese Modifikationen führen zur großen Vielfalt der Monoterpene.

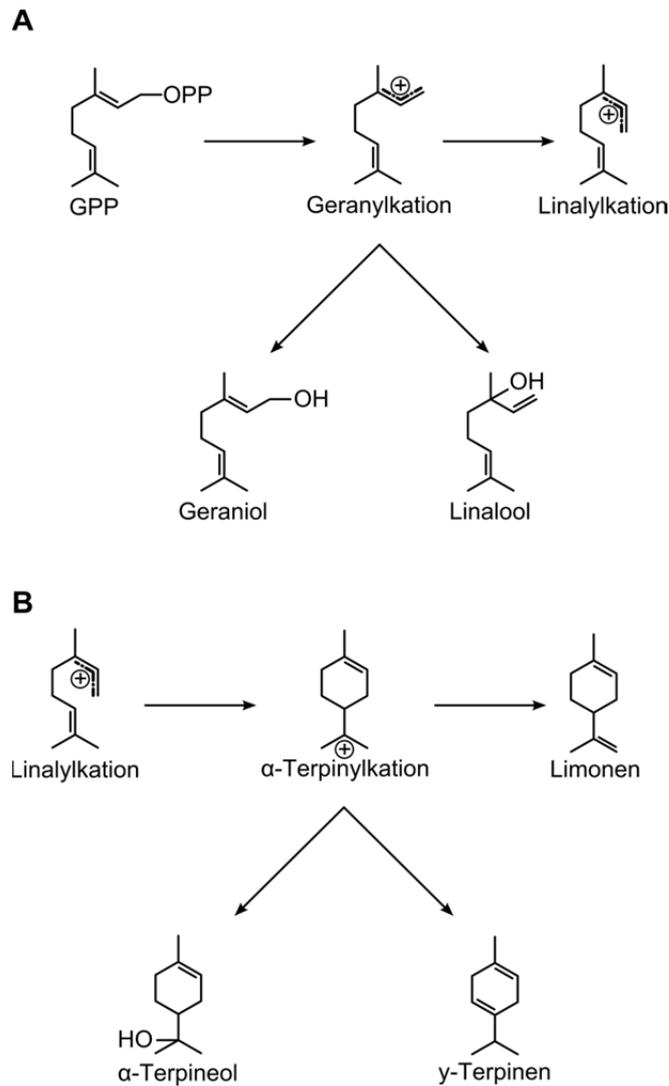


Abbildung 1.4: Die Bildung von Monoterpenen aus GPP.
A) Azyklische Monoterpene wie beispielsweise Geraniol und Linalool entstehen aus dem Geranylkation. **B)** Zyklische Monoterpene werden ausgehend vom α -Terpinylkation gebildet. Mit Limonen, α -Terpineol und γ -Terpinen sind Beispiele für zyklische Monoterpene dargestellt.

Aus der Familie der Lippenblütengewächse sind bisher verschiedene Monoterpensynthasegene isoliert und charakterisiert worden. Darunter finden sich Enzyme aus verschiedenen Salbeiarten (Wise et al., 1998; Kampranis et al., 2007) und Minze (Colby et al., 1993; Crowell et al., 2002) sowie aus *Ocimum basilicum* (Iijima et al., 2004; Iijima et al., 2004a), *Origanum vulgare* (Crocoll et al., 2010) und *Lavandula angustifolia* (Landmann et al., 2007; Demissie et al., 2011). Erst kürzlich wurden zwei Monoterpensynthasen aus dem *Thymus vulgaris*-Sabinenhydrat-Chemotyp (Krause et al., 2012) beschrieben, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Mittlerweile konnten auch verschiedene

Monoterpensynthesen aus einer anderen Thymianart, *Thymus caespititius*, isoliert werden (Lima et al., 2013).

1.6 Die Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung

Der Phänotyp eines Lebewesens wird vor allem durch das Expressionsmuster der Gene seiner Zellen bestimmt. Die Ausprägung eines Gens wird maßgeblich durch der am 5'-Ende liegenden Promotorregion reguliert. An verschiedenen Sequenzmotiven innerhalb des Promotors findet die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren statt. Ebenso haben weitere, außerhalb der Promotorregion gelegene *cis*-Elemente (Enhancer, Silencer) im Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren einen direkten Einfluss auf die Genexpression. Die Informationen, wann und wie stark ein Gen exprimiert werden soll, sind meist epigenetisch festgelegt und werden an folgende Generationen vererbt.

Eine Strategie dieser epigenetischen Regulation der Genexpression ist die Methylierung von Cytosinen der DNA. DNA-Methylierung wurde für Pflanzen ebenso beschrieben wie für Pilze, Tiere und auch den Menschen (Doerfler, 1981; Finnegan et al., 1998; Martienssen et al., 2001; Attwood et al., 2002; Bird, 2002; Poetsch et al., 2011). Es sind nur wenige Organismen bekannt, die nicht in der Lage sind, ihre DNA zu methylieren, darunter beispielsweise die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Proffitt et al., 1984) und der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Gutierrez et al., 2004). Da die Mechanismen der DNA-Methylierung von Pflanzen und Tieren große Ähnlichkeiten aufweisen (Suzuki et al., 2008; He et al., 2011) und Homologe der eukaryotischen DNA-Methyltransferasen in Prokaryoten gefunden wurden (Cheng, 1995), geht man davon aus, dass sich dieses epigenetische Regulationselement schon im gemeinsamen Vorfahren aller Organismen entwickelt hat (Chan et al., 2005).

Die Addition einer Methylgruppe kann an verschiedene Basen des DNA-Moleküls erfolgen (Abbildung 1.5). Die bekannteste und epigenetisch wohl bedeutsamste methylierte Base ist 5-Methylcytosin. Die Methylierung kann jedoch auch an Stickstoffatomen erfolgen, und so treten außerdem N⁴-Methylcytosin und N⁶-Methyladenin auf (Dunn et al., 1958; Vanyushin et al., 1968; Ehrlich et al., 1985). Letztere sind bisher vor allem aus Prokaryoten bekannt, zumindest N⁶-Methyladenin wurde aber auch in DNA höherer Pflanzen gefunden (Pintor-

Toro, 1987; Vanyushin et al., 1988; Dhar et al., 1990). N⁶-Methyladenin schützt bakterielle DNA vor spezifischen Endonukleasen, seine Bedeutung in pflanzlicher DNA ist bis heute weitgehend ungeklärt.

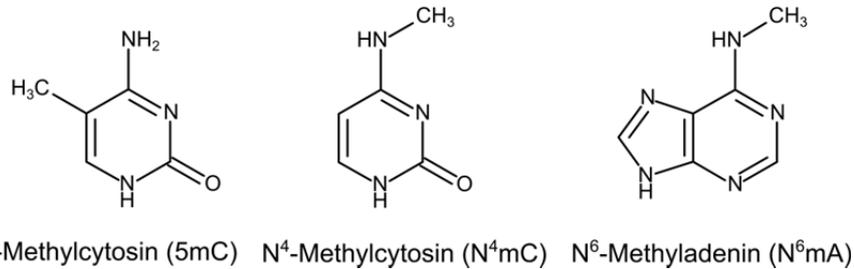


Abbildung 1.5: Strukturformeln der methylierten Basen der DNA.

5-Methylcytosin (5m-Cytosin) wurde schon vor über 60 Jahren als modifizierte Base neben den vier klassischen DNA-Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin im Genom identifiziert (Hotchkiss, 1948), die Aufklärung der Bedeutung des 5m-Cytosins und der DNA-Methylierung begann jedoch erst in den 70er-Jahren des letzten Jahrhunderts (Holliday et al., 1975). Eine besondere Bedeutung kommt der DNA-Methylierung bei der Entwicklung der Pflanzen zu (Watson et al., 1987; Finnegan et al., 1996; Adams et al., 2000). Ebenso spielt sie bei der Pathogenantwort eine Rolle (Guseinov et al., 1975; Pavet et al., 2006), ist für die Stilllegung von Transgenen und Transposons wichtig (Ingelbrecht et al., 1994; Morel et al., 2000; Miura et al., 2001) und wurde im Zusammenhang mit der Chromatinorganisation im Pflanzengenom beobachtet (Richards et al., 2002; Volpe et al., 2002; Liu et al., 2010). Im Allgemeinen besitzt die DNA-Methylierung eine inaktivierende Funktion. Es wurde gezeigt, dass die Transkription eines Gens abnimmt, je höher sein Promoter methyliert ist (Zhou et al., 1996; Zhang et al., 2006; Zemach et al., 2010). Der reprimierende Effekt der DNA-Methylierung beruht einerseits darauf, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an verschiedene Promotorelemente und damit die Transkription des Gens zu verhindern (Inamdar et al., 1991; Eden et al., 1994). Andererseits existieren Methyl-CG-Bindeproteine, die methylierte DNA erkennen, binden und gemeinsam mit Co-Repressoren stilllegen können (Staiger et al., 1989; Ehrlich, 1993; Pitto et al., 2000; Zemach et al., 2003). Methylierungsanalysen des Genoms von *Arabidopsis thaliana* zeigten jedoch, dass auch eine große Zahl exprimierter Gene einen hohen Methylierungsgrad aufweist (Zhang et al., 2006; Zilberman et al., 2006; Cokus et al., 2008). Die DNA-Methylierung innerhalb eines Gens

(*gene body methylation*) tritt vorwiegend bei moderat exprimierten und sogenannten „House-keeping“-Genen auf (Zilberman et al., 2006; Aceituno et al., 2008).

Die Methylierung der Cytosine tritt vor allem im CG-Kontext auf. Der hohe Anteil von 5m-Cytosin in verschiedenen Pflanzengenomen (Wyatt, 1951; Thomas et al., 1956; Ergle et al., 1961) ließ jedoch vermuten, dass 5m-Cytosin auch in anderen Sequenzen vorkommen muss. Mittlerweile wurde das Auftreten von 5m-Cytosin in den Sequenzfolgen CHG und CHH (H = A, T, C) bestätigt (Gruenbaum et al., 1981; Meyer et al., 1994). Heute unterscheidet man die Kontexte der Methylierung in symmetrisch (CG und CHG) und asymmetrisch (CHH), da die Methylierung mehrheitlich auf beiden DNA-Strängen erfolgt. Die Methylierung der Cytosine im CG-Kontext ist vererbbar und scheint die Inaktivierung der betroffenen Genabschnitte über Generationen hinweg sicherzustellen (Mathieu et al., 2007). Bis heute ist die genaue Funktion der CHG- und CHH-Methylierung weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass diese, bei der Replikation nicht automatisch wieder methylierten Stellen, bei der Etablierung neuer Methylierungen unterstützend wirken und eine Regulationsfunktion für die *de novo*-Methylierungsmaschinerie besitzen (Stroud et al., 2014).

Die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Cytosin wird von verschiedenen Familien von DNA-Methyltransferasen katalysiert (Abbildung 1.6) (Wada, 2005; Pavlopoulou et al., 2007). Methyltransferase I-Enzyme (METI) sorgen für die Erhaltung bereits existierender CG-Methylierungsmuster (Finnegan et al., 1996; Ronemus et al., 1996), indem sie bei der DNA-Replikation die neu synthetisierten Stränge methylieren. Die Erhaltung der ebenfalls symmetrischen Methylierung im CHG-Kontext wird in *Arabidopsis* von der Chromomethylase3 (CMT3) sichergestellt (Lindroth et al., 2001). In Mais wurde mit *ZmMET2* ein Homolog der *CMT3* gefunden (Papa et al., 2001).

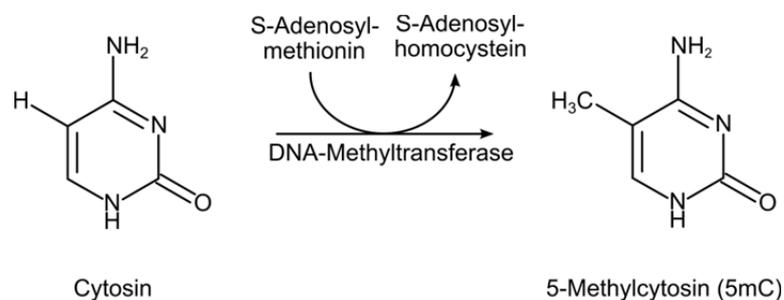


Abbildung 1.6: Bildung von 5-Methylcytosin aus Cytosin. Die Reaktion wird von Methyltransferasen katalysiert, die eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf Cytosin übertragen. Dabei wird aus SAM S-Adenosylhomocystein.

Für die *de novo*-Methylierung aller Sequenzfolgen (CG, CHG, CHH) sind Enzyme der *DRM*-Familie (*Domain Rearranged Methyltransferase*) verantwortlich (Cao et al., 2002b). Die RNA-vermittelte-DNA-Methylierung (RdDM) bisher nicht methylierter DNA-Abschnitte erfolgt über etwa 24 Nukleotide lange RNAs, die homolog zu bestimmten DNA-Sequenzen sind (Wassenegger et al., 1994). Diese sogenannten siRNAs (small interfering RNAs) werden von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen synthetisiert und dirigieren die *DRM*-Enzyme zu den zu methylierenden DNA-Abschnitten (Law et al., 2010; He et al., 2011). Die Erhaltung asymmetrischer DNA-Methylierungen findet auch über RdDM statt und wird in *Arabidopsis* von *DRM* und *CMT3* kontrolliert (Cao et al., 2002a; Cao et al., 2003; Chan et al., 2006).

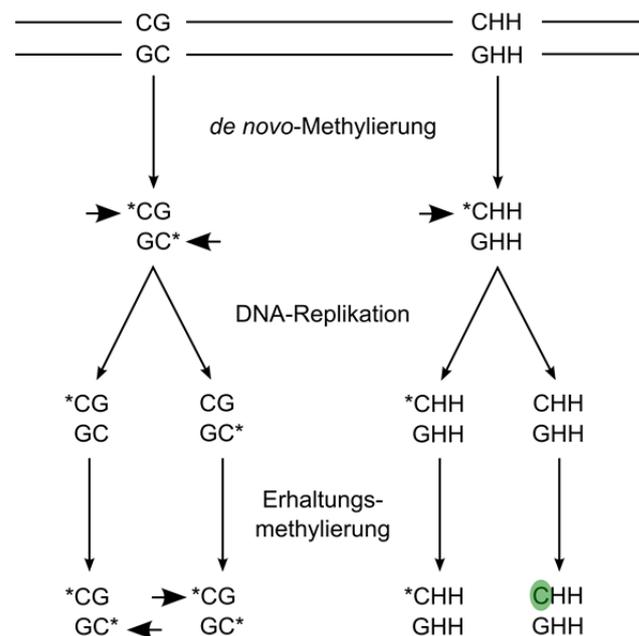


Abbildung 1.7: Schema der Cytosinmethylierung für den symmetrischen (links) und asymmetrischen (rechts) Sequenzkontext. Bei der *de novo*-Methylierung werden die Cytosine in jedem Kontext methyliert. Bei der DNA-Replikation sind die neu synthetisierten Stränge unmethyliert, die Erhaltungsmethylierung stellt die Methylierung im symmetrischen Kontext in dem neuen Strang wieder her. Im asymmetrischen Kontext geht die Information der Methylierung durch die Replikation verloren (grüne Markierung). Die methylierten Cytosine sind durch Sterne gekennzeichnet, die Pfeile kennzeichnen die Stellen, die neu methyliert werden. Abbildung nach (Wada, 2005).

Doch nicht nur die Methylierung bestimmter DNA-Bereiche spielt eine Rolle bei der Regulation der Genexpression. Auch die aktive Demethylierung von 5m-Cytosin durch 5mC-DNA-Glykosylasen ist für den Lebenszyklus der Pflanzen essentiell (Hadfield et al., 1993; Choi et al., 2002; Xiao et al., 2003; Morales-Ruiz et al., 2006) und wurde beispielsweise als Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress beobachtet (Pavet et al., 2006; Choi et al., 2007).

Da die DNA-Methylierung dauerhaft ist, aber stets umkehrbar bleibt, ist sie ein wichtiges epigenetisches Regulationselement. So können beispielsweise methylierte Allele über mehrere Generationen hinweg stillgelegt sein, behalten aber trotzdem ihre Fähigkeit, in einen „aktiven“ Zustand zurückzukehren (Kakutani, 2002; Barreto et al., 2007).

1.7 Ziel der Arbeit

Die Ausprägung von Chemotypen kann in der Pflanzenwelt in vielen verschiedenen Arten beobachtet werden. Die molekularen und biochemischen Grundlagen der Chemotypbildung sind bisher jedoch unbekannt. Die sechs Chemotypen des Thymians aus Südfrankreich bilden eine hervorragende Forschungsgrundlage für die Untersuchung der Ausprägung eines chemischen Polymorphismus, da jeder Typ durch ein Monoterpen, das zu mindestens 50 % im ätherischen Öl enthalten ist, gekennzeichnet ist. Diese jeweiligen Hauptmonoterpene treten in den anderen Chemotypen gar nicht oder nur in Spuren auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Ausprägung der sechs Chemotypen auf molekularer Ebene untersucht und aufgeklärt werden und zum besseren Verständnis der Regulation der Biosynthese der Terpene beitragen. Dazu wurden die für die Bildung der Hauptmonoterpene verantwortlichen Terpensynthasene gene charakterisiert und deren Expression in den Chemotypen analysiert. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde beispielhaft das Strukturgen einer Terpensynthase aus allen sechs Chemotypen identifiziert und dessen Promotorregion hinsichtlich der Genregulation untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Es wurde mit verschiedenen Kultivaren des echten Thymians (*Thymus vulgaris*) gearbeitet, die sich aufgrund ihres speziellen ätherischen Öls besonders zur Analyse und Charakterisierung der Terpenbiosynthese eignen (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Beschreibung des in der Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials.
CNRS = Centre national de la recherche scientifique

Chemotyp	Hauptmonoterpen	Herkunft
<i>Thymus vulgaris</i> G-Typ	Geraniol	CNRS, Montpellier, Frankreich
<i>Thymus vulgaris</i> A-Typ	α -Terpineol/ α -Terpinylacetat	CNRS, Montpellier, Frankreich
<i>Thymus vulgaris</i> U-Typ	<i>trans</i> -Sabinenhydrat	CNRS, Montpellier, Frankreich
<i>Thymus vulgaris</i> L-Typ	Linalool/Linalylacetat	CNRS, Montpellier, Frankreich
<i>Thymus vulgaris</i> C-Typ	Carvacrol	CNRS, Montpellier, Frankreich
<i>Thymus vulgaris</i> T-Typ	Thymol	CNRS, Montpellier, Frankreich

Die Kultivierung der *Thymus vulgaris*-Chemotypen erfolgte im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen: 13 h Tag, Temperatur Tag: 20-22 °C, Temperatur Nacht: 18-20 °C, Luftfeuchte ca. 55 %. Um einen jahreszeitlichen Rhythmus zu gewährleisten, wurde von Dezember bis März eine Winter-Temperatur von ca. 15 °C eingestellt.

Im zweijährigen Feldversuch wurden die Pflanzen im ersten Jahr (2011) Mitte Juni auf einem Feld der Junghanns GmbH in Groß Schierstedt bei Aschersleben ausgepflanzt. Ende Oktober wurden die Pflanzen ausgegraben und in ihrer Erde in das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Gatersleben) zur Überwinterung gebracht, da sie nicht dauerfrostdresistent waren. Dort verblieben sie bis Ende März im Kältehaus, das über Winter

bei 12 °C gehalten wurde, sich aber ab Februar mit der Erwärmung der Natur ebenfalls erwärmte. Ende März wurden die Pflanzen wieder in Groß Schierstedt an die gleiche Stelle gepflanzt, an der sie im Jahr davor standen.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstamm und Bakterienanzucht

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder schüttelnd in Lysogeny-Broth- (LB-) Medium oder auf LB-Agar bei 37 °C soweit nicht anders vermerkt. Glycerolstocks wurden hergestellt, indem 300 µl steriles Glycerol (100 %) zu 700 µl Bakterienkultur gegeben wurden. Die Lagerung erfolgte nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

Für das Klonieren von PCR-Produkten und Plasmiden und für die Expression rekombinanter Proteine wurde der Stamm *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Tabelle 2.2) verwendet.

Tabelle 2.2: Eigenschaften des verwendeten Bakterienstamms.

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

2.2.2 Antibiotika

Antibiotika wurden zur Selektion positiv transformierter Bakterien eingesetzt. Je nach transformiertem Plasmid wurde entweder Kanamycin oder Ampicillin bzw. Carbenicillin zur Selektion zum LB-Medium gegeben (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung (mg/ml in <i>a.dest</i>)	Konzentration im Medium (μ g/ml)
Kanamycin	50	50
Ampicillin	100	100
Carbenicillin	50	50

2.2.3 Medien

LB-Medium: 20 g LB-Medium (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 1 l *a.dest*.

LB-Agar: 32 g LB-Agar (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 1 l *a.dest*.

SOC-Medium:

2 % (w/v)	Trypton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (Sigma-Aldrich)
0,5 % (w/v)	Glucose
10 mM	Natriumchlorid
2,55 mM	Kaliumchlorid
21,6 mM	Magnesiumchlorid
20 mM	Magnesiumsulfat

2.2.4 Transformation von *Escherichia coli*

Zu 50 μ l chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden je nach Ligationsmethode 1 μ l, 3 μ l oder 10 μ l der Ligation gegeben. Der Mix wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (40 s bei 42 °C) und anschließender Abkühlung (1 min auf Eis) wurde der Transformationsansatz mit 200 μ l SOC-Medium versetzt. Die Kulturen wurden anschließend für 1-2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem jeweils benötigten Antibiotikum ausgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag gewachsene Kolonien wurden mittels PCR mit genspezifischen oder vektorspezifischen Primern auf erfolgreiche Transformation untersucht.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Um genomische DNA aus Pflanzenmaterial isolieren zu können, wurden junge, unverholzte Triebe der Pflanzen in flüssigem Stickstoff gefroren und zu einem feinen Pulver gemörsert. Die Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion nach folgendem Protokoll (Brandstädter et al., 1994): 50-100 mg gemörserten Pflanzenmaterials wurden in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl essigsaurer Natriumacetatlösung (3 M NaAc; 2 M Essigsäure) mit anschließender zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die pflanzliche DNA sowie Proteine und Lipide und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. 500 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs im Verhältnis 25 : 24 : 1 wurden zugegeben und die Proben mit einem Vortexmischer durchmischt. Anschließend wurde für 6 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die DNA befand sich in der wässrigen Oberphase und wurde mit 500 µl Isopropanol durch Inkubation für 10 min bei -20 °C ausgefällt. Das Sedimentieren der DNA erfolgte durch zehnmütige Zentrifugation bei 20.000 g. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl Ethanol gewaschen und anschließend in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0), versetzt mit 100 µg/ml RNase A, aufgenommen.

Extraktionspuffer:	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	50 mM	EDTA
	500 mM	NaCl
	10 mM	Mercaptoethanol
	1,5 %	SDS

Wurde besonders reine genomische DNA, zum Beispiel für die Behandlung mit Natriumhydrogensulfit benötigt, erfolgte die Isolierung der DNA aus gemörsertem Pflanzenmaterial entweder mit dem „Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit“ (Stratec Biomedical, Birkenfeld, Deutschland) oder dem „DNeasy[®] Plant Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Isolierte genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy[®] Mini Kit“ (Qiagen) aus bereits gemörsertem Pflanzenmaterial isoliert. Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.3.3 DNA-Verdau

Um DNA-freie RNA für die cDNA- und RACE-cDNA-Synthese zu gewährleisten, wurde ein Verdau der RNA mit der RQ1-DNase von Promega (Madison, USA) durchgeführt. Dazu wurden 2 µg der isolierten RNA für 30 min bei 37 °C mit der DNase und dem zugehörigen Puffer inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl Stop-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65 °C beendet.

2.3.4 cDNA-Synthese

Für die Verwendung in qualitativer und quantitativer PCR wurde cDNA unter Zuhilfenahme des „RevertAid First Strand cDNA Synthesis“-Kits (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) synthetisiert. 2 µg der DNase-verdauten RNA wurden mit 1 µl oligo(dT)₁₈-Primern und 1 µl random hexamer-Primern 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen des Mixes auf Eis wurden dNTPs und Reaktionspuffer wie im Protokoll angegeben sowie je 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor und RevertAid H Minus Reverse Transkriptase hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei 25 °C, 60 min bei 45 °C und anschließend, zum Stoppen der Reaktion, 5 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte eingesetzt. Es kamen verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz (Tabelle 2.4). Ein Standard-PCR-Ansatz (50 µl) enthielt jeweils folgendes: 1 µl Primer 1 (10 pmol/µl), 1 µl Primer 2 (10 pmol/µl), 1 µl dNTP (10 mM), 1x Reaktionspuffer, 0,5 µl Polymerase (0,1-2,5 U) sowie 0,5-2 µl template-DNA (< 10 ng). Eine Liste aller verwendeten Primer ist im Anhang zu finden (siehe 6.1).

Die eigentliche Reaktion erfolgte in einem peqSTAR-Thermocycler (peqSTAR 96 Universal Gradient, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) nach folgendem Temperaturprogramm:

20-35 Zyklen	{	95/98 °C	2 min	initiale Denaturierung
		95/98 °C	30 s	Denaturierung
		50-65 °C	30 s	Annealing
		68/72 °C	1-6 min	Elongation
		68/72 °C	5 min	finale Extension

Der Denaturierungsschritt dient der Auftrennung der doppelsträngig vorliegenden DNA in die Einzelstränge. Beim Annealing lagern sich die PCR-Primer an der zu ihnen komplementären Sequenz im DNA-temple an. Um dies zu ermöglichen wird eine Temperatur gewählt, die ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotides liegt. Im anschließenden Schritt, der Elongation, verlängert die DNA-Polymerase den Primer entlang des DNA-templates und synthetisiert so den neuen Doppelstrang. Dabei rechnet man mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1 kb/min.

Tabelle 2.4: Zur Amplifikation von DNA verwendete Polymerasen

Polymerase	Denaturierungs- /Elongationstemperatur	Anwendung
GoTaq [®] DNA-Polymerase (Promega, Madison, USA)	95 °C/72 °C	Allgemeine PCR
Advantage [®] 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)	95 °C/68 °C	RACE-PCR, Genome Walking, PCR an genomischer DNA
<i>PfuTurbo</i> [®] DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)	94-98 °C/72 °C	Amplifikation von Genen
Phusion [™] High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland)	98 °C/72 °C	PCR mit degenerierten Primern

2.3.6 Real-time PCR

Die Transkriptmengen der Terpensynthasegene in den verschiedenen Thymian-Chemotypen wurde mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Dabei wurde zum PCR-Ansatz ein SYBR-Green-Mastermix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific) gegeben. Dieser enthielt neben der Polymerase, dem zugehörigen Puffer und dNTPs den Farbstoff SYBR Green I. SYBR Green I bindet unspezifisch doppelsträngige DNA. Der Cyaninfarbstoff absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert bei 521 nm. Über die Signalintensität des emittierten Lichts kann die ursprüngliche Menge der mRNA des gewünschten Gens berechnet werden.

Im PCR-Ansatz befanden sich 10 µl SYBR-Green-Mix, 5 µl 1 : 5-verdünnte cDNA, je 0,5 µl *forward* bzw. *reverse* qPCR-Primer (0,25 mM) und 4 µl H₂O. Die PCR wurde in der CFX96 (Bio-Rad, München, Deutschland) nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

	95 °C	10 min	
40 Zyklen	{	95 °C	30 s
		58 °C	30 s
		72 °C	30 s
		95 °C	1 min
Schmelzkurve:	56-95 °C	0,5 °C/30 s	

Die Berechnung der Transkriptmenge erfolgte über eine Standardkurve. Dafür wurde die gleiche Menge cDNA jeden Chemotyps verwendet. Als Referenzgen diente *yls8* (yellow leaf specific gene 8), welches in jedem Chemotyp etwa gleich exprimiert war. Die Berechnung der Transkriptmenge erfolgte über die automatische Berechnung des Schwellenwerts (threshold). Die relativen Transkriptlevel wurden als Quotient der Transkriptmenge des gewünschten Gens und der Transkriptmenge des Referenzgens angegeben. Es wurden jeweils drei technische Replikate durchgeführt.

2.3.7 RACE-PCR und Erstellen von RACE-cDNA

Zur Identifizierung neuer Terpensynthasegene wurde mit RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends with polymerase chain reaction) gearbeitet. RACE-cDNA mit speziellen

Adaptorsequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende wurde mit dem „SMARTer™ RACE Amplification Kit“ (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) nach dem angegebenen Protokoll synthetisiert.

Die eigentliche RACE-PCR wurde mit dem „Advantage® 2 Polymerase Mix“ (Clontech Laboratories) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde wie im RACE-Kit empfohlen pipettiert. Die PCR wurde als touchdown-PCR mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

5 Zyklen: 94°C 30 s
72°C 3 min

5 Zyklen: 94°C 30 s
70°C 30 s
72°C 3 min

25 Zyklen: 94°C 30 s
68°C 30 s
72°C 3 min

Wurden mit der RACE-PCR keine eindeutigen Banden erhalten, wurde anschließend eine zweite, sogenannte „nested“, PCR mit innenliegenden genspezifischen Primern wie im Herstellerprotokoll angegeben durchgeführt.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Trennung erfolgte in 1,5%ige TAE-Agarosegelen (1,5 % (w/v) Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 0,5 x TAE-Puffer), die mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Zu den DNA-Proben wurden 3-5 µl Ladepuffer gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in einer „Mupid™-One“ (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit einer konstanten Spannung von 100 V.

Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht (Syngene G:Box, Syngene, Cambridge, Großbritannien). Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA leuchtet diese bei Anregung mit ultraviolettem Licht auf. Um die Größe der DNA-Fragmente

abschätzen zu können, wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese 3 µl eines 1 kb oder 100 bp DNA-Markers (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mitgeführt.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	20 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA

2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel unter UV-Licht (260 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus den Gelstücken erfolgte anfangs mit dem „NucleoSpin[®] Extract II“-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), später mit dem „QIAquick[®] Gel Extraction Kit“ (Qiagen). Das Vorgehen war bei beiden Kits ähnlich: Das Gelstück wurde in einem mitgelieferten Puffer aufgelöst, die enthaltene DNA an eine Säulenmatrix aus dem jeweiligen Kit gebunden und nach mehreren Waschschritten mit dem im jeweiligen Kit enthaltenen Waschpuffer mit 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5) eluiert.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen erfolgte ebenfalls über Säulenchromatographie. Dafür wurden das „NucleoSpin[®] Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) bzw. das „QIAquick[®] PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet.

2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde unter Zuhilfenahme des „NucleoSpin[®] Plasmid“ Kits (Macherey-Nagel) aus *E. coli* TOP10 isoliert. Die Zellen wurden sedimentiert und chemisch aufgeschlossen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend an eine Säulenmatrix gebunden, mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer einmal gewaschen und mit Elutionspuffer (5 mM Tris-HCl, pH = 8,5) eluiert.

2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von RNA und DNA wurde photometrisch mit dem „Infinite[®] 200 PRO NanoQuant“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) unter Benutzung der „NanoQuant Plate[™]“

(Quarzglasplatte) bestimmt. Die Messungen wurden mit je 2 µl der zu vermessenden Nukleinsäure durchgeführt.

2.3.12 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen NEB (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) und Thermo Scientific. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte der Restriktionsverdau für eine Stunde bei 37 °C im Thermozykler (peqSTAR 96 Universal Gradient).

2.3.13 Ligation von PCR-Produkten

DNA-Fragmente wurden entweder mit Hilfe des „TOPO TA Cloning[®] Kits for Sequencing“ (Invitrogen) in den Vektor pCR[®]4-TOPO oder mit dem „QIAGEN[®] PCR Cloning Kit“ in den Vektor pDrive ligiert. Für Fragmente, die kleiner als 500 bp waren, kam auch das „CloneJET[™] PCR Cloning Kit“ (Thermo Scientific) zum Einsatz (Tabelle 2.5). Hier erfolgte die Ligation in den Vektor pJET1.2/blunt. PCR-Produkte, die mit polyA-Überhängen amplifiziert wurden, wurden vor der Ligation mit dem im Kit enthaltenen „DNA blunting enzyme“ behandelt. Vollständige Terpensynthasogene wurden für die Expression in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-Iba37plus ligiert. Vektor und PCR-Produkt wurden im Verhältnis 1 : 5 in einem Ansatz mit *BsaI* (NEB) bzw. dessen Isoschizomer *Eco3II* (Thermo Scientific) und dem zugehörigen Puffer eine Stunde bei 55 °C, respektive 37 °C, verdaut. Anschließend wurden 2 µl ATP (Stammlösung: 100 mM) und 1 µl T4-Ligase (beides Thermo Scientific) zugegeben und der Ansatz wurde weitere drei Stunden bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Tabelle 2.5: Bakterielle Klonierungsvektoren und ihre Verwendung.

Vektor	ausgewählte Eigenschaften	Verwendung
pCR [®] 4-TOPO [®] (Invitrogen)	Bakterieller Klonierungsvektor, 3956 bp, Amp ^r , Km ^r , P _{lac} -Promotor	Klonierung von PCR- Produkten
pDrive Cloning Vector (Qiagen)	Bakterieller Klonierungsvektor, 3850 bp, Amp ^r ; Km ^r , T7-Promotor, SP6-Promotor	Klonierung von PCR- Produkten
pJET1.2/blunt (Thermo Scientific)	Bakterieller Klonierungsvektor, 2974 bp, Amp ^r , T7-Promotor	Klonierung von PCR- Produkten < 500 bp
pASK-Iba37plus (Iba BioTAGnology)	Bakterieller Expressionsvektor mit His ₆ -Tag, 3270 bp, Amp ^r , Tetrazyklin-Promotor	Heterologe Expression von Terpensynthasegenen in <i>E. coli</i>

2.3.14 Genome Walking

Um unbekannte Abschnitte in der genomischen DNA amplifizieren zu können, wurde mit dem „GenomeWalker[™] Universal Kit“ (Clontech Laboratories) eine „Genombank“ erstellt. Dafür wurde die vorher isolierte genomische DNA (siehe 2.3.1) zuerst mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurde an die entstandenen DNA-Fragmente ein „Adaptor“ ligiert. Die Amplifikation der unbekannt DNA-Abschnitte erfolgte ähnlich der RACE-PCR. Genutzt wurde der empfohlene „Advantage[®] 2 Polymerase Mix“ (Clontech Laboratories). Mit genspezifischen Primern und dem im Kit enthaltenen Adaptorprimern wurden sogenannte primäre und sekundäre PCRs durchgeführt. Dabei entsprach die sekundäre PCR einer nested-PCR.

2.3.15 Bisulfitsequenzierung

Der Methylierungsgrad bestimmter DNA-Abschnitte wurde mittels Bisulfitsequenzierung bestimmt. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen Sensitivität methylierter und unmethylierte Cytosine der DNA gegenüber Natriumhydrogensulfit (NaHSO₃, „Bisulfit“) (Abbildung 2.1).

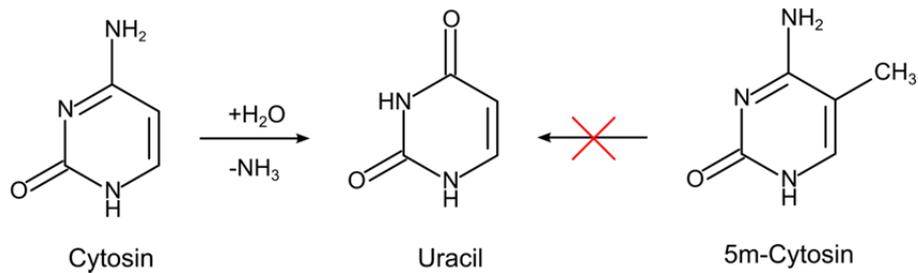


Abbildung 2.1: Strukturformeln von Cytosin, Uracil und 5m-Cytosin. Cytosin, nicht aber 5-methyl-Cytosin, desaminiert unter Einfluss von NaHSO₃ zu Uracil.

Vor der Behandlung mit NaHSO₃ wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, um die Cytosine für das Reagenz zugänglich zu machen. Unmethylierte Cytosine der DNA werden durch Inkubation mit Natriumhydrogensulfit in Uracil desaminiert, während 5m-Cytosin nicht angegriffen wird. Bei der anschließenden Amplifikation der DNA-Fragmente durch PCR erfolgt die Umwandlung des Uracils in Thymin (Abbildung 2.2). Über den Vergleich der durch die PCR an unbehandelter und behandelter DNA erhaltenen Sequenzen kann nachvollzogen werden, welche Cytosine in der Ausgangs-DNA methyliert vorlagen. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit dem Programm CyMATE („Cytosine Methylation Analysis Tool for Everyone“, <http://www.cymate.org>) durchgeführt, welches auch den Methylierungsgrad des DNA-Abschnitts berechnete.

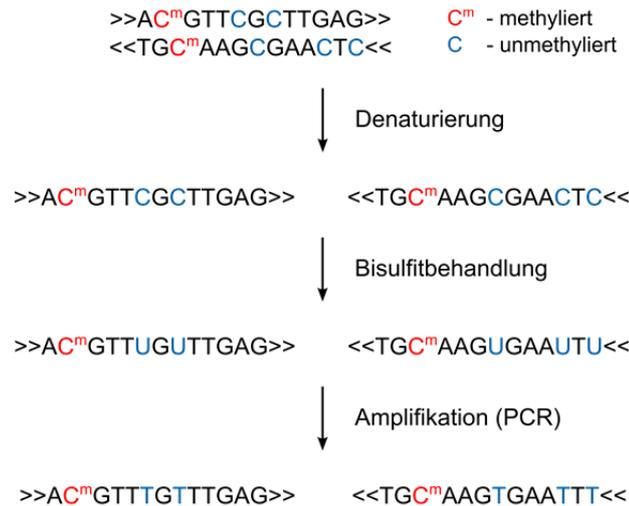


Abbildung 2.2: Methodik der Bisulfitsequenzierung. Der DNA-Doppelstrang wird denaturiert und anschließend mit Natriumhydrogensulfit behandelt. Dabei werden unmethylierte Cytosine (blaue C) in Uracil (blaue U) umgewandelt, während methylierte Cytosine (rote C^m) erhalten bleiben. Bei der Amplifikation und Sequenzierung des DNA-Fragments werden methylierte Cytosine weiterhin als C dargestellt. Die umgewandelten unmethylierten Cytosine werden als Thymin (blaue T) wiedergegeben. Abbildung nach (Xi et al., 2009).

Die für die Bisulfitsequenzierung benötigte genomische DNA wurde mit dem „Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit“ nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Konvertierung von jeweils 1-2 µg DNA erfolgte mit dem „EpiTect[®] Bisulfite Kit“ (Qiagen).

2.3.16 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde entweder von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) oder GATC (Konstanz, Germany) durchgeführt. Die Plasmide wurden entsprechend den Vorgaben der Firmen verdünnt und eingesendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen „DNASTar Lasergene“ (DNASTar, Madison, USA), „Geneious“ (Biomatters, Auckland, Neuseeland) und „Bio Edit“ (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) analysiert. Außerdem wurde die frei zugängliche Websoftware „Multalin“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) für Sequenzvergleiche genutzt. Datenbanksuchen und -abgleiche erfolgten über BLAST auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Signalpeptide wurden mit Hilfe von SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagt. Für die Analyse von Promotorregionen und -elementen wurde auf den „Promoter 2.0 Prediction Server“

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) sowie auf „PlantCARE“ zurückgegriffen (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Heterologe Expression von Terpensynthasegenen in *E. coli* und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Identifizierte Terpensynthasegene wurden zur Aktivitätsbestimmung in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-Iba37plus (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert. 100 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, wurden mit 1 ml Übernachtskultur der transformierten *E. coli* inokuliert. Die Kultur wurde unter konstantem Schütteln bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bis 0,8 wachsen gelassen. Die Proteinexpression wurde mit Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 200 µg/l) induziert. Unter konstantem Schütteln über Nacht bei 18 °C fand die Proteinexpression statt. Am nächsten Tag wurden die rekombinanten Proteine aufgereinigt. Dazu wurde die Kultur bei 4-8 °C 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 3 ml Extraktionspuffer aufgenommen und in 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit einer Ultraschallbehandlung für 1,5-2 min auf Eis aufgeschlossen und Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation (4 °C, 20 min, 11.000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine bereits mit Assaypuffer äquilibrierte 10 DG-Säule (Econo-Pac® Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gegeben und mit 4 ml Assaypuffer eluiert. Der Rohextrakt wurde entweder sofort für Proteinassays eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

Extraktionspuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	10 %	Glycerol
	5 mM	MgCl ₂
	5 mM	DTT
	5 mM	Natriumascorbat, pH = 7,0
	0,5 mM	PMSF

Assaypuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	10 %	Glycerol
	1 mM	DTT

2.4.2 Herstellung hochreiner Proteine

Für die Herstellung hochreiner Proteine wurden *E. coli*, die entsprechenden Terpensynthasen im Vektor pASK-Iba37plus enthielten, in 3 l LB-Medium, angeimpft mit 10 ml Übernachtskultur, heterolog exprimiert (siehe 2.4.1). Die Zellen der Kultur wurden am nächsten Tag durch 15minütige Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C sedimentiert, in Lysispuffer resuspendiert und durch Ultraschall (3 x 30 s, 50 %) aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde 25 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert. 5 ml der Ni-NTA-Matrix (Profinity™-IMAC, BioRad) wurden mit 40 ml Lysispuffer äquilibriert, anschließend wurden die aus der Zentrifugation resultierenden Proteinüberstände zugegeben und das Gemisch 60 min bei 4 °C und 90 rpm geschwenkt. Die Matrix wurde auf eine Säule (Poly-Prep® Chromatography Columns, Bio-Rad) gegeben und zweimal mit je 1,5 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in vier Fraktionen von jeweils 300 µl mit Elutionspuffer. Die Fraktionen mit den jeweils höchsten Proteinkonzentrationen wurden für die Aktivitätsassays vereinigt.

Lysispuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol, pH = 8,0
	1 % (v/v)	Tween 20
	10 % (v/v)	Glycerol

Waschpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol, pH = 8,0
	10 % (v/v)	Glycerol

Elutionspuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	500 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol, pH = 8,0
	10 % (v/v)	Glycerol

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde mit dem „Roti[®]-Quant“-Reagenz (Carl Roth GmbH) durchgeführt. Die Proben wurden 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 verdünnt und mit dem Bradford-Reagenz nach Herstellerangaben verdünnt, inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgerade, die mit BSA (Albumin Fraktion V, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) erstellt wurde.

2.4.4 Biochemische Charakterisierung

Die Bestimmung des K_m -Werts erfolgte sowohl über die Messung des Verbrauchs von ³H-GPP (radioaktiv) als auch über die Quantifizierung des bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen von GPP entstandenen γ -Terpinens (gaschromatographisch). Bei der gaschromatographischen K_m -Wert-Bestimmung wurde mit hochreinem Protein (siehe 2.4.2) gearbeitet, was zusätzlich die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit V_{max} der Enzyme erlaubte.

Um den linearen Bereich der Reaktion zu bestimmen, erfolgte die Inkubation von 30 μ l Enzymrohextrakt (siehe 2.4.1) mit 5 mM Mg^{2+} und 5 μ M GPP zwischen 5 und 30 min. Für die Bestimmung der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat GPP wurde der Rohextrakt schließlich 10 min bei 30 °C mit 5 mM Mg^{2+} und verschiedenen Konzentrationen von ³H-GPP (1-30 μ M) inkubiert. Die Assays wurden mit 1 ml Pentan überschichtet und nach der Inkubationszeit 2 min bei 1400 rpm gevortext. 500 μ l des Pentans wurden mit 2 ml des Szintillationscocktails (RotiSzint[®] 2200, Roth) gemischt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillator (LS 6500, Beckmann Coulter Inc., Krefeld, Deutschland). Alle Assays wurden dreimal wiederholt. Die K_m -Werte wurden über die Lineweaver-Burk-Auftragung bestimmt.

Die Bestimmung des K_m -Wertes und der Maximalgeschwindigkeit V_{max} mittels Gaschromatographie erfolgte über die Messung des entstandenen γ -Terpinens bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen von GPP. Auch hier wurde zuerst in einer Linearitäts-Zeit-Kurve die optimale Inkubationszeit bestimmt. Dazu wurden 170 μ g des reinen Proteins mit 2 mM Mg^{2+} und 10 μ M GPP zwischen 20 min und 2 h inkubiert und das entstandene γ -Terpinen mittel GC/FID gemessen. Für die Bestimmung der biochemischen Parameter wurden 150 μ g Protein mit 2 mM Mg^{2+} und 0-100 μ M GPP gemischt und mit

200 μl Hexan, das 10 $\mu\text{g/ml}$ Nonylacetat als internen Standard enthielt, überschichtet. Die Assays wurden nach 60 min bei 30 °C durch Vortexen gestoppt und für 30 min bei Raumtemperatur stengelassen. Für die Quantifizierung des entstandenen γ -Terpinens mittels GC/FID (siehe 2.5.4) wurden 50 μl des Hexans abgenommen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen, K_m und V_{max} wurden über die Lineweaver-Burk-Auftragung bestimmt.

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Enzymassays mit SPME

Aktivitätsassays isolierter Terpensynthasen wurden mit SPME (solid phase micro extraction) durchgeführt. Zu 70 μl Reaktionsmix bestehend aus 63 μl Assaypuffer, 5 μl 100 mM MgCl_2 und 2 μl GPP (Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA) wurden 30 μl des rekombinanten Proteins gegeben und für 60 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Die Produkte der Reaktion wurden während der Inkubation mit einer Polydimethylsiloxan-SPME-Faser (Supelco, Belafonte, USA) gesammelt.

2.5.2 Hexanextrakte

Um die Produkte der Enzyme quantifizieren zu können, wurden Hexanextrakte der Enzymassays angefertigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz (siehe 2.5.1) mit 200 μl Hexan (versetzt mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Nonylacetat) überschichtet und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und die flüchtigen Produkte in das Hexan zu überführen, wurde der Reaktionsansatz anschließend 2 min auf einem Vortexmischer durchmischt. Nach kurzem Einfrieren in flüssigem Stickstoff, wurde das Hexan mit einer Glaspipette abgenommen und 50 μl davon für die Analyse mittels GC/MS und GC/FID eingesetzt.

Für die Analyse der in den Pflanzen vorhandenen Terpene wurden junge Triebe der zu untersuchenden Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mörser zu einem

feinen Pulver verarbeitet. 20-30 mg des gemörserten Materials wurden in 200 µl Hexan, versetzt mit dem internen Standard Nonylacetat (10 µg/ml) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je 50 µl Hexan wurden für die qualitative Analyse (GC/MS) und die quantitative Analyse (GC/FID) eingesetzt.

Im Zuge des Feldversuchs gesammelte Blätter wurden direkt nach der Ernte in 200-400 µl Hexan (versetzt mit 10 µg/ml Nonylacetat) gegeben und nach ca. einer Stunde mit einem Glasstab im Hexan zerdrückt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 50 µl Hexan für die quantitative bzw. qualitative Analyse abgenommen.

2.5.3 Gaschromatographische Trennung mittels GC/MS

Produkte der Enzymassays und extrahierte Terpene aus Blattmaterial wurden mithilfe eines Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Duisburg, Deutschland), gekoppelt an ein Massenspektrometer (GCMS-QP 2010 Plus, Shimadzu) identifiziert. Als Trägergas für die GC/MS wurde Wasserstoff mit einem Fluss von 1 ml/min verwendet. Die Injektortemperatur betrug 220 °C. Das Injektionsvolumen für die Messung der Hexanextrakte betrug 1 µl („splitless“). Bei Benutzung der SPME-Faser wurde diese direkt injiziert.

Verschiedene Temperaturprogramme auf zwei unterschiedlichen Säulen wurden zur Auftrennung der flüchtigen Terpene benutzt (Tabelle 2.6). Die ECTM-5-Säule (Poly(5 %-diphenyl-95 %-dimethylsiloxan), 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke) (Grace, Deerfield, USA) wurde für die Aktivitätsassays und anfangs für die Messung der Hexanextrakte verwendet. Da diese Säule die Isomere Thymol und Carvacrol nicht gut trennte, wurde für die Terpene der phenolischen Chemotypen später eine ECTM-WAX-Säule (Polyethylenglykol, 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke) benutzt. Diese besaß eine höhere Polarität und war deshalb besser für die Auftrennung der Monoterpenalkohole geeignet.

Tabelle 2.6: Für die Auftrennung genutzte Temperaturprogramme.

GC-Programm für:	Hexanextrakte	SPME
Halten der Temperatur:	40 °C für 3 min	50 °C für 3 min
erste Rampe:	6 K/min bis 280 °C	7 K/min bis 150 °C
zweite Rampe:	100 K/min bis 300 °C (250 °C für EC TM -WAX-Säule)	100 K/min bis 300 °C
Halten der Temperatur:	2 min	2 min

Die Identifizierung der Terpenprodukte erfolgte mit Hilfe der Shimadzu Software „GCMS Postrun Analysis“ und mit Hilfe der Massenspektren-Bibliotheken „Wiley 8“ (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) und „Adams“ (Shimadzu).

2.5.4 Gaschromatographische Trennung mittels GC/FID

Sollten die Produkte der Enzymassays und extrahierten Terpene aus Pflanzenmaterial quantifiziert werden, erfolgte die gaschromatographische Trennung über einen Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu), der an einen Flammenionisationsdetektor (FID) (FID-2010 Plus, Shimadzu) gekoppelt war.

Die quantitative Analyse wurde mit dem internen Standard Nonylacetat durchgeführt. Dazu wurden die Proben wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben vorbereitet, gaschromatographisch aufgetrennt (siehe 2.5.3) und anschließend über den FID (Detektortemperatur: 250 °C) analysiert.

Für die Quantifizierung wurden die erhaltenen Peaks mit der Shimadzu Software „GC Postrun Analysis“ integriert und über den Vergleich der errechneten Flächen mit der Fläche des internen Standards bekannter Konzentration berechnet.

2.6 Mikroskopie

Die Blattmorphologie der Chemotypen von *Thymus vulgaris* wurde von Frau Karin Baumann am Leibniz-Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben durchgeführt. Die Zählung der glandulären Trichome, die Bestimmung der Größe der Drüsenschuppen und die

Vermessung der Blätter erfolgte unter einem Binokularmikroskop mit einem Messokular. Das Messokular wurde mit einem Objektmikrometer kalibriert.

Die Drüsenhaare wurden in definierten Blattausschnitten gezählt und deren Anzahl pro mm² berechnet. Von den Drüsenschuppen wurden alle auf der Ober- bzw. Unterseite sichtbaren Exemplare gezählt und je Seite fünf zufällig ausgewählte Drüsenschuppen vermessen. Die Messung der Länge und Breite der Blätter erfolgte jeweils an der längsten und breitesten Stelle.

