



1 Einleitung

Das charakteristische Aroma von Rebsorten (*Vitis vinifera* L.) wird durch Monoterpene, Sesquiterpene, Methoxypyrazine und Norisoprenoide, sowie in Weinen von Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon und Merlot durch Schwefelverbindungen geprägt (Darriet et al. (1995), Darriet et al. (2001), Lacey et al. (1991), Parker et al. (2007), Schreier et al. (1976b), Siebert et al. (2008), Williams et al. (1982b)).

Gewürztraminer und Sorten der Muskatgruppe besitzen in der Regel hohe Gehalte an Monoterpenen (Fenoll et al. (2009), Girard et al. (2002), Günata et al. (1985a), Günata et al. (1985b), Mateo und Jiménez (2000), Ribéreau-Gayon et al. (1975), Wilson et al. (1984)). Geringe Mengen wurden z.B. in Chardonnay und Cabernet Sauvignon gefunden (Günata et al. (1985a), Kalua und Boss (2009), Kalua und Boss (2010), Sefton et al. (1993)). Dagegen sind auch große Unterschiede innerhalb bestimmter Rebsorten bekannt, besonders die Sorte Gewürztraminer zeigt hierbei eine hohe Varianz. Gewürztraminer Klon N20 Kieselberg bildet signifikant geringere Konzentrationen an bestimmten Monoterpenschlüsselverbindungen als Klon 14Gm D35 (Marais und Rapp (1991)). Zum einen stellt diese hohe Diversität von *Vitis vinifera* L. eine Grundlage für interessante Neuzüchtungen dar, zum anderen wird dadurch auch die Wahl des Kreuzungsmaterials erschwert.

Im Jahre 2007 veröffentlichten zwei wissenschaftliche Gruppen unabhängig voneinander zwei Rebgenome. Einerseits wurde die Sequenz von Pinot Noir Klon ENTAV 115 (Velasco et al. (2007)), andererseits die Sequenz der durch mehrmalige Selbstung zu 93 % homozygoten Rebe PN40024 entschlüsselt (Jaillon et al. (2007)). Die Genomgröße von Pinot Noir ENTAV 115 wird mit 504,6 Mb angegeben, wobei 29 585 Gene vorhergesagt werden. 124 Gene, die mit der Biosynthese von Terpenoiden zusammenhängen, sind bestimmt, von denen 110 auf den Chromosomen kartiert werden konnten (Velasco et al. (2007)). Bei PN40024 wird eine Genomgröße von 487 Mb angenommen, die zwischen 26. 000 und 30. 000 proteinkodierende Gene beinhaltet (Jaillon et al. (2007), Genoscope - Grape Genome Browser (12x) <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). Hierbei sind für Terpensynthesen 89 funktionelle Gene, sowie 27 Pseudogene postuliert (Jaillon et al. (2007)).



In der Vergangenheit wurden Monoterpene erfolgreich mit FREON 11 (CCl_3F) aus Traubensaft und Wein isoliert (Rapp et al. (1976), Rapp und Hastrich (1978), Rapp et al. (1985)). Heutzutage werden Chlorfluorkohlenwasserstoffe kaum noch verwendet, da die chemisch inerten Chlorfluormethane in der Atmosphäre akkumulieren und unter photolytischer Reaktion zu freien Radikalen dissoziieren. Insbesondere in der Stratosphäre werden Chlor-Radikale gebildet, die katalytisch in einer Kettenreaktion zur Zerstörung von O_3 (Ozon) führen (Molina und Rowland (1974)). Deswegen sind alternative Aromaextraktionsverfahren erforderlich.

Die vorliegende Arbeit soll die Monoterpenzusammensetzung von aromatischen, mittel-aromatischen und nicht-aromatischen Rebsorten und -klonen und deren Entwicklung im Reifeverlauf mit Hilfe einer geeigneten Aromaextraktionsmethode charakterisieren. Hierzu wurde ein Methodenvergleich durchgeführt: eine Festphasenextraktion (SPE – Solid Phase Extraction), eine schnelle Wasserdampfdestillation (RSD – Rapid Steam Distillation) und eine Destillation im Hochvakuum mittels SAFE (Solvent Assisted Flavour Evaporation) (Di Stefano (1991), Dimitriadis und Williams (1984), Engel et al. (1999), Iland et al. (2004)). Des Weiteren sollen die Transkriptionsprofile des bekannten (-)- α -Terpineolsynthasegens (Martin und Bohlmann (2004a)) in unterschiedlichen Rebsorten aufgezeigt werden. Anhand von Sequenzinformationen sollen molekulare Marker entwickelt werden, die eng mit der Biosynthese von α -Terpineol korrelieren. Diese Marker könnten in der Rebenzüchtung zur Frühselektion der Kreuzungsabkömmlinge eingesetzt werden, wobei der Züchtungsvorgang erheblich beschleunigt würde.



2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Rebsorten- und Klonunterschiede im Monoterpenprofil

