

Untersuchungen zur Monoterpensynthese,
insbesondere des α -Terpineols,
in verschiedenen Sorten der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.)

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Matthias Alexander Nitsch
aus Königstein im Taunus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1	Rebsorten- und Klonunterschiede im Monoterpenprofil	3
2.2	Die Terpenbiosynthese	6
2.3	Quantitative Trait Loci (QTL) der Monoterpenbiosynthese in <i>Vitis vinifera</i> L.....	11
2.4	Terpensynthasen von <i>Vitis vinifera</i> L.....	13
2.5	Reaktionsmechanismus der α -Terpineolbiosynthese	15
2.6	Transkriptionsprofile von Terpensynthasegenen bei <i>Vitis vinifera</i> L.	16
2.7	Die Monoterpenbiosynthese bei <i>Vitis vinifera</i> L.....	17
2.8	Die Bedeutung von α -Terpineol im Wein	23
2.9	Eukalyptol (1,8-Cineol) in Weinbeeren und im Wein	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Vergleich von Monoterpenextraktionsverfahren	25
3.2	Freisetzung gebundener Monoterpene durch das Enzympräparat β -Glykosidase (Erbslöh) nach Fraktionierung mittels SPE.....	26
3.3	Monoterpenprofile in verschiedenen Rebsorten und –klonen.....	27
3.4	Reifeverlauf einzelner Monoterpene in Traubensäften verschiedener Rebsorten ...	34
3.5	Monoterpenprofile in weiteren Rebsorten.....	44
3.6	Expressionsanalysen.....	46
3.6.1	Primerdesign für Expressionsanalysen.....	46
3.6.2	Transkriptionsprofile des α -Terpineolsynthasegens	48
3.7	Sequenzierung und Vergleich der potentiellen α -Terpineolsynthase- gensequenzen	52
3.8	Vergleich der potentiellen Proteinsequenzen	56
3.9	Vergleich der DNA-Sequenzen mit dem Rebgenom	57
3.10	Weitergehende Sequenzanalyse	57
3.11	Marker für Gene potentiell nicht-funktioneller Monoterpensynthasen.....	62
3.12	Test des Markersystems auf weitere Rebklone	65
4	Diskussion	67
4.1	Methodenvergleich von Monoterpenextraktionsverfahren	67
4.2	Die α -Terpineolbiosynthese in verschiedenen Rebsorten und –klonen	69

4.3	Das mögliche Vererbungsschema von potentiell nicht-funktionellen Synthasegensequenzen in <i>Vitis vinifera</i> L.....	76
4.4	Nukleotidsequenzen aus verschiedenen Rebsorten und dem Rebgenom PN40024.....	78
4.5	Die Monoterpenbiosynthese in verschiedenen Rebsorten und –klonen.....	85
5	Material und Methoden.....	89
5.1	Methodenvergleich von Monoterpenextraktionsverfahren.....	89
5.1.1	Festphasenextraktion (SPE – Solid Phase Extraction).....	90
5.1.2	Schnelle Wasserdampfdestillation (RSD – Rapid Steam Distillation).....	91
5.1.3	Destillation im Hochvakuum (SAFE – Solvent Assisted Flavour Evaporation)	91
5.2	Pflanzenmaterial und Probennahme.....	92
5.2.1	Probenvorbereitung für Aromaanalytik.....	93
5.2.2	Probenvorbereitung für Genexpressionsstudien.....	93
5.3	Aromaanalytik.....	94
5.3.1	Festphasenextraktion (SPE).....	94
5.3.2	GC/MS-Analyse.....	95
5.3.3	Auswertung.....	95
5.4	Molekularbiologie.....	98
5.4.1	DNA-Extraktion aus jungen Rebblättern.....	98
5.4.2	RNA-Extraktion aus Beerenhäuten.....	99
5.4.2.1	DNase-Behandlung.....	100
5.4.3	Klonierung.....	100
5.4.3.1	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	101
5.4.3.2	Restriktion von pUC18 Vektor mit SmaI.....	101
5.4.3.3	Ligation von blunt end PCR-Produkten.....	102
5.4.3.4	Ligation von PCR-Produkten mit dA-tailing.....	102
5.4.3.5	Transformation in <i>E. coli</i>	103
5.4.3.6	Stammkulturen im Flüssigmedium.....	103
5.4.3.7	Plasmid-Präparation.....	103
5.4.4	Expressionsanalysen (qPCR).....	104
5.4.4.1	Die qPCR mittels SYBR® Green Methode.....	104
5.4.4.2	Reverse Transkription.....	108
5.4.4.3	Primerdesign für Expressionsanalysen.....	108

5.4.4.4	Herstellung von Plasmid-Standards für die qPCR	109
5.4.4.5	Durchführung der qPCR.....	111
5.4.5	Vergleichende Sequenzierung bei verschiedenen Sorten.....	113
5.4.5.1	PCR auf genomische DNA	113
5.4.5.2	PCR auf cDNA	114
5.4.5.3	Klonierung und Plasmidisolation	115
5.4.5.4	Sequenzierung	115
5.4.6	Primersystem für molekulare Marker	115
5.4.7	Photometrische Messung (Quantitäts- und Reinheitsbestimmung)	117
5.4.8	Gelelektrophorese.....	118
5.4.9	Verwendete Primer	119
5.4.10	Lösungen und Nährmedien	121
5.4.10.1	Allgemein	121
5.4.10.2	RNA-Extraktion	122
5.4.10.3	Klonierung.....	123
5.5	Verwendete Datenbanken und Computersoftware.....	124
6	Zusammenfassung.....	126
7	Literaturverzeichnis.....	129
8	Anhang	146