

Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren
(*Vitis vinifera*)

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Bianca May

aus

Bad Salzungen

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Wüst
2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 01.06.2015

Erscheinungsjahr: 2016

Für meine Mama

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis des Anhangs	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis des Anhangs	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Rotundon – ein Sesquiterpen als Schlüsselaromastoff für das pfeffrige Weinaroma	1
1.2 Terpenbiosynthese	3
1.3 Strukturelle Diversität der Sesquiterpene	8
1.4 Sesquiterpene in <i>Vitis vinifera</i>	10
1.5 Solid Phase Microextraction (SPME)	13
1.6 Zielsetzung	15
1.7 Lösungsstrategie	15
2 Sesquiterpene in <i>Vitis vinifera</i>: Reifeprofil, Lokalisation und Gehaltsbestimmung ...	17
2.1 Sesquiterpenprofil am Beispiel Lemberger und Gewürztraminer (Exokarp, Reife)....	17
2.2 Veränderung des Profils im Reifeverlauf und Rebsortendifferenzierung	24
2.3 Weitere flüchtige Verbindungen im Emissionsprofil des Exokarps	33
2.4 Headspace-Profil des Mesokarps	35
2.5 Möglichkeiten zur Quantifizierung	36
2.6 Sesquiterpenprofile der Blüten	38
3 Sesquiterpenbiosynthese	43
3.1 Versuchsmodell	43
3.2 Bestimmung der Einbaurrate markierter Präkursoren	45
3.3 Untersuchung der Kompartimentierung der Biosynthesewege	48
3.4 Bestimmung der Stereochemie von Germacren D und Bewertung des Markierungsmusters weiterer Sesquiterpene, Reife	51
3.5 Bestimmung der Stereochemie von Germacren D und Bewertung des Markierungsmusters weiterer Sesquiterpene, Preveraison	55
3.6 Einfluss der mikrobiellen Flora auf die Emission von Sesquiterpenen.....	57
4 Methyljasmonat-induzierte Terpenbiosynthese	59
4.1 Grundlagen	59
4.2 Methyljasmonatinduzierte Terpenbiosynthese in Exo- und Mesokarp nach direkter Applikation	66

4.3	Zeitabhängigkeit des Emissionsprofils.....	72
4.4	Zeitabhängige Emission unter Verwendung von d ₂ -DOX.....	75
4.5	Freilandversuch	77
5	Zusammenfassung	81
6	Experimenteller Teil.....	83
6.1	Pflanzenmaterial	83
6.2	Dynamische Headspace-Extraktion.....	84
6.3	Quantifizierung der Sesquiterpene in der Wachsschicht.....	84
6.4	In vivo Applikationen von d ₂ -DOX, d ₂ -MVL oder MeJA.....	84
6.5	Kontinuierliche Headspace-Messung nach MeJA-Applikation bzw. Applikation von MeJA und d ₂ -DOX.....	85
6.6	Freilandversuch	85
6.7	Analytik	86
6.7.1	SPME.....	86
6.7.2	GC-MS-System	87
6.7.3	GC-MS-Messung.....	87
6.7.4	Chirale Messungen	87
6.7.5	GC×GC-qMS - Messungen	88
6.7.6	Statistische Auswertung.....	88
6.8	Synthesen.....	89
6.8.1	Synthese von [² H ₂ -5,5]-Deoxy-D-xylulose.....	89
6.8.2	Synthese von [² H ₂ -5,5]-Mevalonolacton	90
	Anhang	91
	Literaturverzeichnis.....	125
	Danksagung.....	133
	Publikationsliste	135

Abkürzungsverzeichnis

Bzgl.	bezüglich
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMNT	4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien
DOX	1-Deoxy-D-xylulose
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-phosphat
DXS	1-Deoxy-xylulose-1-phosphat Synthase
FPP	Farnesyldiphosphat
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldihsphat
GLV	green leaf volatiles
h	Stunden
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HMGR	Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase
HS	Headspace
HSCoA	Coenzym A
IPP	Isopentenylidiphosphat
JA	Jasmonat
lq	liquid
MDGC	Multidimensionale GC
MeJA	Methyljasmonat
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MVA	Mevalonoacid (Mevalonsäure)
MVL	Mevalonolacton
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
n	Anzahl der Proben
n.b.	nicht bestimmt
n.q.	nicht quantifiziert
O	Olfaktometrie
PA	Polyacrylat
RI	Retentionsindex
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure

SBSE	stir bar sorptive extraction
SIS	single ion selection
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
sog.	sogenannte(r)
SPE	solid phase extraction
SPME	solid phase micro extraction
TD	Thermo-Desorption
TIC	Totalionenchromatogramm
TMTT	4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen
TOF	time of flight
VvGerD	Germacren D-Synthase
VvVal	Valencen-Synthase
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln des Schlüsselaromastoffs (-)-Rotundon (1), des potentiellen Markers α -Ylangen (2) sowie des möglichen Vorläufersesquiterpens α -Guaien (3)	1
Abbildung 2: Rotundongehalt in <i>Vitis vinifera</i> (Wein, Trauben) und anderen Pflanzen.....	2
Abbildung 3: Biosynthese von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat über den MVA- und den DOXP-Weg.....	5
Abbildung 4: Kompartimentierung der Terpenbiosynthese	6
Abbildung 5: Generierung verschiedener cyclischer Sesquiterpen-Carbokationen aus Farnesyldiphosphat.....	8
Abbildung 6: Grundgerüste, die sich vom Germacran-Grundskelett ableiten lassen	9
Abbildung 7: Mögliche Generierung von β -Bourbonen aus Germacren D	9
Abbildung 8: Manueller SPME-Halter mit SPME-Faser (A) und SPME-Probenahme (B)	13
Abbildung 9: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm (TIC) der Rebsorten Lemberger (A) und Gewürztraminer (B) (Exokarp, Reife: 12.10.2010)	17
Abbildung 10: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm der Rebsorten Lemberger (A) und Gewürztraminer (B), vergrößerter Elutionsbereich der Sesquiterpene	18
Abbildung 11: Strukturformeln der in <i>Vitis vinifera</i> nachgewiesenen Sesquiterpene.....	20
Abbildung 12: Mögliche Generierung verschiedener Sesquiterpene aus Germacren D.....	22
Abbildung 13: Mögliche Generierung verschiedener Sesquiterpene aus Germacren C	23
Abbildung 14: Verschiedene Rebsorten zur Preveraison (oben) und Veraison (unten)	24
Abbildung 15: Emittierte Sesquiterpene (Summenparameter) verschiedener Rebsorten im Reifeverlauf (n=2, 2009).....	25

Abbildung 16: Chromatogramme zur Veränderung des Sesquiterpenprofils im Reifeverlauf für die Rebsorte Lemberger	26
Abbildung 17: Veränderung der Sesquiterpenprofile im Reifeverlauf bei verschiedenen Rebsorten.....	27
Abbildung 18: Kanonische Diskriminanzanalyse zur Unterscheidung der Sesquiterpenprofile der untersuchten Rebsorten zur Reife	29
Abbildung 19: Korrelation von (<i>E,E</i>)- α -Farnesen mit anderen Sesquiterpenen der Rebsorte Gewürztraminer.....	31
Abbildung 20: Korrelation von Guaia-6,9-dien und Selina-4,6-dien in verschiedenen Rebsorten.....	31
Abbildung 21: Veränderung des Caryophyllen- und Humulen-Verhältnisses im Reifeverlauf bei den Rebsorten Spätburgunder, Riesling, Siegerrebe, Silvaner, Gewürztraminer und unaromatischer Gewürztraminer	32
Abbildung 22: Monoterpene verschiedener aromatischer Rebsorten (Exokarp, Reife)	34
Abbildung 23: Strukturformeln der im Headspace verschiedener Rebsorten nachweisbaren Monoterpene und des Diterpenes 13- <i>epi</i> -Manoyloxid.....	34
Abbildung 24: Vergleich der HS-SPME-Messungen des Meso- und Exokarps	35
Abbildung 25: Apparatur zur dynamischen Headspace-Extraktion.	37
Abbildung 26: Blütenentwicklung	38
Abbildung 27: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm: Lemberger, Blüte (13.06.2013)	39
Abbildung 28: Strukturformeln der in Blüten nachweisbaren Sesquiterpene.....	40
Abbildung 29: Sesquiterpenprofil der Blüten zu unterschiedlichen Terminen der Blütenentwicklung (n=3).....	41
Abbildung 30: Korrelation zwischen Valencen und 7- <i>epi</i> - α -Selinen	42

Abbildung 31: Strukturformeln eingesetzter Deuterium-markierter Präkursoren und der daraus generierten markierten Isoprenoidbausteine d ₂ -IPP und d ₂ -DMAPP.....	43
Abbildung 32: Applikationsmöglichkeiten der markierten Präkursoren.....	44
Abbildung 33: Chromatogramm und Massenspektren von markiertem und unmarkiertem Germacren D nach Applikation von d ₂ -MVL	45
Abbildung 34: Charakteristische Ionenspuren unmarkierter und markierter Sesquiterpene nach Applikation von d ₂ -MVL (Lemberger, Reife).....	47
Abbildung 35: Deuteriumeinbau nach Applikation von d ₂ -MVL und d ₂ -DOX (Lemberger, Exokarp).....	50
Abbildung 36: Einbau markierter Präkursoren in die Germacren D-Enantiomere	52
Abbildung 37: Enantioselektive Analyse der Germacren D Enantiomere in <i>Solidago canadensis</i> und <i>Vitis vinifera</i> cv. Lemberger (Reife)	53
Abbildung 38: Einbau Deuterium-markierter Präkursoren in Sesquiterpene zur Preveraison 55	
Abbildung 39: Enantioselektive Analyse der Germacren D Enantiomere in <i>Solidago canadensis</i> und <i>Vitis vinifera</i> cv. Lemberger (Preveraison)	56
Abbildung 40: Einfluss der Oberflächendesinfektion auf des Emissionsprofil und die biosynthetische Aktivität des Exokarps.....	57
Abbildung 41: Biosynthese von Jasmonsäure.....	61
Abbildung 42: Verschiedene Induktoren von Abwehrmechanismen	62
Abbildung 43: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm des Exokarps (Varietät Lemberger, 05.10.2012) nach Applikation von Methyljasmonat (A) und Wasser (B).....	66
Abbildung 44: Cytochrom P450 katalysierte Bildung von DMNT aus Nerolidol.....	67
Abbildung 45: Verschiedene, über Methyljasmonat induzierbare Sesquiterpenmuster.....	68

Abbildung 46: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm des Mesokarps (Rebsorte Lemberger, 05.10.2012) nach Applikation von Methyljasmonat (A) und Wasser (B).....	70
Abbildung 47: Emissionrate von Indol, Mono-, Homo- und Sesquiterpenen als Funktion der Zeit nach Methyljasmonatapplikation.....	73
Abbildung 48: Einbauraten der zeitabhängigen Emissionsstudien nach Methyljasmonat- und d ₂ -DOX-Applikation.....	76
Abbildung 49: Induktion von Sesquiterpenen in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblätter.....	78
Abbildung 50: Induktion von Linalool in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblätter.....	78
Abbildung 51: Synthese von [² H ₂ -5,5]-Deoxy-D-Xylulose erfolgte nach Meyer et al. (2004)	89
Abbildung 52: Synthese von [² H ₂ -5,5]-Mevalonolacton erfolgte nach Simpson et al. (1997).	90