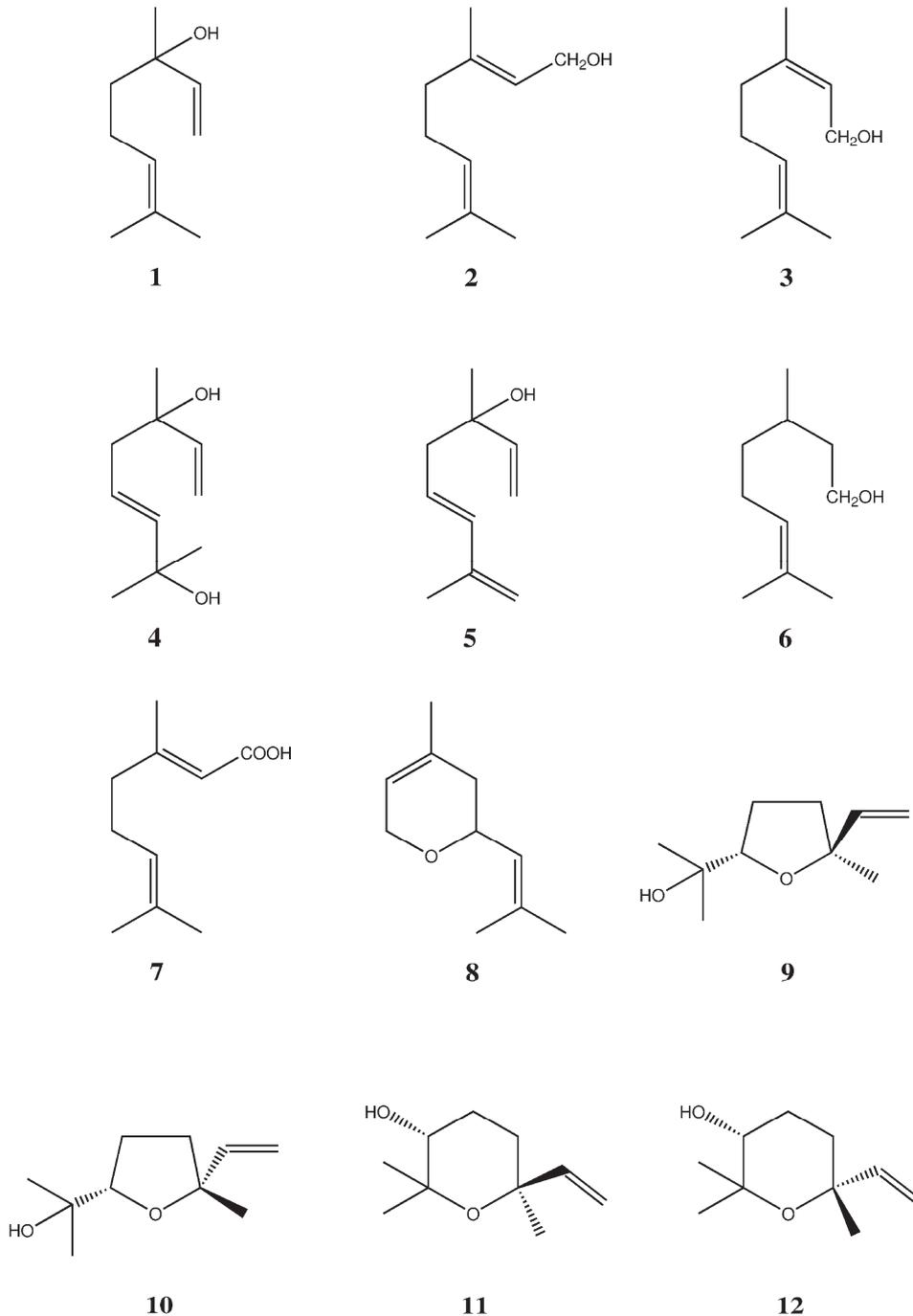
Rebsorten unterscheiden sich stark in ihrer Monoterpenzusammensetzung. Sie können in drei Gruppen eingeteilt werden (Mateo und Jiménez (2000)): 1. Sorten mit intensivem Muskataroma (z.B. Muscat of Alexandria, Muscat Hamburg, Muscat Ottonel, Muscat de Frontignan, Gewürztraminer), 2. Sorten ohne Muskataroma mit 1-4 mg Gesamtmonoterpenen/L (z.B. Kerner, Morio Muskat, Müller-Thurgau, Riesling, Schönburger, Siegerrebe, Traminer) und 3. neutrale Sorten, deren Aromatik nicht von Monoterpenen bestimmt wird (z.B. Bacchus, Cabernet Sauvignon, Chardonnay).

Anhand von 12 Monoterpenen kann man Rebsorten des Weiteren drei Weißweingruppen zuordnen: Sorten des Muskat-, des Riesling- und des Silvanertyps. Folglich ist die stöchiometrische Zusammensetzung an Monoterpenen in verschiedenen Rebsorten unterschiedlich, innerhalb einer Rebsorte aber vergleichbar (Rapp (1990), Abbildung 1).

Monoterpene können in der Traube frei und an Zuckermoleküle (Mono- und Disaccharide) gebunden vorliegen (Günata et al. (1985a), Voirin et al. (1990), Williams et al. (1982a)).

Mit einer kolorimetrischen Methode unter Verwendung eines Vanillin-Schwefelsäure-Reagenzes (Dimitriadis und Williams (1984)) können sowohl freie (FVT – Free Volatile Terpenes), als auch gebundene Monoterpene (PVT – Potential Volatile Terpenes) bestimmt werden. Hohe Gehalte von Gesamtterpenen (FVT + PVT) wurden in Muscat of Alexandria (6,7 mg/L), Canada Muscat (5 mg/L) und Muscat à Petits Grains Rouge (4 mg/L) gemessen, mittlere Konzentrationen in Traminer (2,4 mg/L) und Riesling (1,2 mg/L), sowie geringere in Chardonnay (0,4 mg/L) und Shiraz (0,3 mg/L) (Dimitriadis und Williams (1984)).

Beim Vergleich der Monoterpenzusammensetzung von den aromatischen Sorten Muscat of Alexandria, Muscat de Frontignan und Traminer (Gewürztraminer) wird α -Terpineol in allen drei Sorten nur wenig gebildet. Während große Mengen Linalool in den Beeren der Muskatsorten enthalten sind (Muscat of Alexandria ca. 800 μ g/kg und Muscat de Frontignan



- | | | | |
|-----------|--|------------|---------------------------------------|
| 1: | Linalool | 7: | <i>trans</i> -Geraniumsäure |
| 2: | Geraniol | 8: | Neroloxid |
| 3: | Nerol | 9: | <i>trans</i> -Linalooloxid (furanoid) |
| 4: | Diendiol_1
(3,7-Dimethylokta-1,5-dien-3,7-diol) | 10: | <i>cis</i> -Linalooloxid (furanoid) |
| 5: | Hotrienol | 11: | <i>trans</i> -Linalooloxid (pyranoid) |
| 6: | Citronellol | 12: | <i>cis</i> -Linalooloxid (pyranoid) |

Abbildung 1: Strukturformeln von 12 Monoterpenen in *Vitis vinifera* L. nach Rapp (1990)



ca. 600 µg/kg), handelt es sich im Traminer um eine Minorkomponente (< 50 µg/kg). Auch Diendiol_1 ist beim Traminer deutlich geringer vorhanden. Nerol und Geraniol werden in allen drei Sorten relativ stark ausgebildet, wobei die freie Form hauptsächlich in der Beerenhaut lokalisiert ist. Die gebundenen Formen sind stärker im Saft vertreten als die ungebundenen. Der Gesamtnerolgehalt liegt dabei immer unterhalb des Geraniolgehaltes. Des Weiteren sind die furanoiden *cis*- und *trans*-Linalooloxide hauptsächlich an Zucker gebunden. In Muscat of Alexandria sind vom *cis*-Isomer nur Spuren vorhanden (Wilson et al. (1986)).