2.7 Statistische Methoden

2.7.1 Spearman's Rangkorrelationskoeffizient

Für die Bestimmung der Zusammenhänge zwischen zwei variablen Größen (z. B. zwischen Transkriptmenge und Terpenegehalt) wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) berechnet. Bei dieser Methode werden den Datenreihen unabhängig voneinander Ränge zugewiesen, die dann miteinander verglichen werden. Von den zugeordneten Rängen wird die Differenz (D) gebildet, die anschließend quadriert wird. Der Rangkorrelationskoeffizient r_s ergibt sich dann folgendermaßen:

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=2}^n D_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

mit n = Anzahl der Datenpaare, D = Differenz der Ränge

Durch die Zuordnung von Rängen ist der Rangkorrelationskoeffizient robust gegenüber Ausreißern. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman und dessen Signifikanzwert P wurden mit SigmaPlot 11 (Systat Software, San Jose, USA) berechnet.

2.7.2 Signifikanztests

Die Signifikanz der angegebenen Werte wurde mittels „One Way ANOVA“ (ANalysis Of VAriance) überprüft. Die paarweisen Vergleiche der Werte wurden mit dem Post-Hoc-Test und der Holm-Sidak-Methode durchgeführt. Waren die Werte nicht normalverteilt und konnten nicht in eine Normalverteilung transformiert werden, wurde eine ANOVA nach Rängen durchgeführt. Die Signifikanztests wurden mit SigmaPlot 11 (Systat Software) durchgeführt. Die genutzte Methode und der P-Wert wurden jeweils angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *Thymus vulgaris*-Chemotypen aus Südfrankreich

3.1.1 Die sechs *Thymus vulgaris*-Chemotypen sind durch ihr Terpenspektrum identifizierbar

Zur Erforschung der Terpenbiosynthese in Lamiaceen wurde mit sechs Chemotypen des echten Thymians (*Thymus vulgaris*) aus Frankreich gearbeitet (Granger et al., 1973), die aufgrund ihres unterschiedlichen Terpenspektrums dafür ausgesucht wurden. Jeder dieser Chemotypen produziert ein sogenanntes Hauptmonoterpen, welches sein ätherisches Öl dominiert und nicht oder nur in Spuren in den jeweils anderen fünf Chemotypen zu finden ist. Nach diesen Hauptmonoterpenen wurden die Chemotypen auch benannt. So ist das Hauptmonoterpen des G-Typs Geraniol, das des A-Typs α -Terpineol und des L-Typs Linalool. Der U-Typ besitzt als Hauptmonoterpen *trans*-Sabinenhydrat. Diese Hauptmonoterpene sind nicht-phenolischer Natur. Daher spricht man bei diesen Chemotypen von nicht-phenolischen Chemotypen. Im Gegensatz dazu existieren zwei phenolische Chemotypen, der Carvacrolyp (C) und der Thymotyp (T). Im ätherischen Öl der phenolischen Chemotypen sind immer auch große Mengen γ -Terpinen nachweisbar (Granger et al., 1973). Dieses ist vermutlich ein Zwischenprodukt der Biosynthese von Thymol und Carvacrol (Poulose et al., 1978a)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen waren durch Stecklinge vermehrte Klone der jeweiligen Chemotypen. Die Pflanzen für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Gewächshaus (siehe 2.1) angezogen und hinsichtlich ihres Terpenspektrums gaschromatographisch analysiert (Abbildung 3.1). Die Identifizierung der im ätherischen Öl enthaltenen Substanzen erfolgte über ein an den Gaschromatographen gekoppeltes Massenspektrometer (siehe 2.5.3). Zusätzlich wurde in den Jahren 2011 und 2012 ein Feldversuch mit allen sechs Chemotypen durchgeführt, um die saisonale Variation des Terpenspektrums untersuchen zu können (siehe 3.1.3).

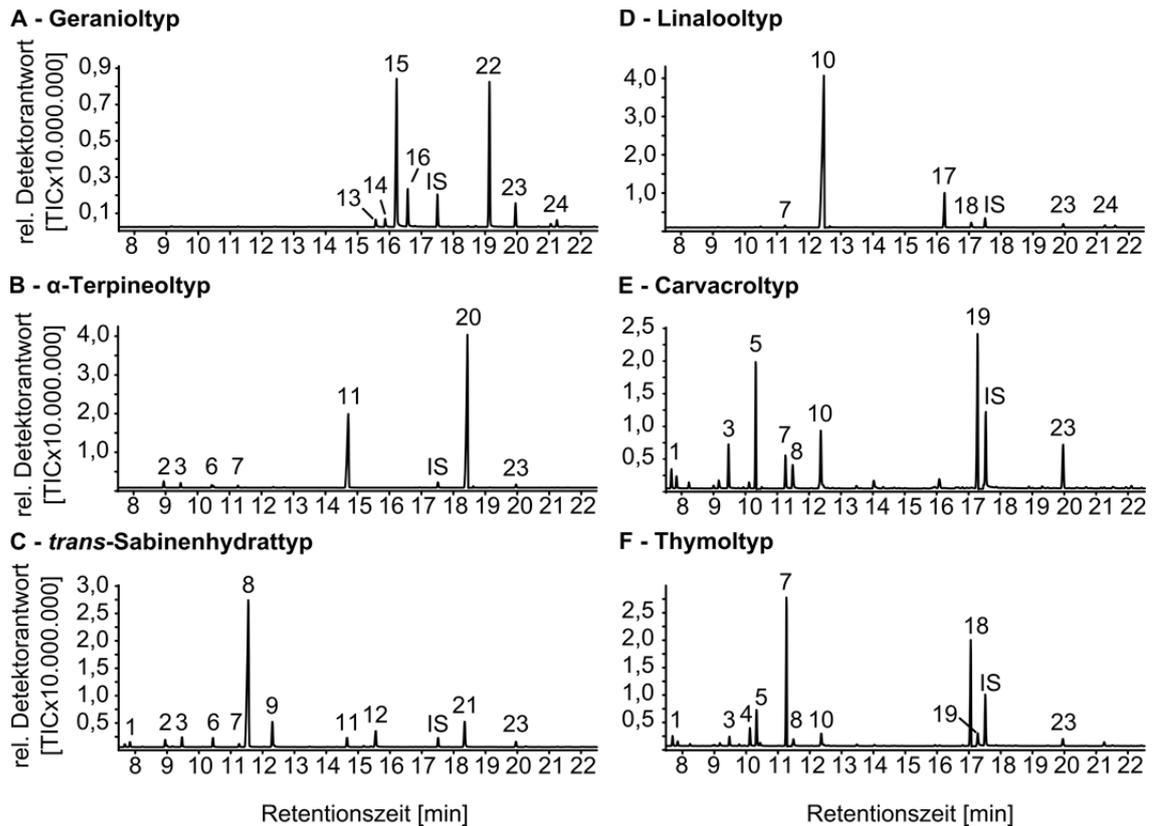


Abbildung 3.1: GC/MS-Chromatogramme von Hexanextrakten der *Thymus vulgaris*-Chemotypen. Im ätherischen Öl konnten folgende Terpene identifiziert werden (sortiert nach Retentionszeit): 1 α -Thujen, 2 Sabinen, 3 Myrcen, 4 α -Terpinen, 5 *para*-Cymen, 6 Limonen, 7 γ -Terpinen, 8 *trans*-Sabinenhydrat, 9 *cis*-Sabinenhydrat, 10 Linalool, 11 α -Terpineol, 12 Limonen-10-ol, 13 Nerol, 14 Neral, 15 Geraniol, 16 Geranial, 17 Linalylacetat, 18 Thymol, 19 Carvacrol, 20 α -Terpinylacetat, 21 Limonen-10-yl-acetat, 22 Geranylacetat, 23 (*E*)- β -Caryophyllen, 24 Germacren D. IS = interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μ l)

Das ätherische Öl des Geranioltyps wurde von seinem Hauptmonoterpen Geraniol und dem zugehörigen Acetat dominiert (Abbildung 3.1A). Weiterhin konnten ein Isomer des Geraniols, Nerol, sowie die beiden Aldehyde Geranial und Neral detektiert werden. Auch im A-Typ bestand das ätherische Öl vorwiegend aus dem Hauptmonoterpen α -Terpineol und dessen Acetat (Abbildung 3.1B). Zwei weitere nicht-phenolische Chemotypen waren der *trans*-Sabinenhydrattyp (U) und der Linalooltyp (L). Die Chromatogramme der ätherischen Öle dieser beiden Chemotypen wurden von großen Mengen ihres jeweiligen Hauptmonoterpens dominiert (Abbildung 3.1C, D). Im U-Typ waren viele weitere Monoterpene detektierbar, darunter *cis*-Sabinenhydrat, Limonen-10-ol und dessen Acetat Limonen-10-yl-acetat. Im ätherischen Öl des L-Typs waren hingegen außer Linalool und Linalylacetat nur noch Thymol und dessen möglicher Vorläufer γ -Terpinen zu finden.

Im ätherischen Öl der phenolischen Chemotypen Carvacrol (C) und Thymol (T) war das jeweilige Hauptmonoterpen weniger dominant als in den nicht-phenolischen Chemotypen. Es

wurden außerdem große Mengen *para*-Cymen und γ -Terpinen detektiert (Abbildung 3.1E, F). Mit *trans*-Sabinenhydrat und Linalool konnten zwei Nebenprodukte identifiziert werden, die Hauptinhaltsstoffe anderer Chemotypen waren. Während der C-Typ lediglich Spuren an Thymol enthielt, konnten im T-Typ größere Mengen an Carvacrol gemessen werden.

Neben den Monoterpenen wurden außerdem in allen Chemotypen das Sesquiterpen (*E*)- β -Caryophyllen identifiziert. Im G- und L-Typ war mit Germacren D ein weiteres Sesquiterpen detektierbar.

Die im Gewächshaus angezogenen Pflanzen wurden zusätzlich quantitativ mittels GC/FID vermessen (Tabelle 3.1). In fünf Chemotypen war das jeweilige Hauptmonoterpen Hauptbestandteil des Terpenegehalts. Im A-Typ hingegen war α -Terpinylacetat mit 8,8 mg/g Frischgewicht die Hauptkomponente des ätherischen Öls. Der Gesamtterpenegehalt der Chemotypen A, L und T war deutlich höher als der der verbleibenden drei Chemotypen.

Tabelle 3.1: Gehalt der Hauptmonoterpene und γ -Terpinen in allen sechs Chemotypen. Da γ -Terpinen als Zwischenprodukt des Biosyntheseweges der phenolischen Hauptmonoterpene angesehen wird, wurde auch dessen Gehalt in der Tabelle aufgeführt. Der Gesamtterpenegehalt beinhaltet alle in den Pflanzen detektierbaren Monoterpene. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC/FID über den internen Standard Nonylacetat (10 ng/ μ l). Die Werte sind angegeben in mg Terpen pro g Frischgewicht. Ch.-typ = Chemotyp

Ch.-typ	Geraniol [mg/g]	α -Terpineol [mg/g]	<i>trans</i> -Sabinenhydrat [mg/g]	Linalool [mg/g]	Carvacrol [mg/g]	Thymol [mg/g]	γ -Terpinen [mg/g]	Terpenegehalt (gesamt) [mg/g]
G	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7
A	0,0	1,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	11,3
U	0,0	0,2	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
L	0,0	0,0	0,1	14,1	0,0	0,2	0,1	17,2
C	0,0	0,0	0,1	0,3	3,7	0,0	0,7	6,3
T	0,0	0,0	0,2	0,6	0,3	3,9	2,0	11,2

3.1.2 Die sechs Chemotypen besitzen eine ähnliche Blattmorphologie

Da die Drüsenhaare und Drüsenschuppen auf den Blättern die Bildungs- und Speicherorte des ätherischen Öls sind (Yamaura et al., 1992), wurde die Blattmorphologie der sechs Chemotypen untersucht. Die Bonitierung der Chemotypen erfolgte am Leibniz-Institut für

Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben von Frau Karin Baumann. In definierten Blattausschnitten wurden bei allen Chemotypen die vorhandenen Drüsenhaare pro mm^2 gezählt, der Durchmesser der Drüsenschuppen in μm bestimmt sowie die Blattlänge und Blattbreite in mm gemessen. Für die Anzahl der Drüsenschuppen wurden alle sichtbaren Drüsenschuppen auf der Blattober- und Blattunterseite gezählt.

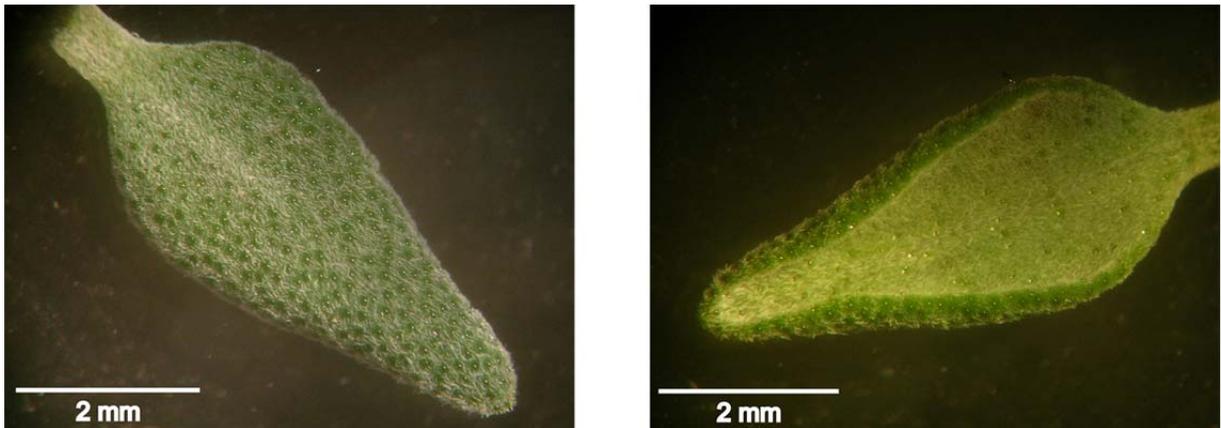


Abbildung 3.2: Ein Blatt des A-Chemotyps unter dem Binokularmikroskop bei ca. 60-facher Vergrößerung. Linke Seite: Blattoberseite, rechte Seite: Blattunterseite.

Die Blätter zeigten die für *Thymus vulgaris* typischen eingerollten Blattränder und hatten eine graugrüne Farbe. Sie waren bei jedem Chemotyp vollständig behaart und die Drüsenschuppen waren auf beiden Seiten über die gesamte Blattfläche verteilt (Abbildung 3.2).

3.1.2.1 Variation der Anzahl der Drüsenhaare

Die Drüsenhaare wurden sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Blattunterseite und den Blattadern gezählt (Abbildung 3.3). Alle Chemotypen wiesen auf der Unterseite ihrer Blätter mehr Drüsenhaare auf als auf der Blattoberseite. Die meisten Drüsenhaare konnten, mit Ausnahme des U-Typs, im Bereich der Blattadern gezählt werden. Im Vergleich der Chemotypen untereinander besaßen der A- und der L-Typ insgesamt signifikant mehr Drüsenhaare als die anderen vier Chemotypen. Der G-Typ besaß mit im Mittel 1552 Drüsenhaaren pro mm^2 Blattfläche nach dem A- und dem L-Typ die drittmeisten Drüsenhaare. Der U-Typ besaß insgesamt die wenigsten Drüsenhaare, was vor allem auf eine schwache Behaarung im Bereich der Blattadern zurückzuführen war. Im Bereich der Blattadern besaßen alle anderen Chemotypen signifikant mehr Drüsenhaare als der *trans*-Sabinenhydrattyp.

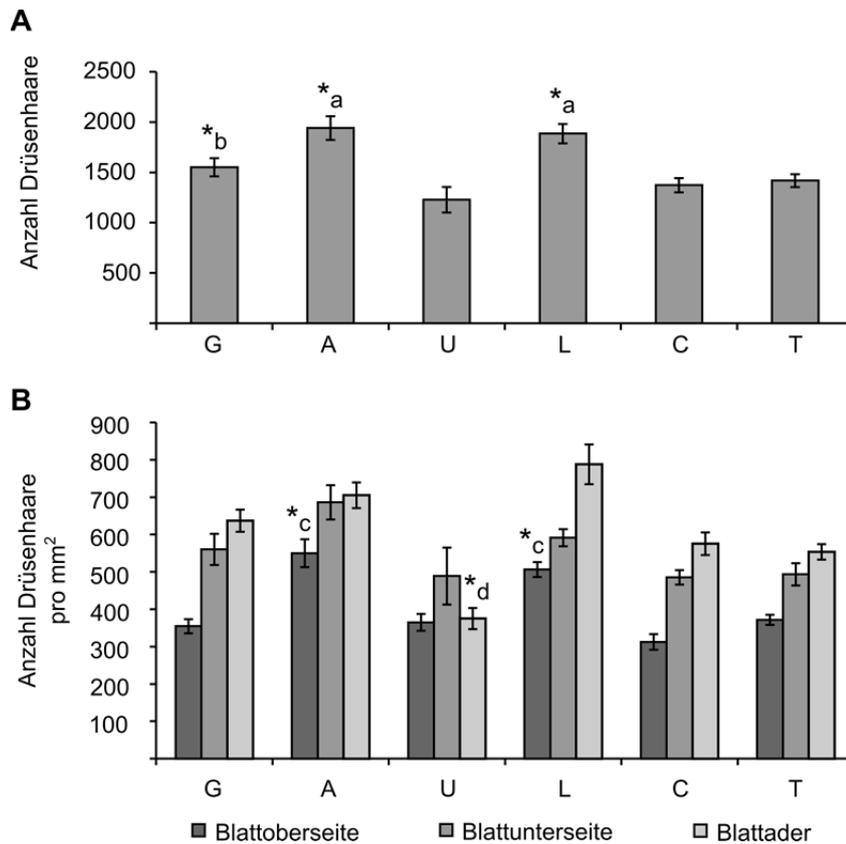


Abbildung 3.3: Anzahl der Drüsenhaare in den Thymian-Chemotypen. **A)** Gesamtanzahl der auf den Blättern gezählten Drüsenhaare. Der A- und der L-Typ besaßen insgesamt signifikant (*a) mehr Drüsenhaare als die anderen vier Chemotypen (One Way ANOVA, $P \leq 0,003$). Auch der G-Typ besaß signifikant (*b) mehr Drüsenhaare als der U-Typ (One Way ANOVA, $P \leq 0,007$). **B)** Verteilung der Drüsenhaare auf der Blattoberseite (dunkelgrau), der Blattunterseite (mittelgrau) und der Blattader (hellgrau). Auf der Blattoberseite waren beim A- und L-Typ signifikant mehr (*c) Drüsenhaare zu finden als bei den anderen vier Chemotypen (One Way ANOVA, $P \leq 0,001$). Im Bereich der Blattadern besaß der U-Typ signifikant (*d) weniger Drüsenhaare als die anderen Chemotypen (One Way ANOVA, $P \leq 0,002$). Gezählt wurde in definierten Ausschnitten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Zählungen wieder. Es wurden jeweils drei Blätter pro Pflanze gezählt. Bei den Chemotypen U, L, C und T wurden jeweils zwei Pflanzen in die Zählung einbezogen (siehe 6.3.1).

3.1.2.2 Zählung und Größenmessung der glandulären Trichome

Da die glandulären Trichome die Hauptproduktionsorte des ätherischen Öls sind, wurde nicht nur die Anzahl dieser auf beiden Blattseiten bestimmt (Abbildung 3.4), sondern auch deren durchschnittliche Größe in μm gemessen.

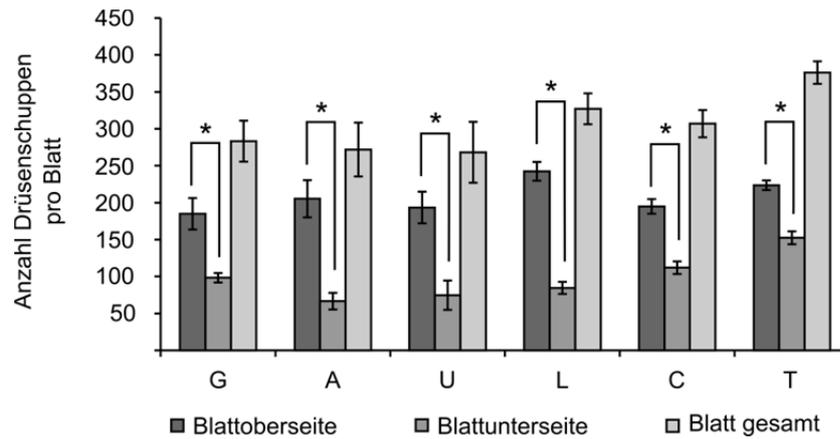


Abbildung 3.4: Anzahl der Drüsenschuppen auf den Blättern der Chemotypen. Es wurden alle sichtbaren Drüsenschuppen auf den Blattoberseiten (dunkelgrau) und Blattunterseiten (mittelgrau) gezählt. Die Drüsenschuppen pro Blatt gesamt (hellgrau) stellen die Summe der gezählten Drüsenschuppen auf der Blattober- und -unterseite dar. Auf den Blattoberseiten konnten signifikant (*) mehr Drüsenschuppen gezählt werden als auf den Blattunterseiten (One Way ANOVA, $P \leq 0,001$). Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler der Zählungen wieder. Es wurden jeweils drei Blätter pro Pflanze gezählt. Bei den Chemotypen U, L, C und T wurden jeweils zwei Pflanzen in die Zählung einbezogen (siehe 6.3.2).

Insgesamt wurden beim T-Typ mit durchschnittlich 376 die meisten Drüsenschuppen pro Blatt gezählt. Die wenigsten Drüsenschuppen pro Blatt besaß der U-Typ (268). Die Drüsenschuppen auf der Blattoberseite waren im Mittel etwa 5 µm größer als die auf der Unterseite der Blätter (Abbildung 3.5). Dieser Größenunterschied konnte bei jedem Chemotyp beobachtet werden und ist über alle Chemotypen hinweg betrachtet signifikant (One Way ANOVA nach Rängen, $P \leq 0,001$). Die kleinsten Drüsenschuppen besaß der G-Typ, die größten wurden beim A-Typ gefunden.

Es konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der Drüsenhaare und der Zahl der Drüsenschuppen gefunden werden (One Way ANOVA, $P > 0,05$).

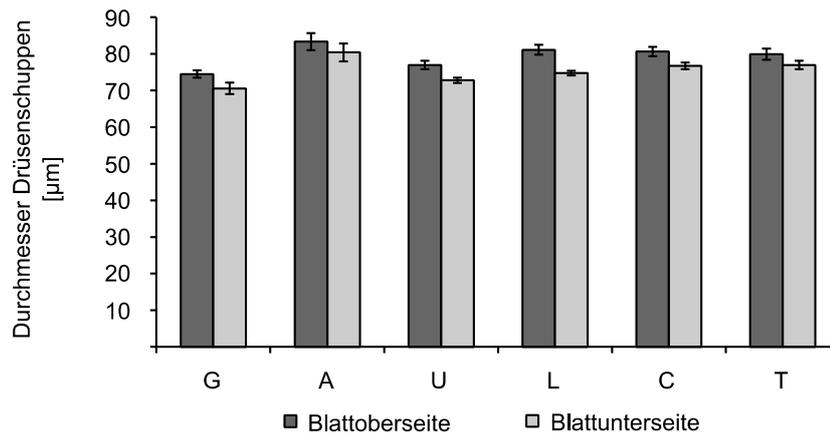


Abbildung 3.5: Durchmesser der Drüsenschuppen auf den Blattober- (dunkelgrau) und Blattunterseiten (hellgrau) der Chemotypen. Angegeben ist der Durchschnitt von jeweils fünf pro Blatt gezählten Drüsenschuppen auf mindestens drei Blättern pro Chemotyp. Der Standardfehler bezieht sich jeweils auf alle Zählungen eines Chemotyps (siehe 6.3.2).

3.1.2.3 Vermessung der Blätter

Neben der Zählung der Drüsenhaare und Drüsenschuppen fand auch eine Vermessung der Blätter der sechs Chemotypen statt. Die Länge und Breite der Blätter wurde mit einem Messokular unter dem Mikroskop bestimmt (Abbildung 3.6). Gemessen wurde jeweils an der längsten und der breitesten Stelle. Die Blätter der Chemotypen waren ungefähr gleich groß und unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Form. Kein Chemotyp hatte signifikant größere Blätter als alle anderen (One Way ANOVA nach Rängen, $P > 0,05$).

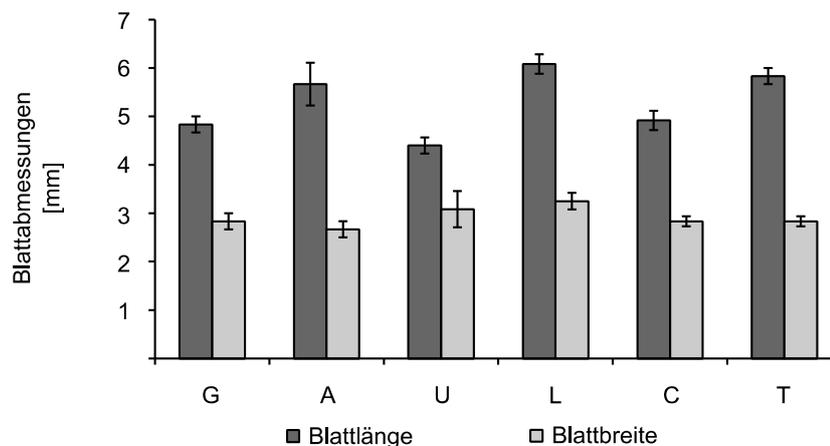


Abbildung 3.6: Länge (dunkelgrau) und Breite (hellgrau) der Blätter der Chemotypen in mm. Pro Chemotyp wurden mindestens drei Blätter vermessen. Die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardfehler wieder.

3.1.3 Die Akkumulation von Terpenen der *Thymus vulgaris*-Chemotypen im Feldversuch

Stecklinge der sechs Chemotypen des Thymians aus Südfrankreich wurden im Mai 2011 auf einem Feld in Groß Schierstedt (Kreis Aschersleben) ausgepflanzt. Bis November 2012 wurden die Pflanzen regelmäßig auf ihren Terpengehalt hin analysiert. Dabei sollte bestimmt werden, ob die Chemotypen stabil sind und wie sich der Gehalt und die Zusammensetzung des ätherischen Öls im Jahresverlauf unter verschiedenen Witterungsbedingungen ändern. Da die Chemotypen als nicht frostresistent gelten, wurden sie im Winter, von Ende Oktober 2011 (26.10.2011) bis Ende März 2012 (29.03.2012), in Gatersleben in einem Kältengewächshaus bei etwa 10 °C untergebracht. Der warme und sonnige März 2012 ließ die Temperatur in diesem Gewächshaus aber schon zeitig auf über 20 °C ansteigen, was eine große Zahl der Versuchspflanzen schon vor dem erneuten Auspflanzen erblühen ließ.

3.1.3.1 Wetterdaten zur Zeit des Feldversuchs

Die Wetterdaten wurden in der Wetterstation am IPK Gatersleben, etwa 18 km Luftlinie von Groß Schierstedt entfernt, gemessen. Für die Auswertung des Feldversuchs wurden die monatlichen Mittelwerte von Temperatur, Niederschlag und Globalstrahlung (die auf Erdoberfläche auftreffende Solarstrahlung) von Juni 2011 bis November 2012 ausgewertet (Abbildung 3.7) und mit den gemessenen Terpengehalten der Pflanzen verglichen.

Die Temperaturmessung erfolgte in 2 m Höhe. Während die Pflanzen auf dem Feld standen, lagen die monatlichen Mittelwerte deutlich über 5 °C. Ungewöhnlich starke Temperaturschwankungen traten während der Zeit des Feldversuchs nicht auf, die wärmsten Monate in der Versuchszeit waren der August 2011 und der August 2012 (Abbildung 3.7A). Der wärmste Tag des gesamten Feldversuchs war der 28. August 2012 (Tagesmittel: 26,48 °C), der kälteste Tag der 15. November 2012 (Tagesmittel: -2,77 °C). Von Juni bis September 2011 lagen die monatlichen Niederschlagsmengen mit ca. 90 mm relativ hoch. Im Oktober 2011 regnete es dagegen kaum. Auch im Jahr 2012 waren die Sommermonate verhältnismäßig regenreich. Jedoch war 2012 der August trockener als 2011 (Abbildung 3.7B). Die Globalstrahlung war zu Beginn des Feldversuchs sehr hoch und fiel dann bis Ende des Jahres kontinuierlich ab. Im Jahr 2012 stieg sie in den ersten fünf Monaten stark und sank nach dem Spitzenwert im Mai 2012 (221 kWh/m²) über eine Plateauphase wieder auf das Minimum von 2011 (Abbildung 3.7C).

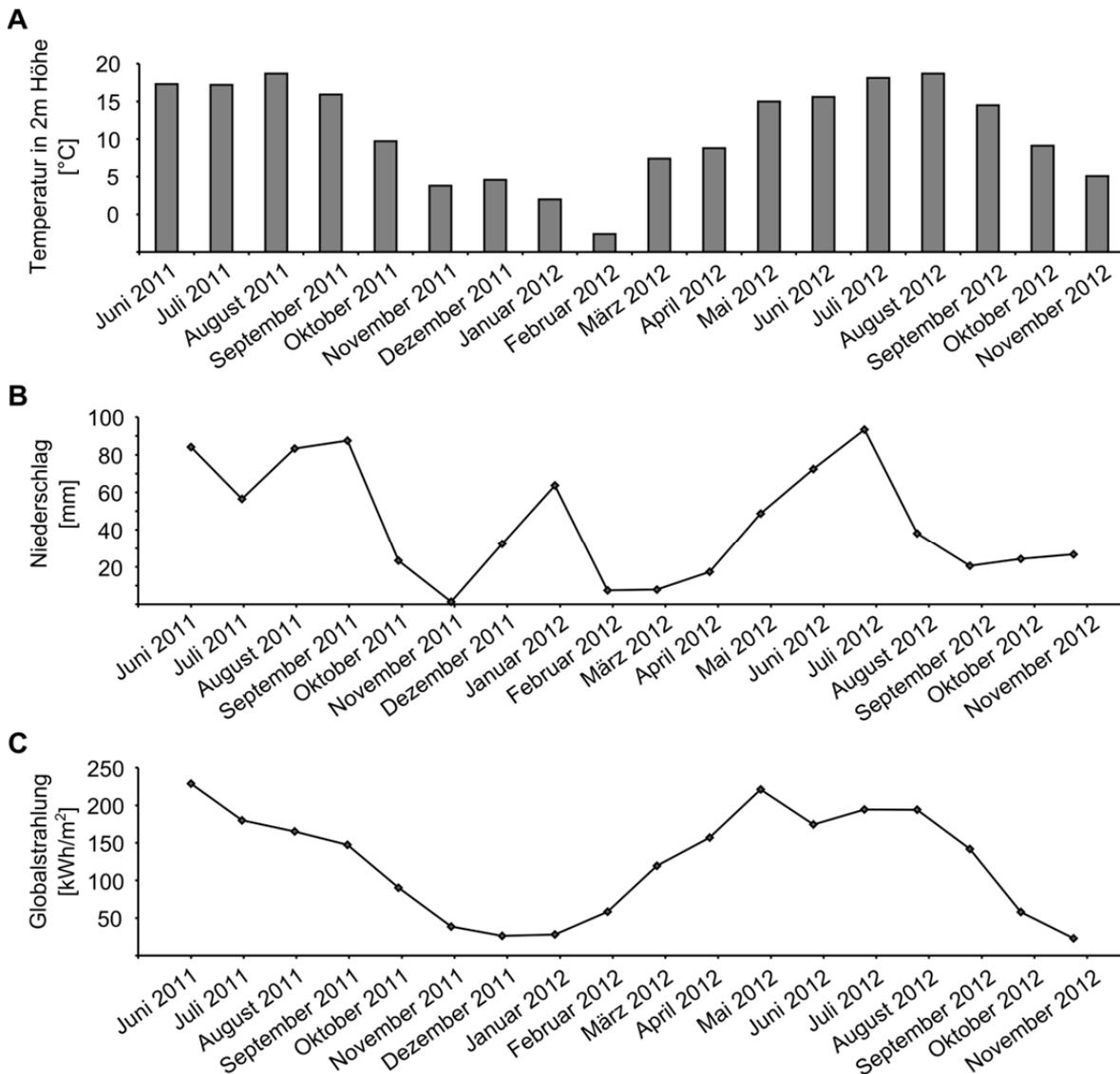


Abbildung 3.7: Monatliche Wetterdaten, gemessen von der Wetterstation im IPK Gatersleben. Dargestellt sind jeweils die monatlichen Mittelwerte von Temperatur (A), Niederschlag (B) und Globalstrahlung (C) von Juni 2011 bis November 2012. Die Wetterdaten sind der Vollständigkeit halber für den gesamten Zeitraum dargestellt, obwohl die Pflanzen von Dezember 2011 bis Februar 2012 im Gewächshaus standen.

Um einen Überblick über die erhaltenen Wetterdaten zu bekommen, wurden die Temperatur, die Niederschlagsmengen und die Globalstrahlung miteinander verglichen.

Für alle drei gemessenen Wetterparameter konnte eine positive Korrelation nach Spearman errechnet werden: Mit einem Temperaturanstieg war ein Anstieg der Globalstrahlung verbunden. Ebenso erhöhte sich mit zunehmender Temperatur auch die Niederschlagsmenge.

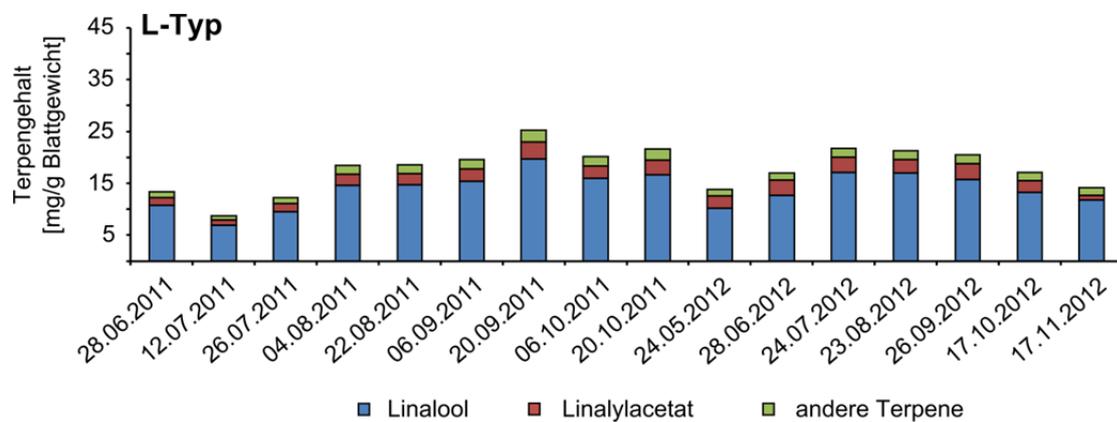
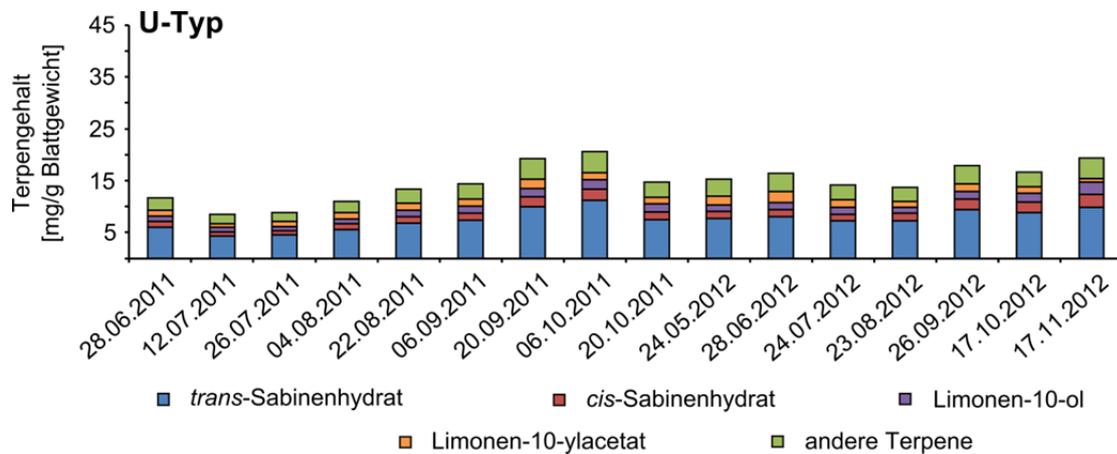
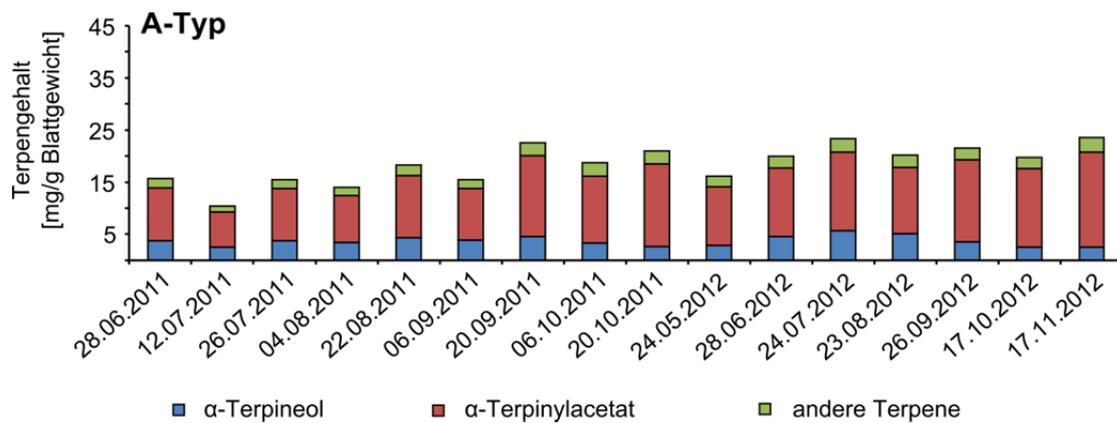
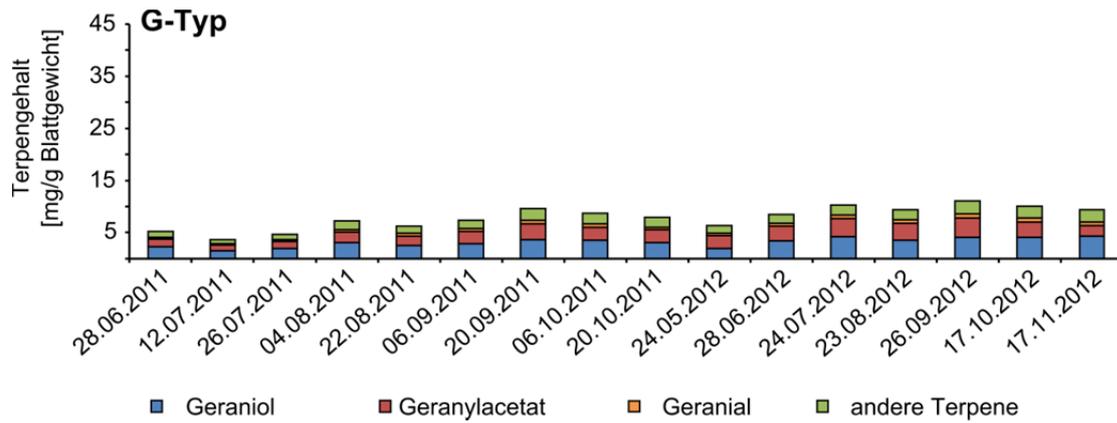
Tabelle 3.2: Spearman's Korrelationskoeffizient für die Wetterparameter des Feldversuchs. Alle berechneten Korrelationskoeffizienten sind signifikant ($P \leq 0,05$).

	Niederschlag	Globalstrahlung
Temperatur	0,666 ($P \leq 0,017$)	0,697 ($P \leq 0,010$)
Niederschlag		0,594 ($P \leq 0,039$)

3.1.3.2 Bestimmung des Terpengehalts der Chemotypen in der Freilandkultur

Alle Chemotypen wurden am 19. Mai 2011 als etwa zwei Monate alte Stecklinge ausgesetzt. Die Messung des Terpengehalts der Pflanzen begann am 28. Juni 2011. Der Gehalt an Terpenen wurde in jeder Pflanze in Blättern des zweiten und dritten Nodiums bestimmt, um jeweils möglichst gleichaltrige Blätter zu untersuchen. Bei den Probenahmen wurden jeweils acht Blätter etwa gleicher Größe gesammelt und die Inhaltsstoffe des ätherischen Öls mit Hexan extrahiert. Die qualitative Analyse des Terpenspektrums des ätherischen Öls erfolgte mittels GC/MS, zur Quantifizierung der Terpene wurde eine Kopplung des Gaschromatographen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) (siehe 2.5.4) genutzt. Für die Quantifizierung wurde das Blattmaterial gewogen und davon ausgegangen, dass die Extraktion der Inhaltsstoffe des ätherischen Öls immer vollständig erfolgte.

Bei allen Chemotypen konnte eine Verringerung des Terpengehalts am zweiten Messtag (12.07.2011) beobachtet werden, danach stieg der Terpengehalt bei allen Pflanzen (Abbildung 3.8). Während bei den phenolischen Chemotypen der Terpengehalt Ende Oktober 2011 am höchsten war, hatten die nicht-phenolischen Chemotypen ihren maximalen Terpengehalt schon Ende September bzw. Anfang Oktober 2011 erreicht. Am 26. Oktober 2011 wurde der Feldversuch unterbrochen und die Chemotypen überwinterten in einem Kältegewächshaus im IPK Gatersleben. Die Pflanzen wurden am 29. März 2012 an der ursprünglichen Stelle wieder ausgebracht und die Sammlung am 24. Mai 2012 fortgesetzt. Eine starke Verringerung des Terpengehaltes trat 2012 nur beim Thymoltyp erneut auf. Im Herbst 2012 konnte ein Abfall des Terpengehaltes nur beim G-Typ und beim L-Typ beobachtet werden. Die anderen Chemotypen blieben bis zum Ende des Versuchs auf einem gleichbleibend hohen Terpeniveau.



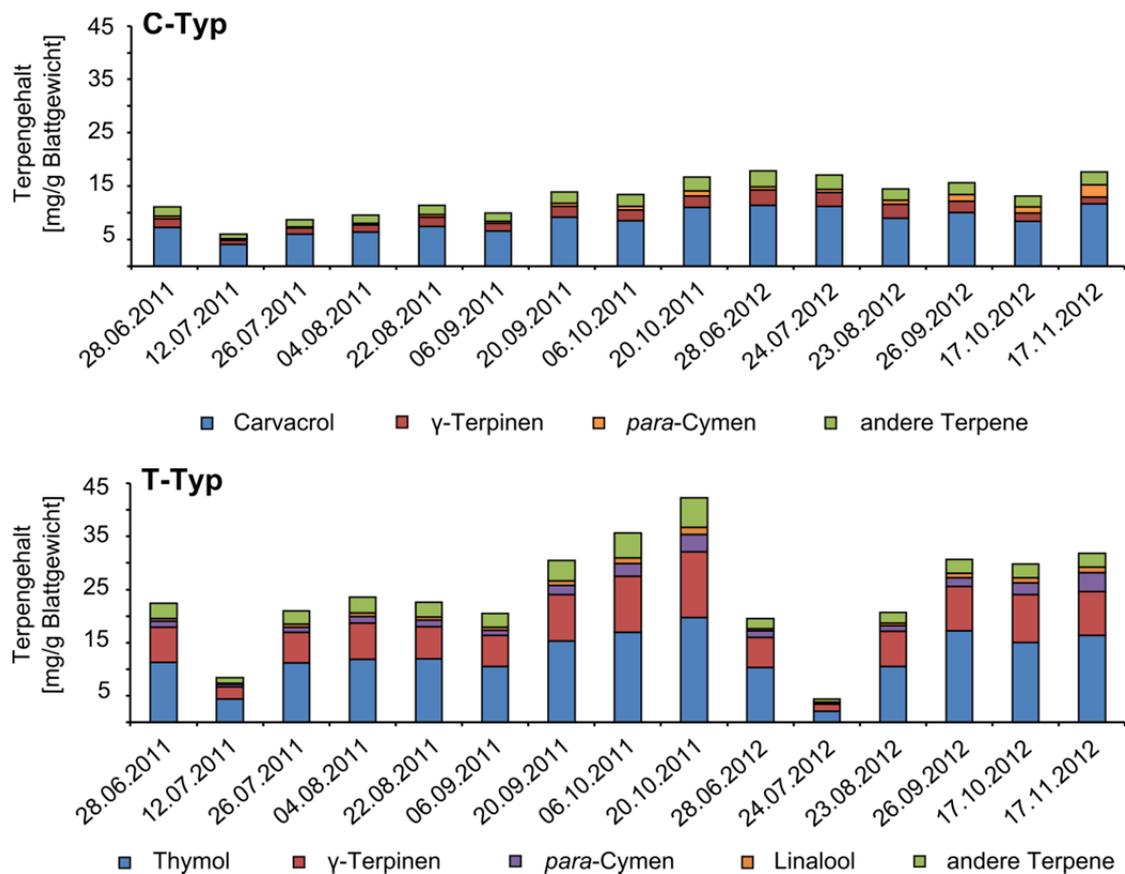


Abbildung 3.8: Terpenegehalt der Thymian-Chemotypen im Feldversuch. Jedes Diagramm zeigt den Terpenegehalt des angegebenen Chemotyps zu den angegebenen Sammeldaten. Das jeweilige Hauptmonoterpen ist blau dargestellt, weitere charakteristische Terpene des jeweiligen Typs in rot, lila und orange. Alle anderen quantifizierten Terpene wurden zusammengefasst und als grüner Balken dargestellt. Die Summe der gemessenen Terpene ergab die Gesamtterpenmenge.

Der Vergleich der Gesamtterpenmengen zeigte, dass im G-Typ mit maximal 10,4 mg/g Blattgewicht (September 2012) deutlich weniger Terpene im ätherischen Öl nachweisbar sind als in allen anderen Chemotypen. Der Mittelwert aller Terpene, gemessen über alle Chemotypen und Messdaten, betrug 16,1 mg/g Blattgewicht. Die größten Schwankungen im Terpenegehalt zeigten sich im T-Typ. Mit 43,4 mg/g Blattgewicht produzierte dieser Chemotyp im Oktober 2011 die meisten Terpene: Dagegen wurde im Juli 2012 mit 4,9 mg/g Blattgewicht nur ein gutes Zehntel dieses Maximalwertes gemessen. Über das gesamte Versuchsjahr betrachtet, produzierten der G-, der A- und der C-Chemotyp 2012 signifikant mehr Terpene als 2011 (One Way ANOVA, $P \leq 0,033$). Für die anderen drei Chemotypen konnte keine signifikante Änderung des Terpenegehalts beobachtet werden (One Way ANOVA, $P > 0,05$).

Der Hauptbestandteil des ätherischen Öls des A-Typs war α -Terpinylacetat, ein Derivat des namensgebenden Hauptmonoterpens α -Terpineol. Bei allen anderen Chemotypen war das

namensgebende Monoterpen auch dasjenige, das den größten Anteil an der Gesamtterpenmenge bildete (Abbildung 3.8, Tabelle 3.3). Das Verhältnis von Hauptmonoterpen und Gesamtterpenmenge blieb über alle Messtage hinweg konstant. Auch für den A-Typ konnte solch ein konstantes Verhältnis gefunden werden, wenn man die Summe von α -Terpineol und α -Terpinylacetat im Vergleich zur Gesamtterpenmenge betrachtete.

Tabelle 3.3: Mittelwerte des Gesamtterpengehalts aller Chemotypen über den Zeitraum des Feldversuchs und Anteil des jeweiligen Hauptmonoterpens am Gesamtterpengehalt.

	Gesamtterpengehalt [mg/g]	Hauptmonoterpengehalt [mg/g]	Anteil des Hauptmonoterpens an der Gesamtterpenmenge [%]
G	7,4	3,1	42,1
A	18,6	3,7	19,8
U	14,9	7,6	51,0
L	17,9	13,9	77,8
C	13,3	8,5	64,0
T	24,9	12,3	49,4

Im Vergleich zu den Pflanzen aus dem Gewächshaus (Tabelle 3.1) hatten die Pflanzen der Freilandkultur einen deutlich höheren Terpengehalt. Der G-Typ produzierte auch auf dem Feld die wenigsten Terpene von allen sechs Chemotypen. Der Gesamtterpengehalt des U- und der C-Typs war ungefähr gleich hoch, in der Freilandkultur produzierten beide etwa doppelt so viele Terpene wie im Gewächshaus. Die Pflanzen des L-Typs produzierten etwa gleich viele Terpene, während beim A- und beim T-Typ ein Anstieg des Gesamtterpengehalts im Vergleich zu den Gewächshauspflanzen zu verzeichnen war.

3.1.4 Korrelation des Gesamtterpengehalts der Chemotypen mit den Wetterparametern

Im Feldversuch sollte untersucht werden, inwiefern die Umweltbedingungen einen Einfluss auf die Terpenproduktion der Chemotypen hatten und ob die Typen unterschiedlich auf die Witterungsbedingungen reagierten. Dazu wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die Gesamtterpengehalte der einzelnen Chemotypen und die Wetterparameter

bestimmt (Tabelle 3.4). Für den T-Typ konnte für alle Parameter ein signifikanter negativer Koeffizient berechnet werden. Eine signifikante negative Korrelation gab es auch zwischen der Globalstrahlung und den Terpenegehalten des U- sowie des G-Typs. Die Temperaturwerte korrelierten negativ mit dem Gesamtterpenegehalt des U-Typs. Für alle anderen Kombinationen konnte keine Korrelation gefunden werden.

Tabelle 3.4: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient für den Gesamtterpenegehalt der Chemotypen und die Wetterparameter. Signifikante Korrelationsergebnisse ($P \leq 0,05$) sind fett hervorgehoben.