Abbildungsverzeichnis des Anhangs

Abbildung A 1: HS-SPME-GC×GC-qMS-Analyse und Vergleich mit eindimensionaler Trennung (Gewürztraminer).....	93
Abbildung A 2: Vergleich der HS-SPME- GC-MS Chromatogramme von Gewürztraminer und dem unaromatischen Gewürztramerklon.	94
Abbildung A 3: Mögliche Bildung von Humulen und Caryophyllen	95
Abbildung A 4: Einbau deuteriummarkierter Präkursoren in Monoterpene des Mesokarps am Beispiel α -Terpineol.	96
Abbildung A 5: Einbau deuteriummarkierter Präkursoren in das Diterpen 13- <i>epi</i> -Manoyloxid	97
Abbildung A 6: Einbau von Deuterium nach Applikation von d_2 -MVL und d_2 -DOX in Sesqui-, Mono- und Diterpene, verschiedene Rebsorten (Exokarp).....	98
Abbildung A 7: Korrelation der erzielten Einbauraten nach Applikation von d_2 -MVL und d_2 -DOX, verschiedene Rebsorten (Exokarp).	99
Abbildung A 8: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene γ -Cadinen, α -Ylangen, α -Copaen und Selina-4,6-dien über d_6 -(R)-Germacren D nach Steele et al. (1998)	100
Abbildung A 9: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene Guaia-6,9-dien, δ -Elemen und Selina-4,6-dien über d_5 -Germacren C nach Steele et al. (1998)	101
Abbildung A 10: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene Germacren B und γ -Elemen nach Steele et al. (1998).....	102
Abbildung A 11: Massenspektren von unmarkierten und markierten α -Ylangen (A) und γ -Cadinen (B) sowie die Markierungsmuster.....	103
Abbildung A 12: Massenspektren von unmarkierten und markierten δ -Elemen (A), Guaia-6,9-dien (B) und Selina-(4,6)-dien (C) sowie die Markierungsmuster.....	104

Abbildung A 13: Massenspektren von unmarkierten und markierten γ -Elemen (A) und Germacren B (B) sowie die Markierungsmuster.....	105
Abbildung A 14: Massenspektren von unmarkierten und markierten Cubebol (A), (<i>E,E</i>)- α -Farnesen (B) und (<i>E,Z</i>)- α -Farnesen (C) sowie die Markierungsmuster.	106
Abbildung A 15: Massenspektren von nicht identifizierten, unmarkierten und markierten Sesquiterpenen (A: RI 1533; B: RI 1597).	107
Abbildung A 16: HS-SPME-GC-MS Messung von Ocimen, zur Bestimmung einer etwaigen Umsetzung zu Cosmen.....	108
Abbildung A 17: Markierungsmuster von d_6 -Nerolidol (A) und mögliche Markierungsmuster von DMNT aus d_2 -Nerolidol (B).....	109
Abbildung A 18: Zeitabhange Emission von Monoterpenen, Sesquiterpenen, dem Homoterpen DMNT und Indol nach Methyljasmonatapplikation	110
Abbildung A 19: Prozentuale Einbaurate von d_2 -DOX nach Methyljasmonatapplikation als Funktion der Zeit.....	111
Abbildung A 20: Induktion von (<i>E</i>)- β -Ocimen in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblatter	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Markierungsstudien zur Ermittlung der, bei der Terpenbiosynthese, partizipierten Biosynthesewege.....	7
Tabelle 2: Bisher nachgewiesene Sesquiterpene in Weintrauben und Wein unter Angabe der angewandten analytischen Methode.....	10
Tabelle 3: Übersicht der beprobten Rebsorten	15
Tabelle 4: In <i>Vitis vinifera</i> identifizierte Sesquiterpene und deren charakteristische Ionenspuren zur Ermittlung der Sesquiterpenprofile	19
Tabelle 5: Prozentuale Anteile der Mono- und Sesquiterpene sowie des Diterpens 13- <i>epi</i> -Manoyloxid im HS-Profil verschiedener Rebsorten	33
Tabelle 6: Quantitative Bestimmung der in der Wachsschicht akkumulierten Sesquiterpene .	36
Tabelle 7: Quantitative Bestimmung der emittierten Sesquiterpene	37
Tabelle 8: Übersicht der in Blüten identifizierten Sesquiterpene.....	40
Tabelle 9: Charakteristische Fragmente genuiner und Deuterium-markierter Terpene in Lemberger und Syrah nach Applikation von d ₂ -DOX und d ₂ -MVL.....	47
Tabelle 10: Maximal erzielter Einbau von d ₂ -DOX und d ₂ -MVL in Mono-, Sesqui- und Diterpene des Exokarps nach Applikation in intakte Beeren, n=1	49
Tabelle 11: Natürlich und künstlich induzierte Abwehrmechanismen verschiedener Pflanzenspezies	63
Tabelle 12: Natürlich und künstlich induzierte Abwehrmechanismen von <i>Vitis</i>	64
Tabelle 13: Statistische Auswertung (ANOVA) induzierbarer Verbindungen in verschiedenen Rebsorten, 48 h nach Applikation, Exokarp.....	69
Tabelle 14: Statistische Auswertung (ANOVA) induzierbarer Verbindungen in verschiedenen Rebsorten, 48 h nach Applikation, Mesokarp	71

Tabelle 15: SPME-Bedingungen der durchgeführten Versuche..... 86

Tabellenverzeichnis des Anhangs

Tabelle A 1: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2009, Geisenheim)	113
Tabelle A 2: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2010, Geisenheim)	113
Tabelle A 3: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2012, Bonn)	113
Tabelle A 4: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Geisenheim, 2009, n=2).....	114
Tabelle A 5: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Geisenheim, 2010, n=3).....	115
Tabelle A 6: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Bonn, 2012, n=3)	116
Tabelle A 7: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Preveraison	117
Tabelle A 8: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Veraison.....	118
Tabelle A 9: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Reife	119
Tabelle A 10: Signifikante Unterschiede im Sesquiterpenprofil der Rebsorten Lemberger, Riesling, Spätburgunder und Syrah.....	120
Tabelle A 11: Korrelationen diverser Sesquiterpene	121
Tabelle A 12: Sesquiterpenprofil der Blüten verschiedener Rebsorten	122
Tabelle A 13: Charakteristische Fragmente genuiner und deuteriummarkierter Terpene in Gewürztraminern nach Applikation von d ₂ -DOX und d ₂ -MVL	123
Tabelle A 14: Ionenspuren zur Berechnung des Deuteriumeinbaus nach Applikation von d ₂ -DOX und Methyljasmonat, Abschnitt 4.4	124

1 Einleitung

1.1 Rotundon – ein Sesquiterpen als Schlüsselaromastoff für das pfeffrige Weinaroma

Das Weinaroma ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Hundert verschiedener flüchtiger Verbindungen, wobei nur ein Teil direkt zum Aroma beiträgt. Entscheidend für den Einfluss auf das Aroma sind Geruchsschwelle und Konzentration der jeweiligen Verbindung, aber auch synergistische, antagonistische oder maskierende Effekte durch andere Weinhaltstoffe^{[1], [2]}. Einige Verbindungen werden als Schlüsselaromastoff bezeichnet, da diese das Weinaroma maßgeblich prägen. Hierzu zählen z.B. 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanon¹ oder Isopropylmethoxypyrazin^{2[2]}.

Weinaromastoffe können verschiedenen Ursprungs sein und von den verarbeiteten Trauben („Traubenbukett“), von an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen oder vom Eichenholz bei einer Fassreifung stammen. Aromastoffe, die traubeneigenem Ursprungs sind, prägen das sortentypische Weinbukett^[2]. Eine zentrale Rolle spielen hierbei Monoterpene. Weißweine können anhand von 12 Monoterpenen als „Muskat-, Riesling und Silvaner/Weißburgunder-Typ“ klassifiziert werden^[3].

Impulsgebend für diese Arbeit ist eine Veröffentlichung aus dem Jahre 2008 in der erstmals ein Sesquiterpen als Schlüsselaromastoff für das pfeffrige Aroma der Rebsorte Syrah³ beschrieben wurde^[4]. Bis dato konnte zwar gezeigt werden, dass dieses Aroma stark mit dem Sesquiterpen α -Ylangen (Abbildung 1) korreliert, α -Ylangen jedoch nicht zum besagten Aroma beiträgt^[5].

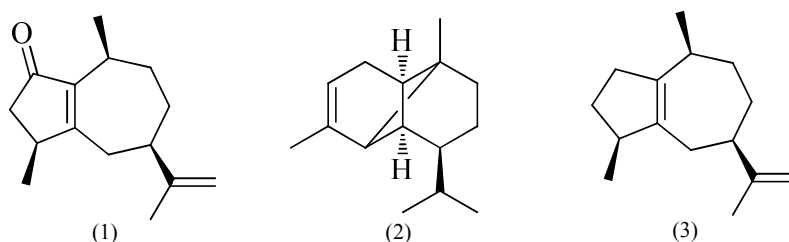


Abbildung 1: Strukturformeln des Schlüsselaromastoffs (-)-Rotundon (1), des potentiellen Markers α -Ylangen (2) sowie des möglichen Vorläufersesquiterpens α -Guaien (3)

¹ Aroma: Passionsfrucht, Geruchsschwellenwert 0,8 ng/L in Wasser/Ethanol

² Aroma: Grüne Paprika, Geruchsschwellenwert 2 ng/L in Wasser

³ Auch Shiraz oder Hermitage genannt

Über GC-MS-O konnten die sensorischen Attribute schließlich einer einzigen Verbindung zugewiesen werden, dem Sesquiterpen Rotundon (Abbildung 1), das bis dahin nur aus Agarwood und *Cyperus rotundus* (Nussgras) bekannt war^{[6],[7]}. In Pfeffer und in weiteren Gewürzpflanzen wurden sogar deutlich höhere Gehalte an Rotundon nachgewiesen (Abbildung 2)^[4].