Hohe Gehalte von Diendiol_1 (3,7-Dimethylocta-1,5-dien-3,7-diol) wurden in den Rebsorten Scheurebe, Riesling und Forta gefunden. Des Weiteren ist diese Verbindung in der Wildart *Vitis labrusca* und der Kulturrebe Niagara, nicht aber in Wildpflanzen von *Vitis riparia* vorhanden. Ihre Konzentration nimmt bei Muscat of Alexandria während der Beerenreife kontinuierlich zu (Rapp und Knipser (1979), Williams et al. (1980b), Wilson et al. (1984)).

Diendiol_2 (3,7-Dimethylocta-1,7-dien-3,6-diol) hingegen wurde meist in Sorten mit intensivem Muskataroma nachgewiesen. Hierzu zählen Blauer Muskateller, Muscat of Alexandria, aber auch die gezüchteten Sorten Schönburger, Morio Muskat und Siegerrebe (Rapp et al. (1980), Williams et al. (1980b)).

Klonunterschiede in der Monoterpenzusammensetzung wurden besonders bei Klonen von cv. Gewürztraminer gefunden. So besitzt Klon N20 Kieselberg deutlich geringere Konzentrationen an bestimmten Monoterpenschlüsselverbindungen als Klon 14Gm D35. Während die Gesamtkonzentration von Geraniol signifikant höher im Klon 14Gm D35 als im Klon N20 Kieselberg ist (Faktor 32), ist die Linaloolkonzentration von beiden Klonen nicht unterscheidbar (Marais und Rapp (1991)). Generell haben aromatische Traminer besonders an Geraniol und Nerol höhere Konzentrationen als weniger aromatische. Geringste Monoterpenkonzentrationen besitzen unter anderem die Gewürztraminer-Klone FR46/107 und N23 (Marais und Rapp (1991), Versini et al. (1990)). In einer weiteren Studie, bei der Säfte verschiedener Rebsorten verglichen wurden, zeigt Gewürztraminer ein analoges Monoterpenprofil (relativ wenig Linalool (28 µg/L), viel Nerol (660 µg/L) und viel Geraniol (3574 µg/L) (Günata et al. (1985a)). Anders sieht es in einer Publikation über die Monoterpenzusammensetzung von Gewürztraminer aus, deren FVTs und PVTs nach saurer Hydrolyse mittels GC/MS analysiert wurden: Linalool übersteigt dabei deutlich die Gehalte an Geraniol und Nerol (1266 µg Linalool/kg Traube, 65 µg Nerol/kg Traube, 209 Geraniol



µg/kg Traube; FVT + PVT gemessen als µg Cyclohexanon-Äquivalente) (Girard et al. (2002)).

Bei Weißem Riesling sind die Klonunterschiede nicht so deutlich. Trotzdem wurden im Klon 37 statistisch höhere Gehalte an Linalool, Linalooloxiden (*trans*- und *cis*-pyranoid), sowie Diendiol_1 und Diendiol_2 als im Klon 239 gefunden (Marais und Rapp (1991)).

Auch bei Chardonnay sind neben neutralen, nicht-aromatischen Klonen, wie z.B. Klon 116 und 130 SMA, aromatische Klone, wie z.B. Chardonnay Klon Musqué und Klon 77, bekannt. Unter anderem kommen die zwei Monoterpene *trans*-Linalooloxid (pyranoid) und Linalool im aromatischen Klon 77 in höherer Konzentration als im neutralen Klon 130 SMA vor. Der Entwicklungsverlauf von *trans*-Linalooloxid (pyranoid) ist während der Beerenreife in beiden Klonen vergleichbar, die tendenzielle Entwicklung von Linalool aber unterschiedlich. Des Weiteren zeigt der aromatische Klon Chardonnay Musqué im Vergleich zu Klon 77 relativ viel Geraniol (439 µg/kg Beere im Vergleich zu 68 µg/kg Beere) (Versini et al. (1990)).

Duchene et al. (2009b) fanden ebenfalls in Säften des aromatischen Chardonnay-Klons 809 mehr Linalool (232 µg/L) als Geraniol (53 µg/L) und bei aromatischem Gewürztraminer mehr Geraniol (496 bzw. 547 µg/L) als Linalool (56 bzw. 71 µg/L). Während der Reife ist dieser Unterschied beim aromatischen Cardonnay 809 noch relativ gering (in der Beerenhaut: 861 µg Linalool/kg und 572 µg Geraniol/kg; im Mesokarp: 150 µg Linalool/kg und 76 µg Geraniol/kg), wird aber zum Herbst größer (in der Beerenhaut: 3026 µg Linalool/kg und 797 µg Geraniol/kg; im Mesokarp: 396 µg Linalool/kg und 104 µg Geraniol/kg). Beim aromatischen Gewürztraminer sind die Unterschiede schon während der Reife deutlich, wobei die Geraniolkonzentration zum Herbst abnimmt (während der Reife: 130 µg Linalool/kg und 6210 µg Geraniol/kg in der Beerenhaut, sowie 15 µg Linalool/kg und 807 µg Geraniol/kg im Mesokarp; Herbst: 177 µg Linalool/kg und 4733 µg Geraniol/kg in der Beerenhaut, sowie 4 µg Linalool/kg und 670 µg Geraniol/kg im Mesokarp) (Duchene et al. (2009b)).

2.2 Die Terpenbiosynthese

Monoterpene zählen zur Stoffklasse der Isoprenoide, deren Vorläufersubstanz Isopentenylidiphosphat (IPP, C₅-Körper) ist. In höheren Pflanzen werden zwei räumlich



getrennte IPP-Biosynthesewege unterschieden: den im Zytoplasma stattfindenden Acetat/Mevalonat (MVA)-Weg und den Mevalonat-unabhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP)-Weg, der in Plastiden lokalisiert ist. Aus Isopentenylidiphosphat-Einheiten bzw. dem Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) werden im Zytosol Sesquiterpene, Triterpene (Sterole) und Polyterpene gebildet, im Plastid wiederum Isoprene, Monoterpene, Diterpene, Carotenoide (C₄₀) und Plastoquinone (C₄₅). In den Mitochondrien werden mit dem C₅-Gerüst aus dem Zytoplasma Ubiquinone (Nona- und Decaprenylkette) synthetisiert (Lichtenthaler. (1999)).