Chemotyp	Temperatur	Niederschlag	Globalstrahlung
G	-0,350 ($P \leq 0,178$)	-0,229 ($P \leq 0,384$)	-0,429 ($P \leq 0,094$)
A	-0,381 ($P \leq 0,139$)	-0,211 ($P \leq 0,422$)	-0,353 ($P \leq 0,174$)
U	-0,769 ($P \leq 0,000$)	-0,416 ($P \leq 0,107$)	-0,646 ($P \leq 0,007$)
L	0,0296 ($P \leq 0,091$)	0,043 ($P \leq 0,865$)	-0,279 ($P \leq 0,287$)
C	-0,410 ($P \leq 0,124$)	-0,031 ($P \leq 0,257$)	-0,145 ($P \leq 0,593$)
T	-0,582 ($P \leq 0,22$)	-0,615 ($P \leq 0,001$)	-0,787 ($P \leq 0,000$)

3.1.5 Der Terpenegehalt korreliert nicht mit der Anzahl der Drüschuppen

Zwischen den Chemotypen wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Menge der produzierten Terpene festgestellt (siehe 3.1.3.2). Da die glandulären Trichome die Bildungsorte des ätherischen Öls sind, wurde deren Anzahl und Größe bestimmt (siehe 3.1.2.2). Zusätzlich wurden die Blätter vermessen und die Drüsenhaare gezählt (siehe 3.1.2.1 und 3.1.2.3). Mit der Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Gesamtterpenegehalt der Pflanzen und den gemessenen Parametern der Blätter besteht. Es konnte kein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient für die Terpenegehalte der Pflanzen der Feldkultur und die Blattmorphologie bestimmt werden ($P > 0,05$).

3.2 Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Monoterpensynthasen aus *Thymus vulgaris*

3.2.1 Identifizierung der Terpensynthasegene

Die Identifizierung der Terpensynthasegene aus *Thymus vulgaris* erfolgte durch RACE-PCR. Als genspezifische Primer wurden dabei degenerierte Primer gewählt, die an konservierte Regionen von Monoterpensynthasen binden (siehe 6.1, Abbildung 3.9 für konservierte Regionen). Die erhaltenen Fragmente wurden in pCR[®]4-TOPO kloniert und sequenziert. Aus diesen Genfragmenten wurden genspezifische Primer erstellt und weitere RACE-PCRs in 5'- und 3'-Richtung durchgeführt. Auf diese Weise konnten die in dieser Arbeit verwendeten Terpensynthasegene *Tvtps2* (Accession-Nr. JX997981), *Tvtps3* (Accession-Nr. JX997982), *Tvtps4* (Accession-Nr. JX997983) von Julia Asbach (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) und die Gene *Tvtps6* und *Tvtps7* von Sandra Krause (Krause et al., 2012) identifiziert werden. *Tvtps5* (Accession-Nr. KC461937) wurde mit den genspezifischen pASK-Iba37-Primern von *Tvtps6* im A-Chemotyp gefunden. Das fehlende 5'-Ende wurde anschließend mittels RACE-PCR amplifiziert (Tabelle 3.5). Die Bezeichnung der Gene erfolgte nach folgenden Kriterien: An den Anfang wurde der Organismus gestellt, aus dem das Gen isoliert wurde (*Thymus vulgaris*). Die Abkürzung *tps* leitet sich von Terpensynthese ab. Die Nummerierung erfolgte nach der Reihenfolge der Identifizierung aus *Thymus vulgaris* sowie dem Vergleich mit bereits bekannten Terpensynthasen aus *Oregano* (Crocoll et al., 2010).

Tabelle 3.5: Merkmale der isolierten Terpensynthasen. Die mögliche Länge des Signalpeptides wurde mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) bestimmt. n.p. = not predicted

	ORF Länge [bp]	Proteinlänge [aa]	Signalpeptid [aa]	Chemotyp aus dem das Gen isoliert wurde
<i>Tvtps2</i>	1791	597	46	T
<i>Tvtps3</i>	1788	596	54	L
<i>Tvtps4</i>	1740	580	n.p.	L
<i>Tvtps5</i>	1794	598	47	A
<i>Tvtps6</i>	1812	604	47	U
<i>Tvtps7</i>	1794	598	47	U

Alle erhaltenen Terpensynthasegene kodierten für Proteine mit typischen Motiven von Monoterpensynthasen (Abbildung 3.9). Außer für *TvTPS4* wurde mit dem Programm SignalP für alle Terpensynthasen ein Signalpeptid vorhergesagt. Dieses lag typischerweise vor dem RR(x)₈W-Motiv, das in allen sechs Terpensynthasen vorhanden war. Auch zwei konservierte Metallionenbindestellen (DDxxD- und DTE-Motiv) sowie das für die Substratbindung und Katalyse wichtige RxR-Motiv konnten in allen Sequenzen identifiziert werden. Neben diesen bekannten konservierten Regionen für Monoterpensynthasen (Cane et al., 1996; Starks et al., 1997; Williams et al., 1998; Cane et al., 2000) wurden im Sequenzvergleich auch viele weitere identische Bereiche gefunden.

	10	20	30	40	50	60
TvTPS2
TvTPS2	MASLSMQVST	LSKQVKNLN-	---TFGMGSA	SKLPMVARRV	STTR-----	-LRPICSASL
TvTPS3	MSATISVLHH	ATILPKPAND	VVLCKNKRAS	NINPWTPSLs	ISS-----	--KLDTKNPG
TvTPS4	MILSSAKTRE	LQILIHGV--	-----	---PLSP-LS	ISS-----	--KLDTK---
TvTPS5	--MSTISINH	VGILRNPLQ-	---CKNKRTS	INKPWSLSLP	RSPPASRLVK	PCRVSskVDt
TvTPS6	--MSTISINH	VGLLRNPLH-	---GKSKRAS	INKSWSLCLP	RSSASRLVK	PCRVSskTDT
TvTPS7	--MSTISINH	VGILRNPLQ-	---CKNKRTS	INKPWSLSLP	RSSPASRLVK	PCRVSskVDt

	70	80	90	100	110	120
TvTPS2
TvTPS2	QVEEETRRSG	NYQAPVWNNd	FIQSFST-DK	YKDEKYLKKK	EELIAQVKVL	LNTKMEAVKQ
TvTPS3	TVKDR-RRSG	NYRPALWDFs	YIQSLNTHDH	YNKE--VRRG	E-LIVEVKKL	LGEEIGAVKQ
TvTPS4	TEKDR-RRSG	KYRPALWDFN	FIQSLNTNDH	YHKE--VHRQ	EELIVEVKKL	LGEEIEAVKQ
TvTPS5	MPAEITRRSG	NYEPSLWDFD	FIQSLDDHHP	YVKEKQLKRE	EELIVQVKML	LGTKMEAVKQ
TvTPS6	KPAEMITRRSG	NYEPSLWDFD	FIQSLDNHHP	HVKEKQLKRE	EELIVEVKML	LGTKIEAVKQ
TvTPS7	MPDEITRRSG	NYEPSLWDLd	FIQSLDNHHP	YVKEMQLKRE	EELIVQVKML	LGTKMEAVKQ

RR(x)_gW

	130	140	150	160	170	180
TvTPS2
TvTPS2	LELIEDLRNL	GLTYFFEDeF	KKILTsiYNE	HKGfKNEQVG	----DLYFTS	LAFRLRLHGG
TvTPS3	LELIDDLKNL	GLSYFFQEEI	RNVLGSiYAE	HKFFRNnQVE	GSK-DLYFTA	LGFRLLREAG
TvTPS4	LELIDDLKNL	GLSYFCQEEI	RNVLGSiYVE	HKFFINnQVE	GSKLDLYFTA	LGFRLLFREAG
TvTPS5	LELIDDLKNL	GLSYFFREEI	KTILTsiYNN	SFEN-nNKVG	----DLYFTA	LGFRLLRQHGG
TvTPS6	LELIDDLKNL	GLSYFFRDEI	KMVLTSiYNN	FFENKNNQVG	----DLYFTA	LGFRLLRQHGG
TvTPS7	LELIDDLKNL	GLSYFFRDEI	KTILTsiYNN	SFEN-nNQVG	----DLYFTA	LGFRLLRQHGG

	190	200	210	220	230	240
TvTPS2
TvTPS2	FDVSEdVFNf	FKNEdGSDFK	AS-LGENTKd	VLELYEASFL	IRVGEVTLEQ	ARVFSTKILE
TvTPS3	FNISQEVFDR	FKNEEGSGFE	ER-LGEdTKG	MLQLYEASFL	LREGEdTLEL	ARQISTEFLK
TvTPS4	FSVSQEVFDR	FKNEESSGFE	EC-LGEdTKG	MLQLYEASFL	LREGEdTLEL	ARQISTKFLQ
TvTPS5	FNVSQQIFDC	FK---GNDFD	ETIIGEdTKG	ILQLYEASFH	LREGENTLEL	ARQISTKYLQ
TvTPS6	FNVSQEIFDC	FKNEKGSDFD	ETLIIGEdTKA	TLQLYEASFH	LREGENTLEL	ARQISTKYLQ
TvTPS7	FNVSQQIFDC	FK---DNDFD	ETLIIGEdTKG	ILQLYEASFH	LREGENTLEL	ARQISTKYLQ

	250	260	270	280	290	300
TvTPS2
TvTPS2	KKVEEG-IKd	-EKLLAWIQH	SLALPLHWRI	QRLEARWFLD	AYKARKDMNP	IYELGKIDF
TvTPS3	EKLDGTEISD	-GNLSSSiRH	SLEIPLHWRI	QRLEARWFLD	AYAARKDMNP	LIFELAKLDF
TvTPS4	EKLDGTQISD	DNNLSSSiRH	SLEIPLHWRI	QRLEARWFLD	AYAARKDMNP	FIFELAKLDF
TvTPS5	KKVDEGSIND	-ENLSSWiRH	SLDLPLHWRI	QRLEARWFLD	AYTVREDKNP	LIFELAKLDF
TvTPS6	KKVDEGSIND	-ENLSSWiRH	SLDLPLHWRI	QRLEARWFLD	AYAAREDKNP	LIFELTKLDF
TvTPS7	KKVDEGSIND	-ENLSSWiRH	SLDLPLHWRI	QRLEARCFLD	AYAAREDKNP	LIFKLAELDF

	310	320	330	340	350	360
TvTPS2
TvTPS2	HIIQETQLQE	VQEVsQWWTN	TNLAEKLPFV	RDRIVECYFW	ALGLFEPHEY	GYQRKMAAII
TvTPS3	NNIQATQQQE	LKDLsRWwKN	LsLPVKLPFV	RDRLVESYFW	AVGLFEPHKF	GYQRKIAAKI
TvTPS4	NIIQAAQQQE	LKDLsRWwKN	LsLPEKLPFV	RDRLVESYFW	AVGLFEPHTF	GNQRKIAAKI
TvTPS5	NIIQATQQQE	LKEVsRWwND	SCLAEKLPFV	RDRVVESFFW	AVGLFEGHEF	GYQRKMTTAAI
TvTPS6	NIIQATQQQE	LKEVsRWwNN	SRLAEKLPFV	RDRVVECYFW	AVGLFDGHdY	GFQRKVNAAV
TvTPS7	NIIQATQQQE	LKEISRWwND	SSLAEKLPFV	RDRVVECYFW	AVGLFEGHEF	GFQRKITAAI

R_xR

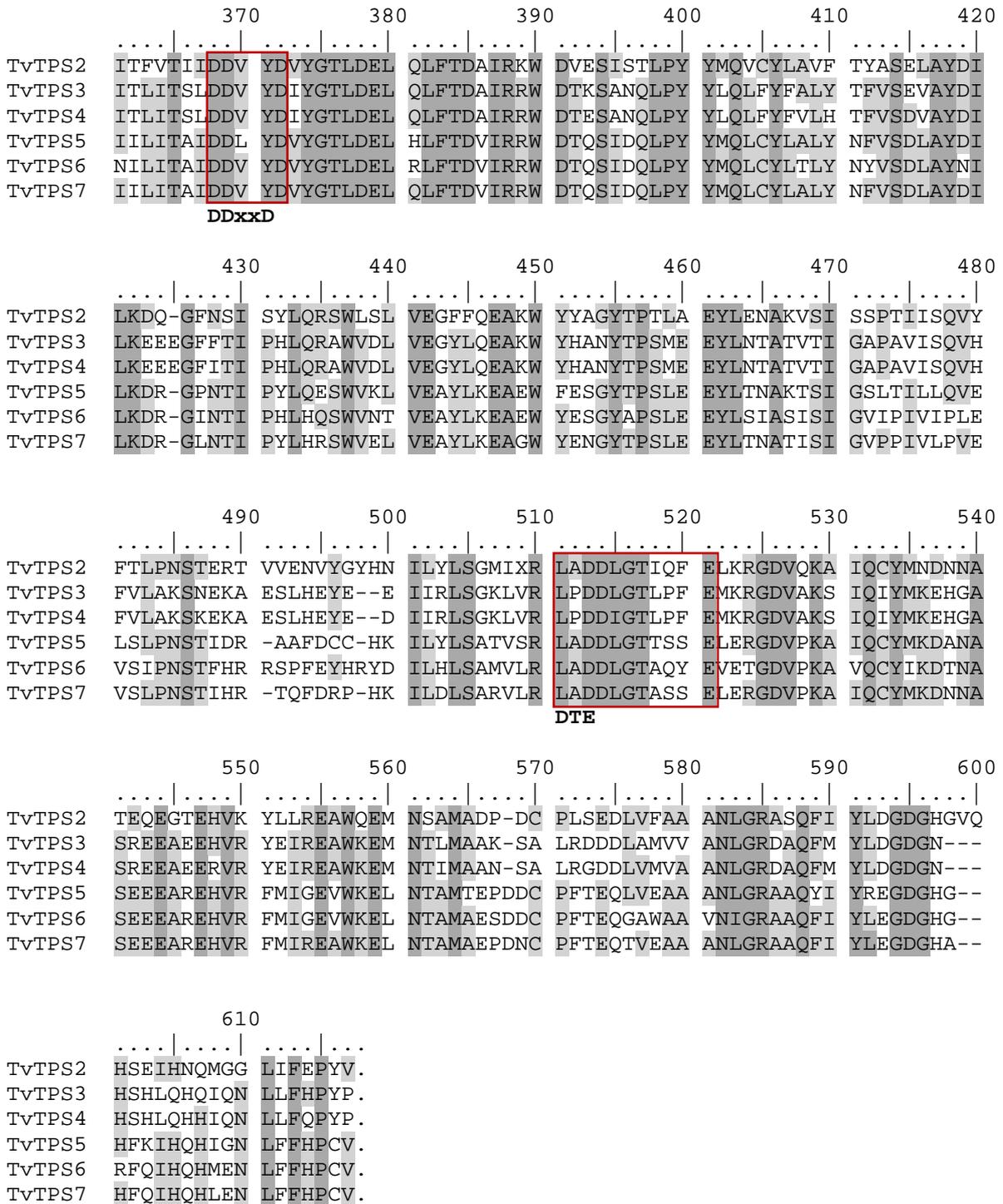


Abbildung 3.9: Vergleich der Proteinsequenzen der sechs aus den *Thymus vulgaris*-Chemotypen isolierten Terpensynthasegene aus Tabelle 3.5. Aminosäuren, die in allen sechs Sequenzen identisch sind, wurden dunkelgrau hinterlegt. In mindestens vier Sequenzen identische Aminosäuren wurden hellgrau markiert. Charakteristische konservierte Motive (RR(x)₈W, RxR, DDxxD, DTE) wurden gekennzeichnet. Das Stopcodon wurde im Proteinalignment mit einem Punkt (.) dargestellt.

Die Berechnung der Sequenzähnlichkeit zwischen den Terpensynthasen auf Aminosäureebene führte zu Identitäten von bis zu 90 % (Tabelle 3.6). Eine besonders hohe Sequenzhomologie wurde bei TvTPS6 und TvTPS7 (84,4 %), TvTPS3 und TvTPS4 (86,2 %) sowie TvTPS5 und TvTPS7 (90,1 %) gefunden.

Tabelle 3.6: Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen aus Abbildung 3.9. Die Berechnung erfolgte mit Bio Edit „Sequence Identity Matrix“. ID = gleiche Sequenz. Alle Angaben in %.

	TvTPS2	TvTPS3	TvTPS4	TvTPS5	TvTPS6	TvTPS7
TvTPS2	ID	52,4	52,3	56,8	54,2	56,6
TvTPS3		ID	86,2	57,5	56,1	58,6
TvTPS4			ID	56,0	55,1	57,5
TvTPS5				ID	82,0	90,1
TvTPS6					ID	84,4
TvTPS7						ID

3.2.2 Funktionelle Analyse der identifizierten Terpensynthasen

Die identifizierten Terpensynthasen wurden in einem heterologen Expressionssystem exprimiert und anschließend *in vitro* charakterisiert, um ihre Funktionalität und ihr Produktspektrum zu untersuchen (siehe 2.4.1 und 2.5.1).

Monoterpensynthasen sind mit ihrem Signalpeptid oft inaktiv (Williams et al., 1998; Turner et al., 1999), weshalb die Amplifikation der Terpensynthasegene für die Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-Iba37plus erst ab drei Aminosäuren vor dem RR(x)₈W-Motiv erfolgte. Über *BsaI*-Schnittstellen erfolgte die gerichtete *in frame*-Ligierung in den Expressionsvektor. Die Vermehrung und die anschließende, durch Anhydrotetrazyklin induzierte, Expression erfolgte in *Escherichia coli* TOP10. Durch den Aufbau des Vektors wurden die Terpensynthasegene mit einem n-terminalen 6xHisTag exprimiert. Nach partieller Aufreinigung wurden die Proteine mit dem potentiellen Substrat GPP sowie dem Cofaktor Mg²⁺ inkubiert. Die Produkte wurden gaschromatographisch analysiert und sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

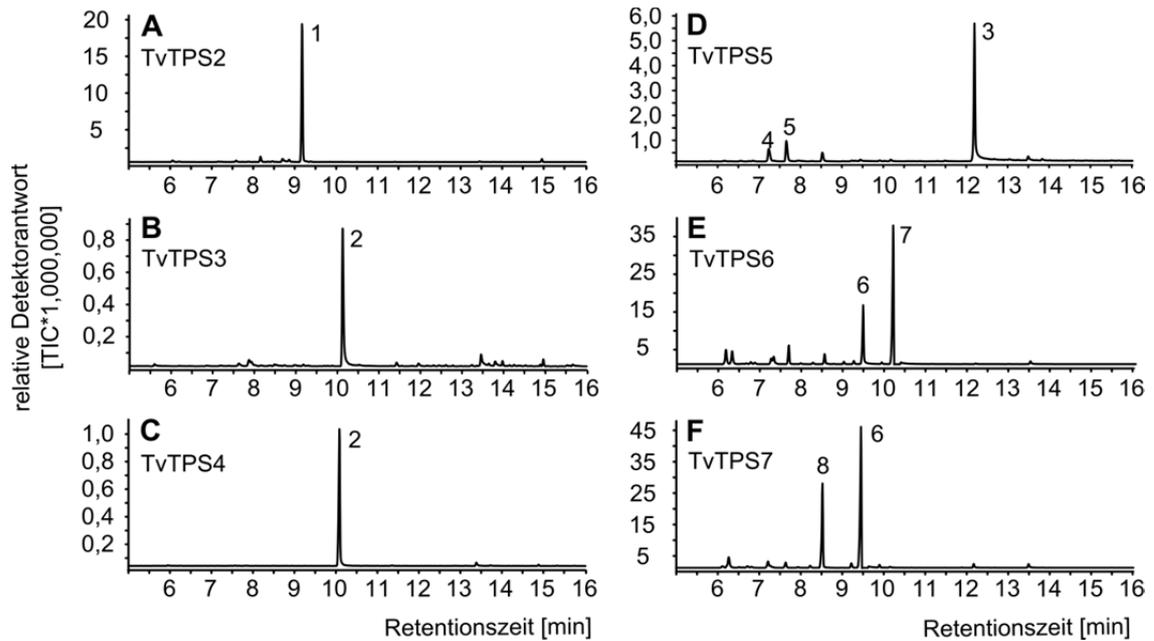


Abbildung 3.10: Monoterpenprodukte der Terpensynthasen TvTPS2 (A), TvTPS3 (B), TvTPS4 (C), TvTPS5 (D), TvTPS6 (E) und TvTPS7 (F) aus *Thymus vulgaris*. Die Enzyme wurden mit dem Substrat GPP und dem Cofaktor Mg^{2+} für eine Stunde bei $37^{\circ}C$ inkubiert und die entstehenden Produkte an SPME-Fasern gebunden. Die Analyse der Produkte erfolgte über GC/MS und dem Vergleich der Massenspektren mit denen von authentischen Standards. Die Terpenprodukte sind: 1 γ -Terpinen, 2 Linalool, 3 α -Terpineol, 4 Sabinen, 5 Myrcen, 6 *cis*-Sabinenhydrat, 7 *trans*-Sabinenhydrat, 8 Limonen

Alle sechs Terpensynthasen akzeptierten GPP als Substrat und produzierten fast ausschließlich ein Hauptmonoterpen. Das Hauptprodukt von TvTPS2 war γ -Terpinen. Spuren von α -Terpinen und α -Thujen konnten ebenfalls identifiziert werden. Die beiden Terpensynthasen TvTPS3 und TvTPS4 produzierten ausschließlich Linalool. Das Hauptprodukt von TvTPS5 war α -Terpineol, als Nebenprodukte wurden Sabinen und Myrcen identifiziert. TvTPS6 und TvTPS7 bildeten als Hauptprodukte Stereoisomere des Sabinenhydrats. TvTPS6 produzierte sowohl *cis*- als auch *trans*-Sabinenhydrat. Das Hauptprodukt von TvTPS7 war *trans*-Sabinenhydrat. Im Chromatogramm konnten auch größere Mengen von Limonen detektiert werden (Krause et al., 2012).

Die sechs isolierten Terpensynthasen waren somit in der Lage, drei Hauptmonoterpene (Linalool, α -Terpineol und *trans*-Sabinenhydrat) der sechs *Thymus vulgaris*-Chemotypen zu bilden. Außerdem wurde mit der TvTPS2 ein Enzym gefunden, welches γ -Terpinen synthetisiert; ein Terpen, das im Biosyntheseweg der phenolischen Monoterpene Thymol und Carvacrol eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Poulose et al., 1978b).

3.3 Die mögliche Bildung von Geraniol durch Phosphatasen

Im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit konnte keine Terpensynthase identifiziert werden, die Geraniol synthetisiert. Dieses ist jedoch das Hauptmonoterpen des G-Chemotyps. Daher wurde überlegt, wie Geraniol ohne die Aktivität von Terpensynthasen gebildet werden könnte. Das Hauptmonoterpen im G-Typ entsteht möglicherweise durch eine von Phosphatasen katalysierte Hydrolyse von GPP zu Geraniol. Solch eine Reaktion wurde bei der Negativkontrolle zu den Aktivitätsassays der funktionsfähigen Terpensynthasen beobachtet. Diese Negativkontrolle war ein leerer pASK-Iba37-Vektor, kloniert und exprimiert in TOP10-*E. coli*-Zellen. Im Assay der Leervektorkontrolle wurden Geraniol und verschiedene Derivate im GC-Chromatogramm detektiert, die nur von den bakteriellen Phosphatasen gebildet worden sein konnten (Abbildung 3.11A). Exakt das gleiche Peakmuster trat im GC-Chromatogramm des Geraniol-Chemotyps auf (Abbildung 3.11B).

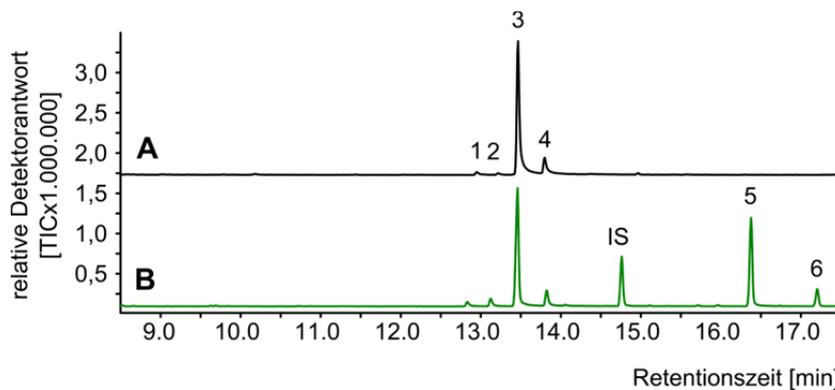


Abbildung 3.11: Vergleich der GC-Chromatogramme eines Aktivitätsassays des Leervektors (A) und eines Hexanextrakts des G-Typs (B). Die Analyse der Produkte des Aktivitätsassays wurden mittels SPME und GC/MS, die Hexanextrakte wurden direkt mittels GC/MS vermessen. Beide Chromatogramme zeigen dasselbe Auftreten von Geraniol (3), Nerol (1), Geranial (4) und Neral (2). Im Hexanextrakt des G-Typs wurden zusätzlich Geranylacetat (5) und (*E*)- β -Caryophyllen (6) detektiert. IS = interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μ l)

Gab man zum aufgereinigten Proteinextrakt etwa eine Stunde vor Zugabe des Substrats GPP einen Phosphataseinhibitor (hier PhosSTOP von Roche) hinzu, konnte kein Geraniol mehr detektiert werden. Um zu testen, ob eine Deaktivierung pflanzlicher Phosphatasen im G-Typ zu einer Veränderung der produzierten Geraniolmenge führte, sollten Pflanzenextrakte des Chemotyps mit einem Phosphataseinhibitor behandelt werden. Allerdings scheiterte der

Versuch, da es nicht möglich war, aktive Proteinextrakte aus Blattmaterial der *Thymus vulgaris*-Chemotypen zu isolieren.

3.4 Die Chemotypbildung in *Thymus vulgaris*

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit war die Regulation der Chemotypbildung in *Thymus vulgaris*. Mit der Identifizierung der Gene, deren Translationsprodukte die Hauptmonoterpene der Chemotypen bilden (siehe 3.2), konnte untersucht werden, wie die Terpenproduktion in den Chemotypen reguliert wird.

Die Ausprägung der Chemotypen kann sowohl auf verschiedenen Stufen im Stoffwechsel als auch epigenetisch reguliert werden. Bei Vorliegen eines allelischen Polymorphismus besitzt ein Chemotyp nur ein Gen, das eine Terpensynthese kodiert. Die jeweiligen Allele dieses Gens würden die Produktion des jeweiligen Hauptmonoterpens bestimmen, während die anderen Terpene nicht produziert werden können. Sind stattdessen alle Terpensynthesen als unabhängige Gene vorhanden, könnte eine differentielle Transkription der Gene zur Ausprägung der verschiedenen Chemotypen führen. Dies würde anschließend die Frage aufwerfen, welche Elemente eine unterschiedliche Expression der Gene steuern.

3.4.1 *Tvtps2g* ist eine typische Terpensynthese der Klasse III und liegt im Genom jedes Chemotyps vor

Wenn Chemotypbildung auf allelischem Polymorphismus beruht, können im diploiden Genom von *Thymus vulgaris* nur eine oder maximal zwei Terpensynthesen kodiert sein, die dem jeweiligen Chemotyp entsprechen. Ist das für eine bestimmte Terpensynthese kodierende Gen nicht im Genom vorhanden, so kann auch das zugehörige Terpen nicht gebildet werden. Diese Möglichkeit der Chemotypbildung wurde am Beispiel von *Tvtps2* untersucht. Das für die γ -Terpinensynthese kodierende Gen sollte der Hypothese nach nur in der genomischen DNA des C- und T-Typs zu finden sein.

Die Isolation von *Tvtps2* aus der genomischen DNA erfolgte mit genspezifischen Primern, die auf der Basis der aus dem Thymotyp isolierten cDNA erstellt wurden. Bei der aus dem T-Typ isolierten genomischen Sequenz *Tvtps2g* (g = genomisch) handelte es sich um eine

typische Klasse-III-Terpensynthase (Trapp et al., 2001) mit sieben Exons und sechs Introns (Abbildung 3.12). Das RR(x)₈W-Motiv lag im ersten Exon, das RxR- und das DDxxD-Motiv waren im vierten Exon zu finden. Das ebenfalls an der Cofaktorbindung beteiligte DTE-Motiv wurde vom sechsten Intron geteilt. Bei den sechs Introns des *Tvtps2g*-Gens handelte es sich um spleißosomale GT-AG-Introns.

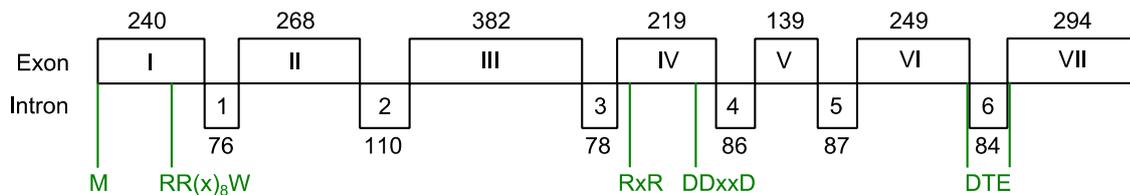


Abbildung 3.12: Struktur des γ -Terpinensynthasegens *Tvtps2*. Das Gen besteht aus sieben Exons und sechs Introns, deren Größe (in bp) im T-Typ ebenfalls dargestellt wurde. Die charakteristischen Motive der Monoterpensynthesen wurden in grün dargestellt. M = Methionin.

Das Strukturgen *Tvtps2g* konnte vollständig aus allen Chemotypen isoliert werden (siehe 6.2.2). In Tabelle 3.7 sind die Größen der Exons und Introns des Gens in den verschiedenen Chemotypen dargestellt. Die Exons hatten in jedem Chemotyp die gleiche Länge und unterschieden sich nur in einigen Nukleotiden, die jedoch keinen vorzeitigen Abbruch bei der Translation hätten verursachen dürfen. Die Introns variierten vor allem in der Länge von polynukleotidreichen Regionen und repetitiven Sequenzen. Ob diese Unterschiede möglicherweise Folge fehlerhafter Amplifikationen der Polymerase bei der PCR waren oder tatsächlich so in der DNA vorlagen, konnte nicht abschließend geklärt werden, da in den verschiedenen Klonen immer verschiedenen Längen aufeinanderfolgender gleicher Nukleotide oder Nukleotidfolgen gefunden wurden. Bei der aus dem G-Typ isolierten Sequenz von *Tvtp2g* fehlte das sechste Intron.

Tabelle 3.7: Größe der Exons und Introns von *Tvtps2g* in bp. Die Größe der Exons ist in allen Chemotypen gleich, Introngrößen unterscheiden sich vor allem in poly-Nukleotidpositionen und repetitiven Sequenzen. E = Exon, In = Intron

	E1	In1	E2	In2	E3	In3	E4	In4	E5	In5	E6	In6	E7
T	240	76	268	110	382	82/78	219	86/83	139	108/89/87	249	84	294
C	240	82	268	98	382	82	219	83	139	80	249	74	294
L	240	75	268	98	382	82	219	83	139	111/107/76	249	82	294
U	240	72	268	106/102	382	78	219	86	139	114/88	249	74	294
A	240	77	268	100/98	382	78	219	83	139	87/77	249	82	294
G	240	80/67	268	102/97	382	73	219	84	139	87	249	-	294

3.4.2 Biochemische Charakterisierung von TvTPS2

Da das Strukturgen *Tvtps2g* in allen Chemotypen vorlag, sollte nun untersucht werden, ob nur im T- und C-Typ aktive Allele vorhanden sind und die anderen Chemotypen Pseudogene besitzen. Dazu sollte *Tvtps2* aus der cDNA aller sechs Chemotypen amplifiziert und anschließend exprimiert werden. Es stellte sich heraus, dass die Amplifikation des Gens aus cDNA nur aus dem L-, C- und T-Typ möglich war. Die später erfolgte Quantifizierung der Transkriptmengen mittels qRT-PCR zeigte, dass *Tvtps2* nur im T- und C-Typ in hohen Maßen sowie im L-Typ in Spuren exprimiert wurde (siehe 3.4.3.1). Die aus den drei Chemotypen erhaltenen Sequenzen wurden miteinander verglichen. Die Allele aus dem L- und C-Chemotyp waren zu 100 % identisch. Da das Allel aus dem T-Typ eine leicht veränderte Proteinsequenz kodiert (siehe 6.2.3), wurden beide Allele exprimiert und auf Aktivität untersucht. Beide Enzyme waren aktiv (Abbildung 3.13).

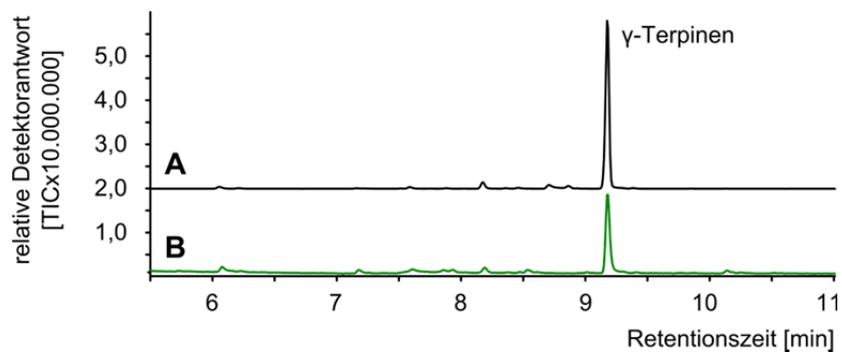


Abbildung 3.13: Vergleich der Produkte der Allele TvTPS2-C (A) und TvTPS2-T (B) gemessen mit SPME. Beide Enzyme bildeten als Hauptprodukt spezifisch γ -Terpinen.

Der Aktivitätsassay ließ aufgrund der Peakfläche von γ -Terpinen, die für das Enzym aus dem C-Typ deutlich größer war als für das T-Typ-Enzym, vermuten, dass die zwei Varianten der γ -Terpinensynthase unterschiedliche Aktivität besaßen. Um zu untersuchen, ob sich die geringen Unterschiede in der Proteinsequenz auf die biochemischen Enzymeigenschaften auswirkten, wurden für TvTPS2-T und TvTPS2-C sowohl der K_m -Wert als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt. Mit dem Rohextrakt des Proteins wurde der K_m -Wert über die Umsetzung von ^3H -GPP gemessen. Für die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit wurde das Enzym über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt (siehe 2.4.2). Die Messungen mit dem gereinigten Protein zur Berechnung des K_m -Wertes und von V_{max} wurden gaschromatographisch durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Biochemische Daten für TvTPS2-T und TvTPS2-C. Die Bestimmung erfolgte mittels ^3H -GPP (radioaktiv) oder über die gaschromatographische Messung des entstandenen γ -Terpinens (GC).

	K_m (radioaktiv)	K_m (GC)	V_{max} (GC)
TvTPS2-T	17,5 μM	13,2 μM	2,0 $\mu\text{M/h}$
TvTPS2-C	22,5 μM	25,5 μM	23,6 $\mu\text{M/h}$

Die K_m -Werte waren für beide Enzyme etwa gleich und lassen keine Unterschiede der Aktivität vermuten. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{max} war jedoch für das Enzym aus dem C-Typ ungefähr zehnmal höher als für TvTPS2 aus dem T-Typ. Damit ist das C-Typ-Enzym in der Lage, in der gleichen Zeit mehr Substrat umzusetzen als TvTPS2-T.

3.4.3 Transkriptanalyse der Monoterpensynthasegene aus

Thymus vulgaris

3.4.3.1 Die Expression der isolierten Terpensynthasegene erfolgt spezifisch in den verschiedenen Chemotypen

Die sechs identifizierten Monoterpensynthasegene produzierten drei Hauptmonoterpene der Chemotypen sowie γ -Terpinen, dem Vorläufermolekül für die phenolischen Hauptmonoterpene Thymol und Carvacrol. Mit der Analyse der Transkriptmengen sollte untersucht werden, ob die identifizierten Terpensynthasen unterschiedlich in den Chemotypen

exprimiert wurden. Mittels relativer qRT-PCR wurden die Transkriptmengen der Monoterpensynthasegene in den einzelnen Chemotypen bestimmt. Die Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte über Vergleich mit dem Referenzgen *yls8* (yellow leaf specific gene 8), welches bereits in Salbei getestet wurde (Prof. J. Novak, Universität Wien, persönliches Gespräch) und sich auch für Thymian als geeignet erwies.

Die Terpensynthasegene wurden spezifisch in den jeweiligen Chemotypen transkribiert (Abbildung 3.14A-F). Das Gen der γ -Terpinensynthase, *Tvtps2*, war im Thymol- und Carvacrolytyp nachweisbar und in Spuren im L-Typ zu finden. In diesen drei Chemotypen konnte auch das Produkt des Enzyms, γ -Terpinen, detektiert werden.

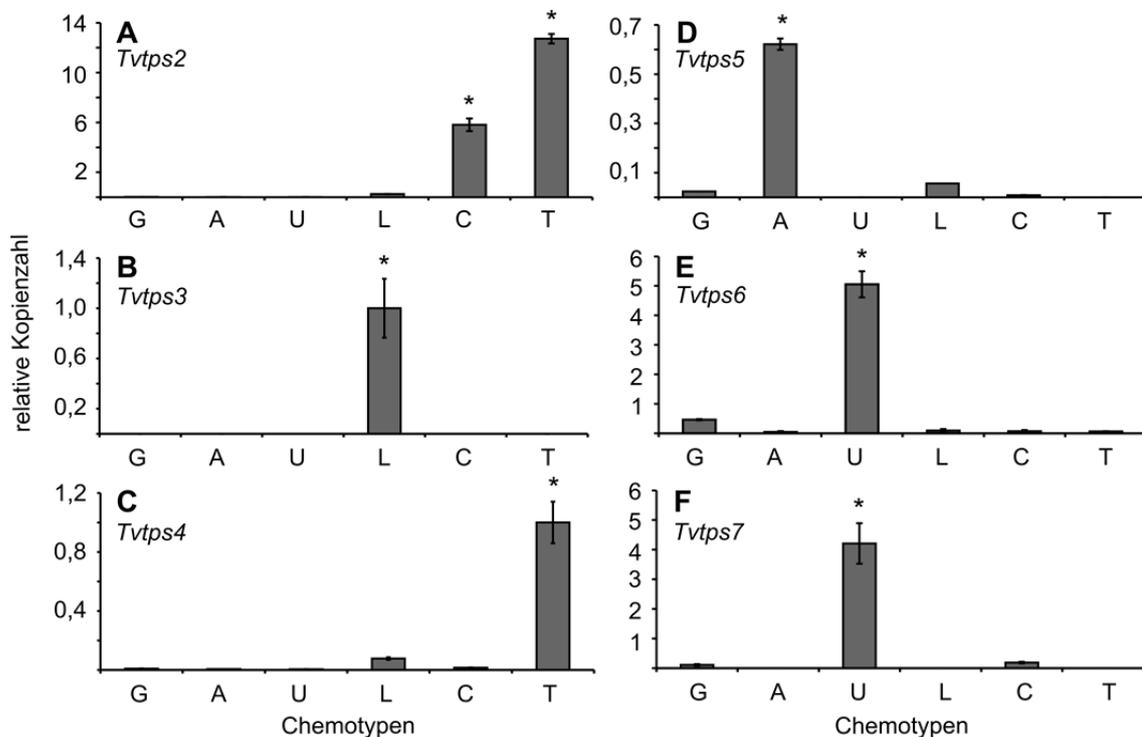


Abbildung 3.14: Transkriptionsmuster der identifizierten Monoterpensynthasegene *Tvtps2* (A), *Tvtps3* (B), *Tvtps4* (C), *Tvtps5* (D), *Tvtps6* (E) und *Tvtps7* (F) in allen sechs *Thymus vulgaris*-Chemotypen. Die Terpensynthasegene waren spezifisch in je einem Chemotyp exprimiert. Die Transkriptmengen wurden relativ zum Referenzgen *yls8* (yellow leaf specific gene 8) bestimmt. Die gegenüber jeweils allen anderen Chemotypen signifikanten Transkriptmengen sind gekennzeichnet (*) (One Way ANOVA, $P \leq 0,004$). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Transkriptanalyse der beiden Linaloolsynthasegene *Tvtps3* und *Tvtps4* zeigte, dass *Tvtps3* ausschließlich im Linalooltyp exprimiert wurde, während *Tvtps4* vor allem im T-Typ auftrat, aber auch in allen anderen Chemotypen nachweisbar war. Das Gen der α -Terpineolsynthase, *Tvtps5*, wurde hauptsächlich im A-Typ exprimiert. Spuren von *Tvtps5* waren auch im G-, L-

und C-Typ zu finden. In diesen Chemotypen trat jedoch kein α -Terpineol auf. Die beiden Sabinenhydratsynthasegene *Tvtps6* und *Tvtps7* waren vorwiegend im U-Chemotyp exprimiert.

Betrachtete man die Transkriptmengen in den einzelnen Chemotypen, so stellte man fest, dass nur Spuren der untersuchten Terpensynthasen im G-Typ zu finden waren. Im A- und U-Typ wurden nur die Terpensynthasegene gefunden, die das jeweilige Hauptmonoterpen bilden. Im L-Typ wurden neben viel Transkript von *Tvtps3* auch Spuren von *Tvtps2*, *Tvtps4*, *Tvtps5* und *Tvtps6* detektiert. Auch im C-Typ wurden neben relativ großen Mengen von *Tvtps2* noch Spuren von vier weiteren Terpensynthasen (*Tvtps4*, *Tvtps5*, *Tvtps6* und *Tvtps7*) gefunden. Im T-Typ wurde dagegen zwei Terpensynthasen in großen Mengen exprimiert (*Tvtps2* und *Tvtps4*).

3.4.3.2 Die Transkriptmengen der Terpensynthasen korrelieren mit dem Auftreten ihrer Enzymprodukte *in planta*

Um zu untersuchen, ob die Transkriptmenge der Terpensynthasen mit dem Auftreten deren Produkte *in planta* korrelierte, wurden die erhaltenen Daten verglichen und Spearman's Rangkorrelationskoeffizient berechnet (Tabelle 3.9).

Die mittels qRT-PCR bestimmte Transkriptmenge von *Tvtps2* korreliert nicht nur mit der Menge des direkten Produktes γ -Terpinen (0,955; $P \leq 0,003$), sondern auch mit den Endprodukten des wahrscheinlichen Biosyntheseweges, Thymol und Carvacrol sowie mit verschiedenen Kombinationen dieser Terpene. Zwischen der Transkriptmenge von *Tvtps2* und Thymol bzw. Carvacrol konnte keine signifikante Korrelation bestimmt werden. Addierte man jedoch beide Terpene und korrelierte die Summe mit dem Auftreten von *Tvtps2*, war der erhaltene Spearman-Rangkorrelationskoeffizient signifikant. Auch die Korrelation der Summen von γ -Terpinen und Thymol und γ -Terpinen und Carvacrol, die jeweils den Biosyntheseweg darstellen soll, war signifikant. Der Vergleich der Kombination der Terpenmengen von γ -Terpinen, Thymol und Carvacrol und der Transkriptmenge von *Tvtps2* war ebenfalls signifikant.

Tabelle 3.9: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient. Berechnet wurde die Korrelation zwischen den Transkriptmengen der isolierten Monoterpensynthasegene und der Menge der Terpenprodukte *in planta* (siehe Tabelle 3.1). * = signifikante Korrelation

Terpen	Gen	Spearman's	P-Wert
γ -Terpinen	<i>Tvtps2</i>	0,955	0,003*
Thymol	<i>Tvtps2</i>	0,809	0,058
Carvacrol	<i>Tvtps2</i>	0,789	0,058
γ -Terpinen + Thymol	<i>Tvtps2</i>	0,868	0,033*
γ -Terpinen + Carvacrol	<i>Tvtps2</i>	0,893	0,017*
Thymol + Carvacrol	<i>Tvtps2</i>	0,868	0,033*
γ -Terpinen + Thymol + Carvacrol	<i>Tvtps2</i>	0,868	0,033*
Linalool	<i>Tvtps3</i>	0,696	0,136
Linalool	<i>Tvtps4</i>	0,880	0,033*
Linalool	<i>Tvtps3</i> + <i>Tvtps4</i>	0,941	0,017*
α -Terpineol	<i>Tvtps5</i>	0,257	0,564
α -Terpineol (ohne U) ¹	<i>Tvtps5</i>	0,880	0,033*
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	<i>Tvtps6</i>	0,273	0,564
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	<i>Tvtps7</i>	0,548	0,242
<i>trans</i> -Sabinenhydrat (ohne T) ²	<i>Tvtps7</i>	0,898	0,017*
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	<i>Tvtps6</i> + <i>Tvtps7</i>	0,395	0,419
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	<i>Tvtps6</i>	0,655	0,175
<i>cis</i> - + <i>trans</i> - Sabinenhydrat	<i>Tvtps6</i> + <i>Tvtps7</i>	0,395	0,419

¹ Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten unter der Annahme, dass das gemessene α -Terpineol im U-Typ als Nebenprodukt von TvTPS6 und TvTPS7 gebildet wurde.

² Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten unter der Annahme, dass das gemessene *trans*-Sabinenhydrat im T-Typ als Nebenprodukt von TvTPS2 gebildet wurde.

Die Ergebnisse der qRT-Analyse von *Tvtps3* und *Tvtps4* wurden mit Linalool, dem Hauptprodukt der beiden Enzyme, verglichen. Linalool kommt vor allem im L-Typ und den beiden phenolischen Chemotypen vor (Abbildung 3.15).

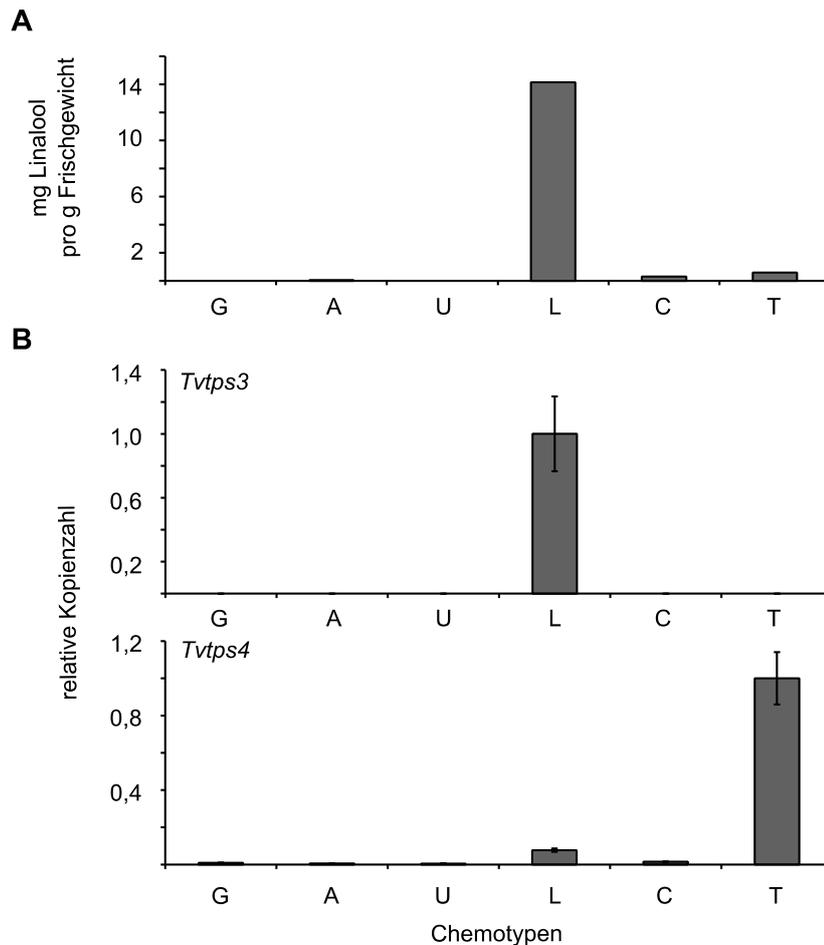


Abbildung 3.15: Vergleich des Gehalts an Linalool in den verschiedenen Chemotypen (A) und den Transkriptmengen der Linaloolsynthesen *Tvtps3* und *Tvtps4* (B).

Da *Tvtps3* nur im L-Typ, nicht aber im T- und C-Typ detektiert werden konnte, war die Korrelation zwischen *Tvtps3*-Transkriptmenge und Linalool nicht signifikant. Für *Tvtps4* und Linalool hingegen wurde ein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient berechnet, da die Terpensynthese in allen Chemotypen exprimiert war, in denen auch Linalool vorkam. Betrachtet man die Expression von *Tvtps3* und *Tvtps4* gemeinsam, deckt das Vorhandensein der beiden Enzyme das Auftreten ihres Produkts Linalool in den sechs Chemotypen ab. So könnte *Tvtps3* für die Produktion des Linalools im L-Typ und *Tvtps4* für die Linaloolproduktion im C- und T-Typ verantwortlich sein. Deshalb wurde die Kombination der Transkriptmengen von *Tvtps3* und *Tvtps4* mit Linalool verglichen. Der hohe Spearman Rangkorrelationskoeffizient von 0,94 ($P \leq 0,017$) unterstützte diese Hypothese.

Der Vergleich der Transkriptmenge von *Tvtps5* und der Menge an α -Terpineol in den Pflanzen führte zu keinem signifikanten Rangkorrelationskoeffizienten. Transkript von *Tvtps5* wurde hauptsächlich im A-Typ amplifiziert. In diesem Chemotyp war auch die größte Menge

an α -Terpineol zu finden. Jedoch waren auch im U-Typ größere Mengen von α -Terpineol vorhanden, obwohl in diesem Typ kein *Tvtps5*-Transkript nachgewiesen werden konnte. Die funktionelle Analyse von TvTPS6 und TvTPS7 ergab, dass beide Enzyme α -Terpineol als Nebenprodukt produzierten (Krause et al., 2012). Das Auftreten größerer Mengen von α -Terpineol im U-Typ könnte dadurch erklärt werden. Deshalb wurde eine zweite Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt, bei der das gemessene α -Terpineol im U-Typ nicht berücksichtigt wurde. Es ergab sich nun ein signifikanter Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für *Tvtps5* und α -Terpineol (0,88; $P \leq 0,033$).

Obwohl *Tvtps6* und *Tvtps7* und ihre Hauptprodukte *cis*- und *trans*-Sabinenhydrat hauptsächlich im U-Typ auftraten (Abbildung 3.16), konnte aufgrund der Transkriptmengen in den anderen Chemotypen keine signifikante Korrelation nach Spearman berechnet werden.