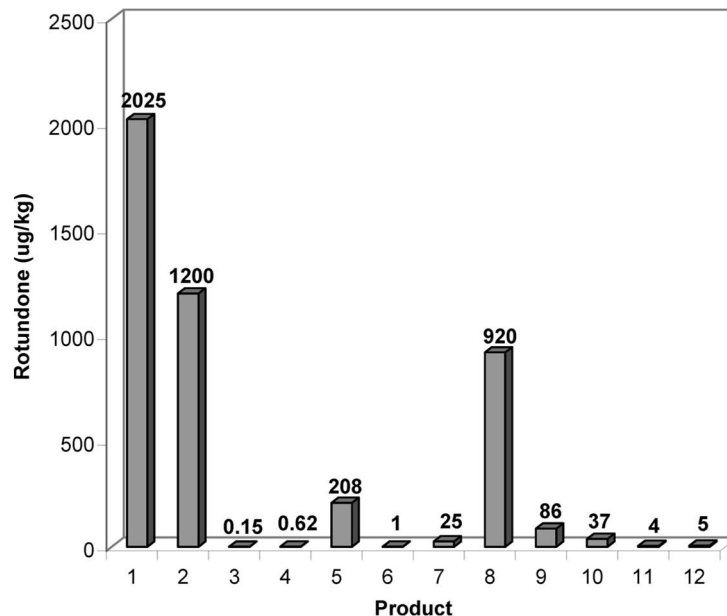


Abbildung 2: Rotundongehalt in *Vitis vinifera* (Wein, Trauben) und anderen Pflanzen. Reprinted (adapted) with permission from *From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound*. Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J.. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (10), 3738–3744. Copyright 2008 American Chemical Society. Die Nummerierung entspricht: 1) Weißer Pfeffer (*Piper nigrum*); 2) Schwarzer Pfeffer (*Piper nigrum*); 3) Wein (*Vitis vinifera* cv. Syrah); 4) Trauben (*Vitis vinifera* cv. Syrah); 5) Majoran (*Origanum majorana*); 6) Oregano (*Origanum vulgare*); 7) Pelargonie (*Pelargonium alchemilloides*); 8) Nussgras (*Cyperus rotundus*); 9) Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*); 10) Melde (*Atriplex cinerea*); 11) Basilikum (*Ocimum basilicum*); 12) Thymian (*Thymus vulgaris*)^[4]

Mit einem Geruchsschwellenwert von 16 ng/L in Wein und 8 ng/L in Wasser ist Rotundon ein potenter Aromastoff. In einem Sensorikpanel erwiesen sich allerdings 20% der Beteiligten gegenüber Rotundon als geruchsblind^[4].

Die Bestimmung von Rotundon in Wein und Trauben nach Siebert et al. (2008) erfolgt über eine doppelte Anreicherung, bei der einer SPE die SPME-GC-MS Analyse nachgeschaltet ist sowie anschließender Quantifizierung mittels SIVA (Stabilisotopenverdünnungsanalyse) unter Verwendung von d₅-Rotundon^[8].

Neben der Rebsorte Syrah ist auch die vorrangig in Österreich angebaute Rebsorte Grüner Veltliner für sein an schwarzen Pfeffer erinnerndes Aroma bekannt und wird im österreichischen Sprachgebrauch auch als das „Pfefferle“ bezeichnet. Der sensorische Eindruck des „Pfefferle“ konnte von Mattivi et al. (2011) analytisch bestätigt werden⁴ [9]. In niedrigen Konzentrationen konnte Rotundon zudem in Cabernet Sauvignon nachgewiesen werden^[4].

Wood et al. (2008) beschreiben weiterhin, dass die Rotundonkonzentration von Jahrgang und Region abhängig ist, wobei „pfeffrige Weinberge“ Australiens in den kühleren Lagen vorzuherrschen scheinen^[4]. Auch die Kontaktzeit mit der Maische bei der Weinherstellung sowie enthaltene Blätter und Stiele scheinen Einfluss auf die Rotundonkonzentration zu haben^{[10],[11]}. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, wie es zur Bildung von Rotundon kommt. Es besteht die Möglichkeit, dass Rotundon durch Oxidation des Sesquiterens α -Guaien (Abbildung 1) entsteht. Ob die Oxidation enzymatisch oder einfach über Luftsauerstoff hervorgerufen wird, ist nicht geklärt. Jüngst konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Oxidation des α -Guaiens durch Luftsauerstoff zum Rotundon möglich ist^[12].

1.2 Terpenbiosynthese

Bausteine aller Terpene (Isoprenoide) sind die C₅-Diphosphate Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und Isopentenylidiphosphat (IPP). Anhand der Isoprenoideinheiten lassen sich Terpene in Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und Polyterpene (>C₄₀) unterteilen^[13].

In der Pflanzenzelle gibt es zwei, in intrazellulären Kompartimenten getrennte, Biosynthesewege zur Generierung von IPP und DMAPP. Bis in die neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts war nur der Mevalonat-Weg (MVA-Weg) bekannt (Abbildung 3). Die Bildung von IPP erfolgt hierbei über insgesamt drei Moleküle Acetyl-Coenzym A, die über eine Claisen-Kondensation und nachgeschalteter Aldolreaktion zum 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reagieren. Nach Reduktion zur Mevalonsäure, die Namensgeber des Biosynthesewegs ist, erfolgt eine enzymvermittelte Phosphorylierung und anschließende Decarboxylierung zum IPP^{[13],[14]}. Über Fütterungsexperimente konnte schließlich der in Bakterien, Algen und Pflanzen vorkommende Deoxy-D-xylulose-phosphat-

⁴ n=2, Rotundonkonzentration 63 bzw. 266 ng/L

Weg (DOXP)⁵ identifiziert werden (Abbildung 3)^{[16]-[18]}. Bei diesem Biosyntheseweg erfolgt die Generierung von IPP/DMAPP über Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat, die auf erster Stufe zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat verknüpft werden. Eine Reduktion und intramolekulare Umlagerung führt letztlich zum Intermediat 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP). Nach Aktivierung der Hydroxygruppe an Position C₄ durch einen Cytidylphosphatrest und die Phosphorylierung der OH-Gruppe an Position C₂ erfolgt eine Cyclisierung zum 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. Über zwei sukzessive reduktive Dehydratisierungsschritte, über das Intermediat 4-Hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl-diphosphat, erfolgt schließlich die Bildung beider C₅ Diphosphate Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und Isopentenylidiphosphat (IPP)^[14].

In der Pflanzenzelle liegen beide Biosynthesewege räumlich getrennt in zwei Kompartimenten vor. Der MVA-Weg ist im Cytoplasma lokalisiert und liefert Isoprenoideinheiten zur Generierung von Sesqui- und Triterpenen, während der DOXP-Weg in den Plastiden lokalisiert ist und zur Bildung von Mono- und Diterpenen beiträgt (Abbildung 4).

Die Trennung der beiden Biosynthesewege ist jedoch nicht absolut. Abhängig von der Pflanzenspezies kann ein Intermediat-Transfer über die Plastidmembran erfolgen. Dieser Substrataustausch wird auch als „metabolic cross talk“ bezeichnet (Abbildung 4). Bick und Lange (2003) konnten mit isolierten Chloroplasten von Spinat, Kohl und Indischem Senf den Transfer von IPP und Geranyl-diphosphat (GPP) bestätigen. Sie vermuteten ein einfachgerichtetes Transportsystem zum Export spezifischer Isoprenoid-Intermediate. Geringere Transferraten waren für Farnesyldiphosphat (FPP) und DMAPP nachweisbar, während Geranylgeranyl-diphosphat und Mevalonsäure kaum transportiert wurden^[19].

⁵ Bevorzugte Bezeichnung: Methylerythritol-4-phosphat-Weg (MEP-Weg)^[15]

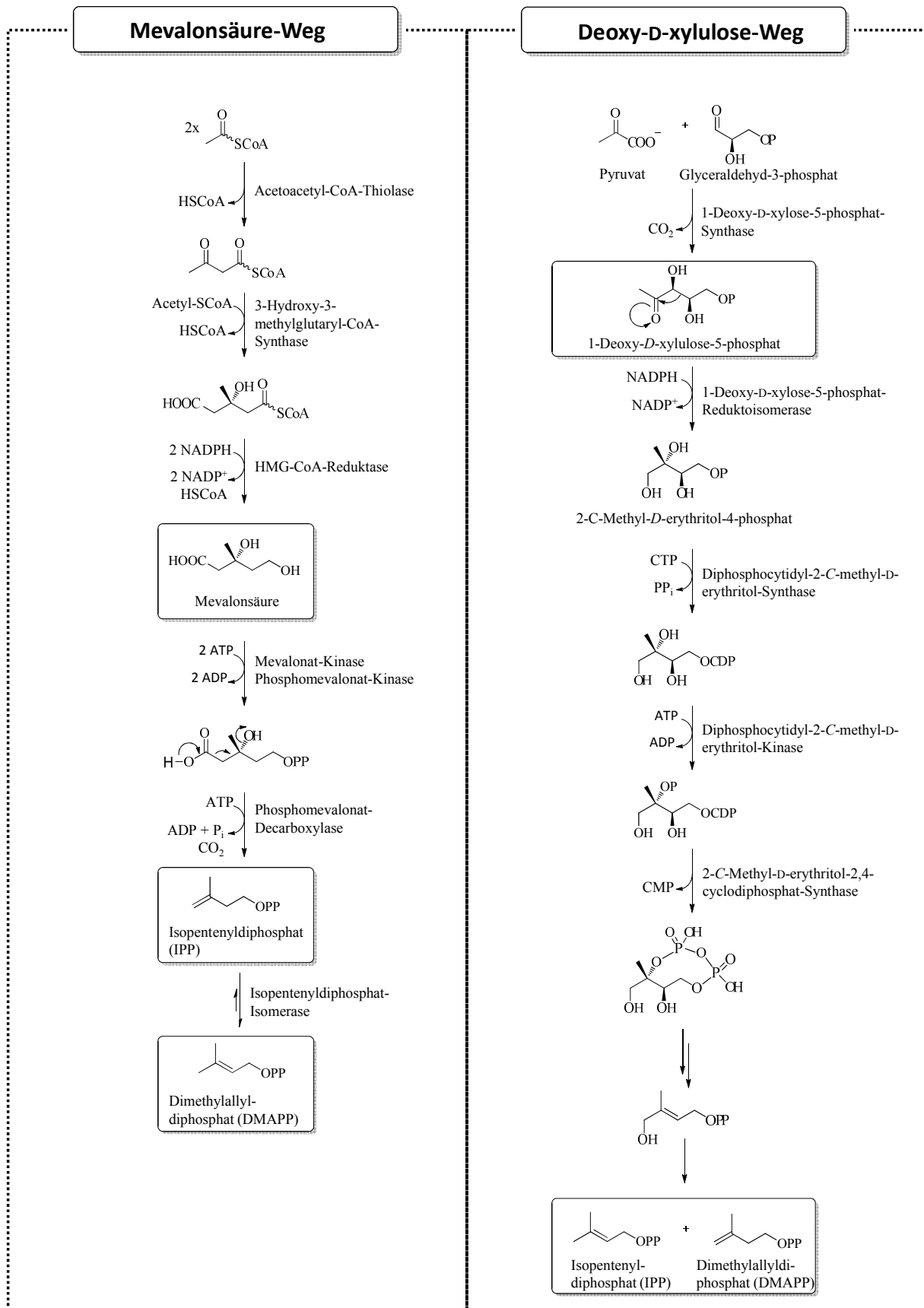


Abbildung 3: Biosynthese von Isopentenyl-diphosphat und Dimethylallyl-diphosphat über den MVA- und den DOXP-Weg