Während der MVA-Weg aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA) als Substrat benutzt, stehen am Beginn des DOXP-Weges Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Als erstes Enzym der plastidischen Isoprenoidbiosynthese fungiert die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase (DXS). Dieser Biosyntheseschritt ist von Thiamin abhängig (TPP - Thiamindiphosphat) (Lichtenthaler. (1999), Rohdich et al. (2002)).

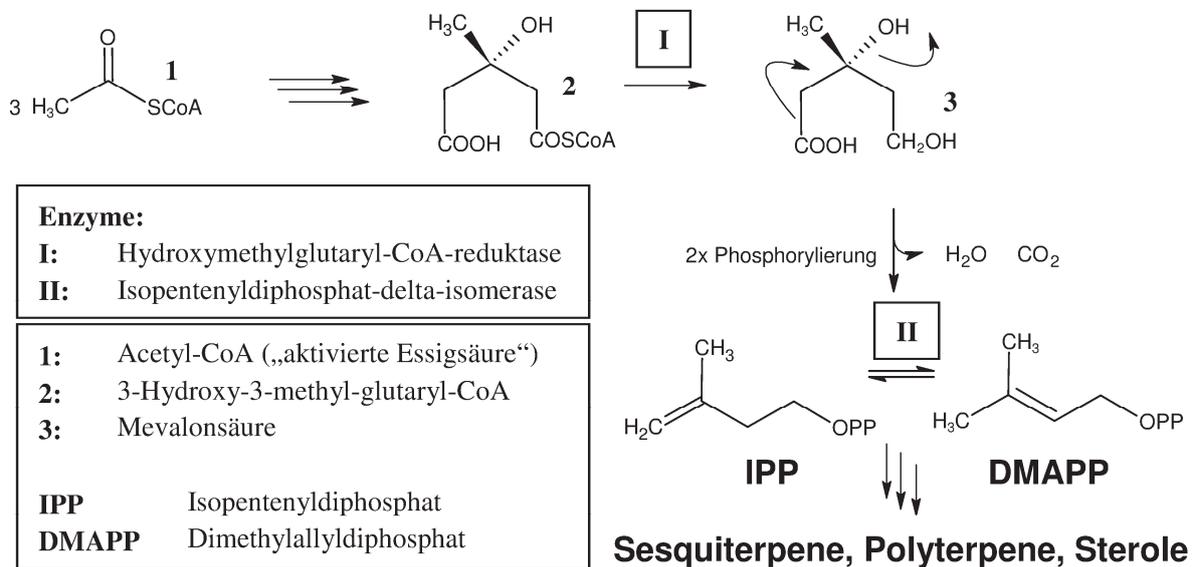
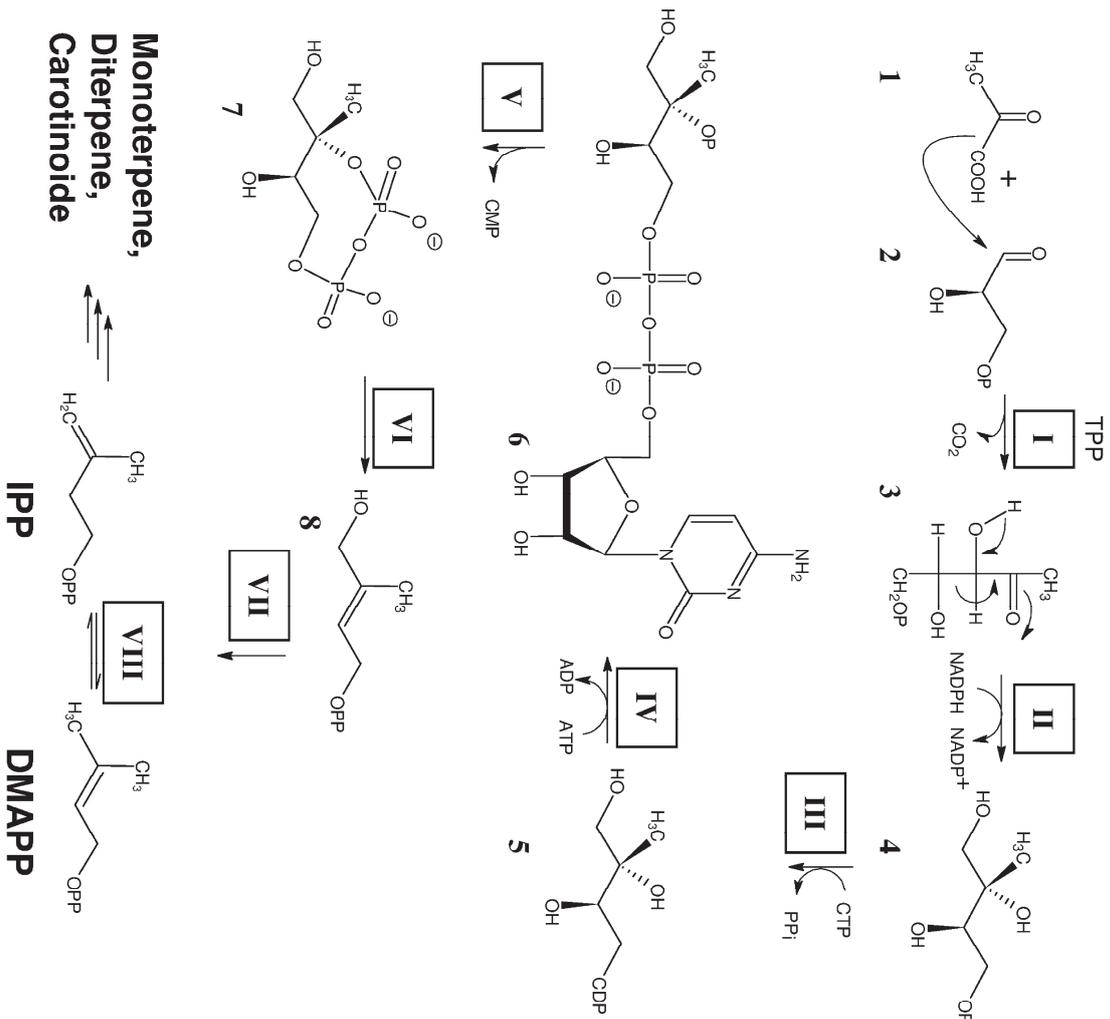


Abbildung 2: Schema des zytosolischen Acetat/Mevalonat (MVA)-Wegs



Enzyme:	
I:	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase
II:	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatreduktase
III:	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolsynthase
IV:	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolkinase
V:	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphatsynthase I
VI:	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphatsynthase II *
VII:	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphatreduktase *
VIII:	Isopentenylidiphosphat-delta-isomerase

*möglicherweise das gleiche Enzym

1:	Pyruvat
2:	Glycerinaldehyd-3-phosphat
3:	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
4:	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
5:	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol
6:	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat
7:	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat
8:	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat

IPP	Isopentenylidiphosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
TPP	Thiamindiphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
NADPH / NADP ⁺	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
CMP	Cytidimonophosphat
PP _i	Diphosphat

Abbildung 3: Schema des plastidären Mevalonat-unabhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP)-Wegs



Für die Biosynthese der Terpene sind die über die sogenannte „Kopf-Schwanz“-Addition von IPP bzw. DMAPP gebildeten Substrate notwendig: Geranyldiphosphat (GPP) für Monoterpene, Farnesyldiphosphat (FPP) für Sesquiterpene und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) für Diterpene (Lichtenthaler (1999)).