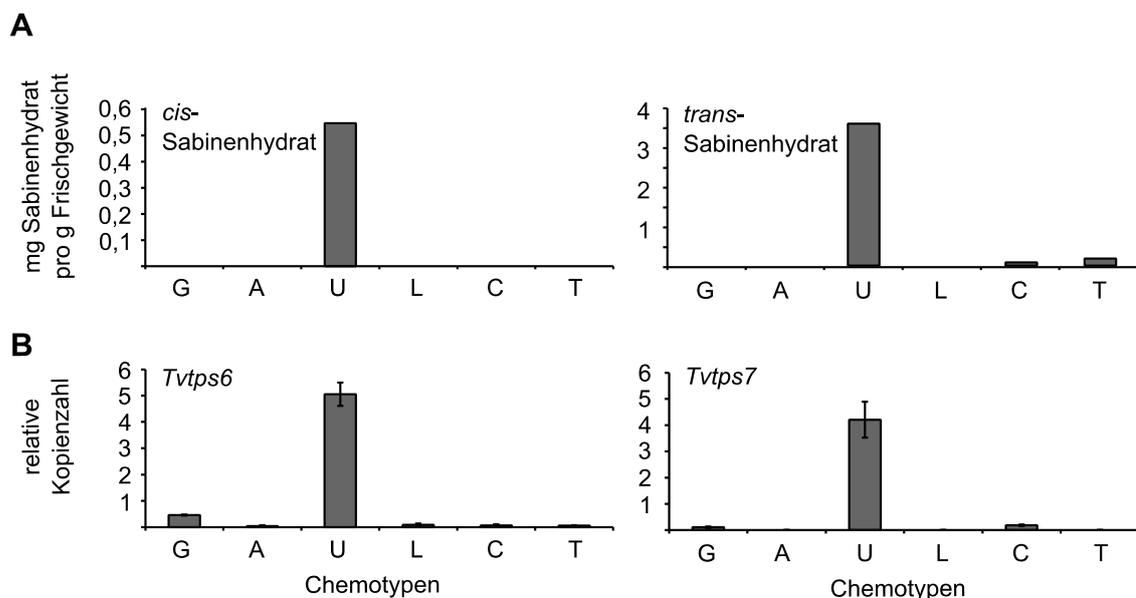


Abbildung 3.16: Vergleich zwischen dem Gehalt an *cis*- und *trans*-Sabinenhydrat in den verschiedenen Chemotypen (A) und den Transkriptmengen der *cis*-Sabinenhydratsynthese *Tvtps6* und der *trans*-Sabinenhydratsynthese *Tvtps7* (B).

Auch hier lag die Vermutung nahe, dass das in den rezessiveren Chemotypen auftretende *trans*-Sabinenhydrat als Nebenprodukt von beispielsweise TvTPS2 zu betrachten ist. Da diese Terpensynthese vor allem im T-Typ stark exprimiert ist, könnte sie dort für die Bildung der geringen Mengen an *trans*-Sabinenhydrat verantwortlich sein. Unter dieser Annahme ließ sich ein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient für TvTPS7 und sein Produkt *trans*-Sabinenhydrat berechnen (0,898, $P \leq 0,017$).

3.5 Die Regulation der Chemotypbildung in *Thymus vulgaris*

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass das Auftreten von γ -Terpinen nicht in der Aktivität des Enzyms oder dem Vorhandensein des Strukturgens *Tvtps2* in den Chemotypen begründet liegt, sondern in der Expression von *Tvtps2* (siehe 3.4.3). Nur in den phenolischen Chemotypen Thymol und Carvacrol sowie in geringen Mengen im Linalooltyp konnte Transkript von *Tvtps2* nachgewiesen werden. Die Regulation der Expression erfolgt über der dem Gen zugehörigen Promotorregion. Um Sequenzelemente zu finden, die für die Regulation verantwortlich sind, wurde die Promotorregion von *Tvtps2* aus der genomischen DNA aller sechs Chemotypen isoliert und analysiert.

3.5.1 Analyse der regulatorischen Elemente im Promotor von *Tvtps2*

Der Promotor wurde mittels Genome Walking aus dem Thymoltyp isoliert. Es konnten etwa 770 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts der γ -Terpinensynthase sequenziert werden. Von diesem Bereich gehörten 66 Nukleotide zum 5'UTR des Gens, die bereits durch 5'Race-PCR amplifiziert wurden. Von der identifizierten Sequenz wurden spezifische Primer angefertigt, die zur Amplifikation der Region aus den anderen Chemotypen genutzt wurden (Abbildung 3.17).

In jedem Chemotyp lagen zwei verschiedene Varianten der Promotorregion vor, die sich durch eine unterschiedliche Anzahl von Nukleotiden identifizieren ließen. Diese könnten verschiedene Allele widerspiegeln. Es gab vier verschiedene mögliche Promotorvarianten (P1-P4). Die Variante „P1“ kam in allen sechs Chemotypen vor. Die Variante „P2“ war durch acht zusätzliche Nukleotide von Position -592 bis -599 gekennzeichnet und wurde aus den Chemotypen A, U, L und T isoliert. Die Promotorvarianten „P3“ (G-Typ) und „P4“ (C-Typ) waren im Vergleich zu „P1“ um 280 Nukleotide verkürzt (-420 bp bis -708 bp). Der G-Typ-Variante „P3“ fehlten außerdem fünf weitere Basenpaare an der Position -196 bis -200.

-524 -464

TvTPS2-P1_G
TvTPS2-P1_A	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P1_U	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P1_L	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P1_C	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P1_T	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P2_A	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P2_U	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P2_L	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P2_T	TCCACTTTAA	CACTTTAACA	CATTAATTTA	TTATTATACT	ATAAAATGCG	AAAAAACTCG
TvTPS2-P3_G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TvTPS2-P4_C	-----	-----	-----	-----	-----	-----

-463 -419 -403

TvTPS2-P1_G
TvTPS2-P1_A	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P1_U	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P1_L	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P1_C	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P1_T	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P2_A	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P2_U	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P2_L	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P2_T	TGCCCATATT	CCCTCCGTC	CTAAATGGAG	GACGGAGAGA	GTAATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P3_G	-----	-----	-----	-----	---ATAGAAG	ATCTTATCGC
TvTPS2-P4_C	-----	-----	-----	-----	---ATAGAAG	ATCTTATCGC

CGTCA-Motiv **TATA-Box**

-402 -342

TvTPS2-P1_G
TvTPS2-P1_A	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P1_U	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P1_L	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P1_C	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P1_T	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P2_A	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P2_U	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P2_L	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P2_T	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTA
TvTPS2-P3_G	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	GTGAATAAAA	AGTTGTTTTG
TvTPS2-P4_C	GTAATCGTGC	ATGATAGTAG	ATTGAGAAAA	GGACTTTAGC	TTGAATAAAA	AGTTGTTTTA

TCA-Element

-341 -281

TvTPS2-P1_G
TvTPS2-P1_A	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P1_U	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P1_L	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P1_C	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P1_T	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P2_A	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAGTAGTTTC
TvTPS2-P2_U	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAGTAGTTTC
TvTPS2-P2_L	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P2_T	ATTTGCGTAA	AATATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TAATAGTTTC
TvTPS2-P3_G	ATTTGCGTAA	A-TATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TTGTAGTTTC
TvTPS2-P4_C	ATTTGCGTAA	A-TATTCTAA	TATCTGAGTA	GCAATCGTGA	TTCACGCCAA	TTGTAGTTTC

-280-220

TvTPS2-P1_G	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P1_A	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P1_U	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P1_L	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGCGGGCC
TvTPS2-P1_C	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P1_T	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P2_A	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P2_U	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P2_L	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGCGGGCC
TvTPS2-P2_T	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	CTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGCGGGCC
TvTPS2-P3_G	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC
TvTPS2-P4_C	CAAATTCGGA	TGGGAGCATG	TTTAAAGTTG	AAAATTCCTGC	TAACAATAAT	GCAGTGGGCC

-219-159

TvTPS2-P1_G	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P1_A	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P1_U	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P1_L	CATAAAAAAGT	AGGCAAAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P1_C	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P1_T	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P2_A	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P2_U	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P2_L	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P2_T	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAACAAAT
TvTPS2-P3_G	CATAAAAAAGT	AGGCTAGT--	---ATTTTTTC	GTGTCTAAAA	CATTACGATT	TGTAATAAAT
TvTPS2-P4_C	CATAAAAAAGT	AGGCTAATCA	CTTATTTTTTC	GTATCTAAAA	CATTACGATT	TGTAATAAAT

-158-98

TvTPS2-P1_G	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P1_A	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P1_U	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P1_L	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P1_C	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P1_T	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P2_A	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P2_U	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P2_L	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P2_T	AATGACACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P3_G	AATGTCACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT
TvTPS2-P4_C	AATGTCACGT	GTAAACAACA	TCAATCAATG	TAGGTGTTAG	AGCGTGAGCA	TCCCTTCAT

G-Box

-97-37

TvTPS2-P1_G	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P1_A	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P1_U	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P1_L	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P1_C	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P1_T	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P2_A	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P2_U	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P2_L	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P2_T	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P3_G	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC
TvTPS2-P4_C	ATAAACAAAC	ACCAACATAC	CAATTCCAAC	AATTAAACAC	AAGATTAGCA	CTAACAAATAC

```

-36                                     0
....|....|....|....|....|....
TvTPS2-P1_G  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P1_A  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P1_U  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P1_L  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P1_C  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P1_T  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P2_A  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P2_U  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P2_L  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P2_T  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P3_G  AAGCTAAGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG
TvTPS2-P4_C  AAGCTACGTG CTCAAACAA GGGGAAATTA AAAAAAATG

```

Abbildung 3.17: Alignment der verschiedenen Varianten der Promotorregion der γ -Terpinensynthase *Tvtps2* aus den *Thymus vulgaris*-Chemotypen. Dargestellt sind alle Promotorvarianten (P1-P4) aus den sechs Chemotypen (G, A, U, L, C, T). Der identifizierte 5'UTR ist unterstrichen, Nukleotidunterschiede sind grau markiert. Mit Position 0 ist das Startcodon ATG von *Tvtps2* gekennzeichnet. Eine vollständige Liste aller identifizierten regulatorischen Elemente befindet sich im Anhang (siehe 6.4). Die mit PlantCARE gefundenen Promotorelemente auf dem dargestellten Strang wurden farblich gekennzeichnet: TATA-Boxen (gelb) und CAAT-Boxen (blau) sowie eine A-Box, zwei TGACG-Motive, ein CGTCA-Motiv, ein TCA-Element und eine G-Box (grün).

Mit allen vier Varianten wurde eine Promotoranalyse mit dem Programm PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) durchgeführt, um durch die verschiedenen Sequenzen entstandene Unterschiede in den regulatorischen Elementen zu finden. Da es kaum Unterschiede zwischen den Nukleotidsequenzen der Promotorvarianten gab, hing das Vorhandensein von regulatorischen Elementen in den verschiedenen Varianten vor allem mit der Länge der Sequenzen zusammen. Im Promotor kamen zahlreiche typische *cis*-Elemente wie TATA- und CAAT-Boxen vor. Die für die Transkription wichtige TATA-Box befindet sich in der Regel etwa 30 bp vor dem Transkriptionsstart. In allen Promotorvarianten existierte eine TATA-Box an Position -100, die damit genau 33 Nukleotide vor dem Start des 5'UTR lag. Außerdem wurde mit einer A-Box an Position -702 ein weiteres regulatorisches Element gefunden. Das Programm identifizierte weitere *cis*-Elemente, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Antwort Methyljasmonat (TGACG-, CGTCA-Motiv) und Salicylsäure (TCA-Element) stehen (Abbildung 3.17). PlantCARE ermittelte ebenso Elemente, die mit der Antwort auf Lichtverfügbarkeit zusammenhängen (G-Box). Es konnte jedoch kein regulatorisches Element identifiziert werden, das nur im L-, C- und T-Typ auftrat, den Chemotypen, in denen auch Transkript von *Tvtps2* gefunden wurde.

3.5.2 Die Methylierungsmuster des γ -Terpinensynthasepromotors geben Hinweise auf die Regulation der Chemotypbildung

Die gefundenen Unterschiede in den regulatorischen Elementen der Promotorvarianten der γ -Terpinensynthase konnten das mittels qRT-PCR gefundene Transkriptionsmuster (siehe 3.4.3.1) nicht erklären. Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsregulation in Pflanzen ist die Methylierung von Cytosinen in der genomischen DNA. Solch eine DNA-Methylierung kann zur Inaktivierung des betroffenen Gens führen. Die Cytosine können in drei verschiedenen Sequenzzusammenhängen methyliert werden: CGN, CHG und CHH. Dabei sind C die Cytosine, die methyliert werden können, G beschreibt die Nukleobase Guanin, N ist ein beliebiges Nukleosid und H sind alle Nukleoside außer Guanin.

Isolierte genomische DNA der Chemotypen wurde einer Bisulfitbehandlung mit dem EpiTect-Kit (Qiagen) unterzogen (siehe 2.3.15). Aus der konvertierten DNA wurde *Tvtps2-P* amplifiziert und die erhaltene Sequenz mit der ursprünglichen, unkonvertierten Sequenz verglichen. So konnte der Methylierungsgrad der Promotorregion bestimmt werden. Die Promotorregion wurde in zwei Fragmente (BS1 und BS2) unterteilt, da nach den Angaben des Herstellers die Amplifikation von kürzeren Fragmenten zu klareren Ergebnissen führen sollte. Es ist zu beachten, dass alle angegebenen Daten durch weitere Versuche validiert und bestätigt werden müssen.

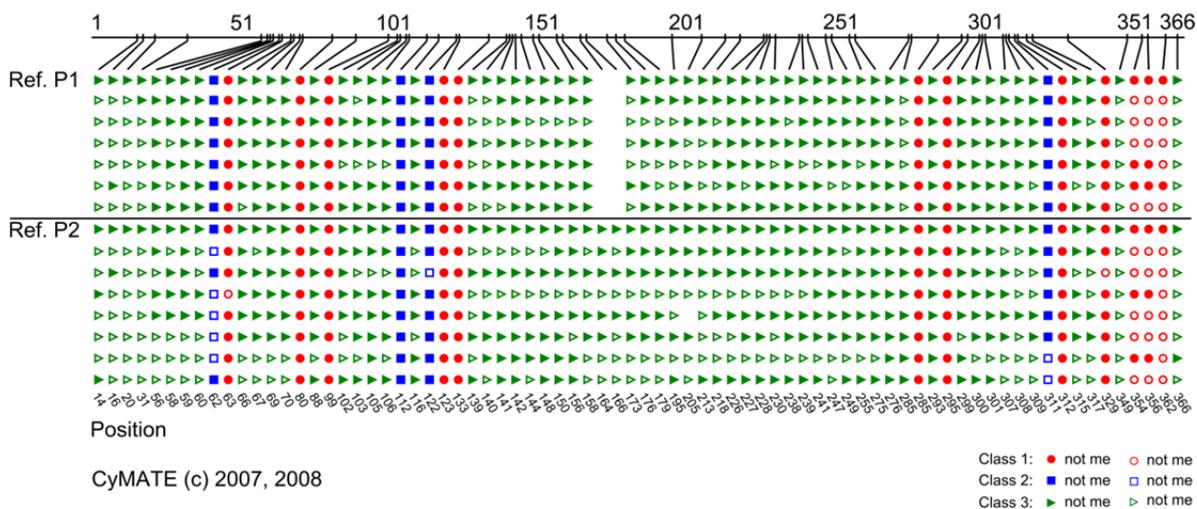
Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm CyMATE, welches den Methylierungsgrad im Vergleich zu einer unkonvertierten Referenzsequenz berechnet (Hetzl et al., 2007). Zu der Auswertung gehörte neben der Angabe des Methylierungsgrades eine graphische Darstellung der Sequenzen (Abbildung 3.18, siehe 0). Die zwei gewählten Promotorfragmente überschneiden sich in etwa 20 Nukleotiden. Von den für die epigenetische Regulation wichtigen CGN-Methylierungen (Klasse 1) lagen zwölf im ersten Fragment und neun im zweiten. Von den sieben im Promotor vorhandenen CHG-Sequenzen (Klasse 2) waren die vier im Fragment BS1 in der Nähe der CG-Inseln zu finden. Auch im Fragment BS2 traten die CHGs nah an den CGNs auf. Beide Methylierungsklassen waren von den geringen Sequenzunterschieden der ersten und zweiten Promotorvariante nicht betroffen und traten in den entsprechenden Chemotypen auf. Ab Nukleotid 351 waren alle Promotorregionen deutlich weniger methyliert als die vorangegangenen Nukleotide (Tabelle 3.10).

Das Fragment BS1 der Promotorvarianten P3 und P4 aus dem G- und C-Typ war nur 105 bp lang. Es besaß nur die letzten drei CGs des ersten Fragments (vgl. Abbildung 3.18,

Fragment 1, Positionen 354, 365 und 362). Die Sequenzfolge CHG fehlte in beiden Varianten, und es gab in diesem Fragment auch nur sechs CHH-Positionen (Klasse 3) (vgl. Abbildung 3.18, Fragment 1, Positionen 14-31, 349 und 366).

A

Fragment: BS1



B

Fragment: BS2

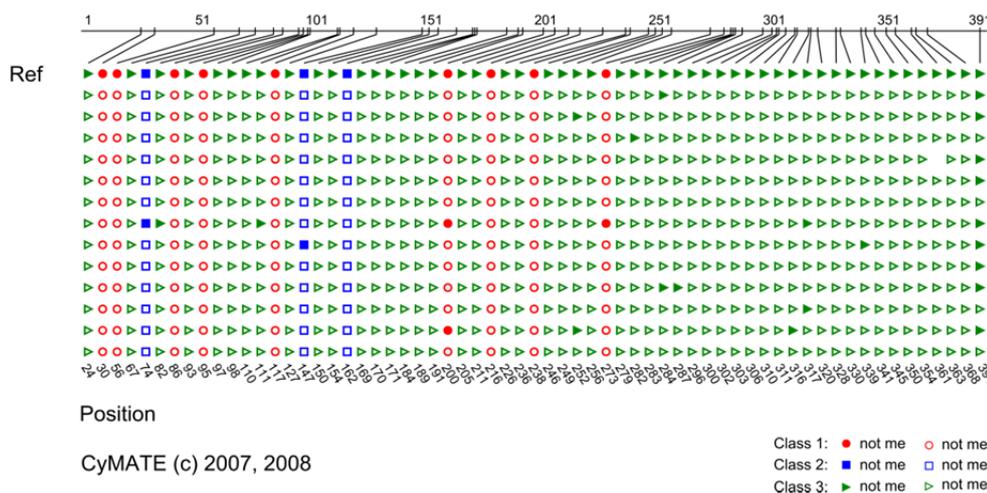


Abbildung 3.18: Das Methylierungsmuster des *Tvtps2*-Promotors am Beispiel des A-Chemotyps. Dargestellt sind alle drei Methylierungsklassen CG (rote Kreise), CHG (blaue Quadrate) und CHH (grüne Dreiecke). Die nicht-konvertierten Referenzsequenzen (Ref) der Promotorvarianten sind markiert.

Die Promotorvariante P1 wurde aus jedem Chemotyp amplifiziert (siehe 3.5.1). Mit Ausnahme des C-Typs konnte P1 auch aus der bisulfitkonvertierten DNA der Chemotypen isoliert werden. Der Promotor des T-Typs hatte mit etwa 8% den geringsten CG-Methylierungsgrad (Abbildung 3.19A, Tabelle 3.10). Bei allen anderen untersuchten

Chemotypen lag der Methylierungsgrad mit über 80 % deutlich höher. Leider war es nicht möglich, das P1-Fragment aus bisulfidkonvertierter DNA des C-Typ zu isolieren. Da *Tvtps2* in beiden phenolischen Chemotypen exprimiert wurde, wurde ein geringerer CG-Methylierungsgrad im T- und C-Typ erwartet. Auch in den anderen beiden Methylierungspositionen CHG und CHH war das Promotorfragment des T-Typs geringer methyliert als das Fragment aus den anderen Chemotypen.

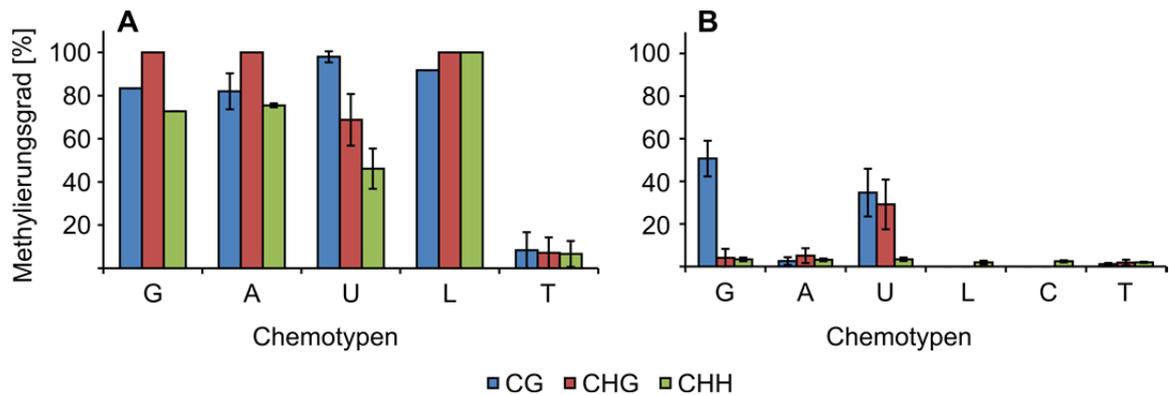


Abbildung 3.19: Methylierungsgrad der zwei Fragmente BS1 (A) und BS2 (B) der Promotorvariante P1. Dargestellt ist der Methylierungsgrad des Cytosins in den verschiedenen Kontexten CG (blau), CHG (rot) und CHH (grün). Der Methylierungsgrad des BS1-Fragments konnte im C-Typ nicht bestimmt werden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler von mindestens drei Sequenzen an.

Ein Vergleich des Methylierungsgrades beider Promotorvarianten war nur im G- und A-Typ möglich, da nur hier die zwei Varianten aus der bisulfidkonvertierten DNA amplifiziert werden konnten. In beiden Chemotypen waren die Promotorvarianten im CGN-Kontext ähnlich hoch methyliert.

Da das zweite Fragment (BS2), das auch die 66 Nukleotide des 5'UTR des Gens umfasste, sich in den verschiedenen Promotorvarianten nicht unterschied, war eine eindeutige Zuordnung zu den Promotorvarianten P1 bis P4 nicht möglich. Alle erhaltenen Sequenzen waren jedoch deutlich geringer methyliert (Abbildung 3.19B, Tabelle 3.10). Sollte die Regulation der Expression auf dem Methylierungsgrad beruhen, so sind die regulierenden Bereiche im ersten Teil des Promotors zu suchen.

Tabelle 3.10: Methylierungsgrad der Fragmente des Promotors von *Tvtps2*, angegeben in %.
 N = alle Nukleotide, H = A, T oder C.

		Fragment 1 (BS1)			Fragment 2 (BS2)		
		CGN	CHG	CHH	CGN	CHG	CHH
T	P1	8,33	7,14	6,61	1,16	1,92	1,96
	P2	-	-	-			
C	P1	<i>keine Ergebnisse</i>			0,00	0,00	2,47
	P4	66,67	-	16,67			
L	P1	91,67	100,00	100,00	0,00	0,00	1,99
	P2	<i>keine Ergebnisse</i>					
U	P1	97,92	68,75	46,12	34,72	29,27	3,46
	P2	<i>keine Ergebnisse</i>					
A	P1	81,94	100,00	75,45	2,56	5,13	3,17
	P2	77,38	71,43	59,19			
G	P1	83,33	100,00	72,73	50,70	41,2	3,39
	P3	100,00	-	8,33			

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der *Thymus vulgaris*-Chemotypen

4.1.1 Die Terpenprofile der Chemotypen zeigen nur eine geringe Variabilität

Das ätherische Öl der sechs untersuchten, ursprünglich aus Südfrankreich stammenden Chemotypen zeichnet sich durch das Vorhandensein verschiedener Monoterpene aus. Die Chemotypen werden über die Monoterpene definiert, die quantitativ am häufigsten im ätherischen Öl vorhanden sind. In der Regel handelt es sich um ein einzelnes Monoterpen, während auch charakteristische Gemische verschiedener Monoterpene den Chemotypen kennzeichnen können. Als einziges Nichtmonoterpen in allen Chemotypen wurde das Sesquiterpen (*E*)- β -Caryophyllen identifiziert.

Das ätherische Öl des Geranioltyps (G) bestand fast ausschließlich aus seinem Hauptmonoterpen Geraniol und dem Ester Geranylacetat. Im Gegensatz dazu konnten in allen anderen Chemotypen neben den Hauptmonoterpenen und deren Derivaten auch signifikante Mengen anderer Monoterpene identifiziert werden. Die ätherischen Öle des α -Terpineoltyps (A) und des Linalooltyps (L) wurden ebenfalls sehr stark von ihrem Hauptmonoterpen und dessen Acetat dominiert. Solche Beobachtungen wurden auch bei Untersuchungen zur Zusammensetzung des ätherischen Öls in natürlichen Populationen gemacht (Thompson et al., 2003). Allerdings fanden die Forscher im G-Typ beträchtliche Mengen an Linalool und im A-Typ Thymol. Beide Substanzen konnten in dieser Arbeit in den jeweiligen Ölen nicht nachgewiesen werden. Das ebenfalls beobachtete Auftreten von Thymol im L-Typ konnte jedoch bestätigt werden.

Das Hauptmonoterpen des U-Typs ist *trans*-Sabinenhydrat. Während in vorangegangenen Untersuchungen das ätherische Öl dieses Chemotyps als komplex beschrieben und auch Monoterpene wie Terpeneol-4 und Linalool zu den charakteristischen Hauptkomponenten des Öls gezählt wurden (Granger et al., 1973; Thompson et al., 2003), konnten in den in dieser Arbeit untersuchten U-Typen vor allem Limonen-10-ol und dessen Acetat, sowie *cis*-Sabinenhydrat als weitere Hauptkomponenten detektiert werden. Diese traten sowohl in

den Pflanzen, die im Gewächshause angezogen wurden, als auch in den Freilandpflanzen auf, sodass das gemessene Terpenspektrum für die weiteren Untersuchungen als charakteristisch für den vorliegenden U-Chemotyp angenommen wurde.

Zu den Hauptmonoterpenen der ätherischen Öle des Carvacrol- (C) und Thymoltyps (T) zählen neben den genannten phenolischen Monoterpenalkoholen auch γ -Terpinen und *para*-Cymen. Weiterhin waren viele andere Monoterpene, darunter auch *trans*-Sabinenhydrat und Linalool im Öl zu finden. Diese Beobachtungen entsprechen bereits durchgeführten Untersuchungen am südfranzösischen Thymian (Thompson et al., 2003; Kaloustian et al., 2005).

4.1.2 Der Standort der Chemotypen hat nur einen geringen Einfluss auf die Zusammensetzung ihres ätherischen Öls

Die sechs untersuchten Chemotypen des echten Thymians sind in Südfrankreich heimisch und an die dortigen Umweltbedingungen adaptiert. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Pflanzen gearbeitet, die sowohl im Gewächshaus angezogen als auch in einer Freilandkultur gehalten wurden. Um die Standortfaktoren berücksichtigen zu können, war ein Vergleich der Terpengehalte zwischen den Gewächshaus- und den Freilandpflanzen sowie ein Vergleich der Freilandkultur mit den beschriebenen Terpengehalten der Chemotypen in ihrer natürlichen Umgebung notwendig.

Während die Pflanzen im Gewächshaus bei konstanter Temperatur, Lichteinstrahlung und Wasserverfügbarkeit wuchsen, waren die Pflanzen der Freilandkultur den unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls der nicht-phenolischen Chemotypen war bei den Gewächshaus- und Freilandpflanzen trotz der unterschiedlichen Bedingungen nahezu identisch (Tabelle 4.1). In den phenolischen Chemotypen war der Anteil des Hauptmonoterpens in der Freilandkultur deutlich höher als in den Pflanzen des Gewächshauses. Im C-Typ war der Gehalt an Carvacrol in den Freilandpflanzen im Vergleich zu den Gewächshauspflanzen mehr als doppelt so hoch. Im T-Typ konnte ebenfalls eine Steigerung des Thymolanteils gemessen werden. Der Anteil der Summe aus Hauptmonoterpen und den postulierten Vorläufersubstanzen *para*-Cymen und γ -Terpinen am Gesamtterpengehalt war im Thymoltyp unter beiden gemessenen Bedingungen (Gewächshaus und Freilandkultur) etwa gleich hoch. Im C-Typ hingegen stieg durch die Verdopplung des Carvacrolgehalts auch der Summenanteil, bestehend aus Carvacrol,

para-Cymen und γ -Terpinen. Dieser Chemotyp reagierte auf veränderte Umweltbedingungen folglich mit einer stärkeren veränderten quantitativen Zusammensetzung seines ätherischen Öls.

Tabelle 4.1: Anteil der Hauptmonoterpene am Gesamtterpenegehalt der Chemotypen im Gewächshaus und in der Freilandkultur. Alle Angaben in %.

Hauptmonoterpen (Chemotyp)	Gewächshaus	Freilandkultur
Geraniol (G)	41,5 (65,5 ¹)	42,1 (74,9 ¹)
α -Terpineol (A)	17,9 (88,0 ¹)	19,8 (87,9 ¹)
<i>trans</i> -Sabinenhydrat (U)	56,3	51,0
Linalool (L)	81,1 (91,0 ¹)	77,8 (90,3 ¹)
Carvacrol (C)	29,5 (49,7 ²)	64,0 (83,3 ²)
Thymol (T)	37,9 (79,7 ²)	49,4 (83,4 ²)

¹ prozentuale Summe aus Hauptmonoterpen und dem zugehörigen Acetat

² prozentuale Summe aus Hauptmonoterpen und den postulierten Vorläufern *para*-Cymen und γ -Terpinen

Über den Vergleich mit den Daten von Granger (1973) und Thompson (2003), die beide *Thymus vulgaris*-Chemotypen in natürlichen Populationen untersuchten, konnte die Qualität der für die Arbeit genutzten Pflanzen eingeschätzt werden. Dass im ätherischen Öl der nicht-phenolischen Chemotypen neben den jeweiligen Hauptmonoterpenen (Geraniol, α -Terpineol und Linalool) auch große Mengen des zugehörigen Acetats zu finden sind, stellten bereits Granger und Passet fest (Granger et al., 1973). In ihrer Quantifizierung fassten sie beide Substanzen zum Hauptmonoterpen zusammen. So erreichte der Anteil der Hauptmonoterpene in diesen drei Chemotypen über 90 % (Tabelle 4.2). Ähnlich hohe Werte konnten im Laufe der Arbeit für den A- und den L-Typ bestätigt werden. Während im A-Typ das ätherische Öl von α -Terpinylacetat dominiert wurde, lag im L-Typ vorwiegend das unveresterte Linalool vor. Die Menge an α -Terpineol war in den angezogenen Pflanzen mit nur etwa 20 % Anteil am Gesamtterpenegehalt sehr gering. Zwar gab auch Robert Granger an, dass nur etwa ein Drittel der angegebenen Hauptmonoterpenmenge α -Terpineol war (Granger et al., 1973), Thompson konnte jedoch 77 % α -Terpineol im A-Typ messen (Thompson et al., 2003). Die hohen Anteile an Geraniol und Geranylacetat der Messung von Granger im G-Typ konnten nicht bestätigt werden. In den Pflanzen der Freilandkultur war der Anteil des Hauptmonoterpens und seines Acetats 15 Prozentpunkte geringer als in den von Granger

vermessenen Pflanzen. Thompson (2003) hingegen publizierte den reinen Anteil an Geraniol im ätherischen Öl des G-Typs. Auch dieser lag mit 75 % deutlich höher als die gemessenen 42,1 % der angezogenen Pflanzen.

Tabelle 4.2: Anteil der Hauptmonoterpene am Gesamtterpenegehalt der Chemotypen im Gewächshaus und in der Freilandkultur verglichen mit Angaben aus der Literatur. Alle Angaben in %. Einzelp. = Einzelpopulation, Mischp. = Mischpopulation, max. = Maximalwert

Hauptmonoterpen (Typ)	Freilandkultur	Granger, 1973	Thompson, 2003 ¹	
			Einzelp.	Mischp.
Geraniol (G)	42,1 (74,9 ²)	90 ²	75	50
α -Terpineol (A)	19,8 (87,9 ²)	96 ²	77	58
<i>trans</i> -Sabinenhydrat (U)	51,0	56	60	- ⁴
Linalool (L)	77,8 (90,3 ²)	95 ²	83	62
Carvacrol (C)	64,0 (83,3 ³)	85 (max.)	58 (72 ³)	30
Thymol (T)	49,4 (83,4 ³)	65 (max.)	52 (70 ³)	40

¹ alle prozentualen Angaben aus Abbildung der Veröffentlichung geschätzt

² prozentuale Summe aus Hauptmonoterpen und dem zugehörigen Acetat

³ prozentuale Summe aus Hauptmonoterpen und den postulierten Vorläufern *para*-Cymen und γ -Terpinen

⁴ keine Angabe, da der U-Typ nicht als Minderheit in Mischpopulationen auftrat

Am wenigsten variierte der Anteil des Hauptmonoterpens *trans*-Sabinenhydrat am Gesamtterpenegehalt im U-Typ. Dieser betrug sowohl bei den Messungen dieser Arbeit als auch in der Literatur zwischen 51 % und 60 %.

Für den Carvacroltyp gab Granger einen Maximalwert von 85 % Carvacrol im ätherischen Öl an. Dieser konnte, wie auch der maximale Thymolgehalt im T-Typ, von Thompson nicht bestätigt werden. Die von Thompson in natürlichen Einzelpopulationen gemessenen Hauptmonoterpenmengen stimmten jedoch mit den in dieser Arbeit im Freiland gemessenen Verhältnissen überein. Zusätzlich gab Thompson den prozentualen Anteil der Summe von Hauptmonoterpen, *para*-Cymen und γ -Terpinen an. Dieser lag etwas niedriger als in den Freilandpflanzen dieser Arbeit.

Thompson (2003) untersuchte den Terpenegehalt in natürlichen Einzel- und Mischpopulationen. Die als Einzelpopulationen bezeichneten Pflanzen lagen entweder tatsächlich in Populationen vor, in denen kein anderer Chemotyp vorkam, oder aber der gemessene Chemotyp war der dominierende Typ einer Mischpopulation. Die von Thompson für die Mischpopulationen angegebenen Messwerte des Terpenegehalts beziehen sich auf

Mischpopulationen, in denen der gemessene Chemotyp als Minderheit auftrat. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil des Hauptmonoterpens in einer Mischpopulation im Vergleich zur Einzelpopulation deutlich geringer ist. Die angezogenen Chemotypen können keiner der beiden Populationen eindeutig zugeordnet werden, da die Pflanzen zwar in unmittelbarer Nähe zueinander wuchsen (Mischpopulation), aber auch in ungefähr gleicher Anzahl. Damit liegt in der angezogenen Kultur kein vorherrschender Chemotyp vor. Die in dieser Arbeit gemessenen relativen Monoterpengehalte der phenolischen Chemotypen und des Linalooltyps glichen jedenfalls den von Thompson gemessenen Gehalten der Einzelpopulationen. Der Gehalt an Geraniol in der Freilandkultur hingegen ist vergleichbar mit dem Geraniolanteil von Pflanzen des G-Typs, die in Mischpopulationen wachsen. Auch für den A-Typ konnte Thompson zeigen, dass der α -Terpineolgehalt in Mischpopulation 25 Prozentpunkte geringer war als in Einzelpopulationen. In den für die Arbeit verwendeten Pflanzen lag der Gehalt statt bei 58 % sogar nur bei etwa 20 %. Für die gemessenen Unterschiede der Zusammensetzung des ätherischen Öls kommen vor allem genetische Grundlagen der Chemotypbildung infrage (Thompson et al., 2003). Da jedoch bereits gezeigt wurde, dass die Chemotypen unterschiedliche Umweltbedingungen für ihr Wachstum bevorzugen (Granger et al., 1973; Amiot et al., 2005; Thompson et al., 2007), könnte auch hier die Ursache für die quantitativen Unterschiede im Terpenegehalt unserer Pflanzen zu suchen sein. Die in den Mischpopulationen als Minderheit auftretenden Chemotypen wuchsen zumeist an Orten, die ihnen nicht ihre favorisierten Umweltbedingungen bieten konnten. Auch die Bedingungen während des Feldversuchs wichen von den natürlichen Wachstumsbedingungen der Chemotypen ab (siehe 4.1.3).

4.1.3 Die saisonale Variation des Terpenegehalts in *Thymus vulgaris*

Zur Untersuchung der saisonalen Variation des Terpenegehalts in den sechs Chemotypen aus Südfrankreich wurde ein Feldversuch durchgeführt, bei dem der Terpenegehalt der Blätter zwei Jahre lang regelmäßig bestimmt wurde. In ihrem natürlichen Lebensraum in Südfrankreich sind die Chemotypen nicht zufällig verteilt; Bodenbeschaffenheit, Wasserverfügbarkeit und die Temperatur kommen als selektive Faktoren in Frage (Granger et al., 1973). So wurde gezeigt, dass die phenolischen Chemotypen in Gegenden mit steinigem Böden, milden Wintern und geringer Niederschlagsmenge vorkommen. Dabei ist der Carvacroltyp empfindlicher gegenüber einem zeitigen Wintereinbruch als der T-Typ, im Gegensatz dazu übersteht er eine Dürreperiode im Sommer besser als alle anderen

Chemotypen (Gouyon et al., 1986; Thompson et al., 2004; Thompson et al., 2007; Thompson et al., 2013). Die nicht-phenolischen Chemotypen wachsen hingegen auf feuchteren Böden und zeigen nur eine geringe Toleranz gegenüber sommerlicher Trockenheit (Gouyon et al., 1986; Thompson et al., 2007). Einen plötzlichen Wintereinbruch und Temperaturen unter -10 °C hingegen überleben die nicht-phenolischen Chemotypen signifikant besser als die phenolischen (Amiot et al., 2005). Entgegen ihrer natürlichen Verbreitung wuchsen die Chemotypen während des Feldversuchs in einer Population, die den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt war. Der Boden war lehmig und konnte die Feuchtigkeit gut halten. Die Durchschnittstemperaturen der warmen Monate betragen während des Feldversuchs etwa 18 °C und waren damit fast 20 °C niedriger als die Temperaturen in den natürlichen Habitaten der Chemotypen. Die mittlere Jahresniederschlagsmenge war geringer als in Südfrankreich, in den Sommermonaten (Juni-August) jedoch in Deutschland höher (vgl. (Thompson et al., 2007)). Die Bodenbedingungen und Niederschlagsmengen im Sommer entsprachen folglich eher den natürlichen Bedingungen der nicht-phenolischen Chemotypen, während die Gesamtniederschlagsmenge den natürlichen Bedingungen der phenolischen Chemotypen glich. Thompson beobachtete, dass die phenolischen Chemotypen schneller wachsen als die nicht-phenolischen (Thompson et al., 2004; Thompson et al., 2007). Diese Feststellung konnte im Feldversuch nicht bestätigt werden. Ebenso waren keine Unterschiede in der Vitalität zwischen den phenolischen und nicht-phenolischen Chemotypen feststellbar. Um ein Erfrieren der phenolischen Chemotypen zu verhindern, waren alle Pflanzen von Ende Oktober 2011 bis Ende März 2012 in einem Kältegewächshaus ($\sim 10\text{ °C}$) vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben untergebracht.

Im Mai 2011 wurden Stecklinge aller sechs *Thymus vulgaris*-Chemotypen auf einem Feld in Groß Schierstedt (Kreis Aschersleben) ausgepflanzt. Einen Monat später begann die qualitative und quantitative Analyse der Terpenegehalte. Vergleicht man die Gesamtterpenmengen beider Versuchsjahre, so produzierten der G-, A- und C-Typ 2012 signifikant mehr Terpene als 2011. Zurückzuführen ist das auf einen gleichbleibend hohen Gesamtterpengehalt im zweiten Versuchsjahr. Trotz der Schwankungen im Gesamtterpengehalt blieb das Verhältnis von Hauptmonoterpen (bzw. der Summe des Hauptmonoterpens und des zugehörigen Acetats) zum Gesamtterpengehalt über alle Messtage konstant.

Auffällig war eine Abnahme des Gesamtterpengehalts im Juli 2011, die in den phenolischen Chemotypen am deutlichsten war, sich aber 2012 nur bei dem Thymoltyp wiederholte. Ende Juni 2012 fiel die Temperatur innerhalb eines Tages von 22 °C auf 14 °C und blieb die

folgenden fünf Tage auf diesem Niveau. Damit verbunden war eine deutlich verringerte Globalstrahlung. Die Abnahme des Gesamtterpenegehalts ließe sich als eine Reaktion der Pflanzen auf den durch die Witterungsbedingungen verursachten Stress deuten. Im folgenden Jahr fand solch ein Wettereinbruch nicht statt. Der erneute Abfall der Terpenmenge im T-Typ kann somit nicht allein durch klimatische Einflüsse erklärt werden. Eine Verminderung des Thymolgehalts im Juli und der folgende Anstieg des Terpenegehalts bis Oktober konnte zwar bereits beobachtet werden (Holthuijzen, 1994). Während sich im durchgeführten Feldversuch jedoch auch der Gesamtterpenegehalt zu dieser Zeit deutlich verringerte, blieb in den Untersuchungen von Holthuijzen (1994) die Summe von Thymol, Carvacrol, *para*-Cymen und γ -Terpinen annähernd gleich. Über alle Chemotypen hinweg betrachtet, unterlag der T-Typ den größten Schwankungen. So wurden bei diesem Chemotyp sowohl sehr niedrige als auch die höchsten Werte für den Gesamtterpenegehalt gemessen. Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Feldversuch mit dem Ziel durchgeführt, die saisonale Variation der sechs Chemotypen des südfranzösischen *Thymus vulgaris* zu untersuchen.

Verschiedene Publikationen, die den Terpenegehalt des Thymians während des Vegetationszyklus untersuchten, beobachteten, dass die Terpenegehalte der Pflanzen während der Blüte oder kurz danach am höchsten sind, während andere Veröffentlichungen von nur geringen Unterschieden in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung des Öls berichteten (Messerschmidt, 1964; McGimpsey et al., 1994; Hudaib et al., 2002; Stahl-Biskup, 2002; Jordán et al., 2006). Messerschmidt ging sogar so weit, dass er die beobachteten Unterschiede für so unbedeutend hielt, „dass ihre pharmakognostische Auswertung nur schwer möglich ist und auch gar nicht notwendig erscheint“. Da die Pflanzen im durchgeführten Feldversuch nicht während des Versuchs blühten, sondern während der Überwinterungszeit im Gewächshaus, war eine Korrelation von Blütezeit und Terpenegehalt nicht möglich. Die Blüte der Pflanzen wurde induziert, da die starke Sonneneinstrahlung die Temperaturen im Kältengewächshaus bereits Anfang März auf über 20 °C ansteigen ließ.

4.1.4 Die Unterschiede im Gesamtterpenegehalt der Chemotypen beruhen nicht auf der Anzahl der glandulären Trichome

Die Blätter ätherisches Öl produzierender Pflanzen sind übersät mit glandulären Trichomen. Beim Thymian gibt es zwei Arten dieser Trichome: die Drüsenhaare und die Drüsenschuppen. Drüsenhaare bestehen aus einer Stielzelle und einer sekretorischen Zelle, während Drüsenschuppen aus einer Basalzelle, einer Stielzelle und zwölf sekretorischen Zellen

bestehen. Das ätherische Öl wird vorwiegend in den Drüsenschuppen gebildet. Yamaura zeigte, dass auch in den Drüsenhaaren die Synthese von Monoterpenen stattfindet, postulierten aber auch, dass in Lamiaceen allgemein durch den unterschiedlichen Aufbau der glandulären Trichome in den Drüsenschuppen mit acht bis zwölf sekretorischen Zellen rund 15 bis 23 Mal mehr Monoterpene als in den einköpfigen Drüsenhaaren gebildet werden (Yamaura et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Blattparameter untersucht, um einen Vergleich der Blattmorphologien der einzelnen Chemotypen durchzuführen sowie einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Terpengehalt und den glandulären Trichomen zu finden. Für *Oregano* wurde gezeigt, dass sich die Morphologie der glandulären Trichome zwischen den Chemotypen nicht unterscheidet (Werker et al., 1985). Auch in den untersuchten *Thymian*-Chemotypen waren bei allen Chemotypen die gleichen Arten glandulärer Trichome zu finden. Die Gesamtzahl der Drüsenhaare ist auf beiden Blattseiten jeweils größer als die Anzahl der Drüsenschuppen. Während sich die sechs Chemotypen hinsichtlich der Gesamtanzahl ihrer Drüsenschuppen nicht signifikant unterschieden, konnten auf der Blattoberseite signifikant mehr Drüsenschuppen gezählt werden als auf der Blattunterseite. Die Anzahl der Drüsenhaare unterschied sich signifikant zwischen einzelnen Chemotypen, jedoch wurden bei allen Chemotypen mehr Drüsenhaare auf der Unterseite ihrer Blätter gefunden als auf der Oberseite. Die höhere Anzahl an Drüsenhaaren im Vergleich zu den Drüsenschuppen wurde auch schon bei anderen Lippenblütengewächsen beobachtet, deren Verteilung auf den beiden Blattseiten variierte zwischen den Arten jedoch beträchtlich (Maffei et al., 1986; Kahraman et al., 2009; Celep et al., 2011).

Das in den glandulären Trichomen produzierte ätherische Öl spielt eine wichtige Rolle beim Schutz und der Abwehr von Fraßfeinden und Pathogenen (Hammer et al., 1999; Dorman et al., 2000; Angioni et al., 2004; Cheng et al., 2005; Bozin et al., 2006; Kim et al., 2008). Die verschiedenen Arten der Trichome scheinen dabei unterschiedliche Rollen zu spielen. So wurde beobachtet, dass die Kutikula der Drüsenhaare porös sein kann und das ätherische Öl damit relativ schnell nach der Bildung abgibt. Ebenso wurden bei Drüsenhaaren dünne Kutikulas beobachtet, die kurz nach der Sekretion des Öls durch den hohen Druck platzen können. Die Drüsenschuppen hingegen können das Öl länger speichern und werden meist erst durch äußere mechanische Einwirkung, beispielsweise durch Fraßfeinde zerstört (Werker, 1993). Auch in *Thymian* könnten die Drüsenhaare die Funktion der regelmäßigen Terpenabgabe haben, während die Drüsenschuppen als direkte Waffen gegen Angreifer genutzt werden könnten.

Da das ätherische Öl in den glandulären Trichomen gebildet wird, wurde die Anzahl der Trichome mit dem Gesamtterpengehalt der Chemotypen verglichen. Hier wurde keine signifikante Korrelation gefunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in den *Thymus vulgaris*-Chemotypen die unterschiedliche Menge der Terpene nicht von der Anzahl der Drüsenschuppen und -haare abhängt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einigen in anderen Lamiaceen gemachten Beobachtungen, die besagen, dass der Terpengehalt mit der Anzahl der glandulären Trichome steigt (Yoshida et al., 1968; Croteau et al., 1981; Werker et al., 1985). Teilweise werden in den angesprochenen Publikationen jedoch keine absoluten Zahlen und Konzentrationen für die Trichome und den Terpengehalt angegeben, was einen Vergleich mit den gemessenen Daten erschwert. Croteau konnte einen Anstieg des Camphorgehaltes um rund 5 mg bei einer Zunahme der Anzahl der Drüsenschuppen um 6000 messen (Croteau et al., 1981). In den in dieser Arbeit vermessenen Chemotypen differierte die Anzahl der Trichome nur um maximal 717. Der Vergleich von Trichomen und Terpengehalt bezog sich auch immer auf gleiche Pflanzen während des Wachstums. In der vorliegenden Arbeit wurden die Trichome der sechs Chemotypen zum gleichen Zeitpunkt und im gleichen Alter gezählt. Die Werte reflektieren also nur eine Momentaufnahme der Anzahl der Trichome und des Terpengehalts zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Unterschied in den Terpengehalten der sechs Chemotypen des südfranzösischen Thymians nicht allein durch die unterschiedliche Anzahl der glandulären Trichome verursacht wird.

4.2 Monoterpenbiosynthese in *Thymus vulgaris*

4.2.1 Die identifizierten Terpensynthasegene besitzen typische Merkmale der Monoterpensynthesen

Es konnten sechs Terpensynthasegene aus *Thymus vulgaris* identifiziert werden, deren Translationsprodukte *in vitro* vorwiegend die Monoterpene α -Terpineol, *trans*-Sabinenhydrat, *cis*-Sabinenhydrat, Linalool und γ -Terpinen bildeten.

Terpensynthesen weisen eine Reihe von konservierten Regionen auf. Die Metallionenbindemotive RxR (Starks et al., 1997), DDxxD (Cane et al., 1996; Starks et al., 1997) und DTE (Cane et al., 2000) sind ebenso in den sechs Thymian-Terpensynthesen zu

finden wie das für die Umsetzung von GPP wichtige RR-Motiv (Williams et al., 1998). Monoterpensynthasen sind in der Regel 600 bis 650 Aminosäuren lang und besitzen ein 50 bis 70 Aminosäuren langes Signalpeptid, das sie für den Transport in die Plastiden markiert (Bohlmann et al., 1998; Turner et al., 1999). Die Monoterpensynthasen aus *Thymus vulgaris* waren nur knapp 600 Aminosäuren lang; ihr mit SignalP vorhergesagtes Signalpeptid hatte eine Länge von 46, 47 bzw. 54 Aminosäuren. TvTPS4 war mit 580 aa die kürzeste isolierte Terpensynthase und für sie wurde kein Signalpeptid vorhergesagt. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit mit TvTPS3 und der Tatsache, dass die Aminosäuren vor dem RR-Motiv nicht für katalytische Aktivität notwendig sind (Williams et al., 1998), wurden die vor diesem Motiv liegenden Aminosäuren dennoch als Signalpeptid betrachtet.

Es gibt verschiedene Ansätze zur Klassifizierung der Terpensynthasen. Die Einteilung von Trapp und Croteau beruht auf der Exon-Intron-Struktur der Terpensynthasen (Trapp et al., 2001). Die hinsichtlich ihrer genomischen Struktur untersuchte γ -Terpinensynthase TvTPS2 ist hier den Klasse III-Terpensynthasen zuzuordnen. Diese besitzen sechs Introns und sieben Exons. In diese Klasse gehören laut Trapp und Croteau auch verschiedene Limonensynthasen aus Minze, *Perilla* und *Arabidopsis thaliana* sowie verschiedene Sesqui- und Diterpensynthasen. Eine andere Art der Klassifizierung versuchte Jörg Bohlmann: Er teilte bekannte Terpensynthasen nach ihrer Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen ein (Bohlmann et al., 1998) (Abbildung 4.1). Diese Gruppen wurden von Aubourg und Dudareva erweitert (Aubourg et al., 2002; Dudareva et al., 2003). Auch hier gliedern sich die identifizierten Terpensynthasen aus *Thymus vulgaris* sehr gut in die *Tpsb*-Familie ein, die Monoterpensynthasen verschiedener Angiospermen enthält, darunter auch die bereits genannten Limonensynthasen aus *Mentha spicata* und *Perilla frutescens* sowie verschiedene Monoterpensynthasen aus Salbei (*Salvia officinalis*).