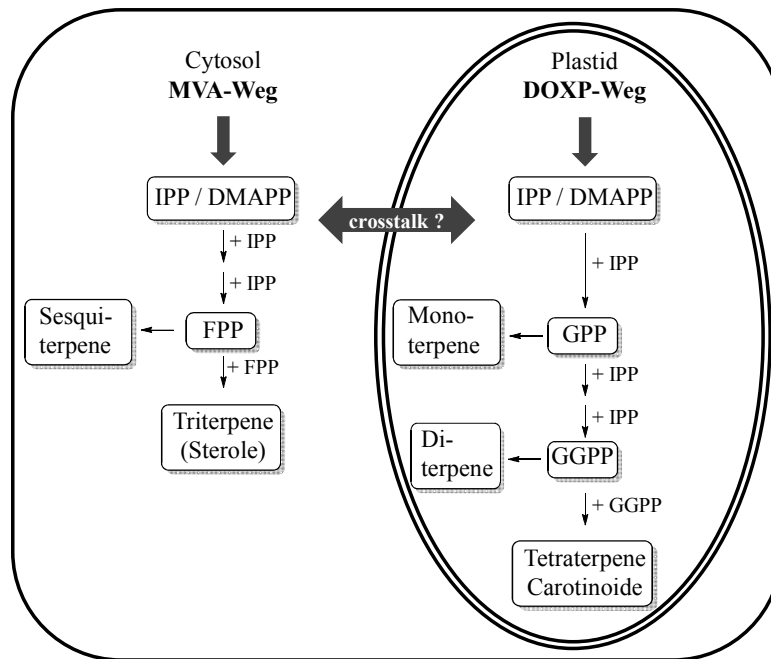


Abbildung 4: Kompartimentierung der Terpenbiosynthese. Die Abkürzungen entsprechen: Isopentenylidiphosphat (IPP); Dimethylallyldiphosphat (DMAPP); Farnesyldiphosphat (FPP); Geranylidiphosphat (GPP); Geranylgeranylidiphosphat (GGPP)

Tabelle 1 zeigt eine Auswahl bisher durchgeführter Biosynthesestudien an unterschiedlichen Pflanzenspezies. Zur Untersuchung der Biosynthesewege können Stabilisotopen-markierte (z.B. ^2H oder ^{13}C) Präkursoren verwendet werden. Als Präkursor eignen sich hierbei z.B. Glucose, Pyruvat oder die spezifischen Intermediate der Biosynthesewege Mevalonsäure und Deoxyxylulosephosphat. Hervorzuheben sind die Studien von Hampel et al. (2005) und Luan et al. (2002), die bereits die Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen in Blättern sowie von Monoterpenen in Beeren von *Vitis vinifera* untersucht haben (Tabelle 1)^{[20],[21]}. Die Biosynthese von Sesquiterpenen in den Beeren wurde bis dato noch nicht untersucht und ist Bestandteil dieser Arbeit.

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Markierungsstudien zur Ermittlung der, bei der Terpenbiosynthese, partizipierten Biosynthesewege. Dargestellt sind die maximalen prozentualen Einbauraten.

Pflanzenspezies	Monoterpene		Sesquiterpene		Literatur
	MVA	DOX	MVA	DOX	
<i>Phaseolus lunatus</i> (Limabohne)	20	90	90	60	[22]
<i>Vitis vinifera</i> , Blätter	1	74	13	31	[20]
<i>Daucus carota</i> L. Cultivar Kazan (Karotte), Wurzel	-	51	41	42	[23]
<i>Gossypium hirsutum</i> (Baumwolle), Keimling (2. Blatt)	5	15	4	4	[24]
<i>Vitis vinifera</i> (Beere, Exokarp)	-	2	n.b.¹	n.b.¹	[21]

1) n.b. = nicht bestimmt

1.3 Strukturelle Diversität der Sesquiterpene

Die Biosynthese der Sesquiterpene erfolgt aus Farnesyldiphosphat. Durch die Kettenlänge und die drei Doppelbindungen ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Cyclisierungsmechanismen zu reaktiven Carbokationen (Abbildung 5). Nachgeschaltete Cyclisierungen, Hydrid- oder Methyl-Verschiebungen, Cope- sowie Wagner-Meerwein-Umlagerungen führen zu diversen Grundgerüsten^[25]. Die Grundgerüste werden als gesättigte Strukturen angegeben⁶. Allein aus dem Germacran-Grundgerüst leiten sich eine Vielzahl polycyclischer Sesquiterpene ab (Abbildung 6).

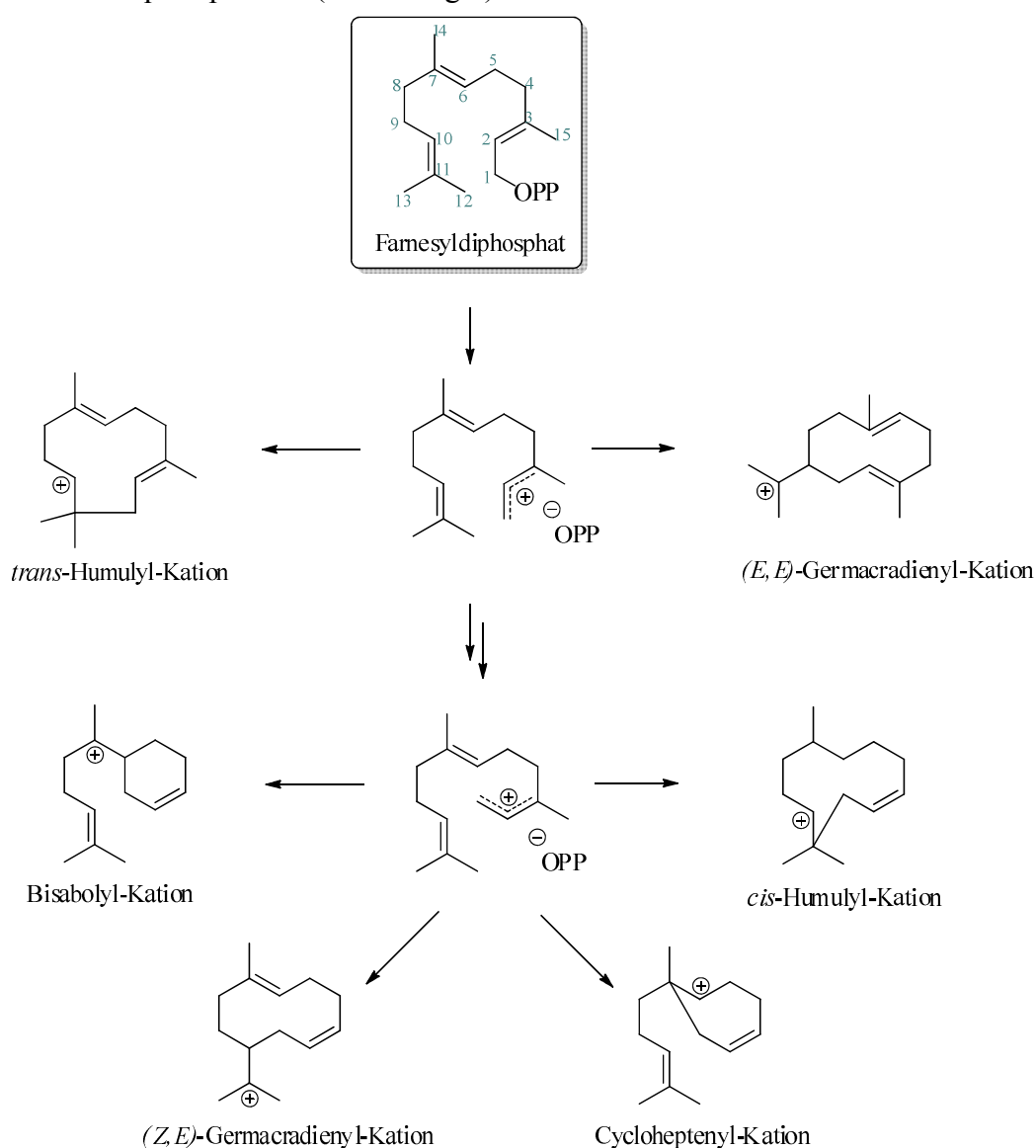


Abbildung 5: Generierung verschiedener cyclischer Sesquiterpen-Carbokationen aus Farnesyldiphosphat^[25]

⁶ Ausnahme bilden hierbei Calamene und Cadalen. Diese Grundgerüste zeichnen sich durch das aromatische System aus. Sie gehören der übergeordneten Gruppe der Cadinane an, vgl. Abbildung 6

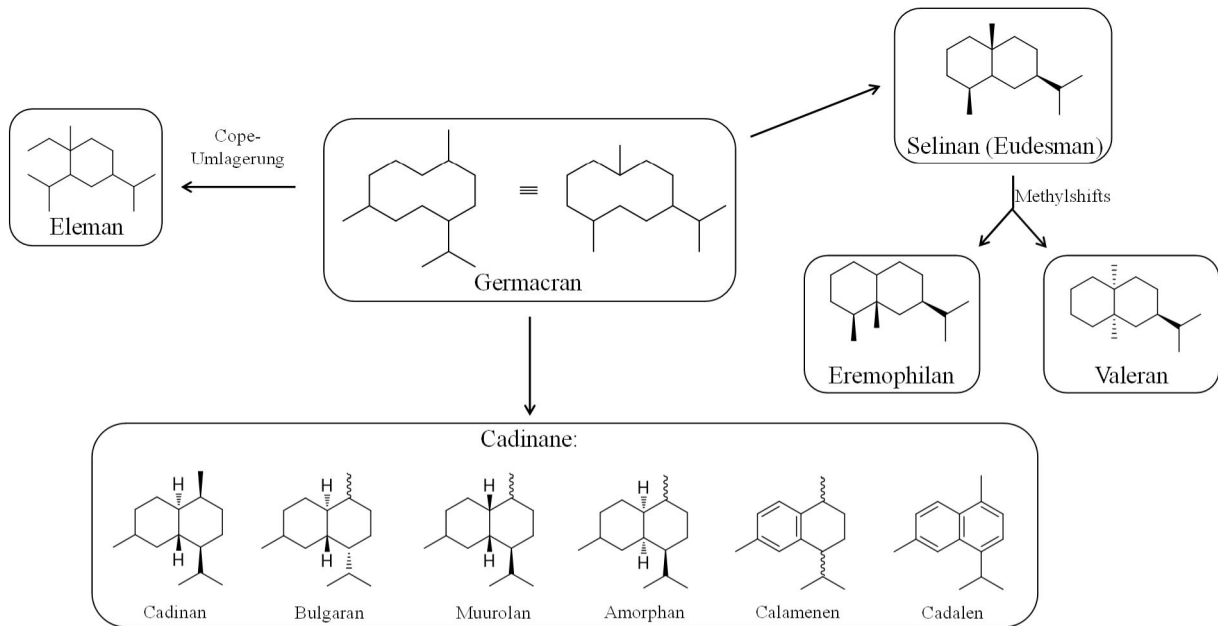


Abbildung 6: Grundgerüste, die sich vom Germacran-Grundskelett ableiten lassen^[13]

Häufig werden Sesquiterpensynthesen als „multiple product“-Synthesen bezeichnet, da einzelne Enzyme verschiedene Sesquiterpene generieren können. So bildet eine Sesquiterpensynthase, isoliert aus *Abies grandis* (Küstentanne) 32 verschiedene Sesquiterpene, mit δ -Selinan als Hauptkomponente^[26].

Aber auch säure-, hitze-, oder photoinduzierte Umlagerungsreaktionen sind bekannt. Germacren D bildet z.B. im sauren Milieu ein ähnliches Produktspektrum an Cadinan-, Muurolan- und Amorphanverbindungen wie die Natur^[27]. Die photoinduzierte 2+2-Cycloaddition zum β -Bourbonen aus dem Germacren D ist ebenfalls beschrieben (Abbildung 7)^[28].