Ein Transfer zwischen dem MVA- und dem DOXP-Biosyntheseweg wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Proteine der inneren Membranhülle von Chloroplasten aus Spinatblättern (*Spinacea oleracea* L.) können IPP, DMAPP, GPP und FPP transportieren, wohingegen GGPP und MVA kein Substrat für dieses Exportsystem darstellen (Bick und Lange (2003)). Hier wird ein gerichtetes, Ca^{2+} -reguliertes Transportsystem in der Plastidmembran vermutet (Bick und Lange (2003)). In der Karotte (*Daucus carota* L.) konnte *in vivo* über die mit Deuterium markierten Standards [5,5- $^2\text{H}_2$]-Mevalonsäurelaktone (d_2 -MVL) und [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-Desoxy-D-xylulose (d_2 -DOX) gezeigt werden, dass hier Monoterpene über den DOXP-Weg und Sesquiterpene über beide Biosynthesewege synthetisiert werden können (Hampel et al. (2005)). Bei *Vitis vinifera* L. cv. Muscat Ottonel wurde ebenfalls durch *in vivo* Assays der DOXP-Weg als dominanter Biosyntheseweg für Monoterpene im Exo- und Mesokarp von Beeren sowie in Blättern nachgewiesen (Luan und Wüst (2002)). Dieser Weg ist bei *Vitis vinifera* L. im Chloroplasten angesiedelt (Velasco et al. (2007)).

Monoterpensynthasen haben am N-Terminus ein Transitpeptid, um in die Plastiden zu gelangen. Dieser Bereich schließt mit seinem C-Terminus am Aminosäuresequenzmotiv RRx_8W -Motiv ab und wird für die Monoterpenbiosynthese nicht benötigt (Bohlmann et al. (1998)).

Bei der Limonensynthase aus *Mentha spicata* scheint das RRx_8W -Motiv an der Isomerisierung von GPP involviert zu sein (Williams et al. (1998)). Anhand von Deletionsstudien konnte gezeigt werden, dass ohne die Aminosäuren RR dieses Motivs das Substrat GPP nicht akzeptiert wird, wohl aber 3S-Linalyldiphosphat, welches als Intermediat vom Enzym gebildet wird (Williams et al. (1998)).

Drei Aminosäuresequenzmotive, die das aktive Zentrum von Terpensynthasen beschreiben, sind bekannt: das DDxxD- (Bohlmann et al. (1998)), das NSE/DTE- (Christianson. (2006), Degenhardt et al. (2009), Martin et al. (2010)) und das RxR-Motiv (Degenhardt et al. (2009), Starks et al. (1997)). Das DDxxD-Motiv umfasst einen Sequenzbereich von fünf



Aminosäuren mit entsprechender Anordnung von drei Aspartaten (D), das RxR einen Sequenzbereich von drei Aminosäuren mit zwei Argininen (R) und das NSE/DTE-Motiv einen Sequenzbereich von 11 Aminosäuren (Aminosäuresequenz: (L,V)(V,L,A)(N,D)D(L,I,V)_x(S,T)_{xxx}E, LWDDL_x(S,T)_{xxx}E bzw. (L,F)(M,I,S,C,W)(N,D)D(L,M,I)_x(S,T,D)_{xxx}E)).

Das NSE/DTE- und das DD_{xx}D-Motiv koordinieren zweiwertige Kationen (Mg²⁺) und sind dadurch an der Fixierung des Pyrophosphatsubstrats beteiligt. Bei Austausch eines der Aspartate des DD_{xx}D-Motivs durch Alanin oder Glutaminsäure kann sich die katalytische Aktivität um das 1000-fache verringern (Bohlmann et al. (1998), Christianson (2006), Degenhardt et al. (2009), Martin et al. (2010), Whittington et al. (2002)).

Das RxR-Motiv befindet sich ca. 35 Aminosäuren in N-terminaler Richtung vom DD_{xx}D-Motiv entfernt. Dieses Motiv ist an der Komplexierung der Diphosphatgruppe nach der Ionisierung beteiligt, um nukleophile Angriffe auf die carbokationischen Intermediate zu verhindern (Degenhardt et al. (2009), Starks et al. (1997)).

Terpensynthasen können in 2 Klassen eingeteilt werden. Zur Klasse I gehören Prenyltransferasen, Monoterpen-, Sesquiterpen- und einige Diterpensynthasen, die Pyrophosphat vom Substrat freisetzen, wodurch ein allylisches Carbokation gebildet wird. Synthasen der Klasse II protonieren hingegen direkt C-C-Doppelbindungen oder Epoxide. Hierzu zählen Tri- und Tetraterpensynthasen, sowie einige Diterpensynthasen. Es wird angenommen, dass sich die zwei Klassen evolutionär separat entwickelt haben. Die Enzyme der Klasse I sind vorwiegend aus α -Helices aufgebaut, wohingegen die Enzyme der Klasse II sogenannte $\alpha\alpha$ -Zylinderstrukturen aufweisen. Allerdings kann auch die N-terminale Domäne des Klasse I-Enzyms, wie das Beispiel der 5-Epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* (Starks et al. (1997)) zeigt, eine ähnliche $\alpha\alpha$ -Zylinderstruktur besitzen (Wendt und Schulz (1998)).