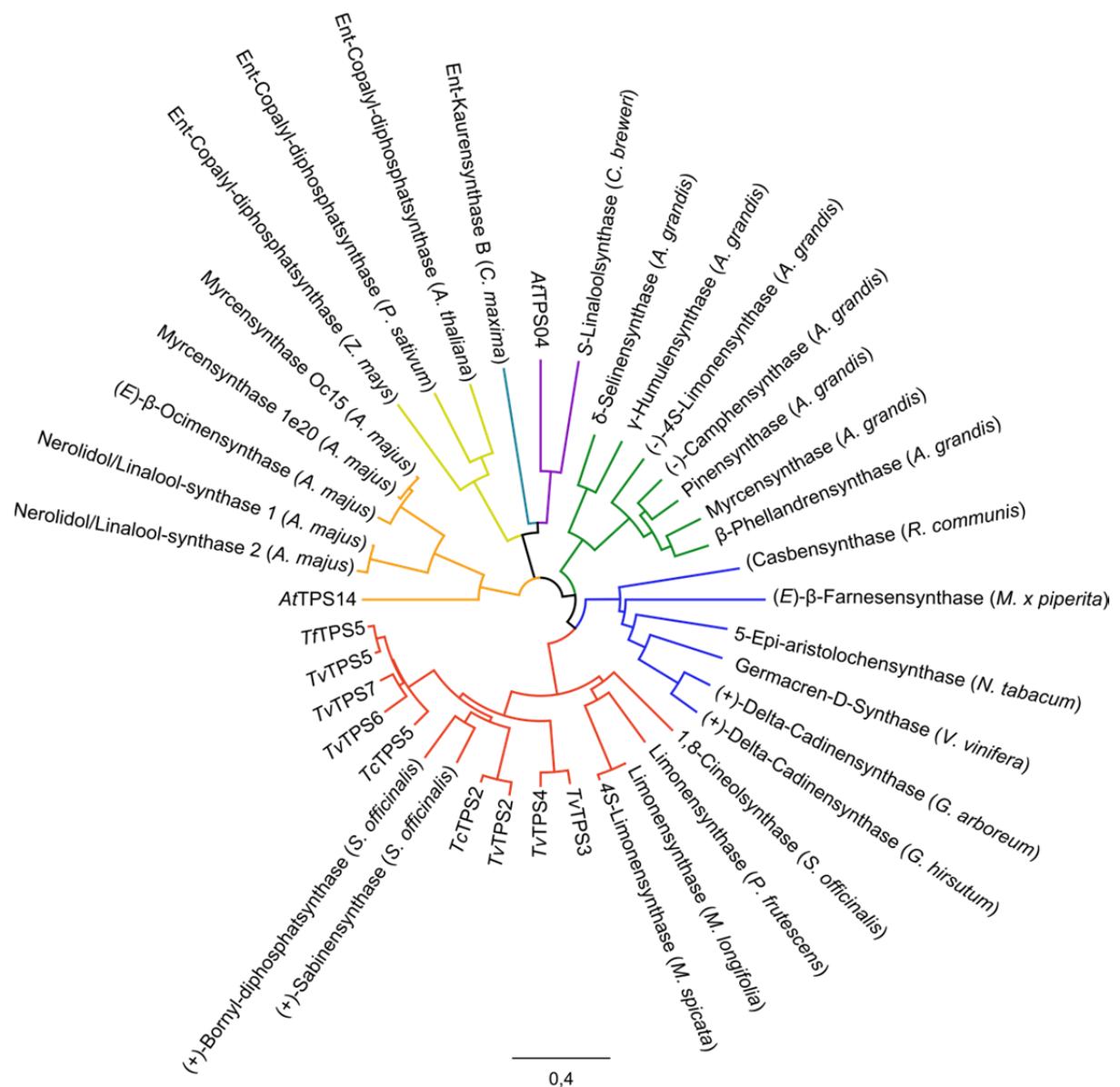


Abbildung 4.1: Phylogenetischer Baum der Thymian-Terpensynthasen und ausgewählter repräsentativer Terpensynthasen anderer Pflanzenfamilien. Die Sequenzverwandtschaft wurde mit Geneious nach der „neighbor-joining“-Methode analysiert und visualisiert. Die unterschiedlichen Gruppen (Bohlmann et al., 1998; Aubourg et al., 2002; Dudareva et al., 2003) wurden zur besseren Erkennbarkeit farblich voneinander getrennt: blau - *Tpsa*, rot - *Tpsb*, gelb - *Tpsc*, grün - *Tpsd*, türkis - *Tpse*, violett - *Tpsf*, orange - *Tpsg*. Der Maßstab (0,4) entspricht einer Differenz von 40 % auf Aminosäureniveau.

Aubourg (2002) verknüpfte die beiden Klassifizierungen nach Exon-Intron-Struktur (Trapp et al., 2001) und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz (Bohlmann et al., 1998). Demnach sind alle Enzyme der Gruppen *Tpsa* und *Tpsb* den Klasse-III-Terpensynthasen nach Trapp und Croteau zuzuordnen. Dass diese Einteilung auch für die aus *Thymus vulgaris* isolierten Terpensynthasen gilt, wurde beispielhaft mit der Analyse von TvTPS2 gezeigt.

4.2.2 Die identifizierten Monoterpensynthasen bilden Hauptmonoterpene der *Thymus vulgaris*-Chemotypen

Fünf der sechs aus *Thymus vulgaris* isolierten Monoterpensynthasen produzierten *in vitro* drei verschiedene Hauptmonoterpene der Chemotypen aus Südfrankreich. TvTPS3 und TvTPS4 synthetisierten Linalool, TvTPS5 katalysierte die Bildung von α -Terpineol und TvTPS6 sowie TvTPS7 bildeten *cis*- und *trans*-Sabinenhydrat (Krause et al., 2012). Damit konnte gezeigt werden, dass diese Hauptmonoterpene ohne die Aktivität weiterer Enzyme aus GPP synthetisiert werden können. Die sechste identifizierte Terpensynthase, TvTPS2, produzierte γ -Terpinen, ein Terpen, welches gemeinsam mit Thymol bzw. Carvacrol auftritt und vermutlich deren Vorläufer ist (siehe 4.2.4). Eine Terpensynthase, die GPP zu Geraniol, dem Hauptmonoterpen des G-Typs, umsetzt, konnte nicht identifiziert werden.

Monoterpensynthasen, die Geraniol, Linalool, α -Terpineol und γ -Terpinen bilden, sind aus verschiedenen Pflanzenfamilien beschrieben worden (Crowell et al., 2002; Iijima et al., 2004; Martin et al., 2004; Iijima et al., 2004a; Crocoll et al., 2010; Masumoto et al., 2010). Erst kürzlich wurden eine γ -Terpinen- und eine α -Terpineolsynthase aus dem in Portugal verbreiteten *Thymus caespititius* identifiziert (Lima et al., 2013). Nahezu alle bisher isolierten Linaloolsynthasen, auch TvTPS3 und TvTPS4, produzieren ihr Hauptmonoterpen sehr spezifisch ohne Nebenprodukte, während α -Terpineol- und γ -Terpinensynthasen oft Nebenprodukte bilden. Die von Sandra Krause (2012) charakterisierten Sabinenhydratsynthasen TvTPS6 und TvTPS7 sind die einzigen bisher isolierten Enzyme mit dieser Spezifität, so dass kein Vergleich mit weiteren Enzymen möglich war.

Die Sequenzähnlichkeit der Monoterpensynthasen aus *Thymus vulgaris* auf Proteinebene betrug mindestens 52 %. Die beiden Linaloolsynthasen TvTPS3 und TvTPS4 sowie die beiden Sabinenhydratsynthasen TvTPS6 und TvTPS7 sind sich mit etwa 85 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz noch ähnlicher. Besonders interessant ist die hohe Sequenzähnlichkeit von TvTPS5 mit TvTPS7 (90 %) und TvTPS6 (82 %), da die Enzyme unterschiedliche Hauptprodukte synthetisieren. Allerdings ist α -Terpineol, Produkt von TvTPS5, ein Nebenprodukt der beiden Sabinenhydratsynthasen TvTPS6 und TvTPS7, was einen ähnlichen Biosyntheseweg von Sabinenhydrat und α -Terpineol vermuten lässt. Der von Sandra Krause vorgeschlagene Weg zur Bildung von Sabinenhydrat lässt eine Bildung von α -Terpineol zu (Krause et al., 2012). Außerdem konnte für verschiedene Monoterpensynthasen gezeigt werden, dass der Austausch nur einer Aminosäure zu einem anderen Produktspektrum führen kann (Köllner et al., 2004; Kampranis et al., 2007; Krause et

al., 2012). Weitere Untersuchungen an diesen Enzymen könnten zur Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung von Terpensynthasen beitragen.

4.2.3 Die Bildung von Geraniol erfolgt in *Thymus vulgaris* möglicherweise durch Phosphatasen

Geraniolsynthasen wurden bereits aus verschiedenen Lippenblütengewächsen wie *Perilla* und Basilikum isoliert (Iijima et al., 2004a; Masumoto et al., 2010), konnten aber nicht in den Chemotypen von *Thymus vulgaris* gefunden werden. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Geraniol in Thymian auf anderen Wegen gebildet werden könnte. Eine Möglichkeit der Bildung von Geraniol ist die hydrolytische Spaltung von GPP, einer Reaktion, die von Phosphatasen katalysiert wird (Pérez et al., 1980; Clastre et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die bakteriellen Phosphatasen aus *E. coli* in der Lage waren, die Phosphatgruppe vom GPP abzuspalten (siehe 3.3). Das Produkt dieser Reaktion ist Geraniol. In den GC-Chromatogrammen konnten außerdem das Isomer Nerol sowie die beiden Aldehyde Geranial und Neral nachgewiesen werden. Diese vier Substanzen waren in etwa in gleichem Verhältnis auch im Geranioltyp zu finden. Es ist durchaus denkbar, dass die in *Thymus vulgaris* vorkommenden Phosphatasen dieselben Reaktionen mit den gleichen Produkten katalysieren können.

4.2.4 Die Biosynthese von Thymol und Carvacrol erfolgt über das Zwischenprodukt γ -Terpinen

Im ätherischen Öl von zwei der sechs Chemotypen des südfranzösischen Thymians sind hauptsächlich die phenolischen Monoterpenalkohole Carvacrol und Thymol zu finden. Diese beiden Terpene sind aufgrund ihrer Wirkung gegen Mikroorganismen und Fraßfeinde sowie als Antioxidantien besonders interessant für die pharmazeutische Industrie und die Lebensmittelindustrie (Lagouri et al., 1993; Aeschbach et al., 1994; Dorman et al., 2000; Hummelbrunner et al., 2001; Nostro et al., 2007; Braga et al., 2008; Sokovic et al., 2008). Bisher ist jedoch wenig über die Biosynthese dieser nützlichen Substanzen bekannt. Durch die distinkte Bildung der verschiedenen Hauptmonoterpene bieten sich die Chemotypen des südfranzösischen Thymians für die Untersuchung der Biosynthese von Carvacrol und Thymol an.

Bereits 1978 gaben Untersuchungen mit markiertem Kohlenstoff (^{14}C) und tritiummarkiertem GPP Hinweise darauf, dass die Biosynthese von Thymol und Carvacrol über die Zwischenprodukte γ -Terpinen und *para*-Cymen verläuft (Poulose et al., 1978a). Poulose und Croteau identifizierten noch im gleichen Jahr mit der γ -Terpinen-Synthetase ein Enzym, das GPP zu γ -Terpinen umsetzt (Poulose et al., 1978b). Ein weiteres Enzym dieser Art beschrieben Alonso und Croteau (Alonso et al., 1991). Mit *Tvtps2* konnte nun ein Gen, das für eine γ -Terpinensynthase kodiert, beschrieben werden. Aus den phenolischen Chemotypen wurden zwei Varianten der *Tvtps2* isoliert (siehe 3.4.2). Beide Enzymvarianten waren aktiv und die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter ließ darauf schließen, dass beide Varianten etwa die gleiche Affinität zum Substrat haben. Die gemessenen K_m -Werte stimmten mit dem von Poulose ($14\ \mu\text{M}$) überein, waren jedoch höher als der von Alonso gemessene K_m -Wert für die γ -Terpinensynthase ($2,6\ \mu\text{M}$). Der von Poulose und Croteau postulierte Biosyntheseweg konnte bisher mit modernen Methoden nicht bestätigt werden. Die Korrelationen der Transkriptmengen von *Tvtps2* und dem Auftreten ihres direkten Produkts γ -Terpinen sowie den Endprodukten der Biosynthese, Thymol und Carvacrol (siehe 3.4.3.2), geben jedoch Hinweise darauf, dass die Biosynthese der phenolischen Monoterpene tatsächlich über das Zwischenprodukt γ -Terpinen verläuft und beide Monoterpene über den gleichen Biosyntheseweg gebildet werden. Poulose und Croteau formulierten den Biosyntheseweg wie folgt: Aus γ -Terpinen, gebildet aus GPP durch eine Terpensynthase, sollte in zwei getrennten Oxidationsschritten erst *para*-Cymen und aus diesem dann Thymol gebildet werden (Poulose et al., 1978a). Beide Oxidationsschritte könnten durch Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert werden. Christoph Crocoll identifizierte verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme aus Oregano und Thymian, die in der Lage waren, *para*-Cymen aus γ -Terpinen zu synthetisieren (Crocoll, 2011). Aus Minze und *Perilla* wurden Cytochrom-P450-Enzyme identifiziert, die ähnliche Reaktionen katalysieren wie sie nach dem postulierten Biosyntheseweg zur Bildung von Carvacrol und Thymol nötig sind (Lupien et al., 1999; Haudenschild et al., 2000; Mau et al., 2010). Verschiedene Untersuchungen belegten schon zeitig die Beteiligung einer Reihe von Monoterpenhydroxylasen am Sekundärstoffwechsel der Lamiaceen (Karp et al., 1987; Karp et al., 1990; Funk et al., 1993; Karp et al., 1993), sodass das Auftreten solcher Enzyme auch in Thymian erwartet werden kann.

4.3 Mechanismen der Chemotypbildung

4.3.1 Die Expressionsmuster der Terpensynthasen führen zu einem neuen Modell der Chemotypbildung in *Thymus vulgaris*

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung der aus *Thymus vulgaris* isolierten Monoterpensynthasen wurde gezeigt, dass die Synthese der Hauptmonoterpene in den Chemotypen unabhängig voneinander erfolgen kann. Jedes der isolierten Enzyme war in der Lage, GPP in Abwesenheit anderer Terpensynthasen zu einem der Hauptmonoterpene umzusetzen. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Terpensynthasegene in den verschiedenen Chemotypen untersucht und die erhaltenen Transkriptmengen mit dem Auftreten des Enzymprodukts *in planta* in den verschiedenen Chemotypen verglichen. Grundsätzlich wurden die Terpensynthasen hauptsächlich in den Chemotypen exprimiert in denen auch ihr Hauptprodukt in großen Mengen vorkam. Der errechnete Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman beschreibt den Zusammenhang zwischen zwei Variablen, in diesem Fall zwischen Transkriptmenge und Terpengehalt. Der ebenfalls berechnete Signifikanzwert stuft ein, ob dieser Zusammenhang zufällig zustande gekommen ist oder nicht.

Für verschiedene Variationen aus Terpenprodukten und Transkriptmengen konnten hohe, signifikante Rangkorrelationskoeffizienten berechnet werden. So ist der Rangkorrelationskoeffizient von 0,995 für *Tvtps2* und γ -Terpinen ein Indiz dafür, dass TvTPS2 für die Bildung von γ -Terpinen in *Thymus vulgaris* allein verantwortlich ist. Signifikante Korrelationskoeffizienten, die beim Vergleich von verschiedenen Terpenen mit den Transkriptmengen entstehen, können auf Biosynthesewege hinweisen. Für die Transkriptmenge von *Tvtps2* und die Kombinationen von γ -Terpinen und Thymol, γ -Terpinen und Carvacrol, sowie γ -Terpinen, Thymol und Carvacrol, wurden signifikante hohe Korrelationskoeffizienten berechnet. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass Thymol und Carvacrol über das Zwischenprodukt γ -Terpinen gebildet werden (Poulose et al., 1978a). Da sich der Biosyntheseweg von Thymol und Carvacrol demnach wahrscheinlich erst nach der Bildung von γ -Terpinen aufspaltet und die phenolischen Monoterpene nicht direkt durch *Tvtps2* gebildet werden, konnte weder eine signifikante Korrelation für *Tvtps2* und Thymol noch für *Tvtp2* und Carvacrol errechnet werden. Hier ist ein zusätzlicher Syntheseschritt notwendig, der vermutlich von Cytochrom-P450-Hydroxylasen katalysiert wird (siehe 4.2.4).

Die zwei isolierten Linaloolsynthesen wurden in unterschiedlichen Chemotypen exprimiert. *Tvtps3* kam nur im L-Typ vor, *Tvtps4* hauptsächlich im T-Typ. Aber auch im C- und L-Typ wurde Transkript von *Tvtps4* nachgewiesen. In allen drei Chemotypen war auch Linalool zu finden. Da *Tvtps4* in allen Chemotypen auftrat, die auch Linalool enthielten, konnte für diese Kombination ein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient berechnet werden. Für *Tvtps3* und Linalool hingegen war wegen des Linaloolgehalts der phenolischen Chemotypen kein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient bestimmbar. Dennoch kann man aufgrund des Vorkommens von *Tvtps3* und Linalool darauf schließen, dass die Expression des Enzyms den L-Chemotyp definiert. Die zweite Linaloolsynthese *Tvtps4* produziert womöglich Linalool als Nebenmonoterpen in den phenolischen Chemotypen Thymol und Carvacrol. Dass *Tvtps4* auch im L-Typ exprimiert wird, könnte darauf beruhen, dass dieser Chemotyp in den ersten Monaten hauptsächlich ein phenolisches Monoterpen produziert (Vernet et al., 1986). So muss man damit rechnen, dass der L-Typ genomisch Ähnlichkeit mit einem der phenolischen Chemotypen, in unserem Fall dem T-Typ, hat, was auch das Auftreten von γ -Terpinen und Thymol sowie die Expression von *Tvtps2* in diesem Chemotyp erklären könnte.

Die Korrelation von *Tvtps5* und ihrem Hauptprodukt α -Terpineol war nicht signifikant, da im U-Typ beträchtliche Mengen α -Terpineol vorkommen, *Tvtps5*-Transkript aber nicht nachgewiesen werden konnte. Die durchgeführten Untersuchungen an *Tvtps6* und *Tvtps7* zeigten, dass beide Terpensynthesen als Nebenprodukt α -Terpineol bilden (Krause et al., 2012). Nimmt man an, dass das im U-Typ auftretende α -Terpineol allein durch die beiden Sabinenhydratsynthesen gebildet wird, ergibt sich auch für *Tvtps5* und α -Terpineol ein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient. In diesem Fall ist *Tvtps5* die Terpensynthese, deren Expression den α -Terpineoltyp charakterisiert.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass das gesamte Terpenspektrum des U-Chemotyps durch die Produkte der beiden Terpensynthesen *Tvtps6* und *Tvtps7* abgedeckt wird (Krause et al., 2012), konnte für die Hauptprodukte *trans*- und *cis*-Sabinenhydrat und die Transkriptmengen der beiden Terpensynthesegene keine signifikante Korrelation gefunden werden. Die Transkriptmengen von *Tvtps6* und *Tvtps7* waren im U-Typ am höchsten. Dazu passend konnten deren Produkte in vergleichsweise großen Mengen im selben Chemotyp nachgewiesen werden. Während *cis*-Sabinenhydrat jedoch nur im U-Typ detektiert werden konnte, war *Tvtps6*-Transkript in geringen Mengen auch in den anderen fünf Chemotypen zu finden. Dass in diesen Chemotypen kein *cis*-Sabinenhydrat zu detektieren war, könnte darauf beruhen, dass die niedrigen Expressionslevel von *Tvtps6* zu einer so geringen Enzymmenge führten, dass die Mengen des gebildeten Produkts unter der Detektionsgrenze lagen. Es wäre

auch denkbar, dass eine zusätzliche post-transkriptionelle Regulation stattfindet, die entweder die Translation des Enzyms verhindert oder das Enzym inaktiviert. Die Monoterpensynthase *Tvtps7* ist im U-Typ und in geringen Mengen im C- und G-Typ exprimiert. Ihr Produkt *trans*-Sabinenhydrat trat außer im U-Typ auch in den beiden phenolischen Chemotypen auf. *Trans*-Sabinenhydrat ist ein Nebenprodukt von *Tvtps2*, einem Enzym, das besonders in den phenolischen Chemotypen (T und C) exprimiert ist. Nimmt man an, dass dieses im T-Typ allein durch *Tvtps2* entsteht, kann man eine signifikante Korrelation für *trans*-Sabinenhydrat und *Tvtps7* errechnen.

Im G-Typ waren außer Geraniol und den verwandten Substanzen Geraniol, Nerol und Neral nur Spuren weiterer Monoterpene detektierbar, während in allen anderen Chemotypen auch andere Monoterpene und sogar Hauptmonoterpene anderer Chemotypen zu finden waren. Allerdings wurde in keinem dieser Chemotypen Geraniol detektiert. Auch dies deutete darauf hin, dass die Bildung von Geraniol in *Thymus vulgaris* nicht durch eine Terpensynthase realisiert wird (siehe 4.2.3). Möglicherweise definiert sogar das Nicht-Vorhandensein jeglicher Monoterpensynthasen diesen Chemotyp. Da mit (*E*)- β -Caryophyllen und Germacren D zwei Sesquiterpene im ätherischen Öl des G-Typs nachgewiesen werden konnten und bereits gezeigt wurde, dass GPP und FPP in den glandulären Trichomen mit dem MEP-Weg über den gleichen Biosyntheseweg gebildet werden (McCaskill et al., 1995), kann man davon ausgehen, dass GPP wie in den anderen Chemotypen gebildet wird. Dieses wird, wenn keine aktiven Monoterpensynthasen exprimiert werden, von Phosphatasen umgesetzt. So könnte das Terpenspektrum für den Geranioltyp erklärt werden.

Mit den gemachten Beobachtungen wurde ein Modell der Chemotypbildung in *Thymus vulgaris* erstellt (Abbildung 4.2). Die Ausprägung der Chemotypen beruht auf der differentiellen Expression der identifizierten Terpensynthasen. Im Fall der phenolischen Chemotypen ist ein weiterer Reaktionsschritt zur Bildung des jeweiligen Hauptmonoterpens möglich. Erst durch Cytochrom-P450-Enzyme wird hier entschieden, welches Hauptmonoterpen gebildet und welcher Chemotyp damit ausgeprägt wird. Die Expression von *Tvtps2* legt hier nur die Bildung eines phenolischen Chemotypen fest. Interessanterweise konnten bisher keine γ -Terpinen-Chemotypen gefunden werden, was eine Kopplung der γ -Terpinenbildung mit der Bildung von Carvacrol oder Thymol vermuten lässt. Die Ausprägung des G-Typs hingegen scheint darauf zu beruhen, dass keine Terpensynthase aktiv ist. Das Vorhandensein einer Geraniolsynthase kann hier aber dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

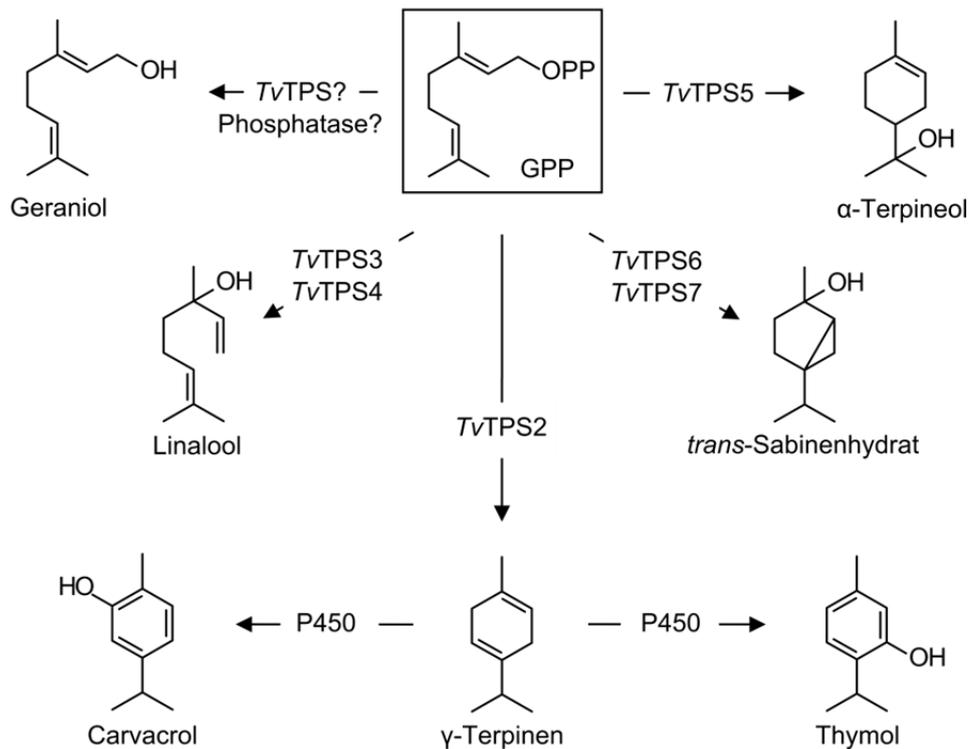


Abbildung 4.2: Modell der Chemotypbildung in *Thymus vulgaris*. Ausgehend vom Substrat Geranyldiphosphat (GPP) bilden Terpensynthasen die Chemotyp-Hauptmonoterpene α -Terpineol, *trans*-Sabinenhydrat und Linalool. Die phenolischen Monoterpene werden von Cytochrom-P450-Enzymen aus dem von *TvTTPS2* gebildeten γ -Terpinen synthetisiert. Es konnte bisher keine Terpensynthase gefunden werden, die die Bildung von Geraniol in *Thymus vulgaris* katalysiert. Möglicherweise spalten pflanzliche Phosphatasen das GPP und sind so für die Bildung von Geraniol verantwortlich.

Für den U-Typ wurde gezeigt, dass *TvTTPS6* und *TvTTPS7* das gesamte Terpenspektrum dieses Chemotyps bilden können (Krause et al., 2012). In diesem Chemotyp ist damit die Aktivität anderer Terpensynthasen theoretisch nicht nötig. Dies gilt jedoch nicht für alle Chemotypen. So konnten im Linalooltyp auch γ -Terpinen und Thymol detektiert werden. Beide Terpene werden nicht durch die Linaloolsynthese *TvTTPS3* gebildet. Ebenso tritt im ätherischen Öl der phenolischen Chemotypen Linalool auf, das kein Nebenprodukt der γ -Terpinensynthese *TvTTPS2* ist. Damit ist zu vermuten, dass weitere Monoterpensynthasen in den verschiedenen Chemotypen aktiv sind, ohne an der Bildung des jeweiligen Hauptmonoterpens beteiligt zu sein. Ein Beispiel dafür ist die Linaloolsynthese *TvTTPS4*. Das Enzym katalysiert die Bildung von Linalool aus GPP, ist aber vor allem im Thymoltyp exprimiert.

Die Grundaussage des Modells ist, dass die Hauptmonoterpene unabhängig voneinander synthetisiert werden können. Sie beruht auf der Beobachtung, dass jedes Hauptmonoterpene ausgehend von GPP von einer eigenen Terpensynthase gebildet werden kann. Damit steht das

Modell im Widerspruch zu Jean Passet, der eine Biosynthesekette postulierte, an deren Ende die Bildung von Thymol und damit die Ausprägung des T-Typs stand (Abbildung 4.3).

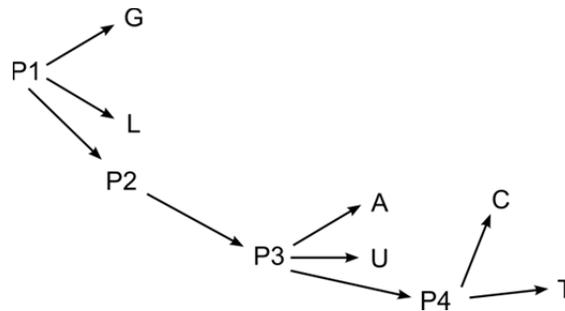


Abbildung 4.3: Modell der Biosynthese der Hauptmonoterpene in *Thymus vulgaris* nach Jean Passet. Die Bildung der Hauptmonoterpene folgt demnach über Intermediate (P1-P4). Die Hauptmonoterpene sind hier mit dem Einbuchstabencode der Chemotypen abgekürzt: G - Geraniol, L - Linalool, A - α -Terpineol, U - *trans*-Sabinenhydrat, C - Carvacrol, T - Thymol. Abbildung nach Passet (Vernet et al., 1986).

Die nicht-phenolischen Monoterpene können im Laufe dieser Kette aus den verschiedenen Zwischenstufen gebildet werden (Passet, 1971; Vernet et al., 1986; Thompson, 2002; Thompson et al., 2003). Das Ausschalten des jeweils letzten Syntheseschritts würde damit zu dem dominanteren Chemotyp führen. Tatsächlich lässt sich in den heute etablierten Reaktionsmechanismen der Monoterpensynthesen eine wie von Passet postulierte Biosynthesekette finden (Degenhardt et al., 2009) (Abbildung 4.4). Diese verläuft jedoch über instabile Intermediate, das nach Passet und Vernet postulierte „Ausschalten des jeweils letzten Syntheseschritts“ ist somit nicht möglich.

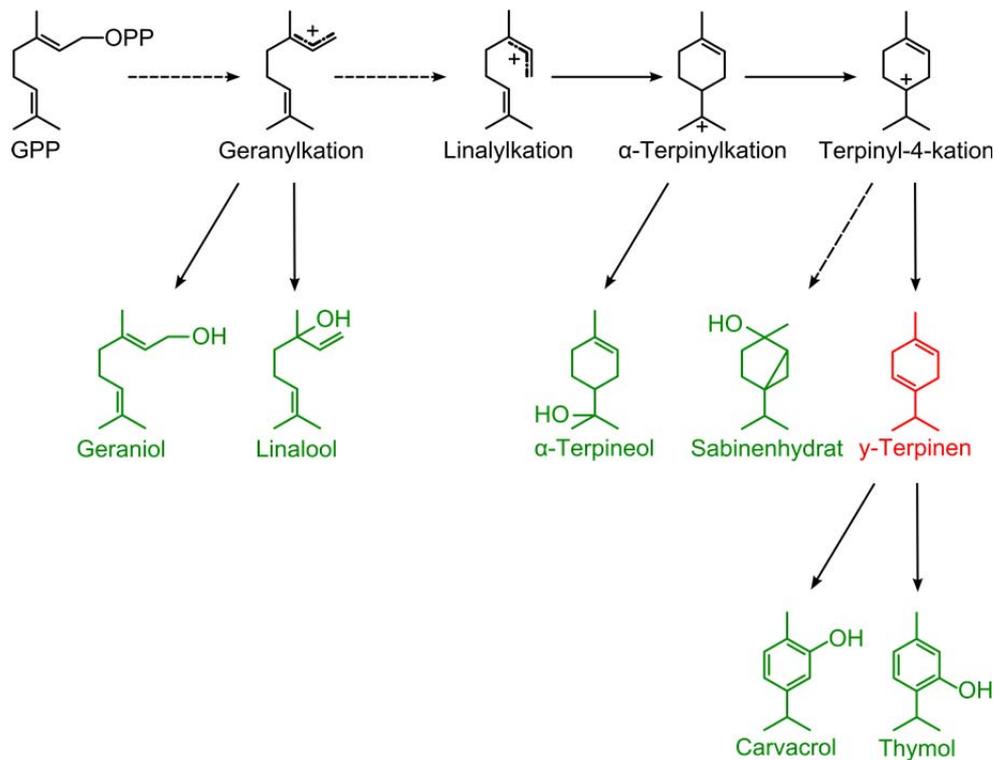


Abbildung 4.4: Bildung der Hauptmonoterpene aus GPP. Die Hauptmonoterpene (grün) werden aus verschiedenen instabilen Intermediaten des Biosynthesewegs von γ -Terpinen (rot) gebildet. Carvacrol und Thymol können aus γ -Terpinen gebildet werden. Gestrichelte Pfeile: Mehrere Syntheseschritte sind zum nachfolgenden Produkt nötig. Abbildung nach (Degenhardt et al., 2009).

In der „Reaktionsketten-Theorie“ wirft die Stellung von Linalool, bzw. des L-Typs, damals wie heute Fragen auf. Linalool kann, wie auch Geraniol, als eines der ersten Monoterpene direkt aus dem Geranyl- oder Linalylkation gebildet werden. In der epistatischen Reihe steht der L-Typ jedoch als rezessivster nicht-phenolischer Chemotyp erst an vierter Stelle. In dem in dieser Arbeit postulierten Modell spielt die Stellung der Chemotypen in der epistatischen Reihe für die Ausprägung des Chemotyps durch die Expression der verschiedenen Terpensynthasen keine Rolle.

4.3.2 Die Ausprägung der Chemotypen erfolgt über die epigenetische Regulation der Expression der Terpensynthasegene durch DNA-Methylierung

Die Ausprägung der Chemotypen hängt direkt mit der Transkription der Terpensynthasegene zusammen. Für *Tvtps2* konnte gezeigt werden, dass das Gen im Genom jedes Chemotyps vorkommt und theoretisch funktionsfähig ist (siehe 3.4.1). Die Regulation der Expression von *Tvtps2* erfolgt über die am 5'-Ende des Gens liegende Promotorregion. Diese wurde für das Gen der γ -Terpinensynthase *Tvtps2* mittels Genome Walking isoliert und hinsichtlich bekannter regulatorischer Elemente wie beispielsweise TATA- und CAAT-Boxen untersucht (siehe 3.5.1). Es konnten verschiedene Promotorvarianten (P1-P4) identifiziert werden. Eine dieser Varianten, P1, konnte aus jedem Chemotyp isoliert werden, die anderen drei Varianten traten jeweils in verschiedenen Chemotypen auf und unterschieden sich in ihrer Länge von der ersten Variante. Da in jedem Chemotyp jeweils zwei der Varianten gefunden werden konnten, spiegeln die Promotorvarianten möglicherweise die zwei Allele im diploiden Thymian wider (Dr. Lohwasser, IPK Gatersleben, persönliche Kommunikation). Die Promotorvariante P2 besaß acht Nukleotide mehr als P1. Die Varianten P3 und P4 hingegen zeichneten sich durch eine Deletion von 280 Nukleotiden aus. Ein solch große Deletion könnte sich auf die Funktionsfähigkeit des Promotors auswirken (Ennajdaoui et al., 2010). Neben diesen Varianten trat jedoch auch immer P1 in den Chemotypen auf; es konnte nicht bestimmt werden, welches der Allele aktiv ist. Dadurch war kein Rückschluss auf die Funktionalität möglich. Somit konnte die differentielle Expression von *Tvtps2* in den sechs verschiedenen Chemotypen nicht allein durch die Promotorsequenz erklärt werden.

Eine epigenetische Modifikation, die einen Einfluss auf die Genexpression hat, ist die DNA-Methylierung. Ein hoher Methylierungsgrad des Promotors kann sich reprimierend auf die Transkription des betroffenen Gens auswirken (Zhou et al., 1996; Zhang et al., 2006; Zemach et al., 2010). Eine etablierte Methode zur Bestimmung des Methylierungsgrades ist die Bisulfitsequenzierung (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994). Die DNA wird dabei mit Natriumhydrogensulfit behandelt, was zur Umwandlung nicht-methylierter Cytosine in Uracil führt (siehe 2.3.15). Nach der Behandlung werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen erlaubt einen Rückschluss darauf, welche der Cytosine im untersuchten DNA-Bereich methyliert vorlagen. Der große Vorteil der Bisulfitsequenzierung ist, dass sie den Methylierungsgrad jedes einzelnen untersuchten Cytosins wiedergeben kann. Die

Methode ist jedoch anfällig für Artefakte, da die Konvertierung vollständig erfolgen muss, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (Henderson et al., 2010). Tatsächlich liegt die Konvertierungsrate jedoch meist zwischen 95 % und 98 % (Warnecke et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Bisulfitkonvertierung des Promotorbereichs von *Tvtps2* gibt somit Hinweise auf den Methylierungsgrad; die Ergebnisse sind jedoch in jedem Fall kritisch zu betrachten und weiterhin zu verifizieren.

Für die Untersuchung wurde der Promotor von *Tvtps2* in zwei Fragmente geteilt. Das Fragment BS2, das den Translationsstart und den isolierten 5'UTR enthielt, war in allen Chemotypen nur gering methyliert. Der Transkriptionsstart liegt in der Regel etwa 35 bp hinter der TATA-Box und bildet den Anfang des 5'UTR (O'Shea-Greenfield et al., 1992). Damit würde dieser in der Mitte des BS2-Fragments liegen. Im BS1-Fragment dagegen, welches weiter stromaufwärts von BS2 lag, unterschied sich der Methylierungsgrad zwischen den Chemotypen deutlich. Eine scharfe Grenze zwischen unmethylierten und methylierten Genabschnitten ist nicht selten und wurde schon häufiger beobachtet (Dr. Hofmann, MLU Halle-Wittenberg, persönliche Kommunikation). Da gezeigt werden konnte, dass der Methylierungsgrad etwa 500 bis 100 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts am höchsten ist (Zhang et al., 2006; Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008), scheint das BS1-Fragment für die Regulation der Transkription von besonderer Bedeutung zu sein und ist Grundlage der weiteren Diskussion.

Wird die Genexpression von *Tvtps2* durch DNA-Methylierung reguliert, müssten die phenolischen Chemotypen einen geringeren Methylierungsgrad aufweisen als die nicht-phenolischen Chemotypen. Es ist bekannt, dass ein Methylierungsgrad von etwa 80 % im CG-Kontext die Genexpression komplett stilllegen kann (Soppe et al., 2000; Weinhold et al., 2013). Die Bisulfitsequenzierung für den T-Typ zeigte, dass die Promotorvariante P1 nahezu unmethyliert vorlag, während sie in den nicht-phenolischen Chemotypen zu über 80 % methyliert war. Die für P2 und P4 erhaltenen Methylierungsgrade lassen vermuten, dass auch das zweite Allel für *Tvtps2* im A- und G-Typ stillgelegt ist. Daraus kann man schließen, dass *Tvtps2* in den nicht-phenolischen Chemotypen inaktiviert wurde, im T-Typ jedoch abgelesen werden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den durch qRT-PCR erhaltenen Expressionsmustern überein. Für das P1-Allel aus dem C-Typ konnte kein vollständiges Methylierungsmuster bestimmt werden. Für die Bestätigung der Hypothese, dass die Methylierung in den Chemotypen die Genexpression bestimmt, müsste P1 auch im C-Typ nur gering methyliert sein. Für die Promotorvariante P4 konnte mit 66 % ein recht hoher Methylierungsgrad gemessen werden. Ob dieser Methylierungsgrad das Allel bereits stilllegt,

konnte nicht geklärt werden. Da die Variante P4 stark verkürzt ist, steht außerdem dessen Funktionalität infrage. Während für die nicht-phenolischen Chemotypen gezeigt werden konnte, dass beide Varianten des *Tvtps2*-Promotors stark methyliert sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit für die phenolischen Chemotypen jeweils nur der Methylierungsgrad für ein Allel bestimmt werden. So kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob in den Chemotypen, in denen *Tvtps2* exprimiert wird, ein Allel unmethyliert (aktiv) und das zweite methyliert (inaktiv) ist, oder ob *Tvtps2* sogar von beiden Allelen transkribiert werden könnte (Kodominanz).

Inwiefern die Methylierung des *Tvtps2*-Promotors in „übergeordnete“ Methylierungsmuster wie beispielsweise der Histonmethylierung (Vaillant et al., 2007; Liu et al., 2010) eingebunden ist, konnte aufgrund des geringen Wissens über das Thymian-Genom in der Zeit der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

Die durchgeführten Untersuchungen zum Methylierungsgrad des Promotors von *Tvtps2* geben Hinweise darauf, dass die Expression der Terpensynthasegene – und damit die Ausprägung der Chemotypen in *Thymus vulgaris* – durch den Methylierungsgrad ihrer Promotorregion reguliert wird. Die bei den Kreuzungen der Chemotypen notwendige Neumethylierung bestimmter Terpensynthasegene bzw. deren Promotoren könnte über RNA-vermittelte *de novo*-DNA-Methylierung geschehen (siehe 1.6). Eine siRNA-Sequenzierung könnte hierüber Aufschluss geben. Jedoch sind die Mechanismen, wie die Methylierungsmaschinerie ihre Ziele findet, bisher unbekannt. Dadurch ist es schwer, Faktoren zu identifizieren, die für die Methylierung bestimmter Gene und damit die Ausprägung der Chemotypen verantwortlich sind.

5 Literaturverzeichnis

- Abraham A, Kirson I, Glotter E, Lavie D** (1968) A chemotaxonomic study of *Withania somnifera* (L.) dun. *Phytochemistry* **7**: 957-962
- Aceituno F, Moseyko N, Rhee S, Gutiérrez R** (2008) The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**: 438
- Adams S, Vinkenoog R, Spielman M, Dickinson HG, Scott RJ** (2000) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* **127**: 2493-2502
- Adzet T, Granger R, Passet J, San Martin R** (1977) Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: sa Signification taxonomique. *Biochemical Systematics and Ecology* **5**: 269-272
- Aeschbach R, Löliger J, Scott B, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma O** (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* **32**: 31-36
- Alonso WR, Croteau R** (1991) Purification and characterization of the monoterpene cyclase γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **286**: 511-517
- Amiot J, Salmon Y, Collin C, Thompson JD** (2005) Differential resistance to freezing and spatial distribution in a chemically polymorphic plant *Thymus vulgaris*. *Ecology Letters* **8**: 370-377
- Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P** (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3530-3535
- Attwood J, Yung R, Richardson B** (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**: 241-257
- Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J** (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* **267**: 730-745
- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F** (2007) *Gadd45a* promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**: 671-675
- Belhassen E, Dommée B, Atlan A, Gouyon P, Pomente D, Assouad M, Couvet D** (1991) Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris* L.: genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **82**: 137-143
- Bennett RN, Wallsgrove RM** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* **127**: 617-633
- Bird A** (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**: 6-21
- Bloch K** (1965) The biological synthesis of cholesterol. Nobel Foundation
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R** (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 4126-4133
- Bohlmann J, Steele CL, Croteau R** (1997) Monoterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*): cDNA Isolation, Characterization, and functional Expression of Myrcene Synthase, (-)-(4*S*)-Limonene Synthase, and (-)-(1*S*, 5*S*)-Pinene Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 21784-21792

- Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, Backhaus RA, Camara B** (2000) Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal* **24**: 241-252
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G** (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 1822-1828
- Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M** (2008) Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**: 472-477
- Brandstädter J, Roßbach C, Theres K** (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* **192**: 69-74
- Burke C, Croteau R** (2002) Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **405**: 130-136
- Burke CC, Wildung MR, Croteau R** (1999) Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13062-13067
- Butcher PA, Doran JC, Slee MU** (1994) Intraspecific variation in leaf oils of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 419-430
- Cane DE, Kang I** (2000) Aristolochene Synthase: Purification, Molecular Cloning, High-Level Expression in *Escherichia coli*, and Characterization of the *Aspergillus terreus* Cyclase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **376**: 354-364
- Cane DE, Xue Q, Fitzsimons BC** (1996) Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **35**: 12369-12376
- Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, Jacobsen SE** (2003) Role of the *DRM* and *CMT3* Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology* **13**: 2212-2217
- Cao X, Jacobsen SE** (2002a) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the *DRM* and *CMT3* methyltransferase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 16491-16498
- Cao X, Jacobsen SE** (2002b) Role of the *Arabidopsis DRM* Methyltransferases in De Novo DNA Methylation and Gene Silencing. *Current Biology* **12**: 1138-1144
- Celep F, Kahraman A, Atalay Z, Doğan M** (2011) Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss. (Lamiaceae) and their systematic implications. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 147-153
- Chalchat J-C, Garry R-P, Michet A, Remery A** (1985) The essential oils of two chemotypes of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry* **24**: 2443-2444
- Chan SW-L, Henderson IR, Zhang X, Shah G, Chien JS-C, Jacobsen SE** (2006) RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* **2**: e83
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **6**: 351-360
- Chang T-H, Hsieh F-L, Ko T-P, Teng K-H, Liang P-H, Wang AH-J** (2010) Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. *The Plant Cell Online* **22**: 454-467
- Cheng S-S, Liu J-Y, Hsui Y-R, Chang S-T** (2005) Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource technology* **97**: 306-312

- Cheng S-S, Liu J-Y, Hsui Y-R, Chang S-T** (2006) Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology* **97**: 306-312
- Cheng X** (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **24**: 293-318
- Choi C-S, Sano H** (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* **277**: 589-600
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, Jacobsen SE, Fischer RL** (2002) DEMETER, a DNA Glycosylase Domain Protein, Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in *Arabidopsis*. *Cell* **110**: 33-42
- Christianson DW** (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical Reviews* **106**: 3412
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M** (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* **22**: 2990-2997
- Clastre M, Bantignies B, Feron G, Soler E, Ambid C** (1993) Purification and characterization of geranyl diphosphate synthase from *Vitis vinifera* L. cv Muscat de Frontignan cell cultures. *Plant Physiology* **102**: 205-211
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**: 215-219
- Colby S, Alonso W, Katahira E, McGarvey D, Croteau R** (1993) 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 23016-23024
- Coppen JJ** (2002) *Eucalyptus - The Genus Eucalyptus*. London: Taylor & Francis
- Crocoll C** (2011) Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. PhD Thesis, Friedrich-Schiller-Universität
- Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J** (2010) Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology* **73**: 587-603
- Croteau R, Felton M, Karp F, Kjonaas R** (1981) Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiology* **67**: 820-824
- Croteau R, Purkett PT** (1989) Geranyl pyrophosphate synthase: Characterization of the enzyme and evidence that this chain-length specific prenyltransferase is associated with monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **271**: 524-535
- Crowell AL, Williams DC, Davis EM, Wildung MR, Croteau R** (2002) Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **405**: 112-121
- de Abreu IN, Mazzafera P** (2005) Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 241-248
- de Meijer EP, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni VC, Ranalli P, Mandolino G** (2003) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* **163**: 335-346
- Degenhardt J, Gershenzon J** (2000) Demonstration and characterization of (*E*)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (*3E*)-4, 8-dimethyl-1, 3, 7-nonatriene biosynthesis. *Planta* **210**: 815-822

- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J** (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**: 1621-1637
- Demissie ZA, Sarker LS, Mahmoud SS** (2011) Cloning and functional characterization of β -phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Planta* **233**: 685-696
- Dhar MS, Pethe V, Gupta V, Ranjekar P** (1990) Predominance and tissue specificity of adenine methylation in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **80**: 402-408
- Dicke M, Baldwin IT** (2009) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the "cry for help". *Trends in Plant Science* **15**: 167-175
- Doerfler W** (1981) DNA methylation - a regulatory signal in eukaryotic gene expression. *Journal of General Virology* **57**
- Dorman H, Deans S** (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **88**: 308-316
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J** (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 933-938
- Dudareva N, Martin D, Kish CM, Kolosova N, Gorenstein N, Fäldt J, Miller B, Bohlmann J** (2003) (*E*)-beta-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. *The Plant Cell Online* **15**: 1227-1241
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I** (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 417-440
- Dunn D, Smith J** (1958) The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochemical Journal* **68**: 627
- Eden S, Cedar H** (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**: 255-259
- Ehrlich KC** (1993) Characterization of DBPm, a plant protein that binds to DNA containing 5-methylcytosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **1172**: 108-116
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Carreira LH, Ljungdahl LG, Kuo KC, Gehrke CW** (1985) DNA methylation in thermophilic bacteria: N⁴-methylcytosine, 5-methylcytosine, and N⁵-methyladenine. *Nucleic Acids Research* **13**: 1399-1412
- Endo T, Suga T** (1992) Demonstration of geranyl diphosphate synthase in several higher plants. *Phytochemistry* **31**: 2273-2275
- Ennajdaoui H, Vachon G, Giacalone C, Besse I, Sallaud C, Herzog M, Tissier A** (2010) Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana glauca*) cembratrien-ol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions. *Plant Molecular Biology* **73**: 673-685
- Ergle DR, Katterman FR** (1961) Deoxyribonucleic acid of cotton. *Plant Physiology* **36**: 811
- Fahn A** (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229-257
- Faulkner DJ, Unson M, Bewley C** (1994) The chemistry of some sponges and their symbionts. *Pure and Applied Chemistry* **66**: 1983-1990
- Finnegan E, Genger R, Peacock W, Dennis E** (1998) DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **49**: 223-247
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES** (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 8449-8454
- Fischbach RJ, Staudt M, Zimmer I, Rambal S, Schnitzler JrP** (2002) Seasonal pattern of monoterpene synthase activities in leaves of the evergreen tree *Quercus ilex*. *Physiologia Plantarum* **114**: 354-360

- Fournier G, Richez-Dumanois C, Duvezin J, Mathieu J-P, Paris M** (1987) Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica* **53**: 277-280
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL** (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 1827-1831
- Funk C, Croteau R** (1993) Induction and characterization of a cytochrome P-450-dependent camphor hydroxylase in tissue cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiology* **101**: 1231-1237
- Gouyon P, Vernet P, Guillermin J, Valdeyron G** (1986) Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity* **57**: 59-66
- Granger R, Passet J** (1973) *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry* **12**: 1683-1691
- Granger R, Passet J, Verdier R** (1963) Diversité des essences de *Thymus vulgaris* L. *La France et ses Parfums* **225**
- Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF** (2002) Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 471-478
- Grayer RJ, Kite GC, Goldstone FJ, Bryan SE, Paton A, Putievsky E** (1996) Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* **43**: 1033-1039
- Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A** (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA.
- Guseinov V, Vanyushin B** (1975) Content and localisation of 5-methylcytosine in DNA of healthy and wilt-infected cotton plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* **395**: 229-238
- Gutierrez A, Sommer RJ** (2004) Evolution of *dnmt-2* and *mbd-2*-like genes in the free-living nematodes *Pristionchus pacificus*, *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Nucleic Acids Research* **32**: 6388-6396
- Hadfield KA, Dandekar AM, Romani RJ** (1993) Demethylation of ripening specific genes in tomato fruit. *Plant Science* **92**: 13-18
- Hammer K, Carson C, Riley T** (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 853-860
- Hammer KA, Carson C, Riley T** (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 985-990
- Haudenschild C, Schalk M, Karp F, Croteau R** (2000) Functional Expression of Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379**: 127-136
- He X-J, Chen T, Zhu J-K** (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research* **21**: 442-465
- Hemmerlin A, Hoeffler J-F, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, Bach TJ** (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 26666-26676
- Henderson IR, Chan SR, Cao X, Johnson L, Jacobsen SE** (2010) Accurate sodium bisulfite sequencing in plants. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* **5**: 47