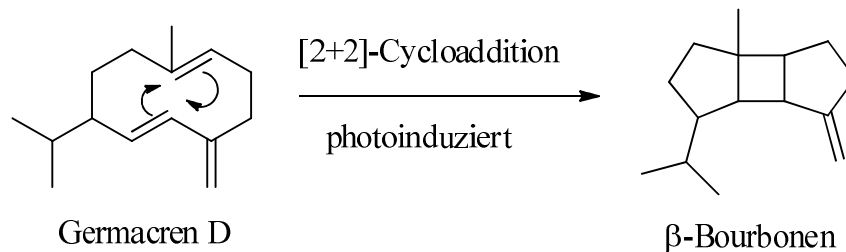


Abbildung 7: Mögliche Generierung von β -Bourbonen aus Germacren D^[28]

1.4 Sesquiterpene in *Vitis vinifera*

Bereits 1976 konnten Schreier et al. (1976) 14 Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Weintrauben identifizieren. Der über Flüssig-Flüssigextraktion hergestellte Extrakt enthielt α -Copaen, β -Ylangen, β -Bourbonen, β -Caryophyllen, α -Guaien, α -Humulen, α - und γ -Muurolen, Germacren D, β -Selinen, α -Farnesen, γ - und δ -Cadinen und Calamenen. In den untersuchten Rebsorten Riesling, Traminer, Ruländer, Müller-Thurgau, Scheurebe, Optima und Riesländer konnten jedoch keine sortenbedingten Unterschiede festgestellt werden^[29].

In den darauf folgenden Jahren sind Sesquiterpene in *Vitis vinifera* aus dem Forschungsschwerpunkt gerückt. Erst über den Einsatz sensitiverer Extraktionsmethoden (solid phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction, (SBSE)) sowie empfindlicherer Massenspektrometer, teilweise unter Verwendung multidimensionaler Chromatographie (MDGC, GC \times GC), wurden diverse Sesquiterpene bei non-target Analysen miterfasst.

Tabelle 2: Bisher nachgewiesene Sesquiterpene in Weintrauben und Wein unter Angabe der angewandten analytischen Methode

Beeren/ Wein	Rebsorte	Methode	Nachgewiesene Sesquiterpene	Literatur
Beeren	Baga	HS-SPME- GC-MS	(+)-Cyclosativen, γ -Elemen, α -Ylangen, β -Bourbonen, β -Cubeben, β -Caryophyllen, 3,7-Guaiadien, (+)-Aromadendren, α -Amorphen, (-)- δ -Selinen, Germacren D, <i>epi</i> -Zonaren, β -Cadinen, (-)-Isoleden, γ -Cadinen, δ -Cadinen, α -Muurolen, α -Calacoren	[31]
Beeren ¹	Cabernet Sauvignon	HS-SPME- GC-MS	β -Caryophyllen, α -Humulen, α - und γ -Muurolen, Calamenen, α -Cubeben, α -Copaen	[32] [33]
Beeren	Riesling	HS-SPME- GC-MS	α -Muurolen	[33]
Wein	Sercial, Tinta Negra Mole, Verdelho, Boal, Malvasia	SBSE/TDGC- MS	α -Cadinol, ι -Muurolol, γ -Eudesmol, Nerolidol	[34]
Wein	Cabernet Sauvignon	HS-SPME- GC \times GC- TOFMS	α -Cedren, Aromadendren, β -Farnesen, α -Curcumen, (<i>E</i>)-Calamen, (<i>Z</i>)- β -Guaien, 1,10-Oxidocalamenen, α -Amorphen, α -Farnesen, β -Bisabolen, α -Alasken, δ -Cadinen, Cubenol, α -Panasinsen, β -Sesquiphellandren, β -Vetivenene, 4,5,9,10-dehydro-Isolongifolen, α -Calacoren, Nerolidol, β -Calacoren, Cadalene, α -Bisabolol, (<i>Z</i>)-Farnesol	[35]
Wein	Cabernet Sauvignon, Pinotage	SPE, GC \times GC- TOFMS	β -Farnesen, (<i>Z,E</i>)- α -Farnesen, Nerolidol, α -Bisabolol, (<i>2E,6E</i>)-Farnesol	[36]

1) frühes Reifestadium

In Tabelle 2 sind bisher nachgewiesene Sesquiterpene in Weintrauben und Wein aufgeführt. Es fällt auf, dass in den Beeren vorrangig Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden konnten, während im Wein vermehrt oxidierte Sesquiterpene präsent sind.

In Tresterbränden sind ebenfalls Sesquiterpene nachweisbar. Versini et al. (1994) konnten zeigen, dass Beerenhäute und Tresterbrände des Gewürztraminers Methylfarnesoat, Farnesol und zwei α -Farnesen-Isomere ($3Z,6E$ und E,E) enthalten^[37]. Die besagten acyclischen Sesquiterpene waren nur in den reifen Trauben nachweisbar. Andere untersuchte Rebsorten (Gelber Muskateller, Roter Traminer, Rosenmuskateller) zeigten nur sehr geringe Gehalte dieser Sesquiterpene^[37]. Auch in weiteren Arbeiten zu Tresterbränden⁷ konnten verschiedene Sesquiterpene (e.g. α - und β -Ylangen, α - und β -Copaen, α -Bourbonen, trans- α -Bergamoten, Isoledene, Germacrene D, β -Selinen, α -Muurolen, α -Farnesen, β -, γ - und δ -Cadinen, trans-Calamenen, Calacoren, *epi*-Zonaren, α -Farnesol) nachgewiesen werden^{[38],[39]}.

Es ist wahrscheinlich, dass Sesquiterpene durch ihren unpolaren Charakter in der Wachsschicht akkumuliert werden. Bei der Untersuchung der Wachsschicht von Beeren (Rebsorte Storgozia) auf akkumulierte Verbindungen, konnten die Sesquiterpene α -Amorphen, Muurolol und Cypren nachgewiesen werden. Die Beeren wurden hierfür in Aceton getaucht und der erhaltene Extrakt anschließend über GC-MS analysiert^[30].

Neben Trauben, Wein und Tresterbränden wurden ebenfalls die Blüten verschiedener Rebsorten untersucht. Blüten emittieren flüchtige Verbindungen zum Anlocken von Insekten zwecks Bestäubung. Für Blüten von *Arabidopsis thaliana* konnte zudem gezeigt werden, dass die Emission des Sesquiterpens (*E*)- β -Caryophyllen vor mikrobiellen Befall schützt und damit zur normalen Entwicklung der Samen beiträgt^[40]. Buchbauer et al. (1994, 1995) zeigten, dass auch Blüten von *Vitis* vorwiegend Sesquiterpene emittieren. Es wurden die Sesquiterpene β -Bisabolen, γ -Cadinen, β -Caryophyllen, β -Caryophyllenoxid, α -Farnesen, β -Farnesen, α - und δ -Guaien, α -Humulen, Nerolidol, β -Selinen und Valencen in den Blüten verschiedener roter und weißer Rebsorten identifiziert. Weiterhin konnten die Emissionsprofile rebsortenabhängig unterschieden werden^{[41],[42]}.

Bisher konnten verschiedene Sesquiterpen-Synthasegene in Gewürztraminer und Spätburgunder identifiziert und über Enzymassays funktionell charakterisiert werden^{[43],[44]}. Im Gewürztraminergenom wurden eine Valencen-Synthase (*VvVal*) sowie eine (-)-Germacren D-Synthase (*VvGerD*) identifiziert, deren Transkription in den geschlossenen Blütenknospen am höchsten waren. Martin et al. (2010) beschreiben für den Spätburgunder 13 verschiedene

⁷ Rebsorten: Albríño, Treixadura, Godello, Loureira, Dona Branca, Torrontés, Istrien Malvasia, Chardonnay, Muscat Blanc, Rose Muscat of Poreč, Teran, Cabernet Sauvignon

Sesquiterpensynthesen, die unter Verwendung von FPP ein breites Produktspektrum verschiedener Sesquiterpene bilden. Weiterhin sind aber auch eine (*E*)- β -Ocimen/(*E,E*)- α -Farnesen-Synthase sowie Linalool/(*E*)-Nerolidol-Synthase beschrieben, die Substratabhängig bei Verabreichung von GPP Ocimen bzw. Linalool bilden, bei Verabreichung von FPP hingegen Farnesen oder Nerolidol^[44]. Zudem wurden bisher die Transkriptionsprofile verschiedener Sesquiterpen-Synthasegene während der verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert. Lücker et al. (2004) konnten zeigen, dass die Transkriptionsprofile der VvVal und VvGerD in den Blütenknospen am höchsten waren. Ebenso konnten in den Blütenknospen hohe Transkriptionslevel einer α -Farnesen-Synthase, α -Humulen-Synthase, α -Bergamoten-Synthase und Selina-4(14),11-dien-Synthase gefunden werden^[45]. In beiden Studien war nur noch eine geringe oder keine Transkription in den Beeren nachweisbar. Martin et al. (2012) haben während der Beerenreife Transkriptionsprofile einer Linalool-/Nerolidolsynthase, einer (*E*)- α -Bergamotensynthase und einer Germacren D-Synthase untersucht, wobei alle drei Transkriptionsprofile am Ende der Veraison⁸ (Linalool/Nerolidol-Synthase) bzw. nach der Veraison (Germacren D-Synthase, (*E*)- α -Bergamotensynthase) anstiegen^[46].

Onofrio et al (2009) untersuchten zudem bereits *in vitro* den Einfluss von Methyljasmonat auf Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Methyljasmonat wird häufig als Induktor zur Untersuchung von pflanzlichen Verteidigungsmechanismen⁹ eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Methyljasmonat die Biosynthese diverser Sesquiterpene (bis zu 25 verschiedene, u.a. β -Caryophyllen, α -Cubeben, α -Copaen und δ -Cadinen) induziert. Methyljasmonat bewirkte eine verstärkte Expression von drei Genen des MVA-Biosynthesewegs: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase (HMGS), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMGR) und Phosphomevalonat-Decarboxylase (MPDC). Dahingegen wurde nur ein Gen des DOXP-Wegs durch Methyljasmonat verstärkt exprimiert, das Enzym Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol Kinase (IspE) (Abbildung 3)^[47].

⁸ Beginn der Reife (Zuckereinlagerung), rote Rebsorten beginnen sich zu verfärben, vgl. Abschnitt 2.2

⁹ Zugrunde liegendes Phytohormon ist ein Konjugat der *cis*-Jasmonsäure mit Isoleucin, vgl. Abschnitt 4.1

1.5 Solid Phase Microextraction (SPME)

SPME (Solid Phase Microextraction, Festphasenmikroextraktion) ist ein 1990 von Pawliszyn entwickeltes Verfahren. Es handelt sich hierbei um eine schnelle, lösungsmittelfreie Extraktionstechnik, die eine Probennahme und Analytaufkonzentration vereint. Ermöglicht wird dies durch eine beschichtete Faser (Abbildung 8A, (2)), die Analyten adsorptiv bindet. Es werden verschiedene Beschichtungen angeboten (z.B. PDMS (Polydimethylsiloxan), PA (Polyacrylat), DVB (Divinylbenzen)), die sich in ihrer Polarität und damit in der Affinität unterscheiden. Die Faser befindet sich in einer Hohlneedle (Abbildung 8A, (1)), mit der durch hermetisch geschlossene Probengefäße gestochen werden kann und anschließend die Faser der Probe exponiert wird (Abbildung 8B).