Eine andere Klassifizierung der Terpensynthasen besteht darin, die Aminosäuresequenzen zu vergleichen. Sieben Terpensynthase-Unterklassen *TPS-a* bis *TPS-g* sind unterscheidbar. Die Gruppe *TPS-a* enthält Enzyme, die für die Biosynthese von Sesqui- und eventuell Diterpenen zuständig sind. Enzyme der Gruppe *TPS-b* bilden Monoterpene, der Gruppe *TPS-d* Mono-, Sesqui- und Diterpene. Diterpene (Copolyldiphosphat, *ent*-Kauren), die als Vorläufer-



substanzen für die Biosynthese von Pflanzenhormonen, den Gibberellinen, notwendig sind, werden von Enzymen der Gruppen *TPS-c* und *-e* gebildet. Enzyme der Gruppe *TPS-g* liefern azyklische Mono- und Sesquiterpene. Als phylogenetische Herkunft von Sesquiterpensynthase-Unterklasse *TPS-a* und Monoterpensynthase-Unterklasse *TPS-b* werden Angiospermen (Bedecktsamer), hingegen von Unterklasse *TPS-d* Gymnospermen (Nacktsamige Pflanzen) gesehen. *TPS-a* bis *-f* besitzen mindestens 40 % Identität der Aminosäuresequenz innerhalb einer Gruppe. Den Monoterpensynthasen der Untergruppe *TPS-g*, die erstmals von Dudareva et al. (2003) beschrieben wurde, fehlt im Vergleich zu den Monoterpensynthasen der Untergruppen *TPS-b* und *TPS-d* das RR_xW-Motiv (Bohlmann et al. (1997), Bohlmann et al. (1998), Dudareva et al. (2003), Martin et al. (2010)).

Neben monomeren Terpensynthasen wie z.B. einer Limonensynthase aus *Mentha spicata* sind auch dimere Enzymstrukturen wie die homodimere Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* bekannt. (Hyatt et al. (2007), Whittington et al. (2002)) Des Weiteren ist eine bifunktionelle Diterpensynthase aus *Abies grandis* mit zwei aufeinanderfolgenden Aspartatreichen aktiven Zentren beschrieben, wobei das eine aktive Zentrum in der N-terminalen Domäne, das andere in der C-terminalen Domäne liegt. Es handelt sich hierbei um eine Abietadiensynthase, die als Intermediat (+)-Copalyldiphosphat bildet (Peters et al. (2000), Peters et al. (2001)). Die Produktspezifität von Monoterpensynthasen kann durch wenige Aminosäureaustausche erheblich beeinflusst werden. Dies zeigt sich am Beispiel einer 1,8-Cineolsynthase der Spezies *Salvia fruticosa*. Durch wenige Mutationen konnte aus ihr eine Sabinensynthase entstehen (Kampranis et al. (2007)).

2.3 Quantitative Trait Loci (QTL) der Monoterpenbiosynthese in *Vitis vinifera* L.

Ein „Quantitative Trait Locus“ (QTL) beschreibt einen Bereich auf einem Chromosom, der in Verbindung mit der Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals steht. In segregierenden Populationen von *Vitis vinifera* L. cv. Muscat Ottonel- und cv. Gewürztraminer-Selbstungen wurden „Quantitative Trait Loci“ (QTL) gefunden, die im Zusammenhang mit dem Gehalt an Terpenalkoholen stehen. Ein auf Linkage Group 5 (LG 5) befindlicher QTL, dessen Marker mit einem Desoxy-D-xylulosesynthasegen (*DXS 1*) kolokalisiert, korreliert je nach vorhandenen Allelen mit den Mengen an Terpenalkoholen. Je ein Einzelnukleotidpolymorphismus („Single Nucleotid Polymorphism – SNP“) von *DXS1*



aus Muscat Ottonel und Gewürztraminer korreliert mit dem Gehalt an Monoterpenalkoholen. Beide SNPs liegen dabei außerhalb des kodierenden Bereichs an unterschiedlicher Position in Introns. Ein weiterer QTL auf LG 10 bestimmt das Gleichgewicht Linalool gegenüber Geraniol und Nerol (Duchene et al. (2009a)).

Ein QTL auf LG 5 der F1-Generation von (Olivette \times Ribol) \times Muscat of Hamburg konnte mit den In-transformierten Gehalten von Linalool, Geraniol und Nerol in Korrelation gesetzt werden (Doligez et al. (2006)). Dieser QTL entspricht dem QTL auf LG 5 aus der Arbeit von Duchene et al. (2009a). Ein weiterer QTL auf LG 2 korreliert mit Linalool, ein anderer auf LG 13 mit Nerol und Geraniol. In dieser Arbeit wurden ungebundene Monoterpene betrachtet (Doligez et al. (2006)).

In einer segregierenden Population von Muscato bianco \times *Vitis riparia* wurden QTLs für gebundene und ungebundene Monoterpene untersucht. So wurde ein QTL für Linalool und Geraniol auf LG 19, ein QTL für Citronellol und Nerol auf LG 15, ein QTL für Linalool und *trans*-Geraniumsäure auf LG 9 detektiert (Sevini et al. (2004)). Ein weiterer QTL für die freie Form von 7-Hydroxygeraniol liegt auf LG 5 (Sevini et al. (2004)). Der QTL auf LG 9 entspricht dem Linalool-QTL auf LG 2 aus der Arbeit von Doligez et al. (2006) (Duchene et al. (2009a)).

In einer weiteren Studie wurden Kreuzungsabkömmlinge von Italia \times Big Perlon (Population 1) und Moscato Bianco \times *Vitis riparia* (Population 2) untersucht. Bei den F1-Individuen liegt ein QTL für Linalool, Nerol und Geraniol auf LG 5. Für freies Linalool wird ein QTL auf LG 2 der Kartierung von Moscato Bianco aufgezeigt. In der Population von Italia \times Big Perlon wird ein QTL für Linalool auf LG 10 beschrieben. Des Weiteren sind QTLs für Monoterpenkonzentrationsverhältnisse bekannt. In der Population 1 werden freie Monoterpene, in der Population 2 freie und gebundene Monoterpene betrachtet (Battilana et al. (2009)).