- Hetzl J, Foerster AM, Raidl G, Scheid OM** (2007) CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *The Plant Journal* **51**: 526-536
- Hiltunen R, Holm Y** (1999) Basil: the genus *Ocimum*, Vol 10. CRC
- Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä P, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison D** (1986) Lipopolysaccharide nomenclature - past, present, and future. *Journal of Bacteriology* **166**: 699
- Holliday R, Pugh JE** (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232
- Holthuijzen J** (1994) Ätherische Öle und glykosidisch gebundene flüchtige Inhaltsstoffe in ausgewählten Arten der Gattung *Thymus* L. Universität Hamburg
- Homer LE, Leach DN, Lea D, Slade Lee L, Henry RJ, Baverstock PR** (2000) Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 367-382
- Hotchkiss RD** (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *Journal of Biological Chemistry* **175**: 315-332
- Hudaib M, Speroni E, Di Pietra AM, Cavrini V** (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**: 691-700
- Hummelbrunner LA, Isman MB** (2001) Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 715-720
- Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang DR, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E** (2004) The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of Basil. *Plant Physiology* **136**: 3724-3736
- Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E** (2004a) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology* **134**: 370-379
- Inamdar NM, Ehrlich KC, Ehrlich M** (1991) CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Molecular Biology* **17**: 111-123
- Ingelbrecht I, Van Houdt H, Van Montagu M, Depicker A** (1994) Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 10502-10506
- Jordán M, Martínez R, Goodner K, Baldwin E, Sotomayor J** (2006) Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products* **24**: 253-263
- Kahraman A, Celep F, Dogan M** (2009) Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). *South African Journal of Botany* **76**: 187-195
- Kakutani T** (2002) Epi-alleles in plants: inheritance of epigenetic information over generations. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1106-1111
- Kaloustian J, Abou L, Mikail C, Amiot MJ, Portugal H** (2005) Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 2437-2444
- Kampranis SC, Ioannidis D, Purvis A, Mahrez W, Ninga E, Katerelos NA, Anssour S, Dunwell JM, Degenhardt J, Makris AM** (2007) Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *The Plant Cell Online* **19**: 1994-2005

- Kappers IF, Aharoni A, Van Herpen TW, Luckerhoff LL, Dicke M, Bouwmeester HJ** (2005) Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science Signaling* **309**: 2070
- Karp F, Croteau R** (1993) Hydroxylation of (-)- β -pinene and (-)- α -pinene by a cytochrome P-450 system from Hyssop (*Hyssopus officinalis*). In *Secondary-Metabolite Biosynthesis and Metabolism*. Springer, pp 253-260
- Karp F, Harris JL, Croteau R** (1987) Metabolism of monoterpenes: Demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-*cis*-sabinol by an enzyme preparation from sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**: 179-193
- Karp F, Mihaliak CA, Harris JL, Croteau R** (1990) Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**: 219-226
- Keefover-Ring K, Thompson JD, Linhart YB** (2009) Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal* **24**: 117-122
- Keszei A, Hassan Y, Foley WJ** (2010) A biochemical interpretation of terpene chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Chemical Ecology* **36**: 652-661
- Kim J, Lee YS, Lee SG, Shin SC, Park IK** (2008) Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal* **23**: 272-277
- Kintzios SE** (2000) Sage - The Genus *Salvia*. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands
- Kintzios SE** (2004) Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. CRC Press
- Kokkini S, Vokou D** (1989) *Mentha spicata* (Lamiaceae) chemotypes growing wild in Greece. *Economic Botany* **43**: 192-202
- Köllner TG, Schnee C, Gershenzon J, Degenhardt J** (2004) 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. *The Plant Cell Online* **16**: 1115-1131
- Komai K, Tang C-S, Nishimoto RK** (1991) Chemotypes of *Cyperus rotundus* in Pacific Rim and Basin: Distribution and inhibitory activities of their essential oils. *Journal of Chemical Ecology* **17**: 1-8
- Krause ST, Köllner TG, Asbach J, Degenhardt J** (2012) Stereochemical mechanism of two sabinene hydrate synthases forming antipodal monoterpenes in thyme (*Thymus vulgaris*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **529**: 112-121
- Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D** (1993) Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **197**: 20-23
- Landmann C, Fink B, Festner M, Dregus Mr, Engel K-H, Schwab W** (2007) Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**: 417-429
- Law JA, Jacobsen SE** (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **11**: 204-220
- Lawrence BM** (2006) Mint: the genus *Mentha*, Vol 44. CRC
- Lebot V, Levesque JI** (1996) Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. *Phytochemistry* **43**: 397-403
- Lima AS, Schimmel J, Lukas B, Novak J, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG, Degenhardt J, Trindade H** (2013) Genomic characterization, molecular cloning and

- expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). *Planta* **238**: 191-204
- Lin K-H, Yeh S-Y, Lin M-Y, Shih M-C, Yang K-Tu, Hwang S-Y** (2007) Major chemotypes and antioxidative activity of the leaf essential oils of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. from a clonal orchard. *Food Chemistry* **105**: 133-139
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE** (2001) Requirement of *CHROMOMETHYLASE3* for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**: 2077-2080
- Lis-Balchin M** (2002) Lavender - The genus *Lavandula* - Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. Taylor & Francis, London
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR** (2008) Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* **133**: 523-536
- Liu C, Lu F, Cui X, Cao X** (2010) Histone methylation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 395-420
- Loreto F, Pinelli P, Manes F, Kollist H** (2004) Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiology* **24**: 361-367
- Lupien S, Karp F, Wildung M, Croteau R** (1999) Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha*) Species: cDNA Isolation, Characterization, and Functional Expression of (-)-4*S*-Limonene-3-hydroxylase and (-)-4*S*-Limonene-6-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **368**: 181-192
- Lynen F** (1967) Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure and Applied Chemistry* **14**: 137-167
- Maffei M, Gallino M, Sacco T** (1986) Glandular trichomes and essential oils of developing leaves in *Mentha viridis lavanduliodora*. *Planta Medica* **52**: 187-193
- Magnet S, Arbeloa A, Mainardi J-L, Hugonnet J-E, Fourgeaud M, Dubost L, Marie A, Delfosse V, Mayer C, Rice LB** (2007) Specificity of L, D-Transpeptidases from Gram-positive Bacteria Producing Different Peptidoglycan Chemotypes. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 13151-13159
- Martienssen RA, Colot V** (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**: 1070-1074
- Martin DM, Bohlmann J** (2004) Identification of *Vitis vinifera* (-)- α -terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry* **65**: 1223-1229
- Mártonfi P** (1992) Polymorphism of essential oil in *Thymus pulegioides* subsp. *chamaedrys* in Slovakia. *Journal of Essential Oil Research* **4**: 173-179
- Mártonfi P, Grejtovský A, Repčák M** (1994) Chemotype pattern differentiation of *Thymus pulegioides* on different substrates. *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 819-825
- Masuda M, Abe T, Sato S, Suzuki T, Suzuki M** (1997) Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Phycology* **33**: 196-208
- Masumoto N, Korin M, Ito M** (2010) Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. *Phytochemistry* **71**: 1068-1075
- Mathieu O, Reinders J, Čaikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J** (2007) Transgenerational Stability of the *Arabidopsis* Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell* **130**: 851-862
- Mau CJ, Karp F, Ito M, Honda G, Croteau RB** (2010) A candidate cDNA clone for (-)-limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry* **71**: 373-379

- McCaskill D, Croteau R** (1995) Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* **197**: 49-56
- McGarvey DJ, Croteau R** (1995) Terpenoid metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1015
- McGimpsey JA, Douglas MH, Van Klink JW, Beauregard DA, Perry NB** (1994) Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* **9**: 347-352
- Messerschmidt W** (1964) Gas- und Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der ätherischen Öle einiger Thymusarten - I. Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Faktoren auf Bildung und Veränderung des ätherischen Öls. *Planta Medica* **12**: 501-512
- Meyer P, Niedenhof I, ten Lohuis M** (1994) Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *The EMBO Journal* **13**: 2084
- Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H, Kakutani T** (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* **411**: 212-214
- Mockute D, Bernotiene G** (1999) The main citral-geraniol and carvacrol chemotypes of the essential oil of *Thymus pulegioides* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3787-3790
- Mockute D, Bernotiene G** (2001) The α -terpenyl acetate chemotype of essential oil of *Thymus pulegioides* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 69-76
- Mockute D, Nivinskienė O, Bernotiene G, Butkienė R** (2003) The *cis*-thujone chemotype of *Salvia officinalis* L. essential oils. *Chemija* **14**: 216-219
- Mohagheghzadeh A, Faridi P, Ghasemi Y** (2007) *Carum copticum* Benth. & Hook., essential oil chemotypes. *Food Chemistry* **100**: 1217-1219
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marín MI, Martínez-Macías MI, Ariza RR, Roldán-Arjona T** (2006) *Demeter* and *repressor of silencing 1* encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 6853-6858
- Morel J-B, Mourrain P, Béclin C, Vaucheret H** (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Current Biology* **10**: 1591-1594
- Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR** (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 519-523
- Novak J, Marn M, Franz CM** (2006) An α -Pinene Chemotype in *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* **18**: 239-241
- O'Shea-Greenfield A, Smale ST** (1992) Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 1391-1402
- Papa CM, Springer NM, Muszynski MG, Meeley R, Kaeppler SM** (2001) Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *The Plant Cell Online* **13**: 1919-1928
- Passet J** (1971) *Thymus vulgaris* L.: Chemotaxonomie et biogénèse monotérpenique. Université Montpellier
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME** (2006) *Arabidopsis* displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 577-587

- Pavlopoulou A, Kossida S** (2007) Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: structure, function, and molecular evolution. *Genomics* **90**: 530-541
- Pérez LM, Taucher G, Cori O** (1980) Hydrolysis of allylic phosphates by enzymes from the flavedo of *Citrus sinensis*. *Phytochemistry* **19**: 183-187
- Pichersky E, Gershenzon J** (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 237-243
- Pintor-Toro JA** (1987) Adenine methylation in zein genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **147**: 1082-1087
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J** (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* **17**: 15-19
- Pitto L, Cernilogar F, Evangelista M, Lombardi L, Miarelli C, Rocchi P** (2000) Characterization of carrot nuclear proteins that exhibit specific binding affinity towards conventional and non-conventional DNA methylation. *Plant Molecular Biology* **44**: 659-673
- Poetsch AR, Plass C** (2011) Transcriptional regulation by DNA methylation. *Cancer Treatment Reviews* **37**: S8-S12
- Poulose A, Croteau R** (1978a) Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **187**: 307-314
- Poulose A, Croteau R** (1978b) γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **191**: 400-411
- Proffitt J, Davie J, Swinton D, Hattman S** (1984) 5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 985-988
- Richards EJ, Elgin SC** (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**: 489-500
- Rohde S, Gochfeld DJ, Ankisetty S, Avula B, Schupp PJ, Slattery M** (2012) Spatial variability in secondary metabolites of the indo-pacific sponge *Stylissa massa*. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 463-475
- Ronemus MJ, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta SL** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* **273**: 654-657
- Rovirosa J, Moena J, San-Martín A** (1988) Two chemical types of the red alga *Plocamium cartilagineum* from Chile. *Biochemical Systematics and Ecology* **16**: 593-595
- Ruzicka L** (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**: 357-367
- Sáez F** (1995) Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain. *Phytochemistry* **40**: 819-825
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T** (1997) Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry* **45**: 307-311
- Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TC, Gershenzon J, Degenhardt J** (2006) The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 1129-1134
- Small E, Beckstead HD** (1973) Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia*
- Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Kataranovski D, Marin P, Vukojevic J, Brkic D** (2008) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **34**: 1388-1393

- Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M, Peeters AJ** (2000) The Late Flowering Phenotype of *fwa* Mutants Is Caused by Gain-of-Function Epigenetic Alleles of a Homeodomain Gene. *Molecular Cell* **6**: 791-802
- Stahl-Biskup E** (1986) Das ätherische Öl norwegischer Thymian-Arten; II. *Thymus pulegioides*. *Planta Medica* **52**: 233-235
- Stahl-Biskup E** (2002) Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - a global view. In F Sáez, E Stahl-Biskup, eds, *Thyme: The genus Thymus*, pp 75-124
- Staiger D, Kaulen H, Schell J** (1989) A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 6930-6934
- Starks CM, Back K, Chappell J, Noel JP** (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* **277**: 1815-1820
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, Patel DJ, Jacobsen SE** (2014) Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 64-72
- Suzuki MM, Bird A** (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* **9**: 465-476
- Tetenyi P** (1970) Intraspecific chemical taxa of medical plants. *Akademiai Kiado*
- Tewksbury JJ, Manchego C, Haak DC, Levey DJ** (2006) Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 547-564
- Tholl D** (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 297-304
- Tholl D, Croteau R, Gershenzon J** (2001) Partial Purification and Characterization of the Short-Chain Prenyltransferases, Geranyl Diphosphate Synthase and Farnesyl Diphosphate Synthase, from *Abies grandis* (Grand Fir). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **386**: 233-242
- Thomas A, Sherratt H** (1956) The isolation of nucleic acid fractions from plant leaves and their purine and pyrimidine composition. *Biochemical Journal* **62**: 1a-4
- Thompson J, Charpentier A, Bouguet G, Charmasson F, Roset S, Buatois B, Vernet P, Gouyon P-H** (2013) Evolution of a genetic polymorphism with climate change in a Mediterranean landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2893-2897
- Thompson JD** (2002) Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme. *Thyme: the genus Thymus*: 44-74
- Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B** (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 859-880
- Thompson JD, Gauthier P, Amiot J, Ehlers BK, Collin C, Fossat J, Barrios V, Arnaud-Miramont Fo, Keefover-Ring K, Linhart YB** (2007) Ongoing adaptation to Mediterranean climate extremes in a chemically polymorphic plant. *Ecological Monographs* **77**: 421-439
- Thompson JD, Manicacci D, Tarayre MI** (1998) Thirty-five years of thyme: a tale of two polymorphisms. *BioScience* **48**: 805-815
- Thompson JD, Tarayre M, Gauthier P, Litrico I, Linhart YB** (2004) Multiple genetic contributions to plant performance in *Thymus vulgaris*. *Journal of Ecology* **92**: 45-56
- Torras J, Grau MD, Lopez JF, de las Heras FXC** (2007) Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 2327-2333

- Towler MJ, Weathers PJ** (2007) Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and the nonmevalonate pathways. *Plant Cell Reports* **26**: 2129-2136
- Trapp SC, Croteau RB** (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**: 811-832
- Trindade H, Monya MC, Lima AS, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG** (2008) Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, São Jorge and Terceira islands (Azores). *Biochemical Systematics and Ecology* **36**: 790-797
- Tucker AO, Maciarello MJ** (1986) The essential oils of some rosemary cultivars. *Flavour and Fragrance Journal* **1**: 137-142
- Turner G, Gershenzon J, Nielson EE, Froehlich JE, Croteau R** (1999) Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* **120**: 879-886
- Vaillant I, Paszkowski J** (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 528-533
- Vanyushin B, Alexandrushkina N, Kirnos M** (1988) *N*⁶-Methyladenine in mitochondrial DNA of higher plants. *FEBS Letters* **233**: 397-399
- Vanyushin B, Belozersky A, Kokurina N, Kadirova D** (1968) 5-Methylcytosine and 6-Methylaminopurine in Bacterial DNA. *Nature* **218**: 1066 -1067
- Vernet P, Gouyon R, Valdeyron G** (1986) Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica* **69**: 227-231
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere J-M** (1993) Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp.*hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology* **21**: 287-295
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA** (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837
- Wada Y** (2005) Physiological functions of plant DNA methyltransferases. *Plant Biotechnology* **22**: 71-80
- Wallaart TE, Pras N, Beekman AC, Quax WJ** (2000) Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Medica* **66**: 57-62
- Wallach O** (1914) Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der acyclischen Kohlenstoffverbindungen.
- Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ** (2002) Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* **27**: 101-107
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL** (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567-576
- Watson JC, Kaufman LS, Thompson WF** (1987) Developmental regulation of cytosine methylation in the nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. *Journal of Molecular Biology* **193**: 15-26
- Weinhold A, Kallenbach M, Baldwin IT** (2013) Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants. *BMC Plant Biology* **13**: 99
- Weitzel C, Simonsen HT** (2012) Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes. *Phytochemistry Reviews*: 1-18
- Werker E** (1993) Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae - a review. *Flavour and Fragrance Journal* **8**: 249-255
- Werker E, Putievsky E, Ravid U** (1985) The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Annals of Botany* **55**: 793-801

- Williams DC, McGarvey DJ, Katahira EJ, Croteau R** (1998) Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* **37**: 12213-12220
- Wise ML, Savage TJ, Katahira E, Croteau R** (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 14891-14899
- Wyatt G** (1951) Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochemical Journal* **48**: 581
- Xi Y, Li W** (2009) BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping program. *BMC Bioinformatics* **10**: 232
- Xiao W, Gehring M, Choi Y, Margossian L, Pu H, Harada JJ, Goldberg RB, Pennell RI, Fischer RL** (2003) Imprinting of the *MEA* Polycomb Gene Is Controlled by Antagonism between MET1 Methyltransferase and DME Glycosylase. *Developmental Cell* **5**: 891-901
- Yamaura T, Tanaka S, Tabata M** (1992) Localization of the biosynthesis and accumulation of monoterpenoids in glandular trichomes of thyme. *Planta Medica* **58**: 153-158
- Yoshida T, Higashi F, Ikawa S** (1968) On the oil containing tissue, the essential oil contents and the chemical composition of essential oil in *Perilla* species. *Japanese Journal of Crop Science* **37**: 118-122
- Zavarin E, Snajberk K, Critchfield WB** (1977) Terpenoid chemosystematic studies of *Abies grandis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **5**: 81-93
- Zemach A, Grafi G** (2003) Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *The Plant Journal* **34**: 565-572
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D** (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* **328**: 916-919
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE** (2006) Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**: 1189-1201
- Zhou Y, Magill J, Magill C, Newton R** (1996) DNA methylation and Dc8-GUS transgene expression in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports* **15**: 815-818
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S** (2006) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature genetics* **39**: 61-69
- Zobayed S, Afreen F, Kozai T** (2007) Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 109-116

6 Anhang

6.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 6.1: Auflistung der Primer. Die MTPS6-Primer wurden von Sandra Krause, die degenerierten Primer wurden von Sandra Irmisch zur Verfügung gestellt (beide Martin-Luther-Universität, Halle).

Name	Sequenz (5'-3')	Gen
Primer für die Amplifikation aus cDNA und genomischer DNA		
Tv-TPS1-fwd	ATGGCTTCCCTTAGCATGCAAGTCTCC	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-fwd-3	CGGTAGTGATTTCAAGGCGAGC	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-fwd-4	GGCAGTCTTCACCTACGCTTC	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-rev	TCACACGTACGGCTCGAAGATGAG	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-rev-2	GGATGCCTCGTAAAGTTC	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-rev3	GCGTTCTCCAAATATTCAGCTAGG	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS2-fwd	GCAACCATTAGCGTACTTC	<i>Tvtps3</i>
Tv-TPS3-fwd	CAAGAGAGCTCCAGATAC	<i>Tvtps4</i>
Tv-TPS2/3-rev	TCAGGGATATGGGTGGAACA	<i>Tvtps3</i> , <i>Tvtps4</i>
Primer für die Amplifikation zur heterologen Expression		
Iba37-TPS1-fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCTTCCCTTAGCATGCAAGT	<i>Tvtps2</i>
Iba37-TPS1-rev	ATGGTAGGTCTCATATCACACGTACGGCTCGAAGATGAGG	<i>Tvtps2</i>
Iba37-TPS2/3-fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCGGTACAGTAAAAGATCGAAGGCG	<i>Tvtps3</i> , <i>Tvtps4</i>
Iba37-TPS2/3-rev	ATGGTAGGTCTCATATCAGGGATATGGGTGGAACAGGAGG	<i>Tvtps3</i> , <i>Tvtps4</i>
MTPS6-IBA1a fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCAAGCCTTGCCGTGTCTCCTTGA	<i>Tvtps6</i>
MTPS6-IBA1b fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCAAGCCTTGCCGTGTCTCCTCGA	<i>Tvtps5</i>
MTPS6-IBA3a fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGCCCGTGAAATAACCCGAC	<i>Tvtps7</i>
MTPS6-IBA2 rev	ATGGTAGGTCTCATATCATACGCATGGGTGGAAGAACAAGT	<i>Tvtps5</i> , <i>Tvtps6</i> , <i>Tvtps7</i>
Primer für die qRT-PCR		
q1-TPS1-fwd	CAGCACAGATAAATATAAGGATGAG	<i>Tvtps2</i>
q3-TPS1-rev	CTGAATGCAAGAGATGTGAAATAC	<i>Tvtps2</i>
q1-TPS2-fwd	GTTGCTCGGGGAAGAAATCGG	<i>Tvtps3</i>
q3-TPS2-rev	GGCCGCGTAAGCATCTAAG	<i>Tvtps3</i>
q1-TPS3-fwd	CTCTCTATCTCCTCAAACTAGAC	<i>Tvtps4</i>
q3-TPS3-rev	CTGCCTATGTACCTCCTTATG	<i>Tvtps4</i>
q3-TPS10-fwd	CTTACACAGTGAGGGAAGAC	<i>Tvtps5</i>
q4-TPS10-rev	CCAATTTACCCACGATTCC	<i>Tvtps5</i>
Tv TPS6 fwd 3	TCCTCGAAAACCGATACCAAG	<i>Tvtps6</i>
Tv TPS6 rev 8	CACGTGGGGATGATGATTGTC	<i>Tvtps6</i>
Tv TPS7 fwd 4	ATCGTCCCCACAAAATACTC	<i>Tvtps7</i>
Tv TPS7 rev 7	CCTCCTCCGAGGCATTGTTG	<i>Tvtps7</i>
YLS8-fwd	ACGAGACCTGCATGCAGATG	<i>yls8</i>
YLS8-rev	TTATTCTGAAGAAGAACATGATGGT	<i>yls8</i>
RACE-PCR-Primer (5'RACE)		

TPS1-R1	CTTTGGCATGGGATCAGC	<i>Tvtps2</i>
TPS1-R2	CTCCGCCTCACTGCAGGT	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS10-174R	CACCTGCACAATCAGCTCTTC	<i>Tvtps5</i>
Tv-TPS10-144R	CAACTGCTTCTCCTTCACATAG	<i>Tvtps5</i>
Genspezifische Adaptorprimer für Genome Walking		
Tv-TPS1-Adap1a	CAATAGTACCTTCACTTGTGCAATCAG	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-Adap2a	ACCATTGGTAACTTAGATGCTGATCC	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-Adap1b	AGATAGGACGGAGACGAGTGGTAGAG	<i>Tvtps2</i>
Tv-TPS1-Adap2b	GTGTTGAGGTTTTTCACTTGCTTGCTA	<i>Tvtps2</i>
Primer für die Amplifikation des <i>Tvtps2</i> -Promotors		
TPS1-P-fwd	GGATGGAGGTATTATTACACATTCAAG	<i>Tvtps2</i>
TPS1-rev	GCTAAGTGTGGATACTTGCATGCTAAG	<i>Tvtps2</i>
TPS1-P-rev	CCCATCCGAATTTGGAACTACTATTGGCG	<i>Tvtps2</i>
Primer für die Bisulfidsequenzierung		
TvTPS1-BS1	GGAGGTATTATTAYAYATTYAAGAT	<i>Tvtps2</i>
TvTPS1-BS2	TCCTTTTCTCAATCTACTATCAT	<i>Tvtps2</i>
TvTPS1-BS5	ATGATAGTAGATTGAGAAAAGGA	<i>Tvtps2</i>
TvTPS1-BS6	AARCCATTTTTTTTAATTTCCCCTT	<i>Tvtps2</i>
degenerierte Primer für die Suche nach der Geraniolsynthese in <i>Thymus vulgaris</i>		
Deg1-F	AAGGGGARGAKATAYTGGATGAAGC	
Deg2-F	GAGCTTARAGAYVTTTCAAGGTGGTG	
Deg1-R	GTTCCATATRCRTCATAVGTGTCATC	
Deg2-R	AATATCCCACCTTTSDATTGCATCTG	
Deg3-F	GGAATAKMTWRACATTTGAAAATG	
Deg4-F	GAGTTARAATATSTCTCRAGATGGTG	
Deg3-R	GTTCCATAGAYRTCRTACATATCGTC	
Deg4-R	TAACCASTGKCGAWCCACTTTGCTTC	

6.2 Sequenzen der Terpensynthesen

6.2.1 cDNA-Sequenzen der charakterisierten Monoterpensynthesen

Tvtps2 (1791 bp)

ATGGCTTCCCTTAGCATGCAAGTCTCCACACTTAGCAAGCAAGTGAAAAACCTCAACACCTTTGGCATGGGATCA
GCATCTAAGTTACCAATGGTGGCGAGGCGCTCTCTACCACCTCGTCTCCGTCCTATCTGCTCCGCCCTCACTGCAG
GTCGAGGAAGAAAACCCGGCGTTCCGGGAACTACCAGGCTCCCGTTTGGAAACAATGATTTTCATCCAATCTTTCAGC
ACAGATAAAATATAAGGATGAGAACTACTTGAAAAAGAAAGAGCTGATTGCACAAGTGAAGGTACTATTGAAC
ACGAAAAATGGAGGCTGTTAAGCAATTGGAGTTGATAGAGGACTTGAGAAATCTAGGGTTGACATATTAATTCGAA
GACGAGTTTAAGAAAAATTTAACTTCTATATATAATGAGCACAAAGGTTTAAAAAACGAACAAGTCGGGGACTTG
TATTTACATCTCTTGCATTCAGACTCCTCAGACTACACGGTTTCGACGCTCAGAAGATGTGTTAACTTCTTT
AAGAACGAGGACGGTAGTGTATTTCAAGGCGAGCCTTGGTGAGAATACGAAGGACGTGTGGAACCTTACGAGGCA
TCCTTCTTATTAGGGTAGGGGAGTTACACTAGAGCAAGCAAGAGTGTTCACCAAAAATCTTGAGAAGAAA
GTTGAGGAAGGAATCAAAGATGAGAAATTAATAGCATGGATTCAACATTCCTTTGGCTCTCCCTTCACTGGAGG
ATCCAAAGGCTAGAGCGAGATGGTTCTTAGACGCTTACAAGGCGAGGAAGGACATGAATCCAATCATCTACGAG
CTCGGGAAAAATCGACTTCCATATCATTTCAAGAAACACAACACTACAAGAAGTCCAAGAGGTTTACAGTGGTGGACT
AATACCAACCTCGCCGAGAACTCCCATTTGTGAGAGACAGAATTTGGAGTGTACTTTTGGGCACCTGGGCTC
TTTGAGCCACATGAATATGGTTACCAGAGGAAAAATGGCTGCCATTATCATCACCTTCGTCACGATCATAGACGAC
GTCTACGACGTCTATGGTACACTCGACGAACTGCAGCTGTTCACCGACGCGATTGAAAATGGGACGTTGAATCA
ATAAGCACACTTCCATATTACATGCAAGTTTGTATTTGGCAGTCTTCACCTACGCTTCAGAGCTGGCTTATGAC
ATTTCAAAGATCAGGGTTTCAACAGTATCTCATACTACAGAGATCGTGGTTGAGTTTGGTTGAAGGGTTTTTC
CAAGAGGCAAAATGGTACTACGCCGTTACACGCCAACCTAGCTGAATATTTGGAGAACGCCAAAGTTTCTATC
TCGCTCTCCACGATTATATCTCAAGTTTACTTCACTCTCCCGAAGCTCGACTGAGAGAACGGTTGTGAGAACGTC
TTCCGATACCACAACATACTCTACCTTTCCGGCATGATTTTAAAGGCTTGCCGATGATCTTGGTACAACCTCAGTTT
GAGCTGAAGAGAGGGGACGTGCAAAAGGCGATCCAGTGTACATGAACGACAACAATGCCACGGAGGAAGAAGGG
ACGGAGCACGTGAAGTATCTGCTGCGGGAGGCGTGGCAGGAGATGAACCTCGGCGATGGCGGACCCCGACTGTCCG
TTGTGCGAAGATCTGGTGTGTTGCTGCTGCTAATCTGGGAAGAGCATCGCAGTTTCATATATCTCGACGGAGATGGC
CATGGCGTGCAGCACTCGGAGATTCATAACCAGATGGGAGGCCCTCATCTTcGAGCCGTACGTGTGA

Tvtps3 (1788 bp)

ATGTCTGCAACCATTAGCGTACTTCACCACGCGACGATCCTTCCCAAACCAGCTAATGATGTTGTCTCTGCAAA
AACAAGAGAGCTTCAAATATTAATCCATGGACTCCCTCTCTCTATCTCTCAAACCTAGATACCAAGAACCCC
GGTACAGTAAAAGATCGAAGGCGTTCCGGGAACTACCGCCCTGCACCTCGGGATTTTCACTTACATCCAATCTCTC
AACACTCATGATCACTATAATAAGGAGGTACGGCGGGGAGAGTTGATCGTGGAGGTGAAGAAGTTGCTCGGGGAA
GAAATCGGGGCGGTTAAGCAGTTGGAGCTGATTGATGACTTGAAGAATTTAGGGTTGCTTATTTCTTTCAAGAG
GAGATTAGGAATGTGTTAGGTTCCATATACGCTGAGCACAAAATCTTCAAGAAACAATCAAGTTCGAGGGGAAGTAAA
GATCTGTATTTACAGCTCTTGGATTACAGACTCCTCAGAGAAGCCGGTTTCAACATTTTCAACAAGAGGATTTGAT
CGTTTCAAGAACGAGGAGGGGAGTGGTTTCGAGGAACGCCTTGGTGAGGACACTAAAGGGATGTTGCAACTCTAC
GAAGCATCTTTCTCTTGGAGAGAAGGTGAGGACACATTTGGAGCTAGCTAGGCAAATTTCCACCGAATTTCTTAAG
GAAAAACTTGATGGTACCAGAAATAGTGATGGTAATCTATCATCTCGATTCGCCATTTCTTGGAGATCCCCCTT
CACTGGAGGATCCAGAGGCTAGAGGCGAGATGGTTCTTAGATGCTTACGCGGCCAGGAAAGACATGAATCCACTT
ATCTTCGAGCTCGCCAAACTCGACTTCAATAATATCCAAGCAACACAACAACAAGAAGTGAAGATCTCTCGAGG
TGGTGAAGAATTTAAGCCTCCAGTAAAACCTCCATTTGTGAGGGATAGGCTAGTGGAGAGCTACTTTTGGGCA
GTTGGGCTTTTCGAGCCTCACAATTTGGATATCAAAGAAAAATTTGCTGCAAAAATCATAACCCTAATTACTTCT
CTTGACGATGTTTATGATATCTACGGTACACTCGACGAACTGCAACTATTTACCGACGCTATTCGAAGATGGGAT
ACTAAATCAGCCAACCAACTTCTTACTACTTGCATTTATTTTATTTTGCCTCTACACTTTTGTTCGGAGGTG
GCTTACGATATTTCTTAAAGAGGAGGAGGGTTTCTTCCACATCCACATCTACAGAGAGCATGGGTGGATTTGGTT
GAAGGATATTTACAAGAGGCGAAGTGGTACCACGCTAATTTATACCCAAGCATGGAGGAATATCTAAACACCGCC
ACCGTCACAATAGGGGCTCCGGCGGTGATTTCCCAAGTTTCATTTCTGACTAGCAAAGTCAATGAGAAAGCCGAG
AGTTTGCACGAATACGAAGAGATCATTCGCTCTCCGGGAACTCGTACGGCTTCCCGATGACCTAGGAACATTA
CCGTTTGGAGATGAAGAGAGGCGACGTGGCGAAATCGATCCAGATATACATGAAGGAACACGGTGTAGTCGGGAA
GAAGCGGAAGAACACGTGAGGTATGAGATTAGGGAGGCGTGAAGGAGATGAATACATTAATGGCGGCGAAATCT
CGGTTGAGAGATGATGATTTGGCTATGGTTGTGCTAATCTTGGGAGAGATGCGCAGTTTCATGTACCCTCGACGGA
GACGGTAACCACTCTCACTTACAGCACCAAGATTCAAACCTCCTGTTCCACCCATATCCCTGA

Tvtps4 (1740 bp)

ATGATCTTGTCTCTGCAAAAACAAGAGAGCTCCAGATACTAATCCATGGAGTCCCTCTCTCTCTCTCTATC
 TCCTCAAACTAGACACCAAGACAGAAAAGATCGACGGCGTTCCGGAAAATACCGGCCTGCACTCTGGGATTTT
 AATTTTCATCCAATCTCTCAACACAAATGATCACTATCATAAGGAGGTACATAGGCAGGAAGAGTTGATCGTGGAG
 GTGAAGAAGTTGCTCGGGGAAGAAATCGAGGCGGTTAAGCAGTTGGAGCTGATTGACGACTTGAAGAATTTGGGG
 TTGTCTTATTTTTTGTCAAGAGGAGATTAGGAATGTATTAGGTTCCATATACGTTGAGCACAAATTTTCATAAAC
 AATCAAGTCGAGGGAAGTAAATTAGATCTGTATTTACAGCTCTTGGATTGAGACTCTTCAGAGAAGCCGGCTTC
 AGTGTTCACAAGAAGTATTTGATCGTTTCAAGAACGAGGAGAGCAGTGGTTTCGAGGAATGCCTTGGTGAGGAC
 ACGAAAGGGATGTTGCAACTCTACGAAGCATCTTTCCTGTTGAGAGAAGGTGAGGACACATTGGAGCTAGCTAGG
 CAAATTTCCACCAAATTTCTTCAGGAAAACTTGATGGTACCCAAATTAGTGATGATAATAATCTATCATCTCG
 ATTCGCCATTTCTTGGAGATCCCTCTTCACTGGAGGATCCAGAGGCTAGAGGCGAGATGGTTCTTAGATGCTTAC
 GCGCTAGGAAAGACATGAATCCATTTATCTTCGAGCTTGCCAACTCGACTTCAATATTATCCAAGCAGCACAA
 CAACAAGAACTGAAAGATCTCTCGAGGTGGTGGAAAGAATTTAAGCCTCCAGAAAACTCCCAATTTGTGAGGGAT
 AGGCTAGTGGAAAGCTACTTTTTGGGCAGTTGGGCTCTTCGAGCCTCACACATTTGGAAATCAAAGAAAAATTTGCT
 GCAAAAATTATAACCTAATTTACTTCTCTTTCAGCATGTTTTAGCATATCTACGGTACTCTCGACGAACTGCAACTA
 TTTACCGACGCTATTTCGAAGATGGGATACTGAATCAGCCAACCAACTTCTTATTACTTGCAATTTTTTATTTT
 GTGCTCCACACTTTTTGTTTCCGACGTGGCATAACGATATTTTAAAGAGGAGGAGGGTTTCATCACCATCCACAT
 CTACAGAGAGCGTGGTGGATTTGGTTGAAGGGTATTTACAAGAGGCGAAGTGGTACCACGCTAATTATACACCA
 AGCATGGAGGAATACCTAAACACCGCCACCGTCACAATAGGGGCTCCGGCAGTGATTTCCCAAGTTCAATTTGTA
 CTAGCAAAGTCGAAAGAGAAAGCCGAGAGTTTGCACGAATACGAAGACATAATTCGCTCTCCGGGAAGCTCGTA
 CGGCTTCCCGATGACATAGGAACATTACCGTTTGGAGATGAAGAGAGGCGACGTGGCGAAATCGATCCAGATATAC
 ATGAAGAACACGGTGTAGTTCGGGAAGAAGCGGAAGAACCGGTGAGGTATGAGATTAGGGAGGCGTGGAAAGGAG
 ATGAATACAATAATGGCGGCAATTTGCGTTGAGAGGTGATGATTTGGTTATGGTTGCTGCTAATCTTGGGAGA
 GATGCGCAGTTCATGTACCTCGACGGAGACGGTAACCCTCTCACTTACAGCACCACATTCAAAACCTCCTGTTC
 CAGCCGTATCCCTGA

Tvtps5 (1704 bp)

ATGTCTACCATTAGCATAAATCATGTGGGAATCCTTAGAAATCCTCTCCAATGCAAAAACAAGAGAAGTTCAATC
 AATAAACCATGGAGTCTCAGTCTCCCTCGTTTCGCCACCCGCTCTCGCCTCGTGAAGCCTTGCCGTGTCTCCTCG
 AAAGTCGATACCATGCCCGCTGAAATAACCCGACGTTCTGGTAACTATGAGCCTTCGCTTTGGGATTTTCGATTTT
 ATTCATCTCTCGACGATCATCATCCCTATGTGAAGGAGAAGCAGTTGAAAAGGGAGGAAGAGCTGATTGTGCAG
 GTGAAGATGCTGCTGGGGACAAAAATGGAGGCTGTGAAGCAGTTGGAGTTGATCGATGACTTGAAAAATCTCGGA
 TTGTCTTATTTTTTTTCGGGAGGAGATTAAGACGATCTTAACTTCTATATACAATAATTTCTTTCGAAAAATAAAT
 AAAGTAGGGGATTTGTATTTACGGCTCTTGGATTGAGACTCCTGAGGCAGCACGGTTTCAATGTTTACAACAA
 ATATTTGACTGTTTTAAGGGTAATGATTTTCGACGAAACCATAATCGGCGAAGATACAAAAGGAATTTCTCCAATC
 TACGAAGCATTTTCCACTTGAGGGAAGGCGAAAACACACTAGAACTAGCTAGGCAAAATTTCCACCAAGTATCTG
 CAGAAAAAAGTCGACGAGGGAAGTATAAATGATGAAAACCTATCGTCTGGATTGACATTGATTGATCTCCCT
 CTTCACTGGAGGATTCAAAGGCTCGAGGCGAGATGGTTCTTAGATGCTTACACAGTGAGGGAAGACAAGAACCCG
 CTTATTTTCGAGCTCGCCAACTCGACTTCAATATTATTCAAGCGACTCAACAACAAGAAGTCAAGAAGTCTCT
 AGGTGGTGGAAATGATTCATGTTTGGCCGAAAACTTCCCTTCGTGAGGGATAGAGTAGTGAAAGCTTCTTTTGG
 GCGGTAGGGCTATTTGAGGGTTCATGAATTTGGATATCAGAGGAAAATGACTACTGCTATTATCATTCTAATTACT
 GCTATAGATGATCTTTATGATGTCTACGGTACATTAGACGAACTTCATCTTTTCACTGACGTATACGAAGATGG
 GATACACAATCAATAGACCAACTTCCATACTACATGCAACTCTGTTATTTGGCGCTCTACAACCTTGTCTCGGAT
 CTGGCTTACGATATTCTCAAAGACCGCGTCCCAATACTATCCCATATCTACAGGAATCGTGGGTGAAATTTGGTT
 GAAGCATATCTGAAGGAGGAGAGTGGTTTGGAGTGGATACACACCAAGCCTTGAAGAGTATCTCACCACCGCC
 AAGACTTCGATAGGCTCTCTTACAATATTACTCCAAGTCAATTATCATTACCGAAGTCCACCATTGATCGCGCT
 GCATTCGACTGTTGCCACAAAATACCTTACCTCTCTGCGACGGTTTCAAGGCTTGGCGATGATCTTGAACAACA
 TCGTCTGAGCTGGAGAGAGGGGACGTGCCGAAAGCAATCCAGTGTACATGAAGGATGCAATGCATCGGAGGAG
 GAGGCGCGGGAGCACGTGAGGTTTATGATCGGAGAGGTGTGGAAGGAGTTGAACACGGCCATGACGGAGCCCGAC
 GATTGCCGTTTACGGAACAACCTGGTGGAGGCTGCAGCTAATCTTGAAGAGCAGCACAGTATATTTATAGAGAG
 GGAGATGGCCATGGACATTTCAAATTCATCAACACATCGGAACTTGTCTTCCACCCATGCGTATGA

Tvtps6 (1812 bp)

ATGTCTACCATTAGCATAAAATCATGTGGGACTCCTTAGAAATCCTCTCCACGGCAAAAGCAAGAGAGCTTCGATC
AATAAATCATGGAGTCTCTGTCTCCCTCGTTCGTTCATCCGCCCTCTCGCCTCGTGAAGCCTTGCCGTGTCTCCTCG
AAAACCGATACCAAGCCCGCTGAAATGACCCGACGTTCCGGAAACTACGAGCCTTCGCTTTGGGATTTTCGATTTTC
ATTCAATCTCTCGACAATCATCATCCCACGTGAAGGAGAAGCAGTTGAAAAGGGAGGAAGAGCTGATTGTGGAG
GTGAAGATGCTGCTTGGGACAAAAATAGAGGCTGTAAAGCAGTTGGAGTTAATCGATGACTTGAAAAATCTCGGA
TTGTCTTATTTCTTTTCGGGACGAGATAAAGATGGTCTTAACTTCTATATATAATAATTTTTTCGAAAAATAAAAAAT
AATCAAGTAGGGGATTTGTATTTTACAGCTCTTGGATTTCAGACTCCTTAGGCAACATGGTTTTCAATGTTTCACAA
GAAATATTTGATTGTTTCAAGAACGAGAAGGGAAAGTGAATTCGACGAAACCCCTAATCGGCAGGATACAAAAGCA
ACCCTGCAACTCTACGAAGCATCTTTCCATCTGAGGGAAGGCGAAAACACACTGGAGCTAGCTAGGCAAATTTCC
ACCAAGTATCTGCAGAAAAAAGTCGACGAGGGAAAGTATAAATGATGAAAACCTATCGTTCATGGATTTCGACATTC
TTGGATCTCCCTCTTCACTGGAGGATCCAAAGGCTCGAGGCGAGATGGTTCTTAGACGCTTACGCGGCAAGGGAA
GATAAGAACCCGCTTATCTTCGAGCTCACCAAACCTGACTTCAATATTTCAAGCAACTCAACAAGAAGAACTC
AAAGAGGCTCTTAGTGGTGAATAAATTCACGTTTGGCTGAAAAACTCCCTTTTCGTGAGGGATAGAGTAGTAGAA
TGCTACTTTTGGCAGTTGGGCTATTTGATGGTCACTGACTATGGATTTTCAGAGGAAAGTTAATGCTGCTGTTAAT
ATTCTAATCACTGCCATAGACGACGTTTACGACGCTTATGGTACATTAGACGAACCTTCGACTTTTTCACGGACGTC
ATCCGGAGATGGGATACTCAATCGATAGACCAACTTCCATATTACATGCAACTCTGCTATCTGACGCTCTACAAC
TATGTATCCGATCTGGCTTACAATATTTCAAAGACCGCGGCATCAACACTATCCCGCATTTACACCAATCGTGG
GTAAATACAGTTGAAGCATATTTGAAGGAGGCAGAGTGGTACGAGAGTGGATATGCACCAAGCCTTGAAGAGTAT
CTCAGCATCGCTAGTATTTCAATAGGTGTTATTTCTATAGTAATACCACCTCGAAGTATCTATAACCAAACCTCCACT
TTTTCATCGTCGCTCCCATTCGAATATCATCGCTACGATATACTTCACCTCTCAGCGATGGTTTTAAGGCTTGCT
GATGACCTCGAACAGCGCAGTATGAGGTGGAGACGGGCGACGTGCCGAAAGCAGTCCAGTGTACATCAAGGAT
ACAAATGCATCGGAGGAGGAGGCGCGGGAGCACGTGAGGTTTATGATCGGAGAGGTGTGGAAGGAGCTGAACACG
GCCATGGCGGAGTCCGATGATGTCCGTTACGGAGCAAGGGGCGTGGGCTGCAGTTAATATTTGGAAGAGCAGCA
CAGTTTATTTATCTAGAGGGAGATGGGCATGGACGTTTCCAAATCCATCAACACATGGAAAACCTTGTCTTCCAC
CCATGCGTATGA

Tvtps7 (1794 bp)

ATGTCTACCATTAGCATAAAATCATGTGGGAATCCTTAGAAATCCTCTCCAATGCAAAAACAAGAGAACCTCAATA
AATAAACCATGGAGTCTCAGTCTCCCTCGTTCGTTCACCCGCCCTCTCGCCTCGTGAAGCCTTGCCGTGTCTCCTCG
AAAGTCGATACCATGCCCGATGAAATAAACCAGCAGTTCCTGGTAACTATGAGCCTTCGCTTTGGGATTTGGATTTTC
ATTCAATCTCTCGACAATCATCATCCATATGTGAAGGAGATGCAGTTGAAAAGGGAGGAAGAGTTGATTGTGCAG
GTGAAGATGCTGCTGGGGACAAAAATGGAGGCTGTGAAGCAGTTGGAGTTGATCGATGACTTGAAAAATCTCGGA
TTGTCTTATTTTTTTTCGGGACGAGATTAAGACGATCTTAACTTCTATATAACAATAATCTTTTCGAAAAATAAAT
CAAGTAGGGGATTTGTATTTTACGGCTCTTGGATTTCAGACTCCTGAGGCAGCACGGTTTTCAATGTTTTCAACA
ATATTTGACTGTTTTAAGGATAATGATTTTCGACGAAACCCCTAATCGGCGAAGATACAAAAGGAATTTCCAACCTC
TACGAAGCATCTTTCCATTTGAGGGAAGGCGAAAACACACTGGAGCTAGCTAGGCAAATTTCCACCAAGTATCTG
CAGAAAAAAGTCGACGAGGGAAAGTATAAATGATGAAAACCTATCGTTCGTGGATCCGACATTCATTGGATCTCCCT
CTTCACTGGAGGATCCAAAGGCTCGAGGCGAGATGTTTTCTTAGACGCTTACGCGGCGAGGGAAGACAAGAACCCG
CTTATTTTTCAAGCTCGCCGAACTCGACTTCAATATTTTCAAGCAACACAACAAGAACTCAAAGAGATCTCT
AGGTGGTGAATGATTCAAGTTTGGCTGAAAAACTCCCTTTCGTGAGAGATAGGGTGGTGAATGCTACTTTTTGG
GCAGTTGGGCTATTTGAGGGTCAATGAAATTTGGATTTTCAGAGGAAAATTACTGCTGCTATTTATTTACTTAAT
GCTATAGACGATGTTTACGACGCTACGGTACATTAGATGAACTTCAACTTTTTTCACTGACGCTATTTCGAAGATGG
GATACACAATCGATTGACCAACTTCCGTATTACATGCAACTCTGTTATTTGGCGCTCTACAACCTTTGTCTCCGAT
CTGGCTTACGATATTTCAAAGACCGCGGTCTCAATACTATCCCATATCTACACAGATCGTGGGTAGAATTGGTT
GAAGCATATTTGAAGGAGGCTGGGTGGTACGAGAATGGATACACACCAAGCCTTGAAGAGTATCTCACCAACGCC
ACTATTTCAATAGGCGTTCCCTCTATAGTTTTTACCCTGCGAAGTATCCTTACCAAACCTCTACGATTCATCGCACC
CAGTTTCGATCGTCCCAACAAAAACTCGACCTTTCTGCAAGGGTTTTTGGGCTTGCTGACGATCTTGGAACAGCA
TCGTCTGAGCTGGAGAGAGGGGACGTGCCGAAAGCAATCCAGTGTACATGAAGGACAACAATGCCCTCGGAGGAG
GAGGCACGGGAGCACGTGAGGTTTATGATCAGGGAGGCATGGAAGGAGCTGAACACGGCCATGGCGGAGCCCGAC
AATTGTCCGTTACGGAACAAACGGTGGAGGCTGCAGCTAATCTCGGAAGAGCAGCACAGTTTTATTTATCTAGAG
GGAGATGGGCATGCACATTTCCAAATCCATCAACACTTGGAAAACCTTGTCTTCCACCCATGCGTATGA

6.2.2 Genomische Sequenz *Tvtps2g*

	10	20	30	40	50	60
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATGGCTTCCC	TTAGCATGCA	AGTCTCCACA	CTTAGCAAGC	AAGTGAAAAA	CCTCAACACC
Tvtps2g-U	ATGGCTTCCC	TTAGCATGCA	AGTCTCCACA	CTTAGCAAGC	AAGTGAAAAA	CCTCACCACC
Tvtps2g-L	ATGGCTTCCC	TTAGCATGCA	AGTCTCCACA	CTTAGCAAGC	AAGTGAAAAA	CCTCAACACC
Tvtps2g-C	ATGGCTTCCC	TTAGCATGCA	AGTCTCCACA	CTTAGCAAGT	AAGTGAAAAA	CCTCAACACC
Tvtps2g-T	ATGGCTTCCC	TTAGCATGCA	AGTCTCCACA	CTTAGCAAGT	AAGTGAAAAA	CCTCAACACC
	70	80	90	100	110	120
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TTTGGCATGG	GATCAGCATC	TAAGTTACCA	ATGGTGGCGA	GGCGCGTCTC	TACCACTCGT
Tvtps2g-U	TTTGGCATGG	GATCAGCATC	TAAGTTACCA	ATGGTGGCGA	GGCGCGTCTC	TACCACTCGT
Tvtps2g-L	TTTGGCATGG	GATCAGCATC	TAAGTTACCA	ATGGTGGCGA	GGCGCGTCTC	TACCACTCGT
Tvtps2g-C	TTTGGCATGG	GATCAGCATC	TAAGTTACCA	ATGGTGGCGA	GGCGCGTCTC	TACCACTCGT
Tvtps2g-T	TTTGGCATGG	GATCAGCATC	TAAGTTACCA	ATGGTGGCGA	GGCGCGTCTC	TACCACTCGT
	130	140	150	160	170	180
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	CTCCGACCTA	TCTGCTCCGC	CTCACTGCAA	GTCGAAGAAG	AAACCCGGCG	TTCCGGGAAC
Tvtps2g-U	CTCCGACCTA	TCTGCTCCGC	CTCACTGCAA	GTCGAAGAAG	AAACCCGGCG	TTCCGGGAAC
Tvtps2g-L	CTCCGACCTA	TCTGCTCCGC	CTCACTGCAA	GTCGAAGAAG	AAACCCGGCG	TTCCGGGAAC
Tvtps2g-C	CTCCGACCTA	TCTGCTCCGC	CTCACTGCAA	GTCGAAGAAG	AAACCCGGCG	TTCCGGGAAC
Tvtps2g-T	CTCCGACCTA	TCTGCTCCGC	CTCACTGCAA	GTCGAAGAAG	AAACCCGGCG	TTCCGGGAAC
	190	200	210	220	230	240
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TACCAGGCTC	CCGTTTGGAA	CAATGATTTT	ATCCAATCTT	TCAGCACAGA	TAAATATAAG
Tvtps2g-U	TACCAGGCTC	CCGTTTGGAA	CAATGATTTT	ATCCAATCTT	TCAGCACAGA	TAAATATAAG
Tvtps2g-L	TACCAGGCTC	CCGTTTGGAA	CAATGATTTT	ATCCAATCTT	TCAGCACAGA	TAAATATAAG
Tvtps2g-C	TACCAGGCTC	CCGTTTGGAA	CAATGATTTT	ATCCAATCTT	TCAGCACAGA	TAAATATAAG
Tvtps2g-T	TACCAGGCTC	CCGTTTGGAA	CAATGATTTT	ATCCAATCTT	TCAGCACAGA	TAAATATAAG
	250	260	270	280	290	300
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	GTACACATAC	ACTAAGCTTC	TTTTTTTTTT	-----TTT	---TTTTWAA	TATTTTATTT
Tvtps2g-U	GTACACATAC	ACTAAGCTTC	TTTTTTTTTT	TT-----TTT	TTTTTTTAAA	TATTTTATTT
Tvtps2g-L	GTACACATAC	ACTAAGCTTC	TTTTTTTTTT	-----TTT	TTTTTTTAAA	TATTTTATTT
Tvtps2g-C	GTACACATAC	ACTAAGCTTC	TTTTTTTTTT	TTTGTGTTT	TTTTTTTAAA	TATTTTATTT
Tvtps2g-T	GTACACATAC	ACTAAGCTTC	TTTTTTTTTT	TTTGTGTTT	TTTTTTTAAA	TATTTTATTT
	310	320	330	340	350	360
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATGCATTAAT	CTATGTGTGT	AGGATGAGAA	GTACTTGAAA	AAGAAAGAAG	AGCTGATTGC
Tvtps2g-U	ATGCATTAAT	CTATGTGTGT	AGGATGAGAA	GTACTTGAAA	AAGAAAGAAG	AGCTGATTGC
Tvtps2g-L	ATGCATTAAT	CTATGTGTGT	AGGATGAGAA	GTACTTGAAA	AAGAAAGAAG	AGCTGATTGC
Tvtps2g-C	ATGCATTAAT	CTATGTGTGT	AGGATGAGAA	GTACTTGAAA	AAGAAAGAAG	AGCTGATTGC
Tvtps2g-T	ATGCATTAAT	CTATGTGTGT	AGGATGAGAA	GTACTTGAAA	AAGAAAGAAG	AGCTGATTGC
	370	380	390	400	410	420
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ACAAGTGAAG	GTAATTATGA	ACACGAAAAT	GGAGGCTGTT	AAGCAATTGG	AGTTGATTGA
Tvtps2g-U	ACAAGTGAAG	GTAATTATGA	ACACGAAAAT	GGAGGCTGTT	AAGCAATTGG	AGTTGATTGA
Tvtps2g-L	ACAAGTGAAG	GTAATTATGA	ACACGAAAAT	GGAGGCTGTT	AAGCAATTGG	AGTTGATTGA
Tvtps2g-C	ACAAGTGAAG	GTAATTATGA	ACACGAAAAT	GGAGGCTGTT	AAGCAATTGG	AGTTGATTGA
Tvtps2g-T	ACAAGTGAAG	GTAATTATGA	ACACGAAAAT	GGAGGCTGTT	AAGCAATTGG	AGTTGATTGA