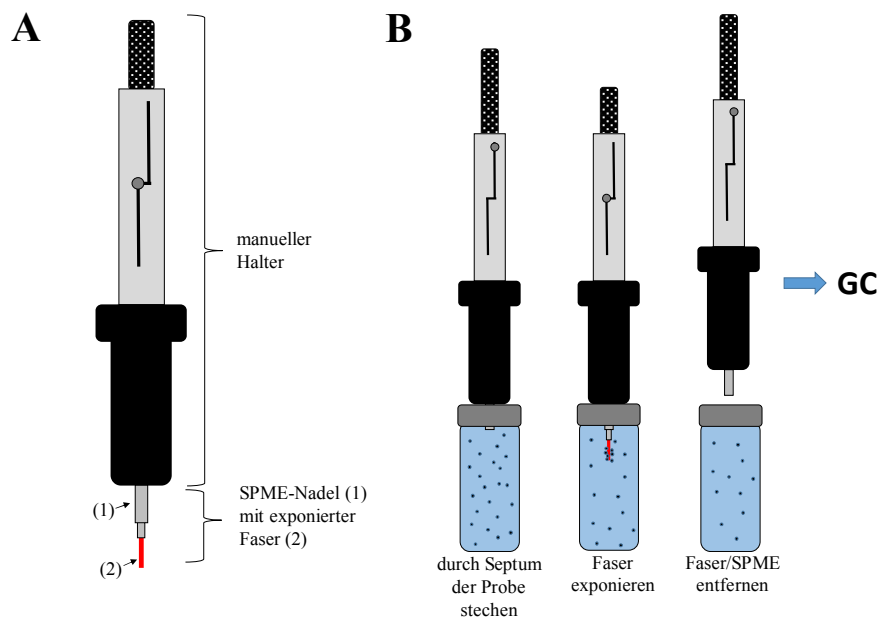


Abbildung 8: Manueller SPME-Halter mit SPME-Faser (A) und SPME-Probenahme (B)

Die Probennahme kann über die Headspace-Technik oder über Immersion erfolgen. Die Headspace-Technik wird bei flüchtigen Analyten bevorzugt angewandt. Die Faser wird hierbei im Headspace (HS, Gasraum) über der Probe exponiert. Flüchtige Verbindungen können an die Faser adsorbieren, während schwerflüchtige Matrixbestandteile abgetrennt bleiben. Die Extraktion kann durch das Temperieren der Probe oder Salzzusatz verbessert werden. Eine Immersion wird bei schwerer bzw. schwer flüchtigen Analyten bevorzugt durchgeführt. Die Faser taucht hierbei in die Probenlösung ein, was jedoch den negativen Einfluss der

Probenmatrix erhöht (Extraktion unerwünschter Komponenten, Kurzlebigkeit der Faser). Daher findet die Immersion bei deutlich weniger Fragestellungen Anwendung.

Bei der Probenahme über HS-SPME ist die anschließende gaschromatographische Analyse geeignet, während der Immersion je nach erwartetem Analytspektrum GC oder HPLC nachgeschaltet werden kann. Die Faser wird hierbei im Injektor exponiert und die Analyten durch die hohe Injektortemperatur (GC) oder einem geeigneten Lösungsmittel (HPLC) desorbiert.

$$\frac{n_f}{n_0} = \frac{K_{fs}V_f}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad (1)$$

n_f	= Anteil des Analyts auf der Faser
n_0	= Totaler Anteil des Analyts im Probenahme-System
K_{fs}	= Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen Faser und Probe
K_{hs}	= Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen Headspace und Probe
V_f	= Volumen der Faserbeschichtung
V_s	= Volumen der Probe
V_h	= Volumen des Headspace

Die Anreicherung des Analyten an die Faser wird jedoch durch viele Faktoren bestimmt. Die dargestellte Formel (1) beschreibt die Verteilung eines Analyten bei einer HS-SPME-Messung zwischen Lösung, Gasraum und Faser^[48]. Dieses Gleichgewicht wird durch die Matrixbeschaffenheit (Salzkonzentration; andere Analyten, die z.B. konkurrieren), Extraktionstemperatur und Extraktionszeit verändert. Eine Quantifizierung ist aufgrund dessen schwierig, lässt sich aber über stabilisotopenmarkierte, interne Standards, Standardaddition oder Multiple-Headspaceextraktion ermöglichen^[49]. Steht jedoch nicht die absolute Quantifizierung sondern das Erfassen von Profilen bzw. Profiländerungen im Vordergrund, ist die HS-SPME-Technik durch die schonende, lösungsmittelfreie Analytextraktion und die schnelle, automatisierbare Durchführung von Vorteil.

1.6 Zielsetzung

Im Fokus dieser Arbeit steht zum einen die Bestimmung des Sesquiterpenprofils verschiedener Rebsorten bzw. eine Rebsortendifferenzierung bei großer Variationsbreite des Probenmaterials (verschiedene Jahrgänge, zwei verschiedene Anbauregionen) sowie die Bestimmung der an der Biosynthese der Sesquiterpene in *Vitis vinifera* beteiligten Biosynthesewege sowie die Modulation und Regulation des Sesquiterpenprofils (reifeabhängige Modulation, Jasmonat induzierte Modulation).

1.7 Lösungsstrategie

Die Bestimmung des Sesquiterpenprofils verschiedener Rebsorten und Reifegrade erfolgte über HS-SPME-GC-MS, differenziert nach Exo- und Mesokarp. Das Probenmaterial umfasste rote und weiße Rebsorten sowie aromatische¹⁰ und neutrale Rebsorten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der beprobten Rebsorten

Rebsorte	Klon	Aroma, Farbe	Anbauregion ¹
Riesling	64-177 Gm	aromatisch, weiß	GH
Gewürztraminer	11 Gm	aromatisch, weiß	GH, BN
Gewürztraminer	FR 46-107	neutral, weiß	GH
Gelber Muskateller	Fr 90	aromatisch, weiß	GH
Silvaner	1 Gm	neutral, weiß	GH
Siegerrebe	k.A.	aromatisch, weiß	GH
Spätburgunder	20 Gm	neutral, rot	GH, BN
Lemberger	Elite We	neutral, rot	GH, BN
Syrah	R 99	neutral, rot	GH, BN
Cabernet Sauvignon	R 5	neutral, rot	GH
<i>Vitis labrusca</i>	k.A. ²	k.A. ² , rot	GH

1) GH: Geisenheim, Hessen; BN: Bonn, NRW

2) k.A.: keine Angabe

¹⁰ monoterpenreich

Der Gewürztraminerklon FR 46-107 wird auch als unaromatischer Traminer bezeichnet, da er im Vergleich zu anderen Traminerklonen sehr niedrige Monoterpenkonzentrationen aufweist^[50]. Bei der Siegerrebe handelt es sich um eine Kreuzung aus Gewürztraminer und Madeleine angévine. *Vitis labrusca* ist eine nordamerikanische Wildrebe^[51].

Für die Biosynthesestudien wurden Schlüsselverbindungen der jeweiligen Biosynthesewege (DOXP-, MVA-Weg) deuteriummarkiert in Form von [²H₂-5,5]-Deoxy-D-xylulose (d₂-DOX) und [²H₂-5,5]-Mevalonolacton (d₂-MVL) synthetisiert. Nach Applikation der Präkursoren sollte ein etwaiger Deuteriumeinbau in Sesquiterpene und damit die Beteiligung der Biosynthesewege über HS-SPME-GC-MS erfasst werden.

Weiterhin sollte betrachtet werden, inwiefern das Phytohormon Jasmonsäure die Terpenbiosynthese, mit Fokus auf Sesquiterpene, reguliert. Auch hier wurden Applikationsstudien mit Methyljasmonat durchgeführt und die Änderung des Emissionsprofils über HS-SPME-GC-MS erfasst.

2 Sesquiterpene in *Vitis vinifera*: Reifeprofil, Lokalisation und Gehaltsbestimmung

2.1 Sesquiterpenprofil am Beispiel Lemberger und Gewürztraminer (Exokarp, Reife)

Für die HS-SPME-GC-MS Messungen wurden ganze Beeren in Headspace-Vials gegeben und die an den Gasraum (Headspace, HS) abgegebenen flüchtigen Verbindungen vermessen. Analog wurde das isolierte, homogenisierte Mesokarp unter Zusatz von Salz (NaCl) über HS-SPME-GC-MS analysiert (Abschnitt 2.4).

In Abbildung 9 sind Chromatogramme der Rebsorten Lemberger und Gewürztraminer dargestellt. Über das angewandte Verfahren lassen sich neben Sesquiterpenen auch Mono- und Diterpene detektieren (Abschnitt 2.3). Der Headspace der Trauben wird jedoch deutlich von Sesquiterpenen, v.a. Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen dominiert. Abbildung 10 zeigt vergrößert den Elutionsbereich der Sesquiterpene. In Tabelle 4 in Verbindung mit Abbildung 11 sind die identifizierten Sesquiterpene und ihre Strukturformeln angegeben.

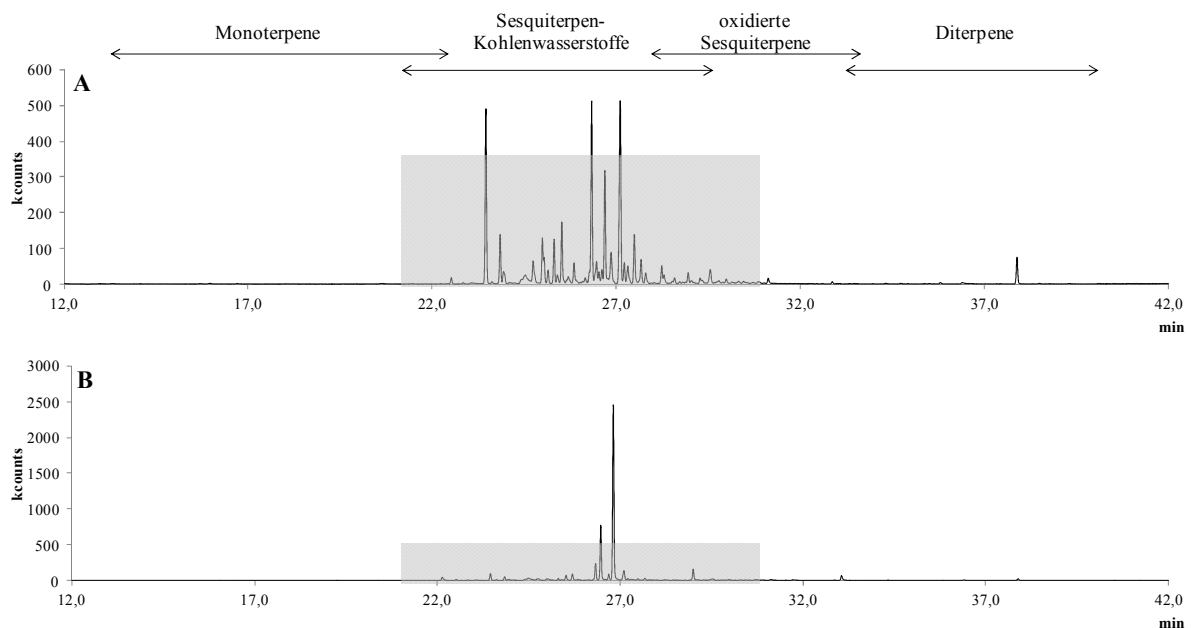


Abbildung 9: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm (TIC) der Rebsorten Lemberger (A) und Gewürztraminer (B) (Exokarp, Reife: 12.10.2010). Elutionsbereiche der verschiedenen Terpenklassen sind über dem Chromatogramm angegeben. Der grau hinterlegte Bereich ist in Abbildung 10 vergrößert dargestellt.