2.4 Terpensynthesen von *Vitis vinifera* L.

Nachdem das 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase (*VvDXS*)-Gen mit dem Gehalt an Monoterpenalkoholen in *Vitis vinifera* L. in Verbindung gebracht wurde (Battilana et al. (2009), Duchene et al. (2009a)), sind zwei *VvDXS*-Allele in Moscato Bianco detektiert worden (Emanuelli et al. (2010)). Diese beiden Allele wurden näher untersucht. Trotz vergleichbarer Substrataffinität zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat ist das Enzym *VvDXS* N284 („Muskat-Typ“ mit Asparagin) doppelt so effizient wie *VvDXS* K284 („neutral“ mit Lysin). Dieses Ergebnis spiegelt sich in Untersuchungen transgener Tabakpflanzen wider. So akkumulieren Individuen mit *VvDXS* N284-Gen deutlich mehr Monoterpene als Individuen mit dem *VvDXS* K284-Gen (Battilana et al. (2011)). Diese Mutation scheint jedoch nicht die einzige Ursache für die Aromatik bzw. Neutralität einer Rebsorte zu sein. Weitere unabhängige *VvDXS*-Mutationen wurden in *Vitis vinifera* L. festgestellt, die einerseits Grund für die Neutralität, andererseits für die Muskat-ähnliche Aromatik bei Klonen von Chardonnay, Chasselas und Savagnin rosé (Roter Traminer) sein könnten. Die genetische Variabilität weiterer Enzyme der Isoprenbiosynthese (DOXP-Weg) wird für die Aromausprägung von Rebsorten und -klonen in Betracht gezogen (Emanuelli et al. (2010)).

Aus Zellkulturen von *Vitis vinifera* L. cv. Muscat de Frontignan konnten Prenyltransferasen nachgewiesen werden (Clastre et al. (1993), Feron et al. (1990)). Die Isolierung einer spezifischen Geranyldiphosphatsynthase, die aus DMAPP und IPP mit Hilfe von zweiwertigen Kationen (Mn^{2+} , Mg^{2+}) die Bildung von GPP katalysiert, wird dabei beschrieben (Clastre et al. (1993)).

In Beeren von *Vitis vinifera* L. cv. Muscat de Frontignan wird ein *S*-Linaloolsynthasegen aufgezeigt. Sein Expressionsprofil und der Konzentrationsverlauf an freiem *S*-Linalool sind in der Beere nahezu identisch. Beide steigen ab der 8. Woche nach der Blüte stark an. Zur 13. Woche sinken die Profile wieder. Die Enzymaktivität der dazugehörigen Synthase bleibt aber in der 13. und 14. Woche in der Beerenhaut erhalten (Ebang-Oke et al. (2002)).

Inzwischen wurden anhand der 12-fachen Genomsequenzierung von *Vitis vinifera* L. 53 vollständige Terpensynthasegene, die die erwarteten funktionellen Motive und Domänen besitzen, sowie 16 vollständige Terpensynthesen, die im ORF (Open Reading Frame) eine



Verschiebung im Leseraster oder eine Nonsense-Mutation besitzen, sowie 20 partielle Gene, die z.B. Lücken in der Sequenz aufweisen, und 63 durch eine Vielzahl von Deletionen, Frameshifts bzw. Stoppcodons offensichtliche Pseudogene für Terpensynthesen erwähnt. So liegt die Anzahl an potentiell funktionellen Terpensynthesen zwischen 53 und 89 Genen. 69 Kandidatengene für potentiell funktionelle Terpensynthesen in *Vitis vinifera* L. gehören zu 5 von 7 Terpensynthase-Unterklassen. Auf Chromosom 18 und 19 liegen dabei 30 Gene von *TPS-a*, die mit der Sesquiterpen- und eventuell Diterpensynthese in Zusammenhang gebracht werden. Für Monoterpensynthesen wurden 19 Gene von Subklasse *TPS-b* auf Chromosomen 8, 12 und 13 lokalisiert. Für die Bildung von azyklischen Mono- und Sesquiterpenen ist die Subklasse *TPS-g* mit 17 Genen in *Vitis vinifera* L. vertreten. Zwei Gene von *TPS-c* und ein Gen von *TPS-e*, deren Enzyme mit dem primären Pflanzenhormonmetabolismus in Verbindung stehen, sind beschrieben (Bohlmann et al. (1998), Dudareva et al. (2003), Martin et al. (2010)).

Mittels volllängen cDNA-Klonen, die jeweils den vollständigen codierenden Bereich eines Gens (entspricht mRNA) beinhalten, von *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer, Pinot Noir und Cabernet Sauvignon konnten funktionelle Analysen über Enzymassays durchgeführt werden (Driesel et al. (2003), Lücker et al. (2004), Martin und Bohlmann (2004a), Martin et al. (2010)). Es sind zwei nahezu identische Terpensynthasegene (*VvTPS-1891* and *VvTPS-4568*) aus Gewürztraminer als α -Terpineolsynthasegen beschrieben (Martin und Bohlmann (2004a)). Die dazugehörigen Proteinsequenzen mit einer Länge von je 590 Aminosäuren sind an zwei Stellen (Aminosäure 126 und Aminosäure 589) unterschiedlich. Beide Enzyme besitzen ein identisches Produktprofil. Das Enzym zu *VvTPS-4568* synthetisiert *in vitro* aus GPP 50,1 % (-)- α -Terpineol, 11,8 % 1,8-Cineol und 8,5 % (+)- β -Pinen, sowie Minorkomponenten ((-)- α -Thujen, (-)- α -Pinen, Mycren, Sabinen, (-)- β -Pinen, (-)-Limonen, Terpinolen, (-)-*trans*-Sabinenhydrat, (+)-*cis*-Sabinenhydrat, (-)-*cis*-Sabinenhydrat und (+)- α -Terpineol). Produkte mit den Substraten FPP und GGPP wurden nicht festgestellt (Martin und Bohlmann (2004a)).

Zwei Sesquiterpensynthesen, die FPP als Substrat verwenden, sind in *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer bekannt, wobei GPP oder GGPP nicht verstoffwechselt werden. Das eine Enzym, als (+)-Valencensynthase (*VvVal*) bezeichnet, produziert *in vitro* 49,5 % (+)-Valencen, 35,5 % (-)-7-*epi*- α -Selinen, 7 % α -Selinen sowie 4 andere Verbindungen. Das



andere Enzym (-)-Germacren D-Synthase (*VvGerD*) bildet *in vitro* zu 92 % (-)-Germacren D und zu 8 % δ -Cadinen (Lücker et al. (2004)).