	430	440	450	460	470	480

Tvtps2g-G	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAGGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
Tvtps2g-A	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAAGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
Tvtps2g-U	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAAGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
Tvtps2g-L	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAAGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
Tvtps2g-C	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAAGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
Tvtps2g-T	GGACTTGAGA	AATCTAGGGT	TGACATATTA	TTTCGAAGAC	GAGTTTAAGA	AAATTTTAAC
	490	500	510	520	530	540

Tvtps2g-G	TTCTATATAT	AATGAGTACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
Tvtps2g-A	TTCTATATAT	AATGAGCACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
Tvtps2g-U	TTCTATATAT	AATGAGCACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
Tvtps2g-L	TTCTATATAT	AATGAGCACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
Tvtps2g-C	TTCTATATAT	AATGAGCACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
Tvtps2g-T	TTCTATATAT	AATGAGCACA	AAGGTTTCAA	AAACGAACAA	GTCGGGGACT	TGTATTTTAC
	550	560	570	580	590	600

Tvtps2g-G	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
Tvtps2g-A	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
Tvtps2g-U	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
Tvtps2g-L	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
Tvtps2g-C	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
Tvtps2g-T	ATCTCTTGCA	TTCAGACTCC	TCAGACTACA	CGGTTTCGAC	GTCTCAGAAG	GTAATCTATC
	610	620	630	640	650	660

Tvtps2g-G	AGAGCTAGCT	T-AGCTTGAT	T----ACTAA	CATGTATAT	TTCTTTTCTT	GAGTCTAATT
Tvtps2g-A	AGAGCTAGCT	TTAGCTTGAT	G----ACTAA	CATGTCTYAT	TTCTCTKCTT	GAGTCTAATW
Tvtps2g-U	AGAGCTAGCT	T-AGCTTGAT	ATATTACTAA	CATGTCTTAT	TTCTCTTCTT	GAGTTTAATT
Tvtps2g-L	ATAGCTAGCT	T-AGCTTGAT	G----ACTAA	CATGTCTTAT	TTCTCTTCTT	GAGTCTAATT
Tvtps2g-C	AGAGCTAGCT	T-AGCTTGAT	G----ACTAA	CATGTCTTAT	TTCTCTTCTT	GAGTCTAATT
Tvtps2g-T	AGAGCTAGCT	T-AGCTTGAT	G----ACTAA	CATGTCTTAT	TTCTCTTCTT	GAGTCTAATT
	670	680	690	700	710	720

Tvtps2g-G	CAATCGAAAT	ATT--ATCGA	TATACCGAAT	GCA----GAT	GTGTTTAACT	TTTTTAAGAA
Tvtps2g-A	TAACCGAAAT	TTTTTATTGA	TGWATCGAAT	GCA----GAT	GTGTTTAACT	TCTTTAAGAA
Tvtps2g-U	TAACCGGAGA	TTTT-ATTGA	TGTATCGAAT	GCATGCAGAT	GTGTTTAACT	TCTTTAAGAA
Tvtps2g-L	TAACCGAAAT	TTTT-ATTGA	TGTATCGAAT	GCA----GAT	GTGTTTAACT	TCTTTAAGAA
Tvtps2g-C	TAACCGAAAT	TTTT-ATTGA	TGTATCGAAT	GCA----GAT	GTGTTTAACT	TCTTTAAGAA
Tvtps2g-T	TAACCGAAAT	TTTT-ATTGA	TGTATCGAAT	GCA----GAT	GTGTTTAACT	TCTTTAAGAA
	730	740	750	760	770	780

Tvtps2g-G	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAAAAT	ACGAAGGACG	T-CTGGAACT
Tvtps2g-A	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAGAAT	ACGAAGGACG	TGTTGGAACT
Tvtps2g-U	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAGAAT	ACGAAGGACG	TGTTGGAACT
Tvtps2g-L	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAGAAT	ACGAAGGACG	TGTTGGAACT
Tvtps2g-C	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAGAAT	ACGAAGGACG	TGTTGGAACT
Tvtps2g-T	CGAGGACGGT	AGTGATTTCA	AGGCGAGCCT	TGGTGAGAAT	ACGAAGGACG	TGTTGGAACT
	790	800	810	820	830	840

Tvtps2g-G	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACT	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT
Tvtps2g-A	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACT	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT
Tvtps2g-U	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACA	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT
Tvtps2g-L	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACA	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT
Tvtps2g-C	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACA	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT
Tvtps2g-T	TTACGAGGCA	TCCTTCCTTA	TAAGGGTAGG	GGAAGTTACA	CTAGAGCAAG	CAAGAGTGTT

	850	860	870	880	890	900
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TTCCACCAAA	ATTCTGGAAA	AGAAAGTTGA	GGAAGGAATC	AAAGATGAGA	AATTATTAGC
Tvtps2g-U	TTCCACCAAA	ATTCTTGAGA	AGAAAGTTGA	GGAAGGAATC	AAAGATGAGA	AATTATTAGC
Tvtps2g-L	TTCCACCAAA	ATTCTTGAGA	AGAAAGTTGA	GGAAGGAATC	AAAGATGAGA	AATTATTAGC
Tvtps2g-C	TTCCACCAAA	ATTCTTGAGA	AGAAAGTTGA	GGAAGGAATC	AAAGATGAGA	AATTATTAGC
Tvtps2g-T	TTCCACCAAA	ATTCTTGAGA	AGAAAGTTGA	GGAAGGAATC	AAAGATGAGA	AATTATTAGC
	910	920	930	940	950	960
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATGGATTCAA	CATGCTTTGG	CTCTCCCTCT	TCACTGGAGG	ATCCAAAGGC	TAGAGGCAGG
Tvtps2g-U	ATGGATTCAA	CATTCTTTGG	CTCTCCCTCT	TCACTGGAGG	ATCCAAAGGC	TAGAGGCAGG
Tvtps2g-L	ATGGATTCAA	CATTCTTTGG	CTCTCCCTCT	TCACTGGAGG	ATCCAAAGGC	TAGAGGCAGG
Tvtps2g-C	ATGGATTCAA	CATTCTTTGG	CTCTCCCTCT	TCACTGGAGG	ATCCAAAGGC	TAGAGGCAGG
Tvtps2g-T	ATGGATTCAA	CATTCTTTGG	CTCTCCCTCT	TCACTGGAGG	ATCCAAAGGC	TAGAGGCAGG
	970	980	990	1000	1010	1020
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATGGTTCTTA	GACGCTTACA	AGGCGAGAAA	GGACATGAAT	CCAATCATCT	TCGAGCTCGG
Tvtps2g-U	ATGGTTCTTA	GACGCTTACA	AGGCGAGGAA	GGACATGAAT	CCAATCATCT	ACGAGCTCGG
Tvtps2g-L	ATGGTTCTTA	GACGCTTACA	AGGCGAGGAA	GGACATGAAT	CCAATCATCT	ACGAGCTCGG
Tvtps2g-C	ATGGTTCTTA	GACGCTTACA	AGGCGAGGAA	GGACATGGAT	CCAATCATCT	ACGAGCTCGG
Tvtps2g-T	ATGGTTCTTA	GACGCTTACA	AGGCGAGGAA	GGACATGGAT	CCAATCATCT	ACGAGCTCGG
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	GAAAATCGAC	TTCCATATCA	TTCAAGAAAC	GCAACTACAA	GAAGTGCAAG	AGGTTTCACA
Tvtps2g-U	GAAAATCGAC	TTCCATATCA	TTCAAGAAAC	ACAACTACAA	GAAGTCCAAG	AGGTTTCACA
Tvtps2g-L	GAAAATCGAC	TTCCATATCA	TTCAAGAAAC	ACAACTACAA	GAAGTCCAAG	AGGTTTCACA
Tvtps2g-C	GAAAATCGAC	TTCCATATCA	TTCAAGAAAC	ACAACTACAA	GAAGTCCAAG	AGGTTTCACA
Tvtps2g-T	GAAAATCGAC	TTCCATATCA	TTCAAGAAAC	ACAACTACAA	GAAGTCCAAG	AGGTTTCACA
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	GTAAGTACTA	C-----	TCCAAACTTT	GAACTTATTT	ATTATTTGTG	AATCGAATCT
Tvtps2g-U	GTAAGTACTA	A----AAACA	TCCAAACTTT	AGACTTATCT	ATTATTTGAG	CATCGAATCT
Tvtps2g-L	GTAAGTACTA	A----AAACA	TCCAAACTTT	AGACTTATCT	ATTATTTGTG	CATCGAATCT
Tvtps2g-C	GTAAGTACTA	ATTAAAAACA	TCCAAACTTC	AATCTTATTT	ATTATTTGTG	CATCGAATCT
Tvtps2g-T	GTAAGTACTA	ATTAAAAACA	TCCAAACTTA	AATCTTATTT	ATTATTTGTG	CATCGAATCT
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	CTACTAATAG	AAACATTTTT	AGGTGGTGGG	CTAATACCAA	CCTCGCGGAG	AAACTCCCAT
Tvtps2g-U	CTACTGATGG	AAACATTTTT	AGGTGGTGGG	CTAATACCAA	CCTCGCCGAG	AAACTCCCAT
Tvtps2g-L	CTACTAATCG	AAACRTTTTT	AGGTGGTGGG	CTAATACCAA	CCTCGCCGAG	AAACTCCCAT
Tvtps2g-C	CTACTAATCG	AAACATTTTT	AGGTGGTGGG	CTAATACCAA	CCTCGCCGAG	AAACTCCCAT
Tvtps2g-T	CTACTAATCG	AAACATTTTT	AGGTGGTGGG	CTAATACCAA	CCTCGCCGAG	AAACTCCCAT
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TTGTGAGAGA	TAGAATTGTG	GAGTGCTACT	TTTGGGCACT	TGGGCTCTTT	GAGCCACATG
Tvtps2g-U	TTGTGAGAGA	CAGAATTGTG	GAGTGCTACT	TTTGGGCACT	TGGGCTCTTT	GAGCCACATG
Tvtps2g-L	TTGTGAGAGA	CAGAATTGTG	GAGTGCTACT	TTTGGGCACT	TGGGCTCTTT	GAGCCACATG
Tvtps2g-C	TTGTGAGAGA	CAGAATTGTG	GAGTGCTACT	TTTGGGCACT	TGGGCTCTTT	GAGCCACATG
Tvtps2g-T	TTGTGAGAGA	CAGAATTGTG	GAGTGCTACT	TTTGGGCACT	TGGGCTCTTT	GAGCCACATG

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	AATATGGTTA	CCAGAGGAAA	ATGGTTGCCA	TTATCATCAC	TTTCGTCACG	ATCATAGACG
Tvtps2g-U	AATATGGATA	CCAGAGAAAA	ATGGCTGCCA	TTATCATCAC	TTTCGTTACG	ATCATAGACG
Tvtps2g-L	AATATGGTTA	CCAGAGGAAA	ATGGCTGCCA	TTATCATCAC	TTTCGTCACG	ATCATAGACG
Tvtps2g-C	AATATGGATA	CCAGAGGAAA	ATGGCTGCCA	TTATCATCAC	TTTCGTTACG	ATCATAGACG
Tvtps2g-T	AATATGGATA	CCAGAGGAAA	ATGGCTGCCA	TTATCATCAC	TTTCGTTACG	ATCATAGACG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ACGTCTACGA	CGTCTATGGT	ACACTCGACG	AACTGCAGCT	G TTCACCGAT	GCGATTCGAA
Tvtps2g-U	ACGTCTACGA	CGTCTATGGT	ACACTCGACG	AACTGCAGCT	G TTCACCGAC	GCGATTCGAA
Tvtps2g-L	ACGTCTACGA	CGTCTATGGT	ACACTCGACG	AACTGCAGCT	G TTCACCGAC	GCGATTCGAA
Tvtps2g-C	ACGTCTACGA	CGTCTATGGT	ACACTCGACG	AACTGCAGCT	G TCCACCGAC	GCGATTCGAA
Tvtps2g-T	ACGTCTACGA	CGTCTATGGT	ACACTCGACG	AACTGCAGCT	G TCCACCGAC	GCGATTCGAA
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	CGTCAGTACT	ATGTATTTAT	GTTATGTATG	AAATACAATC	TGCTGGTTGA	TTAGGCCTTA
Tvtps2g-U	CGTCAGTACT	ATGTATTTAT	GTTATGTATG	AAATACAATC	TGCTGGTTAA	TTAGGCCTTA
Tvtps2g-L	AGTCAGTACT	ATGTATTTAT	GTTATGTATG	AAATACAATC	TGCTACTTAA	TTAGGCCTTA
Tvtps2g-C	AGTCAGTA--	-TATATGTAT	ATTATGTATG	AAATACAATC	TGCTGGTTAA	TTAGGCCTTA
Tvtps2g-T	AGTCAGTA--	-TATATGTAT	ATTATGTATG	AAATACAATC	TGCTGGTTAA	TTAGGCCTTA
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ACTAATCAAA	AA-TGAAAA-	-TTTTTCAGAT	GGGACTTTGA	ATCAATAAGC	ACACTTCCAT
Tvtps2g-U	ACTAATCAAA	AA-TGAAAA-	-TTTACAGAT	GGGACGTTGA	ATCAATAAGC	ACACTTCCAT
Tvtps2g-L	AGTAATCAAA	AA-TGGAATT	TTTTTCAGAT	GGGACGTTGA	ATCAATAAGC	ACACTTCCAT
Tvtps2g-C	ACTAATCAAA	AA-TGGAAT	TTTTTCAGAT	GGGACGTTGA	ATCAATAAGC	ACACTTCCAT
Tvtps2g-T	ACTAATCAAA	AA-TGGAAT	TTTTTCAGAT	GGGACGTTGA	ATCAATAAGC	ACACTTCCAT
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATTACATGCA	AGTTTGCTAT	TTGGCAGTCT	TCACCTACGC	TTCAGAGCTG	GCTTATGACA
Tvtps2g-U	ATTACATGCA	AGTTTGCTAT	TTGGCAGTCT	TCACCTACGC	TTCAGAGCTG	GCTTATGACA
Tvtps2g-L	ATTACATGCA	AGTTTGCTAT	TTGGCAGTCT	TCACCTACGC	TTCAGAGCTG	GCTTATGACA
Tvtps2g-C	ATTACATGCA	AGTTTGCTAT	TTGGCAGTCT	TCACCTACGC	TTCAGAGCTG	GCTTATGACA
Tvtps2g-T	ATTACATGCA	AGTTTGCTAT	TTGGCAGTCT	TCACCTACGC	TTCAGAGCTG	GCTTATGACA
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TTCTCAAAGA	TCAGGGTTTC	AACAGTATCT	CATACCTACA	GAGATCGGTA	TGTATACTTT
Tvtps2g-U	TTCTCAAAGA	TCAGGGTTTC	AACAGTATCT	CATACCTACA	GAGATCGGTA	TRYATMCTTT
Tvtps2g-L	TTCTCAAAGA	TCAGGGTTTC	AACAGTATCT	CATACCTACA	GAGATCGGTA	TACATCCTTT
Tvtps2g-C	TTCTCAAAGA	TCAGGGTTTC	AACAGTATCT	CATACCTACA	GAGATCGGTA	TACATCCTTT
Tvtps2g-T	TTCTCAAAGA	TCAGGGTTTC	AACAGTATCT	CATACCTACA	GAGATCGGTA	TACATCCTTT
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	CTCTCTCCTA	CTGTTGC---	-----	-----	-----TT	GTGAGGTTTA
Tvtps2g-U	CTCTCTCYW	CTSTYK---	-----	-----	-----TY	SYSWRSYWTW
Tvtps2g-L	CTCTCTCYW	CTATCTCTCT	CTCCCTCTCC	TACCATTGST	TG---YKTK	KKARGTTTWA
Tvtps2g-C	CTCTCTCTCT	CTCTCTCCCT	CTCCTACCAT	TGCTTGTGTT	TCTCTCTCTC	CCCTACCATT
Tvtps2g-T	CTCTCTCTCT	CTCTCTC---	-----	-----	-----TCTC	CCCTACCATT

	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ATCATTGAA	GAAACTGATT	ATGAATTTGT	GTGTATTAAT	TGCAGTGGTT	GAGTTTGGTT
Tvtps2g-U	RYYWKTKKWR	KAARYTKWKT	RTGWATKTGT	GTGTATTAAT	TGCAGTGGTT	GAGTTTGGTT
Tvtps2g-L	WYMWTTKRAR	RAARYTGATT	ATGAATTTGT	GTGTATGAAT	TGCAGTGGTT	GAGTTTGGTT
Tvtps2g-C	GCTTGTGTTG	TAAGTTTTGT	GTGTATG---	-----AAT	TGCAGTGGTT	GAGTTTGGTT
Tvtps2g-T	GCTTGTGTTG	TAAGTTTTGT	GTGTATG---	-----AAT	TGCAGTGGTT	GAGTTTGGTT

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	GAAGGGTTTT	TCCAAGAGGC	AAAATGGTAC	TACGCCGGTT	ACACGCCAAC	CCTAGCTGAA
Tvtps2g-U	GAAGGGTTTT	TCCAAGAGGC	AAAATGGTAC	TACGCCGGTT	ACACGCCAAC	CCTAGCTGAA
Tvtps2g-L	GAAGGGTTTT	TCCAAGAGGC	AAAATGGTAC	TACGCCGGTT	ACACGCCAAC	CCTAGCTGAA
Tvtps2g-C	GAAGGGTTTT	TCCAAGAGGC	AAAATGGTAC	TACGCCGGTT	ACACGCCAAC	CCTAGCTGAA
Tvtps2g-T	GAAGGGTTTT	TCCAAGAGGC	AAAATGGTAC	TACGCCGGTT	ACACGCCAAC	CCTAGCTGAA

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	TATTTGGAGA	ACGCCAAAGT	TTCTATCTCG	TCTCCCACGA	TTATATCTCA	AGTTTACTTC
Tvtps2g-U	TATTTGGAGA	ACGCCAAAGT	TTCTATCTCG	TCTCCCACGA	TTATATCTCA	AGTTTACTTC
Tvtps2g-L	TATTTGGAGA	ACGCCAAAGT	TTCTATCTCG	TCTCCCACGA	TTATATCTCA	AGTTTACTTC
Tvtps2g-C	TATTTGGAGA	ACGCCAAAGT	TTCTATCTCG	TCTCCCACGA	TTATATCTCA	AGTTTACTTC
Tvtps2g-T	TATTTGGAGA	ACGCCAAAGT	TTCTATCTCG	TCTCCCACGA	TTATATCTCA	AGTTTACTTC

	1870	1880	1890	1900	1910	1920
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	ACTCTCCCGA	ACTCGACTGA	AAGAACGGTT	GTCGAGAACG	TCTACGGATA	CCACAACATA
Tvtps2g-U	ACTCTCCCGA	ACTCGACTGA	GAGAACGGTT	GTCGAGAACG	TCTACGGATA	CCACAACATA
Tvtps2g-L	ACTCTCCCGA	ACTCGACTGA	GAGAACGGTT	GTCGAGAACG	TCTACGGATA	CCACAACATA
Tvtps2g-C	ACTCTCCCGA	ACTCGACTGA	GAGAACGGTT	GTCGAGAACG	TCTACGGATA	CCACAACATA
Tvtps2g-T	ACTCTCCCGA	ACTCGACTGA	GAGAACGGTT	GTCGAGAACG	TCTACGGATA	CCACAACATA

	1930	1940	1950	1960	1970	1980
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	CTCTATCTTT	CCGGCATGAT	TTTAAGGCTT	GCCGATGATC	TTGGTACAAC	TCAG-----
Tvtps2g-U	CTCTATCTTT	CCGGCATGAT	TTTAAGGCTT	GCCGATGATC	TTGGTACAAC	TCAGGTAATT
Tvtps2g-L	CTCTATCTTT	CCGGCATGAT	TTTAAGGCTT	GCCGATGATC	TTGGTACAAC	TCAGGTAATT
Tvtps2g-C	CTCTATCTTT	CCGGCATGAT	TTTAAGGCTT	GCCGATGATC	TTGGTACAAC	TCAGGTAATT
Tvtps2g-T	CTCTATCTTT	CCGGCATGAT	TTTAAGGCTT	GCCGATGATC	TTGGTACAAC	TCAGGTAATT

	1990	2000	2010	2020	2030	2040
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	AAACATATTT	GCTAATTAAA	TTATAGTATT	TTGATTAATT	ATGAGTTTGT	ATAATTATGT
Tvtps2g-U	AAACATATTT	GCTAATTAAA	TTATAGTATT	TTTATTAATT	ATAATTATGT	ATG-----
Tvtps2g-L	AAACATATTT	GCTAATTAAA	TTATAGTATT	TTGATTAATT	ATGAGTTTGT	ATAATTATGT
Tvtps2g-C	AAACATATTT	GCTAATTAAA	TTATAGTATT	TTGATTAATT	ATAATTATGT	ATA-----
Tvtps2g-T	AAACATATTT	GCTAATTAAA	TTATAGTATT	TTGATTAATT	ATAATTATGT	ATA-----

	2050	2060	2070	2080	2090	2100
Tvtps2g-G
Tvtps2g-A	-----TTTG	AGCTGAAGAG	AGGGGACGTG	CAAAAAGCGA	TCCAGTGTTA	
Tvtps2g-U	ACATGTTTTT	ATACAGTTTG	AGCTGAAGAG	AGGGGACGTG	CAAAAAGCGA	TCCAGTGTTA
Tvtps2g-L	-TTTTTTTTT	ATACAGTTTG	AGCTGAAGAG	AGGGGACGTG	CAAAAAGCGA	TCCAGTGTTA
Tvtps2g-C	ACATGTTTTT	ATACAGTTTG	AGCTGAAGAG	AGGGGACGTG	CAAAAAGCGA	TCCAGTGTTA
Tvtps2g-T	-TATGTTTTT	ATACAGTTTG	AGCTGAAGAG	AGGGGACGTG	CAAAAAGCGA	TCCAGTGTTA

		2110	2120	2130	2140	2150	2160
	
Tvtps2g-G		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CAGAGGCAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
Tvtps2g-A		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CAGAGGCAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
Tvtps2g-U		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CGGAGGAAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
Tvtps2g-L		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CAGAGGCAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
Tvtps2g-C		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CGGAGGAAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
Tvtps2g-T		CATGAACGAC	AACAATGCCA	CGGAGGAAGA	AGGGACAGAG	CACGTGAAGT	ATCTGCTGCG
		2170	2180	2190	2200	2210	2220
	
Tvtps2g-G		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGG
Tvtps2g-A		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGA
Tvtps2g-U		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGA
Tvtps2g-L		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGA
Tvtps2g-C		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGA
Tvtps2g-T		GGAGGCGTGG	CAGGAGATGA	ACTCGGCGAT	GGCGGACCCC	GACTGTCCGT	TGTCGGAAGA
		2230	2240	2250	2260	2270	2280
	
Tvtps2g-G		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
Tvtps2g-A		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
Tvtps2g-U		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
Tvtps2g-L		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
Tvtps2g-C		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
Tvtps2g-T		TCTGGTGTTT	GCTGCTGCTA	ATCTGGGAAG	AGCATCGCAG	TTCATATATC	TCGACGGAGA
		2290	2300	2310	2320	2330	2340
	
Tvtps2g-G		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
Tvtps2g-A		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
Tvtps2g-U		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
Tvtps2g-L		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
Tvtps2g-C		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
Tvtps2g-T		TGGCCATGGC	GTGCAGCACT	CGGAGATTCA	TAACCAGATG	GGAGGCCTCA	TCTTCGAGCC
		2350					
						
Tvtps2g-G		GTACGTGTGA					
Tvtps2g-A		GTACGTGTGA					
Tvtps2g-U		GTACGTGTGA					
Tvtps2g-L		GTACGTGTGA					
Tvtps2g-C		GTACGTGTGA					
Tvtps2g-T		GTACGTGTGA					

Abbildung 6.1: Vergleich der genomischen Sequenzen *Tvtps2g* aus allen sechs Chemotypen. Dargestellt ist jeweils die Konsensussequenz aus mindestens drei Isolationen aus genomischer DNA. Die Introns sind grau hinterlegt.

6.2.3 Vergleich der Proteinsequenzen TvTPS2-T und TvTPS2-C

	10	20	30	40	50	60
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	70	80	90	100	110	120
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	130	140	150	160	170	180
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	190	200	210	220	230	240
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	250	260	270	280	290	300
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	310	320	330	340	350	360
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	370	380	390	400	410	420
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	430	440	450	460	470	480
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	490	500	510	520	530	540
TvTPS2-C
TvTPS2-T
	550					
TvTPS2-C				
TvTPS2-T				

Abbildung 6.2: Vergleich der Proteinsequenzen von TvTPS2-C und TvTPS2-T. Unterschiede in den Sequenzen wurden grau markiert, charakteristische Motive der Monoterpensynthesen unterstrichen.

6.3 Zähl- und Messdaten der Bonitierung von Thymian

Die in den Kapiteln 6.3.1 und 6.3.2 verwendeten Abkürzungen bedeuten: OS = Oberseite, US = Unterseite, DS = Drüsenschuppe.

6.3.1 Anzahl Drüsenhaare

Chemotyp	Pfl.-Nr.	Blatt-Nr.	Haare/mm ² OS 1	Haare/mm ² OS 2	Haare/mm ² US 1	Haare/mm ² US 2	Haare/mm ² Blattader 1	Haare/mm ² Blattader 2
A	5	1	445,2	485,7	592,4	901,7	670,5	639,7
A	5	2	511,5	537,2	688,1	603,5	747,5	832,3
A	5	3	643,9	677,1	680,7	651,3	739,8	601,1
Mittelwert			550,1		686,3		705,2	
Standardfehler			37,29309615		45,9		34,4	
G	6	1	379,0	338,5	511,5	747,5	631,9	624,2
G	6	2	368,0	426,8	478,4	608,8	531,8	693,6
G	6	3	309,1	305,4	518,8	496,8	601,1	739,8
Mittelwert			354,5		560,3		637,1	
Standardfehler			18,9		41,7		29,6	
U	1	1	323,8	316,5	554,9	305,4	477,8	400,7
U	1	2	283,3	423,2	470,1	485,5	485,5	447,0
U	1	3	386,4	327,5	360,6	423,2	369,9	308,3
U	2	1	496,8	239,2	360,6	375,3	208,1	292,9
U	2	2	309,1	371,6	k.A.	k.A.	246,6	323,7
U	2	3	456,3	445,2	1063,5	k.A.	485,5	454,7
Mittelwert			364,9		488,8		375,1	
Standardfehler			22,5		76,3		28,3	
T	1	1	390,0	386,4	353,2	382,7	493,2	477,8
T	1	2	356,9	371,6	452,6	430,5	470,1	462,4
T	1	3	327,5	298,1	624,2	601,1	670,5	554,9
T	2	1	327,5	356,9	500,4	548,3	554,9	601,1
T	2	2	419,5	434,2	434,2	379,0	593,4	662,8
T	2	3	338,5	452,6	555,6	658,7	585,7	516,3
Mittelwert			371,6		493,4		553,6	
Standardfehler			13,5		29,8		20,7	
C	1	1	342,2	323,8	526,2	588,7	631,9	647,4
C	1	2	261,3	452,6	551,9	526,2	639,7	655,1
C	1	3	287,0	419,5	566,7	493,1	724,4	709,0
C	2	1	235,5	338,5	386,4	390,0	531,8	470,1
C	2	2	246,5	250,2	439,3	447,0	524,1	416,2
C	2	3	235,5	356,9	448,9	460,0	508,6	447,0
Mittelwert			312,5		485,4		575,4	
Standardfehler			21,0		19,4		30,3	
L	10	1	555,6	485,7	507,8	467,3	500,9	655,1
L	10	2	533,6	504,1	632,9	526,2	578,0	601,1
L	10	3	548,3	621,9	721,2	544,6	870,9	616,5
L	11	1	599,8	478,4	636,6	643,9	1017,3	932,5
L	11	2	496,8	393,7	658,7	496,8	1009,6	924,8
L	11	3	430,5	426,8	643,9	618,2	909,4	840,0
Mittelwert			506,3		591,5		788,0	
Standardfehler			20,0		22,9		53,2	

6.3.2 Anzahl Drüsenschuppen

Chemotyp	Pfl.-Nr.	Blatt-Nr.	Anzahl DS OS	Anzahl DS US	Durchmesser DS OS in µm					Durchmesser DS US in µm				
					1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
A	5	1	155,0	47,0	88,2	73,5	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	88,2
A	5	2	231,0	67,0	88,2	88,2	102,9	73,5	88,2	88,2	88,2	102,9	73,5	88,2
A	5	3	230,0	86,0	73,5	73,5	88,2	88,2	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5
Mittelwert			205,3	66,7	83,3					80,4				
Standardfehler			25,2	11,3	2,3					2,4				
G	6	1	170,0	94,0	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
G	6	2	158,0	90,0	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	58,8	58,8
G	6	3	227,0	111,0	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	58,8
Mittelwert			185,0	98,3	74,5					70,6				
Standardfehler			21,3	6,4	1,0					1,6				
U	1	1	223,0	96,0	73,5	88,2	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
U	1	2	153,0	61,0	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
U	1	3	188,0	116,0	73,5	73,5	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
U	2	1	246,0	k.A.	73,5	73,5	88,2	88,2	73,5	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
U	2	2	238,0	k.A.	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
U	2	3	113,0	26,0	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	58,8	73,5	73,5
Mittelwert			193,5	74,8	77,0					72,8				
Standardfehler			21,4	19,8	1,2					0,7				
T	1	1	212,0	123,0	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5
T	1	2	252,0	175,0	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5
T	1	3	216,0	133,0	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5
T	2	1	229,0	172,0	88,2	73,5	88,2	88,2	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5
T	2	2	225,0	164,0	73,5	88,2	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
T	2	3	208,0	148,0	88,2	73,5	88,2	102,9	88,2	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5
Mittelwert			223,7	152,5	79,9					77,0				
Standardfehler			6,5	8,7	1,5					1,2				
C	1	1	202,0	110,0	88,2	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5
C	1	2	208,0	96,0	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	80,9	73,5	80,9	73,5
C	1	3	196,0	108,0	88,2	88,2	80,9	73,5	80,9	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
C	2	1	214,0	145,0	88,2	73,5	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5	73,5	88,2	73,5
C	2	2	147,0	87,0	88,2	73,5	73,5	73,5	88,2	73,5	80,9	73,5	73,5	80,9
C	2	3	203,0	126,0	88,2	80,9	73,5	73,5	88,2	80,9	80,9	80,9	73,5	73,5
Mittelwert			195,0	112,0	80,6					76,7				
Standardfehler			9,9	8,5	1,3					0,9				
L	10	1	257,0	115,0	73,5	88,2	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	80,9	73,5
L	10	2	240,0	101,0	88,2	73,5	88,2	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
L	10	3	293,0	84,0	73,5	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
L	11	1	213,0	70,0	88,2	73,5	88,2	88,2	73,5	73,5	73,5	88,2	73,5	80,9
L	11	2	208,0	61,0	73,5	88,2	80,9	88,2	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5	73,5
L	11	3	244,0	77,0	88,2	73,5	88,2	88,2	88,2	73,5	80,9	73,5	73,5	73,5
Mittelwert			242,5	84,7	81,1					74,8				
Standardfehler			12,7	8,2	1,3					0,6				

6.3.3 Blattabmessungen

Chemotyp	Pfl.-Nr.	Blatt-Nr.	Blattlänge [mm]	Blattbreite [mm]
A	5	1	5,0	2,5
A	5	2	6,5	3,0
A	5	3	5,5	2,5
Mittelwert			5,7	2,7
Standardfehler			0,4	0,2
G	6	1	5,0	3,0
G	6	2	4,5	2,5
G	6	3	5,0	3,0
Mittelwert			4,8	2,8
Standardfehler			0,2	0,2
U	1	1	4,5	3,0
U	1	2	4,5	2,0
U	1	3	4,4	4,0
U	2	1	5,0	4,0
U	2	2	4,5	3,5
U	2	3	3,5	2,0
Mittelwert			4,4	3,1
Standardfehler			0,2	0,4
T	1	1	6,0	3,0
T	1	2	6,0	3,0
T	1	3	5,0	2,5
T	2	1	6,0	3,0
T	2	2	6,0	3,0
T	2	3	6,0	2,5
Mittelwert			5,8	2,8
Standardfehler			0,2	0,1
C	1	1	4,0	3,0
C	1	2	5,0	2,5
C	1	3	5,0	3,0
C	2	1	5,0	3,0
C	2	2	5,5	2,5
C	2	3	5,0	3,0
Mittelwert			4,9	2,8
Standardfehler			0,2	0,1
L	10	1	7,0	4,0
L	10	2	6,0	3,5
L	10	3	6,0	3,0
L	11	1	6,0	3,0
L	11	2	5,5	3,0
L	11	3	6,0	3,0
Mittelwert			6,1	3,3
Standardfehler			0,2	0,2

6.4 Promotorelemente des *Tvtps2*-Promotors

Tabelle 6.2: Auflistung aller im Promotor von *Tvtps2* gefundenen Promotorelemente.
Pos. = Position, Str. = Strang

Name	Organismus	Pos	Str.	Sequenz	Datenbank
-10PEHVPSBD		435	+	TATTCT	PLACE
2SSEEDPROTBANAPA		668	+	CAAACAC	PLACE
AACACOREOSGLUB1		666	+	AACAAAC	PLACE
A-box	<i>P. crispum</i>	65	+	CCGTCC	PlantCARE
A-box	<i>P. crispum</i>	321	-	CCGTCC	PlantCARE
ABRE	<i>A. thaliana</i>	597	+	CACGTG	PlantCARE
ACGTATERD1		84	+	ACGT	PLACE
ACGTATERD1		103	+	ACGT	PLACE
ACGTATERD1		137	+	ACGT	PLACE
ACGTATERD1		84	-	ACGT	PLACE
ACGTATERD1		103	-	ACGT	PLACE
ACGTATERD1		137	-	ACGT	PLACE
ACGTCBOX		102	+	GACGTC	PLACE
ACGTCBOX		102	-	GACGTC	PLACE
AGATCONSENSUS		479	+	TTWCCWWWNNGGWW	PLACE
ANAERO1CONSENSUS		665	+	AAACAAA	PLACE
ARR1AT		26	+	NGATT	PLACE
ARR1AT		380	+	NGATT	PLACE
ARR1AT		704	+	NGATT	PLACE
ARR1AT		588	+	NGATT	PLACE
ARR1AT		460	+	NGATT	PLACE
ARR1AT		150	-	NGATT	PLACE
ARR1AT		364	-	NGATT	PLACE
ARR1AT		455	-	NGATT	PLACE
ARR1AT		625	-	NGATT	PLACE
ASF1MOTIFCAMV		82	+	TGACG	PLACE
ASF1MOTIFCAMV		317	-	TGACG	PLACE
AuxRR-core	<i>N. tabacum</i>	216	-	GGTCCAT	PlantCARE
Box 4	<i>P. crispum</i>	253	+	ATTAAT	PlantCARE
BOXIINTPATPB		345	+	ATAGAA	PLACE
BOXIINTPATPB		657	-	ATAGAA	PLACE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	27	-	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	95	-	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	147	+	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>G. max</i>	208	+	CAATT	PlantCARE
CAAT-box	<i>B. rapa</i>	213	+	CAAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>G. max</i>	225	+	CAATT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	372	-	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>B. rapa</i>	412	-	CAAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>A. thaliana</i>	458	+	CCAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	459	+	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>B. rapa</i>	472	+	CAAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	515	+	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>B. rapa</i>	579	-	CAAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>B. rapa</i>	587	+	CAAAT	PlantCARE

CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	613	+	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	617	+	CAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>A. thaliana</i>	671	+	CCAAT	PlantCARE
CAAT-box	<i>G. max</i>	672	+	CAATT	PlantCARE
CAAT-box	<i>G. max</i>	681	+	CAATT	PlantCARE
CAAT-box	<i>H. vulgare</i>	706	+	CAAT	PlantCARE
CAATBOX1		149	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		218	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		235	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		470	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		526	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		624	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		683	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		692	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		717	+	CAAT	PLACE
CAATBOX1		28	-	CAAT	PLACE
CAATBOX1		97	-	CAAT	PLACE
CACTFTPPCA1		153	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		161	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		169	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		244	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		252	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		320	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		561	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		711	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		788	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		59	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		91	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		182	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		208	+	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		341	-	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		377	-	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		449	-	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		550	-	YACT	PLACE
CACTFTPPCA1		780	-	YACT	PLACE
CANBNNAPA		668	+	CNAACAC	PLACE
CANBNNAPA		636	-	CNAACAC	PLACE
CCAATBOX1		469	+	CCAAT	PLACE
CCAATBOX1		682	+	CCAAT	PLACE
CCGTCC-box	<i>A. thaliana</i>	65	+	CCGTCC	PlantCARE
CCGTCC-box	<i>A. thaliana</i>	321	-	CCGTCC	PlantCARE
CEREBLUBOX1PSLEGA		154	-	TGTAAAGT	PLACE
CEREBLUBOX1PSLEGA		162	-	TGTAAAGT	PLACE
CEREBLUBOX1PSLEGA		245	-	TGTAAAGT	PLACE
CEREBLUBOX1PSLEGA		253	-	TGTAAAGT	PLACE
CGTCA-motif	<i>H. vulgare</i>	80	-	CGTCA	PlantCARE
CGTCA-motif	<i>H. vulgare</i>	307	+	CGTCA	PlantCARE
CGTCA-motif	<i>H. vulgare</i>	99	-	CGTCA	PlantCARE
CPBCSPOR		439	-	TATTAG	PLACE
CURECORECR		58	+	GTAC	PLACE
CURECORECR		58	-	GTAC	PLACE
DOFCOREZM		390	+	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		411	+	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		506	+	AAAG	PLACE

DOFCOREZM		548	+	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		155	-	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		163	-	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		171	-	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		184	-	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		246	-	AAAG	PLACE
DOFCOREZM		254	-	AAAG	PLACE
DPBFCOREDCDC3		699	+	ACACNNG	PLACE
DPBFCOREDCDC3		608	-	ACACNNG	PLACE
EBOXBNNAPA		223	+	CANNTG	PLACE
EBOXBNNAPA		223	-	CANNTG	PLACE
ERELEE4		219	+	AWTTCAA	PLACE
GAG-motif	<i>A. thaliana</i>	327	+	AGAGAGT	PlantCARE
GATABOX		374	+	GATA	PLACE
GATABOX		356	-	GATA	PLACE
GATABOX		443	-	GATA	PLACE
GATABOX		782	-	GATA	PLACE
G-Box	<i>P. sativum</i>	597	+	CACGTG	PlantCARE
G-box	<i>B. napus</i>	596	+	ACACGTGT	PlantCARE
G-box	<i>A. thaliana</i>	597	+	CACGTG	PlantCARE
GT1CONSENSUS		291	+	GRWAAW	PLACE
GT1CONSENSUS		512	+	GRWAAW	PLACE
GT1CONSENSUS		745	+	GRWAAW	PLACE
GT1CONSENSUS		567	-	GRWAAW	PLACE
GT1GMSCAM4		291	+	GAAAAA	PLACE
GT1GMSCAM4		567	-	GAAAAA	PLACE
GTGANTG10		459	+	GTGA	PLACE
GTGANTG10		152	-	GTGA	PLACE
GTGANTG10		319	-	GTGA	PLACE
GTGANTG10		464	-	GTGA	PLACE
GTGANTG10		560	-	GTGA	PLACE
HEXMOTIFTAH3H4		82	-	ACGTCA	PLACE
IBOX		354	-	GATAAG	PLACE
IBOXCORE		355	-	GATAA	PLACE
IBOXCORENT		353	-	GATAAGR	PLACE
INRNTPSADB		26	-	YTCANTYY	PLACE
LECPLEACS2		430	+	TAAAATAT	PLACE
MARTBOX		186	+	TTWTWTTWTT	PLACE
MNF1	<i>Z. mays</i>	291	+	GTGCCC(A/T)(A/T)	PlantCARE
MYBST1		782	-	GGATA	PLACE
MYCCONSUSAT		223	+	CANNTG	PLACE
MYCCONSUSAT		223	-	CANNTG	PLACE
NTBBF1ARROLB		154	+	ACTTTA	PLACE
NTBBF1ARROLB		162	+	ACTTTA	PLACE
NTBBF1ARROLB		170	+	ACTTTA	PLACE
NTBBF1ARROLB		245	+	ACTTTA	PLACE
NTBBF1ARROLB		253	+	ACTTTA	PLACE
PALBOXAPC		67	+	CCGTCC	PLACE
PALBOXAPC		331	-	CCGTCC	PLACE
POLASIG1		406	+	AATAAA	PLACE
POLASIG1		187	-	AATAAA	PLACE
POLASIG1		268	-	AATAAA	PLACE
POLASIG2		693	+	AATTTAA	PLACE
POLASIG2		748	+	AATTTAA	PLACE

POLASIG3		527	+	AATAAT	PLACE
POLASIG3		600	+	AATAAT	PLACE
POLASIG3		11	-	AATAAT	PLACE
POLASIG3		190	-	AATAAT	PLACE
POLASIG3		237	-	AATAAT	PLACE
POLASIG3		271	-	AATAAT	PLACE
POLLENILELAT52		387	+	AGAAA	PLACE
PROXBBNAPA		668	+	CAAACACC	PLACE
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A		389	-	CCTTTT	PLACE
RAV1AAT		618	+	CAACA	PLACE
RAV1AAT		675	+	CAACA	PLACE
RAV1AAT		689	+	CAACA	PLACE
RHERPATEXPA7		299	-	KCACGW	PLACE
RHERPATEXPA7		366	-	KCACGW	PLACE
RHERPATEXPA7		457	-	KCACGW	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		95	+	ATATT	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		122	+	ATATT	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		307	+	ATATT	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		434	+	ATATT	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		433	-	ATATT	PLACE
ROOTMOTIFTAPOX1		441	-	ATATT	PLACE
RYREPEATBNNAPA		774	+	CATGCA	PLACE
RYREPEATBNNAPA		369	-	CATGCA	PLACE
RYREPEATLEGUMINBOX		368	-	CATGCAY	PLACE
SITEIIATCYTC		539	-	TGGGCY	PLACE
Skn-1 motif	<i>O. sativa</i>	593	-	GTCAT	PlantCARE
SORLIP2AT		538	+	GGGCC	PLACE
SORLIP2AT		539	-	GGGCC	PLACE
SP8BFIBSP8BIB		208	+	TACTATT	PLACE
TAAAGSTKST1		505	+	TAAAG	PLACE
TAAAGSTKST1		155	-	TAAAG	PLACE
TAAAGSTKST1		163	-	TAAAG	PLACE
TAAAGSTKST1		171	-	TAAAG	PLACE
TAAAGSTKST1		246	-	TAAAG	PLACE
TAAAGSTKST1		254	-	TAAAG	PLACE
TATA-box	<i>G. max</i>	9	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	12	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	36	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	44	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	47	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	86	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	92	+	TATA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	160	-	taTATAAAgg	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	161	-	taTATAAAg	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	162	-	TATAAA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	163	-	TATATAA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	164	+	TATA	PlantCARE
TATA-box	<i>B. napus</i>	165	+	ATATAT	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	166	+	TATA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	176	+	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	179	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	184	+	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	192	+	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	195	+	TAATA	PlantCARE

TATA-box	<i>G. max</i>	201	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	260	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	263	-	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>B. napus</i>	264	+	ATTATA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	265	-	TATAA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	266	+	TATA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	271	+	TATAAA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	273	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	333	+	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	397	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	407	+	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	419	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	429	+	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>G. max</i>	462	+	TAATA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	530	+	ccTATAAAaa	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	534	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	567	-	TTTTA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	649	+	TATA	PlantCARE
TATA-box	<i>B. oleracea</i>	650	+	ATATAA	PlantCARE
TATA-box	<i>A. thaliana</i>	651	+	TATAAA	PlantCARE
TATA-box	<i>L. esculentum</i>	740	-	TTTTA	PlantCARE
TATABOX4		660	+	TATATAA	PLACE
TATABOX5		191	+	TTATTT	PLACE
TATABOX5		564	+	TTATTT	PLACE
TATABOX5		599	-	TTATTT	PLACE
TATAPVTRNALEU		660	-	TTTATATA	PLACE
TATCCACHVAL21		782	+	TATCCAC	PLACE
TATCCAOSAMY		782	+	TATCCA	PLACE
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D		782	+	TATCCAY	PLACE
TCA-element	<i>B. oleracea</i>	375	+	CAGAAAAGGA	PlantCARE
TCA-element	<i>N. tabacum</i>	742	-	CCATCTTTT	PlantCARE
TGACG-motif	<i>H. vulgare</i>	80	+	TGACG	PlantCARE
TGACG-motif	<i>H. vulgare</i>	307	-	TGACG	PlantCARE
TGACG-motif	<i>H. vulgare</i>	99	+	TGACG	PlantCARE
TGACGTVMAMY		82	+	TGACGT	PLACE
UPIATMSD		539	+	GGCCCAWWW	PLACE
WRKY71OS		82	+	TAGC	PLACE
WRKY71OS		318	-	TGAC	PLACE

6.5 Methylierungsgrade der Promotorfragmente

Nachfolgend sind die von CyMATE (<http://www.cymate.org/>) ausgegebenen Daten zu den Methylierungsgraden der Promotorfragmente von *Tvtps2* aufgelistet.