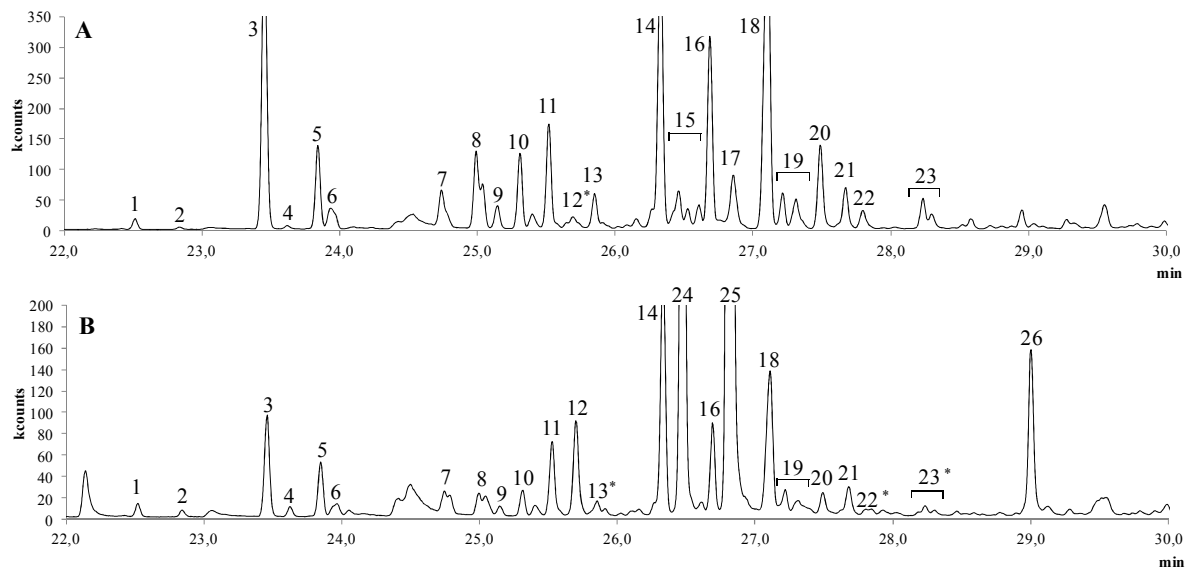


Abbildung 10: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm der Rebsorten Lemberger (A) und Gewürztraminer (B), vergrößerter Elutionsbereich der Sesquiterpene. Die Bezeichnung der nummerierten Sesquiterpene ist Tabelle 4 zu entnehmen. Mit *) gekennzeichnete Sesquiterpene sind nur in Spuren detektierbar. Coeluiierende Sesquiterpene sind nur mit einer Nummer versehen.

Neben den hier aufgeführten Sesquiterpenen sind, in Abhängigkeit des Reifegrads und der untersuchten Rebsorte, weitere Sesquiterpene, z.B. Nerolidol, Methylfarnesoat, Farnesol, Cadalen, sowie in Spuren Cubebol (Tabelle 4 sowie Abbildung 11 Nr. 27-33) nachweisbar. Über die HS-Messungen ganzer Beeren können allein zum Zeitpunkt der Beerenreife mehr als 30 verschiedene Sesquiterpene nachgewiesen werden. Es handelt sich fast ausschließlich um Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe. Einige oxidierte (z.B. Cubebol, Farnesol) sowie aromatische (z.B. Calacoren, Cadalen) Sesquiterpene, sind ebenfalls vertreten. Da einige Verbindungen coeluierten, wurden vergleichshalber Messungen an einem GC×GC-qMS durchgeführt (Abbildung A 1). Die GC×GC-Analyse zeichnete sich durch eine bessere Trennleistung aus, stand aber nicht dauerhaft zur Verfügung. Das nachgewiesene Analytspektrum war über beide Verfahren vergleichbar. Eindimensional coeluiierende Sesquiterpene können zum Teil durch die Wahl geeigneter Ionenspektren (Tabelle 4, Quantifier) differenziert werden.

Tabelle 4: In *Vitis vinifera* identifizierte Sesquiterpene und deren charakteristische Ionenspuren zur Ermittlung der Sesquiterpenprofile

Nr. ¹	Verbindung	Identifizierung ²	RI ³	RI (Lit.)	Quantifier
1	δ-Elementen	b	1337	1339	93, 121
2	α-Cubeben	c	1349	1351	161, 105
3	α-Ylängen	b	1372	1372	161, 119
4	α-Copaen	b	1379	1376	161, 105
5	β-Bourbonen	b	1387	1384	161, 81
6	β-Cubeben	c	1391	1390	161, 105
	β-Elementen	c	1391	1391	161, 105
	unbekannt, RI 1391	-	1391	-	161, 105
7	β-Ylängen	c	1422	1420 ⁴	n.q. ⁵
	(E)-β-Caryophyllen	a	1424	1421	133
8	γ-Elementen	c	1432	1434	121, 161
	unbekannt, RI 1437	-	1437	-	n.q. ⁵
9	unbekannt, RI 1440	-	1440	-	n.q. ⁵
10	Guaia-6,9-dien	c	1444	1443 ⁴	161, 105
11	Selina-4,6-dien	c	1453	1450 ⁴	161, 105
12	Humulen	b	1461	1454	93
13	unbekannt, RI 1469	-	1469	-	n.q. ⁵
14	Germacren D	b	1485	1480	161, 105
15	unbekannt, RI 1489	-	1489	-	n.q. ⁵
	unbekannt, RI 1491	-	1491	-	n.q. ⁵
	unbekannt, RI 1493	-	1493	-	n.q. ⁵
	unbekannt, RI 1496	-	1496	-	n.q. ⁵
16	Epi-Zonaren	c	1499	1497	161, 204
17	unbekannt, RI 1506	-	1506	-	n.q. ⁵
18	γ-Cadinen	c	1517	1513	161, 105
19	δ-Cadinen	c	1521	1524	161, 105
	Calamenen (Isomer)	b	1526	1521	159
20	unbekannt, RI 1533	-	1533	-	122
21	unbekannt, RI 1543	-	1543	-	n.q. ⁵
	α-Calacoren	b	1539	1544	157
22	β-Calacoren	b	1546	1541 ⁴	157
23	Germacren B	c	1564	1559	n.q. ⁵
	γ-Calacoren	b	1566	1554 ⁴	157
24	(E,Z)-Farnesen	a	1491	1480 ⁴	93, 119
25	(E,E)-Farnesen	a	1505	1508	93
26	unbekannt, RI 1597	-	1597	-	n.q. ⁵
27	(E)-β-Farnesen	a	1454	1454	n.q. ⁵
28	Cubebol	c	1519	1514	n.q. ⁵
29	Nerolidol	a	1563	1564	n.q. ⁵
30	Cubenol	b	1648	1645	161, 105
31	Cadalen	b	1679	1675	183
32	Farnesol (Isomer)	a	1719	1694 ⁴	n.q. ⁵
33	(E,E)-Methylfarnesoat	b	1781	1783	69, 121

1) Nummerierung nach Abbildung 10, coeluiierende Sesquiterpene sind nur mit einer Nummer versehen, Sesquiterpene Nr. 27-33 sind nicht in Abbildung 10 angegeben

2) Identifizierung: a = mittels Standardsubstanz identifiziert, b = identifiziert über Massenspektrum und Retentionsindex, c = vorläufig identifiziert über Massenspektrum und Retentionsindex

3) Kovatsindizes (RI) wurden auf einer DB5-Säule bestimmt, RI (Lit.) sind Referenzindizes für DB5-Säulen ^[52]

4) Referenzindizes für DB1-Säulen (MassFinder4®)

5) n.q. = nicht für die Ermittlung der Sesquiterpenprofile (Abschnitt 2.2) quantifiziert

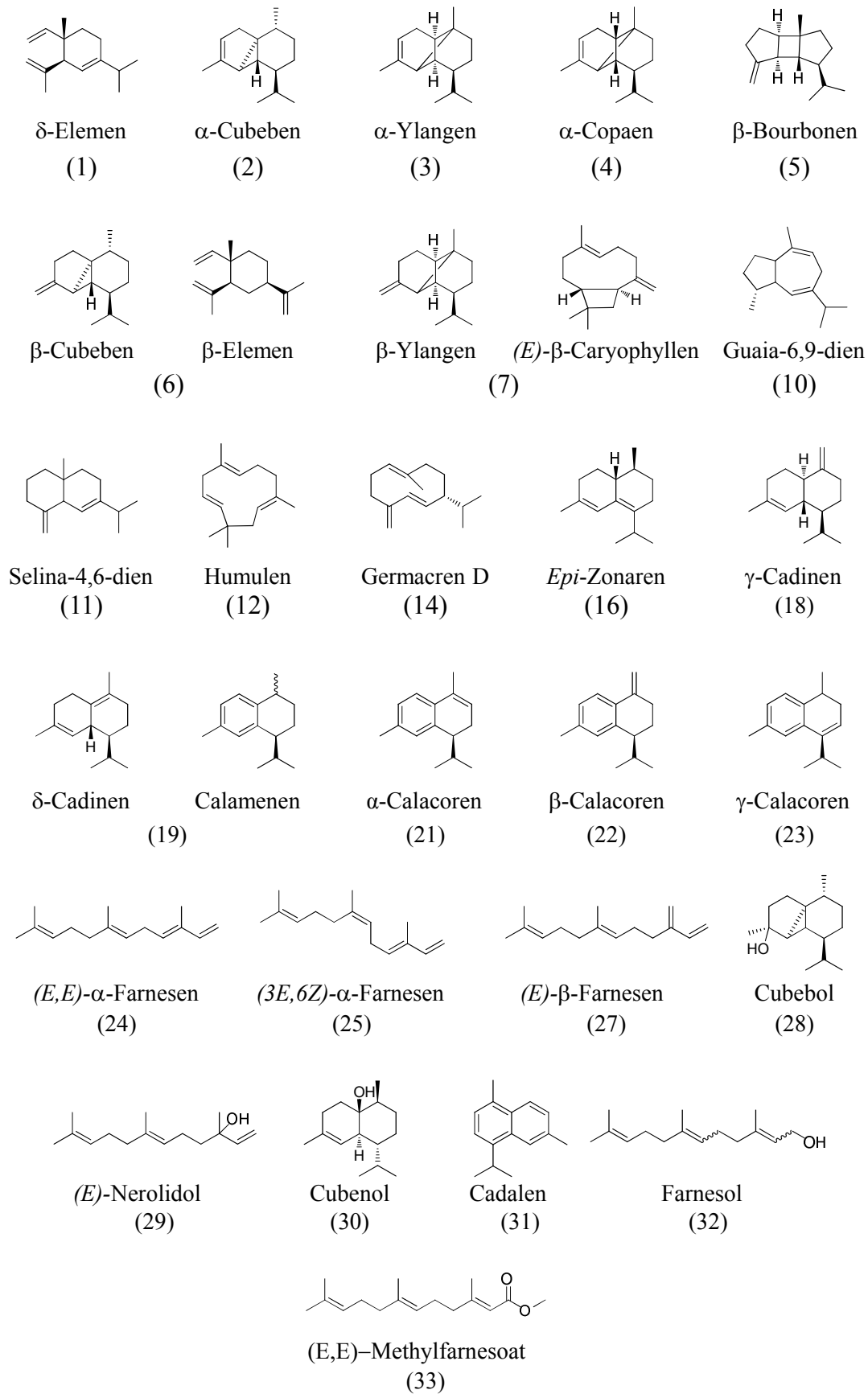


Abbildung 11: Strukturformeln der in *Vitis vinifera* nachgewiesenen Sesquiterpene