Des Weiteren wurden Enzyme von 39 Terpensynthasegenen aus *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer, Pinot noir und Cabernet Sauvignon im Enzymassay funktionell charakterisiert. Als Substrat wurde jeweils GPP, FPP und GGPP verwendet. Die Enzyme der Unterklasse *TPS-a* produzieren Sesquiterpene, die Enzyme der Unterklasse *TPS-b* stellen Monoterpene und die der Unterklasse *TPS-g* azyklische Terpene her. Die Enzyme dreier Gene der Klasse *TPS-g* können GPP oder FPP zu dem Monoterpen (3*S*)-Linalool bzw. dem Sesquiterpen (*E*)-Nerolidol entsprechend umsetzen. Enzyme von vier weiteren Genen der Klasse *TPS-g* produzieren neben dem Monoterpen (3*S*)-Linalool und dem Sesquiterpen (*E*)-Nerolidol noch das Diterpen (*E,E*)-Geranylinalool aus GGPP. Des Weiteren sind 2 Enzyme aus Cabernet Sauvignon und Pinot Noir der Unterklasse *TPS-f* beschrieben, die mittels der Substrate FPP und GGPP (*E*)-Nerolidol bzw. (*E,E*)-Geranylinalool synthetisieren, obwohl kein potentiell funktionelles Enzym dieser Unterklasse anhand von *in silico* Genomanalysen identifiziert wurde. Viele der untersuchten Enzyme bilden mehrere Produkte. Die Enzyme der Unterklassen *TPS-g* und *-f* synthetisieren allerdings je nach Substrat nur ein spezifisches Produkt (Martin et al. (2010)).

2.5 Reaktionsmechanismus der α -Terpineolbiosynthese

Im Mechanismus der α -Terpineolbiosynthese wird zuerst das Diphosphat vom GPP abgespalten, wodurch eine positive Ladung an der Allylstruktur zurückbleibt (Ionisierung). Nach Anlagerung des Diphosphats an den tertiären Kohlenstoff erfolgt die Isomerisierung zum Linalyldiphosphat (cisoid). Eine erneute Ionisierung mit anschließender Zyklisierung führt nun zum α -Terpinylkation, welches durch Wasseraufnahme α -Terpineol bildet (siehe Abbildung 4). Generell gilt das α -Terpinylkation als Vorläufersubstanz für zyklische Monoterpene. Das synthetisierte α -Terpineol ist wiederum das Substrat für 1,8-Cineol (Christianson (2006), Degenhardt et al. (2009), Hyatt et al. (2007), Kampranis et al. (2007)).

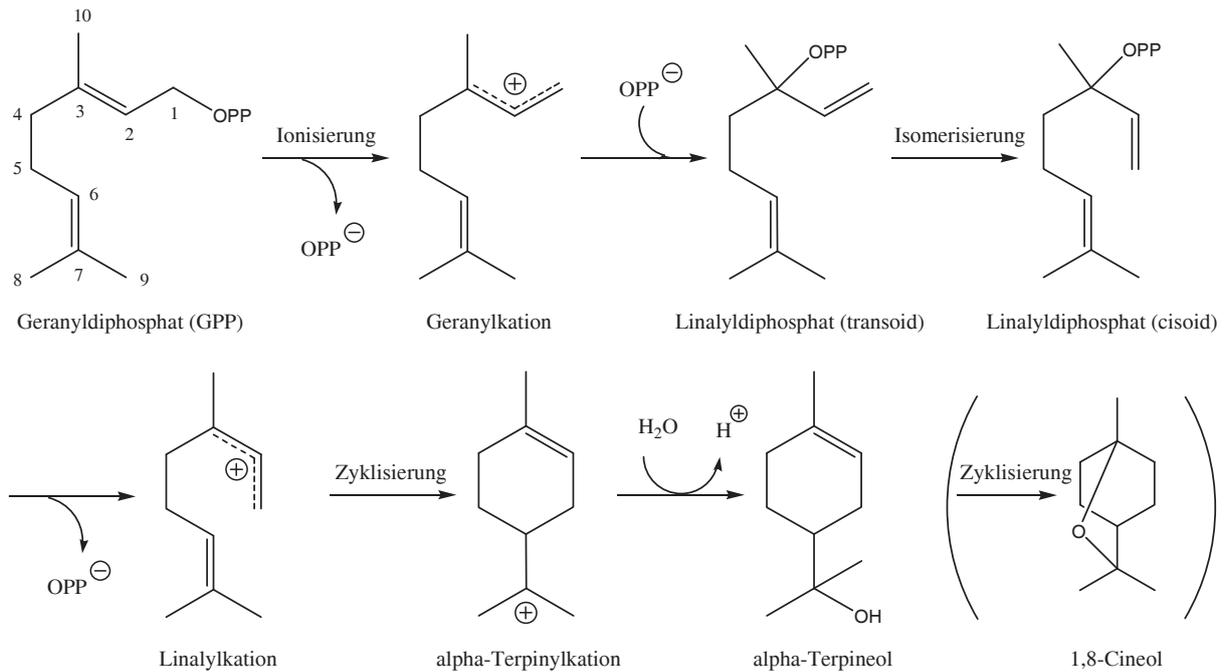


Abbildung 4: Biosynthese von α -Terpineol

2.6 Transkriptionsprofile von Terpensynthasengen bei *Vitis vinifera* L.

Die Transkription der drei Terpensynthasene *VvTer* ((-)- α -Terpineolsynthasegen (*VvTPS*)), *VvVal* und *VvGerD* ((+)-Valencensynthasegen und (-)-Germacren D-Synthasegen) in *Vitis vinifera* L. mittels Northern Blot-Analyse ist publiziert (Lücker et al. (2004)). In der Blüte von Chardonnay wird die Transkription der Gene *VvVal* und *VvTer* bis zur postantheren Blüte bzw. zum Fruchtansatz stark runterreguliert. Auch die *VvGerD*-Transkription wird in dem Zeitraum geringer, ist aber bis zum Fruchtansatz etwa gleich bleibend ausgeprägt. Zusätzlich ergibt *VvGerD* sowohl im Stamm, in den Ranken, als auch in jungen Blättern ein Produkt. Bei Gewürztraminer ist das Transkriptionsprofil von *VvVal* während der Beerenreife beschrieben (Lücker et al. (2004)). Während bei RNA von Kernen, sowie beim RNA-Gemisch aus Meso- und Exokarp im Laufe des Julis die *VvVal*-Transkription runterreguliert wird und ab August kein Produkt mehr nachweisbar ist, erscheint im RNA-Extrakt aus Meso- und Exokarp ab September erneut ein Transkriptionsprodukt von *VvVal*, welches im Oktober stark ausgeprägt ist. In den Kernen dagegen war die Qualität der RNA ab September stark beeinträchtigt und es konnte keine weitere *VvVal*-Transkription festgestellt werden. Die Transkription der Gene *VvTer* und *VvGerD* konnte in Beeren von Gewürztraminer mittels Northern Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden. (Lücker et al. (2004))