6.5.1 Thymoltyp

FRAGMENT 1 (P1)

Sum of all bisulfite patterns: 70 of 389 positions (17.99%).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 70 (17.14%).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 70 (5.71%).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 54 of 70 (77.14%).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 490 analysed positions 34 (6.94%) are methylated, 456 are not methylated (93.06%) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
64	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
81	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
100	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
124	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
134	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
286	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
296	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
313	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
330	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
355	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
357	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
363	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
SUM (AVG)	7 (8.33 %)	77 (91.67 %)	84 (100 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
63	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
113	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
123	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
312	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
SUM (AVG)	2 (7.14 %)	26 (92.86 %)	28 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
31	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
57	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
59	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
60	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
61	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
67	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
68	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
70	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
71	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
89	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
103	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
104	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
106	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)

107	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
117	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
140	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
142	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
143	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
145	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
149	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
151	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
157	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
159	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
177	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
180	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
193	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
196	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
206	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
214	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
219	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100 %)
227	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
228	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
229	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
231	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
239	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
240	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
242	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
248	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
250	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
256	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
258	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
276	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
294	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
301	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
302	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
308	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
309	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
310	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
316	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
318	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
350	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100 %)
367	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
SUM (AVG)	25 (6.61 %)	353 (93.39 %)	378 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 66 of 394 positions (16.75 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 10 of 66 (15.15 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 66 (4.55 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 53 of 66 (80.30 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 2284 analysed positions 42 (1.84 %) are methylated, 2242 are not methylated (98.16 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
30	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
56	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
86	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
95	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
117	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
165	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
200	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
216	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
238	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
273	1 (2.94 %)	33 (97.06 %)	34 (100.00 %)
SUM (AVG)	4 (1.16 %)	341 (98.84 %)	345 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
74	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
147	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
162	2 (5.88 %)	32 (94.12 %)	34 (100.00 %)
SUM (AVG)	2 (1.92 %)	102 (98.08 %)	104 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
24	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
67	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
82	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
93	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
97	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
98	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
101	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
110	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
111	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
127	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
132	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
150	1 (2.94 %)	33 (97.06 %)	34 (100.00 %)
154	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
169	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
170	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
171	1 (2.94 %)	33 (97.06 %)	34 (100.00 %)
184	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
189	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
191	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
205	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
211	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
226	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
236	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
246	1 (2.94 %)	33 (97.06 %)	34 (100.00 %)
249	0 (0.00 %)	33 (100.00 %)	33 (100.00 %)
252	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
256	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
279	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
282	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
283	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
284	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)

287	1 (2.86 %)	34 (97.14 %)	35 (100.00 %)
296	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
302	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
303	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
306	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
310	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
311	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
316	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
317	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
320	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
328	1 (2.94 %)	33 (97.06 %)	34 (100.00 %)
330	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
339	2 (5.88 %)	32 (94.12 %)	34 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
345	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
350	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
361	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
363	0 (0.00 %)	34 (100.00 %)	34 (100.00 %)
368	0 (0.00 %)	35 (100.00 %)	35 (100.00 %)
391	22 (64.71 %)	12 (35.29 %)	34 (100.00 %)
SUM (AVG)	36 (1.96 %)	1799 (98.04 %)	1835 (100.00 %)

6.5.2 Carvacrolytp

FRAGMENT 1 (P4)

Sum of all bisulfite patterns: 10 of 388 positions (18.30 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 3 of 10 (16.90 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 0 of 10 (5.63 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 7 of 10 (77.46 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 81 analysed positions 27 (33.33 %) are methylated, 54 are not methylated (66.67 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
351	6 (66.67 %)	3 (33.33 %)	9 (100.00 %)
353	6 (66.67 %)	3 (33.33 %)	9 (100.00 %)
359	6 (66.67 %)	3 (33.33 %)	9 (100.00 %)
SUM (AVG)	18 (66.67 %)	9 (33.33 %)	27 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	0 (100.00 %)	0 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
18	1 (11.11 %)	8 (88.89 %)	9 (100.00 %)

20	0 (0.00 %)	9 (100.00 %)	9 (100.00 %)
24	0 (0.00 %)	9 (100.00 %)	9 (100.00 %)
35	3 (33.33 %)	6 (66.67 %)	9 (100.00 %)
61	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
346	5 (55.56 %)	4 (44.44 %)	9 (100.00 %)
363	0 (0.00 %)	9 (100.00 %)	9 (100.00 %)
SUM (AVG)	9 (16.67%)	45 (83.33 %)	54 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 64 of 395 positions (16.20 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 9 of 64 (14.06 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 64 (4.69 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 52 of 64 (81.25 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 896 analysed positions 18 (2.01 %) are methylated, 878 are not methylated (97.99 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
58	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
88	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
97	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
119	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
202	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
218	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
240	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
275	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
359	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	126 (100.00 %)	126 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
76	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
149	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
164	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	42 (100.00 %)	14 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
26	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
32	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
69	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
84	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
95	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
99	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
100	2 (14.29 %)	12 (85.71 %)	14 (100.00 %)
112	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
113	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
129	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
152	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)

156	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
171	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
172	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
173	2 (14.29 %)	12 (85.71 %)	14 (100.00 %)
186	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
191	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
193	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
207	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
213	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
237	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
238	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
248	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
251	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
254	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
258	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
281	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
284	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
285	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
286	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
289	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
298	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
302	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
304	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
305	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
308	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
312	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
313	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
318	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
319	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
322	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
330	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
332	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
343	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
347	1 (7.14 %)	13 (92.86 %)	14 (100.00 %)
352	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
356	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
363	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
365	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
370	0 (0.00 %)	14 (100.00 %)	14 (100.00 %)
393	8 (57.14 %)	6 (42.86 %)	14 (100.00 %)
SUM (AVG)	18 (2.47%)	710 (97.53 %)	728 (100.00 %)

6.5.3 Linalooltyp

FRAGMENT 1 (P1)

Sum of all bisulfite patterns: 68 of 400 positions (17.00 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 68 (17.65 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 68 (5.88 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 52 of 68 (76.47 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 204 analysed positions 201 (98.53 %) are methylated, 3 are not methylated (1.47 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
68	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
85	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
104	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
118	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)	3 (100.00 %)
138	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
290	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
300	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
317	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
334	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
359	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
361	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
367	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
SUM (AVG)	33 (91.67 %)	3 (8.33 %)	36 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
67	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
117	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
127	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
316	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
SUM (AVG)	12 (100.00 %)	0 (0.00 %)	12 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
35	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
61	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
63	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
64	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
65	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
71	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
72	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
74	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
75	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
93	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
107	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
108	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
110	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
111	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
121	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
144	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
146	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
147	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
149	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
153	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
155	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
161	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
163	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
181	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)

184	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
200	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
210	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
218	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
223	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
231	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
232	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
233	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
235	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
243	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
244	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
246	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
252	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
254	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
260	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
262	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
280	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
298	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
304	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
305	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
306	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
312	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
313	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
314	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
320	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
322	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
354	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
377	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
SUM (AVG)	156 (100.00 %)	0 (0.00 %)	156 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 64 of 394 positions (16.75 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 10 of 64 (15.62 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 64 (4.69 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 51 of 64 (79.69 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 252 analysed positions 4 (1.59 %) are methylated, 248 are not methylated (98.41 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
30	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
56	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
86	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
95	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
117	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
165	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
200	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
216	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
238	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)

273	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)	3 (100.00 %)
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	39 (100.00 %)	39 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
74	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
147	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
162	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	12 (100.00 %)	12 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
24	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
67	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
82	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
93	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
97	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
98	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
101	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
110	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
111	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
127	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
150	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
154	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
169	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
170	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
171	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
184	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
189	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
191	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
205	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
211	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
226	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)	3 (100.00 %)
236	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
246	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
249	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
252	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
256	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
279	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
282	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
283	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
284	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
287	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
296	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
302	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
303	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
306	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
310	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
311	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
316	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
317	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
320	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)	3 (100.00 %)
328	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)

330	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
339	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
345	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
350	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
361	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
363	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
368	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
392	3 (100.00 %)	0 (0.00 %)	3 (100.00 %)
SUM (AVG)	4 (1.99 %)	197 (98.01 %)	201 (100.00 %)

6.5.4 *trans*-Sabinenhydrattyp

FRAGMENT 1 (P1)

Sum of all bisulfite patterns: 74 of 389 positions (19.02 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 74 (16.22 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 74 (5.41 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 58 of 74 (78.38 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 296 analysed positions 165 (55.74 %) are methylated, 131 are not methylated (44.26 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
63	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
80	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
99	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
123	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
133	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
285	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
295	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
312	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
329	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
354	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
356	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
362	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
SUM (AVG)	47 (97.92 %)	1 (2.08 %)	48 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
62	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
112	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
122	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
311	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
SUM (AVG)	11 (68.75 %)	5 (31.25 %)	16 (100.00 %)

>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
16	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
20	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
31	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
56	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
58	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
59	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
60	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
66	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
67	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
69	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
70	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
88	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
102	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
103	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
105	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
106	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
116	4 (100.00 %)	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)
139	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
140	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
141	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
142	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
144	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
148	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
150	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
156	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
158	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
173	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
176	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
179	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
195	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
201	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
205	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
213	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
218	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
226	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
228	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
230	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
238	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
239	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
241	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
247	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
249	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
255	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
257	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
275	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
276	3 (75.00 %)	1 (25.00 %)	4 (100.00 %)
293	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
299	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
300	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
301	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
307	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)

308	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
309	2 (50.00 %)	2 (50.00 %)	4 (100.00 %)
315	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
317	1 (25.00 %)	3 (75.00 %)	4 (100.00 %)
349	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
366	0 (0.00 %)	4 (100.00 %)	4 (100.00 %)
SUM (AVG)	107 (46.12 %)	125 (53.88 %)	232 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 64 of 398 positions (16.08 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 9 of 64 (14.06 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 64 (4.69 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 52 of 64 (81.25 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 501 analysed positions 46 (9.18 %) are methylated, 455 are not methylated (90.82 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
34	4 (50.00 %)	4 (50.00 %)	8 (100.00 %)
60	5 (62.50 %)	3 (37.50 %)	8 (100.00 %)
90	5 (62.50 %)	3 (37.50 %)	8 (100.00 %)
99	4 (50.00 %)	4 (50.00 %)	8 (100.00 %)
121	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
204	3 (37.50 %)	5 (62.50 %)	8 (100.00 %)
220	2 (25.00 %)	6 (75.00 %)	8 (100.00 %)
242	2 (25.00 %)	6 (75.00 %)	8 (100.00 %)
277	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
SUM (AVG)	25 (34.72 %)	47 (65.28 %)	72 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
78	5 (62.50 %)	3 (37.50 %)	8 (100.00 %)
151	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
166	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
SUM (AVG)	7 (29.17 %)	17 (70.83 %)	24 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
3	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)
28	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
71	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
86	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
97	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
101	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
102	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
114	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
115	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
131	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
154	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
158	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)

173	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
174	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
175	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
188	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
193	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
195	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
209	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
215	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
230	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
240	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
250	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
253	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
256	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
260	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
283	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
286	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
287	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
288	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
291	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
304	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
306	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
307	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
310	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
314	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
315	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
320	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
321	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
324	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
332	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
334	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
343	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
345	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
349	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
358	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
365	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
367	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
372	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
396	3 (60.00 %)	2 (40.00 %)	5 (100.00 %)
SUM (AVG)	14 (3.46 %)	391 (96.54 %)	405 (100.00 %)

6.5.5 α -Terpineoltyp

FRAGMENT 1 (P1)

Sum of all bisulfite patterns: 71 of 389 positions (18.25 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 71 (16.90 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 71 (5.63 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 55 of 71 (77.46 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 426 analysed positions 332 (77.93 %) are methylated, 94 are not methylated (22.07 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
63	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
80	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
99	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
123	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
133	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
285	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
295	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
312	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
329	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
354	2 (33.33 %)	4 (66.67 %)	6 (100.00 %)
356	2 (33.33 %)	4 (66.67 %)	6 (100.00 %)
362	1 (16.67 %)	5 (83.33 %)	6 (100.00 %)
SUM (AVG)	59 (81.94 %)	13 (18.06 %)	72 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
62	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
112	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
122	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
311	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
SUM (AVG)	24 (100.00 %)	0 (0.00 %)	24 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)	6 (100.00 %)
16	1 (16.67 %)	5 (83.33 %)	6 (100.00 %)
20	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)	6 (100.00 %)
31	1 (16.67 %)	5 (83.33 %)	6 (100.00 %)
56	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
58	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
59	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
60	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
66	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
67	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
69	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
70	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
88	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
102	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
103	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
105	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
106	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
116	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
139	2 (33.33 %)	4 (66.67 %)	6 (100.00 %)
141	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
142	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
144	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
148	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
150	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)

156	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
158	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
176	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
179	3 (50.00 %)	3 (50.00 %)	6 (100.00 %)
195	3 (50.00 %)	3 (50.00 %)	6 (100.00 %)
205	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
213	3 (50.00 %)	3 (50.00 %)	6 (100.00 %)
218	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
226	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
227	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
228	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
230	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
238	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
239	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
241	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
247	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
249	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
255	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
257	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
275	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
293	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
299	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
300	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
301	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
307	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
308	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)
309	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
315	5 (83.33 %)	1 (16.67 %)	6 (100.00 %)
317	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	6 (100.00 %)
349	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)	6 (100.00 %)
366	0 (0.00 %)	6 (100.00 %)	6 (100.00 %)
SUM (AVG)	249 (75.45 %)	81 (24.55 %)	330 (100.00 %)

FRAGMENT 1 (P2)

Sum of all bisulfite patterns: 76 of 389 positions (19.54 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 76 (15.79 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 76 (5.26 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 60 of 76 (78.95 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 531 analysed positions 333 (62.71 %) are methylated, 198 are not methylated (37.29 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
63	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
80	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
99	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
123	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
133	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
285	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
295	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)

312	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
329	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
354	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
356	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
362	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
SUM (AVG)	65 (77.38 %)	19 (22.62 %)	84 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
62	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
112	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
122	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
311	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
SUM (AVG)	20 (71.43 %)	8 (28.57 %)	28 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
16	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100.00 %)
20	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
31	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
56	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
58	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
59	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
60	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
66	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
67	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
69	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
70	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
88	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
102	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
103	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
105	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
106	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
116	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
139	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
140	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
141	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
142	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
144	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
148	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
150	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
156	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
158	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
164	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
166	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
173	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
176	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
179	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
195	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
205	3 (50.00 %)	3 (50.00 %)	6 (100.00 %)
213	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
218	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
226	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)

227	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
228	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
230	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
238	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
239	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
241	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
247	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
249	5 (71.43 %)	2 (28.57 %)	7 (100.00 %)
255	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
257	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
275	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
276	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
293	7 (100.00 %)	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)
299	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
300	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
301	6 (85.71 %)	1 (14.29 %)	7 (100.00 %)
307	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
308	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100.00 %)
309	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
315	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	7 (100.00 %)
317	3 (42.86 %)	4 (57.14 %)	7 (100.00 %)
349	0 (0.00 %)	7 (100.00 %)	7 (100.00 %)
366	1 (14.29 %)	6 (85.71 %)	7 (100.00 %)
SUM (AVG)	248 (59.19 %)	171 (40.81 %)	419 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 63 of 393 positions (16.03 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 9 of 63 (14.29 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 63 (4.76 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 51 of 63 (80.95 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 818 analysed positions 26 (3.18 %) are methylated, 792 are not methylated (96.82 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
30	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
56	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
86	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
95	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
117	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
200	2 (15.38 %)	11 (84.62 %)	13 (100.00 %)
216	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
238	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
273	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
SUM (AVG)	3 (2.56 %)	114 (97.44 %)	117 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
74	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
147	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)

162	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
SUM (AVG)	2 (5.13 %)	37 (94.87 %)	39 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
24	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
67	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
82	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
93	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
97	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
98	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
110	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
111	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
127	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
150	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
154	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
169	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
170	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
171	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
184	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
189	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
191	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
205	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
211	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
226	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
236	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
246	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
249	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
252	2 (15.38 %)	11 (84.62 %)	13 (100.00 %)
256	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
279	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
282	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
283	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
284	2 (15.38 %)	11 (84.62 %)	13 (100.00 %)
287	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
296	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
302	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
303	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
306	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
310	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
311	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
316	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
317	2 (15.38 %)	11 (84.62 %)	13 (100.00 %)
320	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
328	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
330	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
339	1 (7.69 %)	12 (92.31 %)	13 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
345	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
350	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
361	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
363	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)

368	0 (0.00 %)	13 (100.00 %)	13 (100.00 %)
391	9 (69.23 %)	4 (30.77 %)	13 (100.00 %)
SUM (AVG)	21 (3.17 %)	641 (96.83 %)	662 (100.00 %)

6.5.6 Geranioltyp

FRAGMENT 1 (P1)

Sum of all bisulfite patterns: 71 of 381 positions (18.64 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 12 of 71 (16.90 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 4 of 71 (5.63 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 55 of 71 (77.46 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 142 analysed positions 108 (76.06 %) are methylated, 34 are not methylated (23.94 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
63	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
80	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
99	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
123	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
133	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
277	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
287	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
304	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
321	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
346	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
348	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
SUM (AVG)	20 (83.33 %)	4 (16.67 %)	24 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
62	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
112	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
122	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
303	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
SUM (AVG)	8 (100.00 %)	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
16	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
20	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
31	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
56	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
58	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
59	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
60	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)

66	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
67	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
69	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
70	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
88	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
102	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
103	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
105	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
106	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
116	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
139	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
141	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
142	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
144	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
148	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
150	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
156	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
158	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
168	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
171	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
187	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
197	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
205	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
210	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
218	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
219	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
220	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
222	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
230	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
231	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
239	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
241	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
247	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
249	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
267	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
285	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
291	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
292	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
293	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
299	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
301	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
307	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)
309	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
358	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
SUM (AVG)	80 (72.73 %)	30 (27.27 %)	110 (100.00 %)

FRAGMENT 1 (P3)

Sum of all bisulfite patterns: 9 of 380 positions (2.37 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 3 of 9 (33.33 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 0 of 9 (0.00 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 6 of 9 (66.67 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 18 analysed positions 7 (38.89 %) are methylated, 11 are not methylated (61.11 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
346	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	0 (100.00 %)
348	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	0 (100.00 %)
354	2 (100.00 %)	0 (0.00 %)	0 (100.00 %)
SUM (AVG)	6 (100.00 %)	0 (0.00 %)	84 (100.00 %)
>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
SUM (AVG)	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
14	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
16	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
20	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
31	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
341	1 (50.00 %)	1 (50.00 %)	2 (100.00 %)
358	0 (0.00 %)	2 (100.00 %)	2 (100.00 %)
SUM (AVG)	1 (8.33 %)	11 (91.67 %)	12 (100.00 %)

FRAGMENT 2

Sum of all bisulfite patterns: 60 of 394 positions (15.23 %).

>> Class I (CGN): Pattern frequency: 9 of 60 (15.00 %).

>> Class II (CHG): Pattern frequency: 3 of 60 (5.00 %).

>> Class III (CHH): Pattern frequency: 48 of 60 (80.00 %).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 479 analysed positions 50 (10.44 %) are methylated, 429 are not methylated (89.56 %) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):			
Position	M	NM	OK
30	8 (100.00 %)	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)
56	7 (87.50 %)	1 (12.50 %)	8 (100.00 %)
86	7 (87.50 %)	1 (12.50 %)	8 (100.00 %)
95	6 (75.00 %)	2 (25.00 %)	8 (100.00 %)
117	2 (25.00 %)	6 (75.00 %)	8 (100.00 %)
200	2 (28.57 %)	5 (71.43 %)	7 (100.00 %)
216	2 (25.00 %)	6 (75.00 %)	8 (100.00 %)
238	2 (25.00 %)	6 (75.00 %)	8 (100.00 %)
273	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
SUM (AVG)	36 (50.70 %)	35 (49.30 %)	71 (100.00 %)

>> Class II (CHG):			
Position	M	NM	OK
74	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
147	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
162	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
SUM (AVG)	1 (4.17 %)	23 (95.83 %)	24 (100.00 %)
>> Class III (CHH):			
Position	M	NM	OK
24	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
67	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
82	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
93	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
97	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
98	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
110	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
111	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
127	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
150	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
154	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
169	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
170	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
171	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
184	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
205	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
211	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
236	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
246	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
249	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
252	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
256	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
279	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
282	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
283	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
284	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
287	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
296	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
300	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
302	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
303	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
306	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
310	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
311	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
316	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
317	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
320	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
328	1 (12.50 %)	7 (87.50 %)	8 (100.00 %)
330	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
339	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
341	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
345	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
350	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
354	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
361	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)

363	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
368	0 (0.00 %)	8 (100.00 %)	8 (100.00 %)
392	5 (62.50 %)	3 (37.50 %)	8 (100.00 %)
SUM (AVG)	13 (3.39 %)	371 (96.61 %)	384 (100.00 %)

6.6 Wetterdaten des Feldversuchs

Tabelle 6.3: Monatliche Mittelwerte des Feldversuchs, dargestellt in Abbildung 3.7. Die Werte stammen von der Wetterstation des IPK Gatersleben (<http://wetter.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=217:1:0:.....>)

Datum	Temp. in 2m Höhe [°C]	Niederschlag [mm]	Globalstrahlung [kWh/m ²]
Juni 2011	17,3	84,1	228,8
Juli 2011	17,2	56,5	179,9
August 2011	18,7	83,3	165,2
September 2011	15,9	87,5	147,4
Oktober 2011	9,7	23,4	90,3
November 2011	3,8	1,4	38,7
Dezember 2011	4,6	32,4	26,3
Januar 2012	2	63,7	28,2
Februar 2012	-2,6	7,5	58,5
März 2012	7,4	7,9	119,5
April 2012	8,8	17,4	157
Mai 2012	15	48,7	221,1
Juni 2012	15,6	72,4	174,5
Juli 2012	18,1	93,4	194,4
August 2012	18,7	38,1	194,1
September 2012	14,5	20,6	141,9
Oktober 2012	9,1	24,3	58,1
November 2012	5,1	26,7	23

6.7 Terpenegehalte der Chemotypen im Feldversuch

Die Hauptbestandteile des ätherischen Öls, die in Abbildung 3.8 dargestellt sind, wurden in den Tabellen grau hinterlegt. Angegeben sind die Mittelwerte der Messdaten und der sich ergebende Standardfehler aller Pflanzen des jeweiligen Chemotyps.

Geranioltyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	24.05.2012	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α-Thujen	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α-Pinen	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,000	0,004	0,004	0,004	0,004
Camphen	0,003	0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,007	0,006	0,005	0,007	0,004	0,000	0,008	0,009	0,008	0,009
Sabinen	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
β-Pinen	0,009	0,023	0,025	0,046	0,033	0,039	0,062	0,048	0,039	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Myrcen	0,002	0,014	0,014	0,010	0,010	0,011	0,011	0,015	0,010	0,007	0,010	0,000	0,031	0,029	0,019	0,000
α-Phellandren	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ-Caren	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α-Terpinen	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
para-Cymen	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,002	0,000	0,001	0,000	0,002	0,003	0,004	0,004
Limonen	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,003	0,002	0,001	0,002	0,000	0,004	0,004	0,003	0,007
1,8-Cineol	0,004	0,002	0,003	0,004	0,003	0,005	0,000	0,005	0,004	0,004	0,004	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
γ-Terpinen	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
trans-Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
cis-Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalool	0,002	0,003	0,005	0,009	0,000	0,113	0,000	0,000	0,000	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Camphor	0,004	0,005	0,004	0,006	0,005	0,006	0,009	0,007	0,007	0,022	0,004	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000
α-Terpineol	0,000	0,000	0,000	0,007	0,002	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Limonen-10-ol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nerol	0,180	0,124	0,171	0,292	0,245	0,247	0,406	0,295	0,328	0,246	0,333	0,383	0,329	0,476	0,413	0,423
Neral	0,207	0,144	0,174	0,307	0,239	0,270	0,449	0,352	0,363	0,239	0,334	0,411	0,370	0,477	0,494	0,516
Geraniol	2,244	1,524	1,925	3,050	2,538	2,846	3,622	3,561	3,069	1,969	3,391	4,243	3,517	4,150	4,082	4,361
Linalylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranial	0,350	0,239	0,300	0,532	0,456	0,495	0,708	0,653	0,550	0,414	0,588	0,620	0,661	0,814	0,743	0,707
Thymol	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,018	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Carvacrol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α-Terpinylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranylacetat	1,503	1,103	1,441	2,026	1,836	2,431	3,031	2,497	2,439	2,519	2,812	3,500	3,290	3,615	2,953	1,938
(E)-β-Caryophyllen	0,226	0,157	0,161	0,253	0,225	0,267	0,398	0,372	0,360	0,290	0,356	0,410	0,367	0,452	0,443	0,524
β-Copaen	0,018	0,034	0,045	0,068	0,064	0,073	0,105	0,093	0,080	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,003	0,022	0,007	0,011	0,010	0,012	0,017	0,018	0,017	0,016	0,000	0,000	0,000	0,018	0,017	0,018
Germacren D	0,029	0,019	0,021	0,032	0,028	0,035	0,051	0,047	0,049	0,035	0,070	0,104	0,099	0,124	0,063	0,057
β-Duprezianen	0,026	0,017	0,019	0,030	0,027	0,031	0,049	0,052	0,054	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isocitral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,060
Summe aller Terpene	4,822	3,438	4,321	6,697	5,732	6,895	8,929	8,070	7,382	5,902	7,928	9,671	8,697	10,226	9,298	8,629

Geranioltyp

Standardfehler der Messungen

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	24.05.2012	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Pinen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Camphen	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
Sabinen	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
β -Pinen	5	1	2	4	5	2	5	2	2	4	0	0	0	0	0	0
Myrcen	1	1	2	1	1	0	1	2	1	2	3	0	3	2	2	0
α -Phellandren	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
δ -Caren	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Terpinen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>para</i> -Cymen	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Limonen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1,8-Cineol	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
γ -Terpinen	5	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0	0	0	0	0
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	1	0	1	1	0	107	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Camphor	0	1	0	0	0	0	1	1	0	7	1	0	1	0	0	0
α -Terpineol	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Limonen-10-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	16	8	14	18	31	17	21	10	16	34	27	16	29	30	24	17
Neral	23	10	16	24	33	19	28	13	21	31	28	13	34	29	25	23
Geraniol	226	101	183	170	280	163	147	138	162	231	223	126	293	226	181	157
Linalylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranial	33	18	27	34	57	28	43	22	30	57	44	18	64	54	42	34
Thymol	0	0	0	1	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0
Carvacrol	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Terpinylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranylacetat	179	95	150	84	215	160	146	255	154	305	194	146	298	222	170	103
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	24	10	14	10	28	15	13	14	23	39	24	20	34	24	18	19
β -Copaen	10	5	5	3	8	4	4	4	5	8	0	0	0	0	0	0
Bicyclogermacren	2	11	1	0	1	1	2	1	1	2	0	0	0	1	1	1
Germacren D	3	1	2	1	4	2	2	2	3	5	19	6	11	11	4	3
β -Duprezianen	2	2	2	1	3	2	2	2	3	8	0	0	0	0	0	0
Isocitral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	7

α -Terpineoltyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	24.05.2012	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0,006	0,004	0,006	0,006	0,007	0,007	0,008	0,009	0,008	0,008	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,007
α -Pinen	0,013	0,008	0,012	0,010	0,014	0,011	0,018	0,021	0,018	0,019	0,016	0,018	0,018	0,021	0,022	0,029
Camphen	0,008	0,005	0,007	0,007	0,010	0,007	0,014	0,017	0,015	0,020	0,010	0,011	0,010	0,013	0,019	0,030
Sabinen	0,342	0,224	0,357	0,324	0,432	0,351	0,531	0,574	0,458	0,376	0,460	0,550	0,505	0,511	0,434	0,496
β -Pinen	0,057	0,038	0,039	0,040	0,058	0,044	0,080	0,113	0,094	0,020	0,020	0,000	0,020	0,029	0,026	0,038
Myrcen	0,316	0,205	0,332	0,305	0,398	0,327	0,471	0,470	0,376	0,345	0,430	0,517	0,464	0,440	0,339	0,333
α -Phellandren	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ -Caren	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinen	0,008	0,005	0,010	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014	0,000	0,000	0,009	0,006	0,000
<i>para</i> -Cymen	0,052	0,031	0,024	0,026	0,030	0,030	0,071	0,096	0,101	0,044	0,026	0,000	0,044	0,022	0,093	0,169
Limonen	0,375	0,176	0,245	0,218	0,239	0,188	0,257	0,235	0,223	0,278	0,241	0,337	0,380	0,139	0,255	0,557
1,8-Cineol	0,139	0,087	0,124	0,103	0,137	0,108	0,170	0,195	0,168	0,127	0,140	0,176	0,168	0,294	0,226	0,306
γ -Terpinen	0,133	0,097	0,164	0,140	0,153	0,157	0,193	0,170	0,192	0,216	0,247	0,257	0,177	0,182	0,128	0,096
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	0,030	0,016	0,023	0,021	0,027	0,011	0,024	0,032	0,030	0,024	0,028	0,034	0,030	0,031	0,036	0,031
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalool	0,000	0,045	0,067	0,103	0,094	0,070	0,093	0,082	0,079	0,057	0,111	0,172	0,094	0,085	0,062	0,000
Camphor	0,007	0,005	0,005	0,005	0,007	0,005	0,008	0,009	0,009	0,009	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011
α -Terpineol	3,806	2,550	3,762	3,383	4,309	3,905	4,537	3,343	2,682	2,862	4,563	5,723	5,078	3,554	2,469	2,567
Limonen-10-ol	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nerol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Neral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geraniol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,047	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranial	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Thymol	0,000	0,028	0,022	0,021	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,030	0,028	0,032	0,030	0,033	0,035	0,031
Carvacrol	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,104	0,156	0,208	0,208	0,208	0,208	0,260
α -Terpinylacetat	10,068	6,676	9,953	8,990	11,958	9,837	15,478	12,827	15,799	11,264	13,091	15,046	12,771	15,739	15,117	18,202
Geranylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,029	0,051	0,039	0,037	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
(E)- β -Caryophyllen	0,262	0,176	0,245	0,219	0,272	0,239	0,380	0,312	0,404	0,343	0,366	0,386	0,321	0,369	0,363	0,475
β -Copaen	0,000	0,013	0,019	0,017	0,021	0,018	0,023	0,023	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,000	0,013	0,017	0,016	0,021	0,017	0,030	0,026	0,037	0,000	0,065	0,021	0,000	0,024	0,025	0,032
Germacren D	0,016	0,011	0,016	0,015	0,019	0,016	0,019	0,022	0,031	0,000	0,026	0,032	0,046	0,064	0,030	0,035
β -Duprezianen	0,000	0,007	0,010	0,009	0,013	0,011	0,020	0,016	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isoborneol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060
Summe aller Terpene	15,767	10,528	15,566	14,089	18,377	15,525	22,594	18,846	21,028	16,224	20,093	23,529	20,371	21,774	19,899	23,764

trans- Sabinenhydrattyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	24.05.2012	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0,128	0,088	0,089	0,113	0,142	0,157	0,222	0,217	0,143	0,170	0,175	0,154	0,160	0,213	0,175	0,212
α -Pinen	0,192	0,138	0,135	0,180	0,230	0,260	0,370	0,381	0,244	0,299	0,293	0,259	0,268	0,344	0,293	0,372
Camphen	0,023	0,015	0,013	0,019	0,023	0,030	0,040	0,050	0,035	0,056	0,035	0,025	0,035	0,061	0,057	0,085
Sabinen	0,278	0,203	0,193	0,247	0,320	0,353	0,488	0,507	0,304	0,384	0,381	0,338	0,359	0,439	0,365	0,273
β -Pinen	0,053	0,053	0,054	0,064	0,081	0,085	0,117	0,139	0,091	0,118	0,117	0,105	0,102	0,136	0,122	0,127
Myrcen	0,466	0,348	0,369	0,427	0,580	0,575	0,802	0,849	0,484	0,689	0,828	0,636	0,520	0,642	0,537	0,535
α -Phellandren	0,011	0,007	0,005	0,006	0,006	0,005	0,006	0,006	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ -Caren	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinen	0,032	0,020	0,014	0,019	0,017	0,017	0,020	0,017	0,013	0,021	0,013	0,000	0,000	0,016	0,012	0,032
<i>para</i> -Cymen	0,032	0,031	0,015	0,021	0,030	0,044	0,061	0,104	0,081	0,051	0,028	0,033	0,043	0,095	0,092	0,176
Limonen	0,380	0,272	0,268	0,340	0,416	0,457	0,650	0,690	0,432	0,499	0,532	0,450	0,439	0,555	0,489	0,585
1,8-Cineol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
γ -Terpinen	0,151	0,114	0,120	0,138	0,158	0,161	0,233	0,215	0,178	0,197	0,277	0,201	0,127	0,144	0,116	0,160
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	5,972	4,345	4,500	5,590	6,784	7,349	9,965	11,172	7,440	7,672	7,998	7,252	7,300	9,347	8,781	9,827
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	1,123	0,789	0,834	1,043	1,269	1,405	1,888	2,228	1,546	1,380	1,406	1,273	1,435	2,089	2,045	2,457
Linalool	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Camphor	0,029	0,019	0,018	0,026	0,028	0,036	0,046	0,047	0,049	0,055	0,021	0,000	0,042	0,079	0,086	0,117
α -Terpineol	0,336	0,233	0,248	0,299	0,363	0,399	0,501	0,557	0,384	0,302	0,425	0,375	0,381	0,488	0,171	0,514
Limonen-10-ol	1,019	0,849	0,802	0,993	1,211	1,351	1,626	1,724	1,509	1,233	1,389	1,284	1,075	1,454	1,697	2,455
Nerol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Neral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geraniol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranial	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Thymol	0,017	0,018	0,018	0,020	0,020	0,020	0,025	0,022	0,128	0,013	0,020	0,024	0,007	0,016	0,015	0,000
Carvacrol	0,003	0,003	0,002	0,004	0,004	0,006	0,005	0,012	0,058	0,020	0,011	0,000	0,020	0,026	0,020	0,000
α -Terpinylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
(E)- β -Caryophyllen	0,210	0,145	0,138	0,191	0,212	0,232	0,277	0,205	0,232	0,320	0,331	0,250	0,213	0,244	0,225	0,261
β -Copaen	0,000	0,013	0,012	0,016	0,017	0,020	0,024	0,016	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,000	0,005	0,005	0,007	0,007	0,008	0,010	0,009	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,009	0,000
Germacren D	0,012	0,009	0,009	0,012	0,013	0,015	0,017	0,014	0,017	0,000	0,009	0,022	0,088	0,061	0,016	0,000
β -Duprezianen	0,000	0,014	0,015	0,021	0,023	0,026	0,031	0,028	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Limonen-10-ylacetat	1,120	0,729	0,981	1,196	1,367	1,331	1,788	1,387	1,281	1,751	2,137	1,504	1,132	1,429	1,249	0,662
Terpinen-4-ol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,492
Summe aller Terpene	11,719	8,563	8,961	11,096	13,427	14,445	19,317	20,701	14,844	15,335	16,584	14,393	13,953	18,093	16,785	19,601

Linalooltyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	24.05.2012	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0,009	0,006	0,009	0,014	0,013	0,016	0,019	0,016	0,015	0,004	0,012	0,016	0,019	0,017	0,014	0,011
α -Pinen	0,007	0,004	0,006	0,010	0,010	0,014	0,017	0,027	0,030	0,016	0,016	0,016	0,025	0,037	0,037	0,035
Camphen	0,004	0,002	0,003	0,005	0,006	0,007	0,010	0,016	0,021	0,040	0,023	0,012	0,036	0,021	0,093	0,112
Sabinen	0,006	0,004	0,005	0,008	0,009	0,010	0,013	0,011	0,011	0,007	0,008	0,013	0,016	0,017	0,015	0,016
β -Pinen	0,000	0,053	0,075	0,111	0,114	0,128	0,155	0,129	0,115	0,008	0,008	0,012	0,015	0,018	0,017	0,084
Myrcen	0,050	0,034	0,042	0,053	0,057	0,055	0,065	0,050	0,054	0,058	0,060	0,081	0,069	0,080	0,053	0,040
α -Phellandren	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ -Caren	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinen	0,011	0,007	0,010	0,016	0,014	0,017	0,021	0,016	0,015	0,014	0,016	0,000	0,014	0,015	0,011	0,015
<i>para</i> -Cymen	0,033	0,025	0,023	0,040	0,043	0,060	0,072	0,097	0,110	0,074	0,036	0,057	0,073	0,126	0,139	0,185
Limonen	0,008	0,005	0,005	0,007	0,007	0,008	0,009	0,008	0,008	0,012	0,011	0,000	0,014	0,016	0,013	0,147
1,8-Cineol	0,043	0,025	0,036	0,056	0,067	0,079	0,102	0,089	0,094	0,072	0,074	0,115	0,115	0,155	0,155	0,001
γ -Terpinen	0,137	0,009	0,144	0,207	0,187	0,223	0,295	0,209	0,219	0,130	0,207	0,238	0,252	0,174	0,124	0,049
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	0,010	0,006	0,008	0,020	0,010	0,019	0,020	0,021	0,018	0,011	0,014	0,000	0,016	0,018	0,016	0,041
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalool	10,760	6,956	9,536	14,610	14,657	15,395	19,722	15,993	16,681	10,175	12,720	17,123	16,947	15,712	13,274	11,747
Camphor	0,005	0,004	0,004	0,004	0,008	0,007	0,014	0,018	0,026	0,044	0,026	0,000	0,033	0,077	0,091	0,093
α -Terpineol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Limonen-10-ol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nerol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Neral	0,014	0,009	0,012	0,012	0,018	0,020	0,024	0,017	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geraniol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalylacetat	1,458	0,966	1,551	2,171	2,210	2,350	3,214	2,290	2,819	2,339	2,876	2,957	2,610	3,014	2,253	0,941
Geranial	0,059	0,027	0,028	0,035	0,045	0,054	0,042	0,036	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Thymol	0,256	0,205	0,272	0,359	0,377	0,421	0,515	0,341	0,386	0,072	0,349	0,413	0,434	0,397	0,316	0,243
Carvacrol	0,021	0,011	0,013	0,025	0,017	0,000	0,023	0,014	0,017	0,222	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
(E)- β -Caryophyllen	0,190	0,120	0,156	0,232	0,241	0,273	0,334	0,283	0,334	0,237	0,238	0,295	0,291	0,314	0,250	0,210
β -Copaen	0,114	0,069	0,096	0,148	0,150	0,147	0,203	0,139	0,155	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,124	0,075	0,102	0,153	0,159	0,178	0,227	0,173	0,201	0,131	0,184	0,202	0,180	0,163	0,125	0,073
Germacren D	0,000	0,024	0,032	0,050	0,051	0,062	0,071	0,059	0,072	0,106	0,145	0,000	0,164	0,116	0,092	0,045
β -Duprezianen	0,054	0,030	0,035	0,059	0,067	0,082	0,092	0,077	0,096	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isoborneol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053
Summe aller Terpene	13,472	8,866	12,306	18,513	18,646	19,732	25,386	20,228	21,673	13,875	17,177	21,958	21,529	20,697	17,293	14,348

Carvacroltyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0,138	0,074	0,104	0,127	0,161	0,130	0,196	0,189	0,208	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Pinen	0,072	0,038	0,051	0,064	0,084	0,070	0,101	0,105	0,118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Camphen	0,027	0,014	0,015	0,020	0,030	0,028	0,035	0,042	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Sabinen	0,017	0,009	0,012	0,015	0,018	0,014	0,021	0,018	0,021	0,300	0,246	0,239	0,179	0,150	0,111
β -Pinen	0,059	0,050	0,057	0,062	0,023	0,094	0,028	0,028	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Myrcen	0,465	0,220	0,356	0,428	0,529	0,416	0,637	0,650	0,732	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Phellandren	0,020	0,010	0,016	0,019	0,024	0,019	0,028	0,026	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ -Caren	0,009	0,004	0,006	0,008	0,010	0,008	0,013	0,013	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinen	0,149	0,075	0,109	0,136	0,180	0,139	0,190	0,190	0,196	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>para</i> -Cymen	0,503	0,279	0,244	0,310	0,418	0,400	0,585	0,719	0,903	0,604	0,582	0,763	1,225	1,184	2,301
Limonen	0,044	0,025	0,033	0,043	0,052	0,043	0,061	0,061	0,069	1,041	0,870	0,677	0,635	0,583	0,604
1,8-Cineol	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
γ -Terpinen	1,572	0,773	1,132	1,346	1,775	1,429	2,004	1,976	2,164	2,941	2,547	2,571	2,115	1,599	1,277
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	0,140	0,072	0,101	0,114	0,160	0,123	0,193	0,187	0,232	0,228	0,212	0,189	0,202	0,175	0,213
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalool	0,245	0,122	0,177	0,208	0,272	0,219	0,336	0,342	0,456	0,398	0,350	0,326	0,406	0,372	0,495
Camphor	0,005	0,006	0,006	0,004	0,003	0,008	0,005	0,005	0,007	0,020	0,012	0,015	0,040	0,040	0,066
α -Terpineol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Limonen-10-ol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nerol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Neral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,042	0,039	0,049	0,043	0,010
Geraniol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranial	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,102	0,107	0,070	0,067	0,051	0,043
Thymol	0,023	0,013	0,026	0,035	0,025	0,021	0,039	0,039	0,034	0,188	0,299	0,067	0,039	0,024	0,087
Carvacrol	7,296	4,062	6,004	6,370	7,440	6,563	9,174	8,515	11,007	11,355	11,221	8,998	10,044	8,375	11,669
α -Terpinylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
(E)- β -Caryophyllen	0,277	0,142	0,182	0,223	0,234	0,222	0,290	0,282	0,391	0,438	0,439	0,344	0,389	0,314	0,424
β -Copaen	0,067	0,035	0,050	0,053	0,058	0,051	0,066	0,056	0,070	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,022	0,011	0,013	0,016	0,019	0,019	0,022	0,021	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Germacren D	0,033	0,017	0,023	0,026	0,030	0,026	0,038	0,036	0,054	0,061	0,053	0,059	0,077	0,060	0,080
β -Duprezianen	0,063	0,029	0,038	0,044	0,061	0,052	0,073	0,072	0,102	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isoborneol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,090	0,058	0,074	0,113	0,107	0,163
Carvacrolacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,082	0,051	0,009	0,051	0,082	0,112
Summe aller Terpene	11,355	6,187	8,864	9,775	11,709	10,198	14,237	13,735	17,020	18,047	17,298	14,648	15,839	13,350	17,894

Carvacroltyp

Standardfehler der Messungen

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	10	3	8	6	19	5	24	22	21	0	0	0	0	0	0
α -Pinen	6	2	4	3	9	3	12	13	13	0	0	0	0	0	0
Camphen	4	1	1	1	3	2	4	6	7	0	0	0	0	0	0
Sabinen	1	0	1	1	2	1	3	2	2	28	15	18	18	7	7
β -Pinen	9	2	8	9	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Myrcen	32	22	29	20	61	19	77	76	74	0	0	0	0	0	0
α -Phellandren	2	1	1	1	3	1	3	3	3	0	0	0	0	0	0
δ -Caren	1	0	1	0	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0
α -Terpinen	12	5	9	7	21	8	23	23	21	0	0	0	0	0	0
<i>para</i> -Cymen	44	18	19	17	58	21	84	103	129	63	71	88	112	76	117
Limonen	5	1	2	2	6	2	7	7	7	98	56	51	58	30	38
1,8-Cineol	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ -Terpinen	144	43	87	67	192	75	231	236	228	248	160	195	55	77	76
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	10	3	7	7	14	4	21	20	23	15	14	13	7	9	10
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	18	5	11	9	23	10	34	35	45	31	37	23	15	17	25
Camphor	1	1	2	1	0	0	1	1	1	3	3	3	3	4	7
α -Terpineol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Limonen-10-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	2	2	1
Geraniol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranial	4	0	0	0	0	0	0	6	0	8	8	5	2	2	5
Thymol	1	1	5	10	4	1	10	11	3	47	89	40	8	3	43
Carvacrol	375	185	390	226	439	231	836	742	994	676	522	632	375	420	944
α -Terpinylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	18	7	13	9	12	9	26	25	40	28	30	23	10	16	24
β -Copaen	4	2	4	4	4	2	6	5	7	0	0	0	0	0	0
Bicyclgermacren	2	0	1	1	1	1	2	2	3	0	0	0	0	0	0
Germacren D	2	1	2	1	2	2	3	3	5	5	3	4	4	6	5
β -Duprezianen	7	1	3	2	3	2	6	6	11	0	0	0	0	0	0
Isoborneol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	6	5	4	4	8
Carvacrolacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	7	2	5	4	7

Thymoltyp

Terpengehalt in mg/g Blattgewicht

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	0,352	0,126	0,309	0,396	0,353	0,331	0,497	0,615	0,698	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Pinen	0,146	0,050	0,118	0,158	0,142	0,133	0,200	0,261	0,309	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Camphen	0,040	0,009	0,020	0,030	0,032	0,029	0,038	0,066	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Sabinen	0,043	0,015	0,037	0,046	0,040	0,038	0,053	0,059	0,064	0,506	0,226	0,658	0,777	0,792	0,605
β -Pinen	0,170	0,062	0,168	0,186	0,201	0,179	0,254	0,288	0,356	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Myrcen	0,449	0,160	0,411	0,502	0,446	0,416	0,638	0,790	0,911	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Phellandren	0,062	0,022	0,057	0,068	0,061	0,058	0,087	0,105	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
δ -Caren	0,020	0,007	0,018	0,022	0,019	0,018	0,028	0,035	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α -Terpinen	0,619	0,205	0,524	0,646	0,594	0,558	0,824	0,977	1,096	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>para</i> -Cymen	1,079	0,486	1,005	1,306	1,166	0,994	1,700	2,445	3,303	1,243	0,208	1,076	1,680	2,245	3,556
Limonen	0,107	0,042	0,102	0,125	0,111	0,104	0,158	0,196	0,226	0,497	0,122	0,567	0,729	0,774	0,678
1,8-Cineol	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
γ -Terpinen	6,653	2,303	5,749	6,758	6,095	5,804	8,788	10,507	12,340	5,694	1,431	6,523	8,352	9,014	8,234
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	0,277	0,107	0,265	0,299	0,305	0,262	0,398	0,455	0,556	0,265	0,056	0,283	0,385	0,382	0,390
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalool	0,546	0,200	0,530	0,647	0,622	0,517	0,840	1,054	1,312	0,401	0,097	0,477	0,814	0,892	1,037
Camphor	0,014	0,004	0,006	0,008	0,011	0,011	0,014	0,022	0,034	0,016	0,003	0,021	0,045	0,077	0,122
α -Terpineol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Limonen-10-ol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nerol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Neral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,000	0,016
Geraniol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linalylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranial	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Thymol	11,293	4,417	11,179	11,894	11,945	10,548	15,303	16,959	19,764	10,310	2,046	10,575	17,204	15,034	16,402
Carvacrol	0,525	0,215	0,517	0,539	0,548	0,496	0,692	0,761	0,883	0,710	0,360	0,484	0,555	0,490	0,599
α -Terpinylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Geranylacetat	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
(E)- β -Caryophyllen	0,357	0,121	0,292	0,316	0,300	0,290	0,419	0,505	0,646	0,367	0,096	0,292	0,479	0,439	0,576
β -Copaen	0,168	0,064	0,146	0,156	0,159	0,154	0,199	0,231	0,275	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bicyclogermacren	0,007	0,002	0,005	0,006	0,006	0,006	0,008	0,011	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Germacren D	0,015	0,005	0,012	0,012	0,012	0,012	0,016	0,018	0,021	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,011
β -Duprezianen	0,017	0,005	0,010	0,011	0,012	0,011	0,015	0,022	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isoborneol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,027	0,000	0,000	0,000
Summe aller Terpene	23,063	8,730	21,583	24,236	23,284	21,070	31,272	36,485	43,203	20,386	4,913	21,342	31,439	30,517	32,652

Thymoltyp

Standardfehler der Messungen

Terpen	28.06.2011	12.07.2011	26.07.2011	04.08.2011	22.08.2011	06.09.2011	20.09.2011	06.10.2011	20.10.2011	28.06.2012	24.07.2012	23.08.2012	26.09.2012	17.10.2012	27.11.2012
α -Thujen	35	8	27	26	20	16	48	59	50	0	0	0	0	0	0
α -Pinen	15	3	13	10	9	7	19	25	22	0	0	0	0	0	0
Camphen	6	1	1	2	3	2	4	7	9	0	0	0	0	0	0
Sabinen	4	1	3	3	2	1	5	6	5	52	89	96	49	49	35
β -Pinen	17	4	11	10	11	9	19	17	17	0	0	0	0	0	0
Myrcen	44	10	26	32	25	20	62	74	64	0	0	0	0	0	0
α -Phellandren	6	1	4	5	3	2	9	10	8	0	0	0	0	0	0
δ -Caren	2	0	1	1	1	1	3	3	3	0	0	0	0	0	0
α -Terpinen	61	14	36	44	28	24	85	91	78	0	0	0	0	0	0
<i>para</i> -Cymen	114	43	48	78	116	91	146	216	229	136	25	137	109	102	243
Limonen	14	3	6	8	6	5	15	18	15	54	17	76	46	42	37
1,8-Cineol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ -Terpinen	617	146	376	439	282	235	870	940	821	666	194	871	520	505	463
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	26	7	16	18	18	12	34	33	30	26	6	31	24	13	22
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	60	13	38	39	41	30	74	84	73	42	12	57	51	31	59
Camphor	2	0	0	0	1	1	2	3	4	2	0	5	3	4	8
α -Terpineol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Limonen-10-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3
Geraniol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thymol	1013	247	634	579	568	410	1104	1208	902	997	260	1160	990	485	1037
Carvacrol	40	12	29	24	28	26	40	48	34	382	105	92	40	26	29
α -Terpinylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranylacetat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	30	7	18	18	17	13	30	37	32	41	13	30	29	15	33
β -Copaen	21	4	10	11	7	5	16	18	16	0	0	0	0	0	0
Bicyclogermacren	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Germacren D	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
β -Duprezianen	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Isoborneol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0

Danksagung

Während der Anfertigung dieser Arbeit bin ich auf breite Unterstützung gestoßen. Bedanken möchte ich mich vor allem bei

Prof. Dr. Jörg Degenhardt...

...für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und für die wissenschaftliche Betreuung derselben,

Prof. Dr. Johannes Novak...

...für die Bereitstellung der Referenzgenprimer und das zur Verfügung stellen der Original-Doktorarbeit von Philippe Vernet,

Sandra Krause & Julia Asbach...

...für die Sequenzen der Monoterpensynthesen aus *Thymus vulgaris*,

Andreas Fischer & Ingo Hofmann...

...für die Einführung in die Methode der Bisulfitsequenzierung,

Dr. Wolfram Junghanns...

...für die Unterstützung seiner Firma bei meinem Feldversuch,

Dr. Ulrike Lohwasser...

...für die Möglichkeit der Unterbringung meiner Thymianpflanzen und die weitere wissenschaftliche Zusammenarbeit,

Karin Baumann...

...für die Bonitierung des Thymians,

meiner Arbeitsgruppe, vor allem bei Annett Richter, Natalie Arndt und Claudia Lenk...

...für die wissenschaftlichen Diskussionen, das Gegenlesen der Arbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre,

Daniel Reichling...

...für das Gegenlesen meiner Arbeit aus fachfremder Sicht,

meiner Familie...

...für die Unterstützung in jeder Hinsicht.

Veröffentlichungen

Publikationen

Schimmel J, Krause ST, Asbach J, Degenhardt J (Manuskript) Chemotype regulation in thyme is based on terpene synthase expression patterns

Lima AS, Schimmel J, Lukas B, Novak J, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG, Degenhardt J, Trindade H (2013) Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). *Planta* **238**: 191-204

Vorträge

Schimmel J 2011, „Regulation of Terpene Biosynthesis in *Thymus vulgaris* Chemotypes”. Terpnet 2011 - The 10th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites

Schimmel J 2013, „Untersuchungen der chemischen Diversität von Thymian mithilfe der Genbank des IPK Gatersleben“. 23. Bernburger Winterseminar für Arznei- und Gewürzpflanzen

Schimmel J 2013, „Chemotypbildung in verschiedenen Thymianarten“. Vortrag im Rahmen des Vavilov-Seminars am IPK Gatersleben

Poster

Schimmel J, Arndt N, Asbach J, Degenhardt J (2013) „Mechanisms of chemotype formation in *Thymus vulgaris*“. Terpnet 2013 - The 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jette Schimmel
Adresse Zwintschönaer Straße 53a, 06116 Halle
Email-Adresse jette.schimmel@yahoo.de
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

09/1990 - 07/1994 Grundschule Johannes, Halle
09/1994 - 07/2003 Georg-Cantor-Gymnasium, Halle
Abschluss: Abitur
10/2003 - 01/2009 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Diplomarbeit zum Thema: Analyse der Interaktion von Proteinen der
Jasmonat-Signaltransduktion *in planta* durch Bimolekulare
Fluoreszenzkomplementation
Abschluss: Diplom Biochemie

Berufliche Tätigkeiten

02/2009 - 03/2009 wissenschaftliche Hilfskraft am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
(IPB), Halle
04/2009 - 03/2013 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dissertation zum Thema: Molekulare Mechanismen der Ausprägung
von Chemotypen in *Thymus vulgaris*

Sprachkenntnisse Englisch in Wort und Schrift
Französisch, Spanisch Grundkenntnisse

Halle, den 18.03.2014

Jette Schimmel

Selbstständigkeitserklärung

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 selbstständig 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, den 18.03.2014

Jette Schimmel