Die identifizierten Sesquiterpene entsprechen zu einem Großteil den in der Literatur (Tabelle 2) beschriebenen Verbindungen. Einige in der Literatur beschriebene Sesquiterpene (z.B. Muurolen, α -Guaien) konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe weisen meist sehr ähnliche Fragmentierungsmuster auf. Da Signalen häufig mehrere mögliche Sesquiterpene mit ähnlichem Fragmentierungsmuster und annähernd gleichem Kovatsindex zugeordnet werden konnten, war bei einem Teil der nachweisbaren Sesquiterpene eine Identifizierung nicht möglich. Die nicht identifizierten Sesquiterpene werden im Folgenden mit ihren Kovatsindices angegeben.

Die identifizierten Sesquiterpene weisen unterschiedliche Grundgerüste auf. Während das Headspace-Profil des Gewürztraminers durch die Farnesen-Isomere von acylischen Sesquiterpenen dominiert wird, sind im Profil des Lembergers hauptsächlich mono-, bi- und polycyclische Verbindungen vertreten. Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, lassen sich vom Germacran-Grundgerüst verschiedene weitere Grundgerüste ableiten (Abbildung 6). Auch in den untersuchten Rebsorten lassen sich die Grundgerüste des Typs Germacran, Cadinan, Eleman, Cadalan wiederfinden.

Steele et al. (1998) formulierten bereits für das Produktspektrum einer δ -Selinen-Synthase Cyclisierungsmechanismen. Verschiedene Sesquiterpene, die aus den Intermediaten Germacren D (Abbildung 12) und Germacren C (Abbildung 13) gebildet werden, sind auch in *Vitis* nachweisbar^[26].

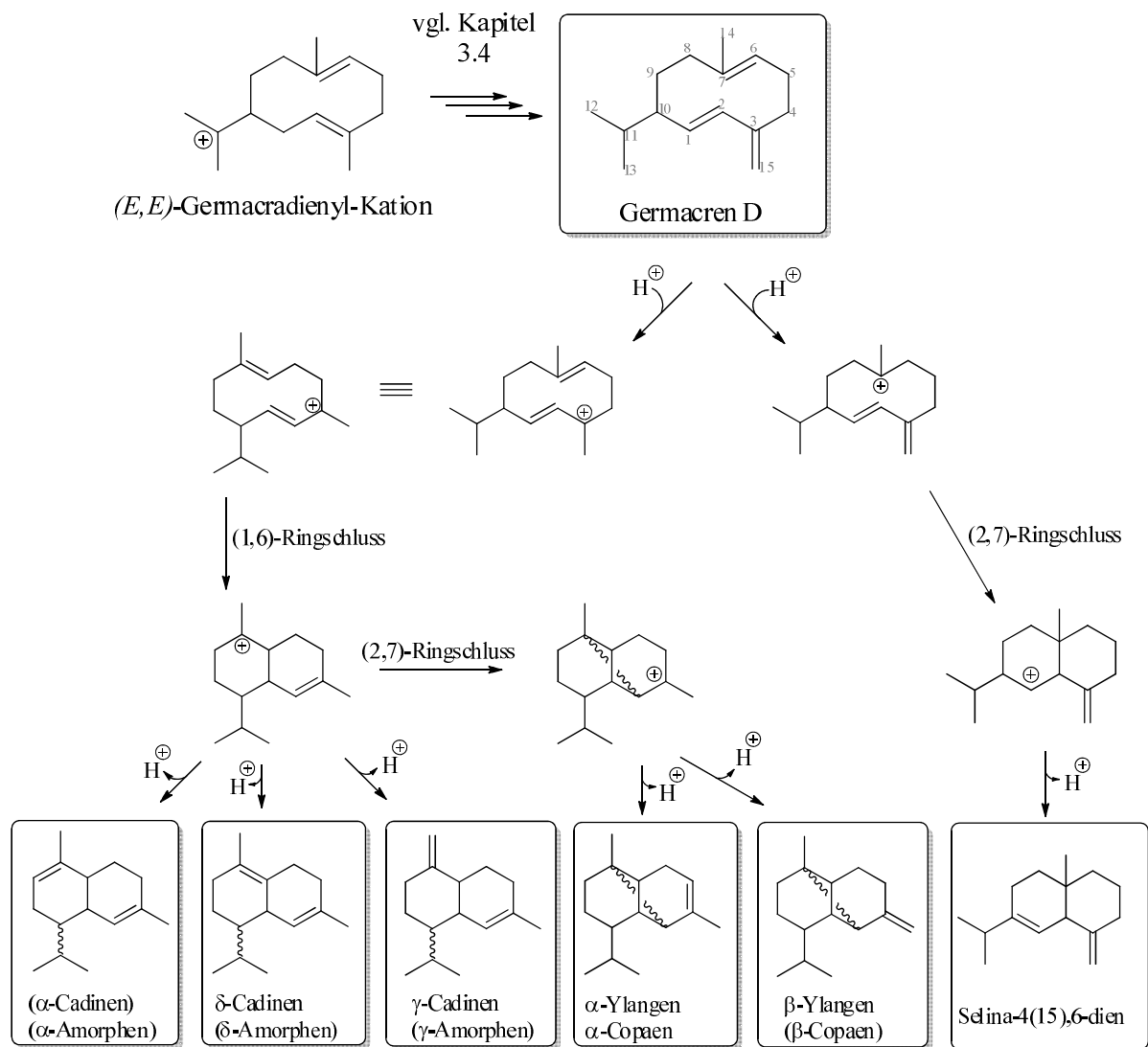


Abbildung 12: Mögliche Generierung verschiedener Sesquiterpene aus Germacren D^[26]. Das von Steele et al. (1998) formulierte Schema wurde um Selina-4,6-dien, γ-Cadinen, γ-Amorphen, β-Ylangen und β-Copaen erweitert. Sesquiterpene in Klammern waren nicht in *Vitis* nachweisbar. Bei den zwei unterschiedlichen Namen unter einer Struktur handelt es sich um Diastereomere.

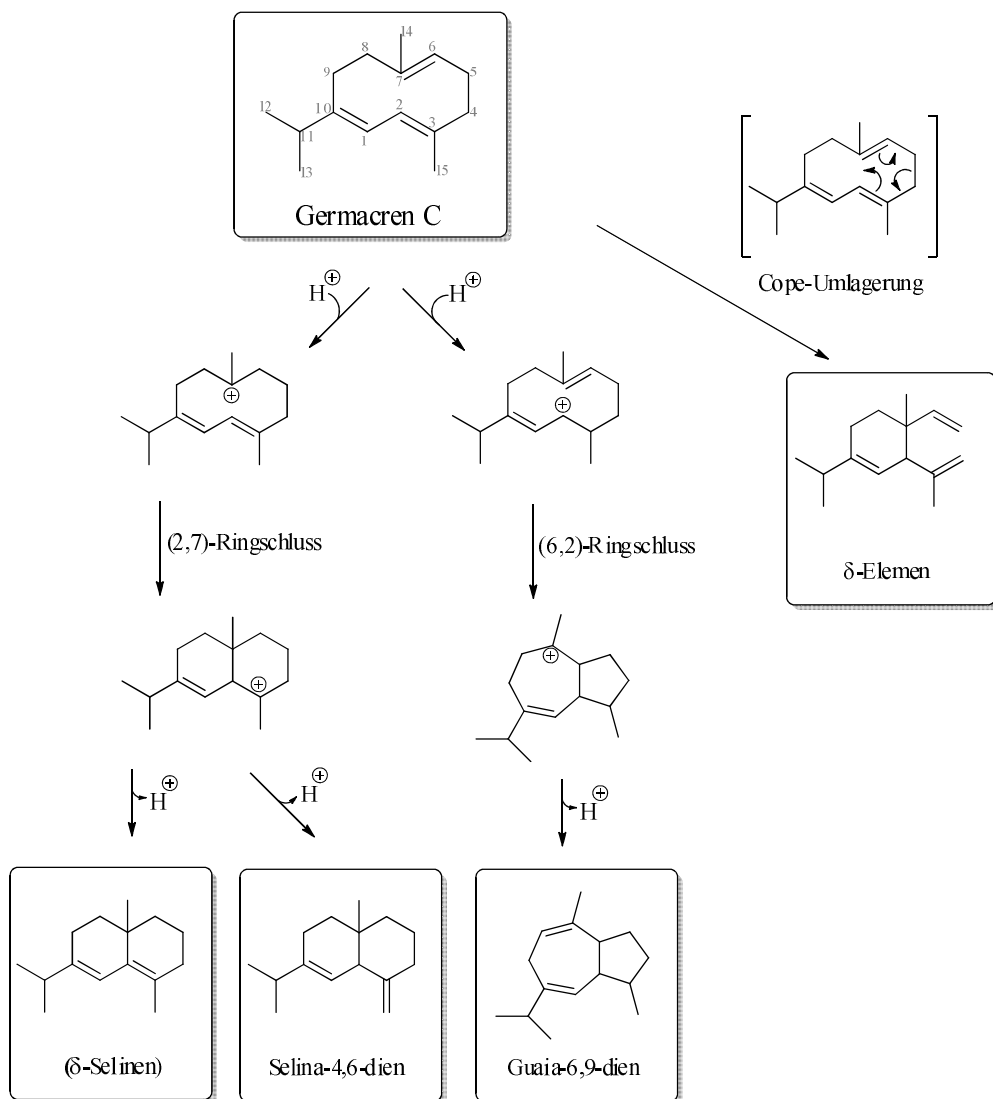


Abbildung 13: Mögliche Generierung verschiedener Sesquiterpene aus Germacren C^[26]. Das von Steele et al. (1998) formulierte Schema wurde um Selina-4,6-dien und δ -Elemen erweitert. Sesquiterpene in Klammern waren nicht in *Vitis* nachweisbar.

2.2 Veränderung des Profils im Reifeverlauf und Rebsortendifferenzierung

Der Verlauf der Beerenreife lässt sich wie folgt unterteilen:

1. Preveraison: Beeren sind noch grün, Zuckergehalt niedrig
2. Veraison: Beginn der Reife (Zuckereinlagerung), rote Rebsorten beginnen sich zu verfärben
3. Reife Traubenlese

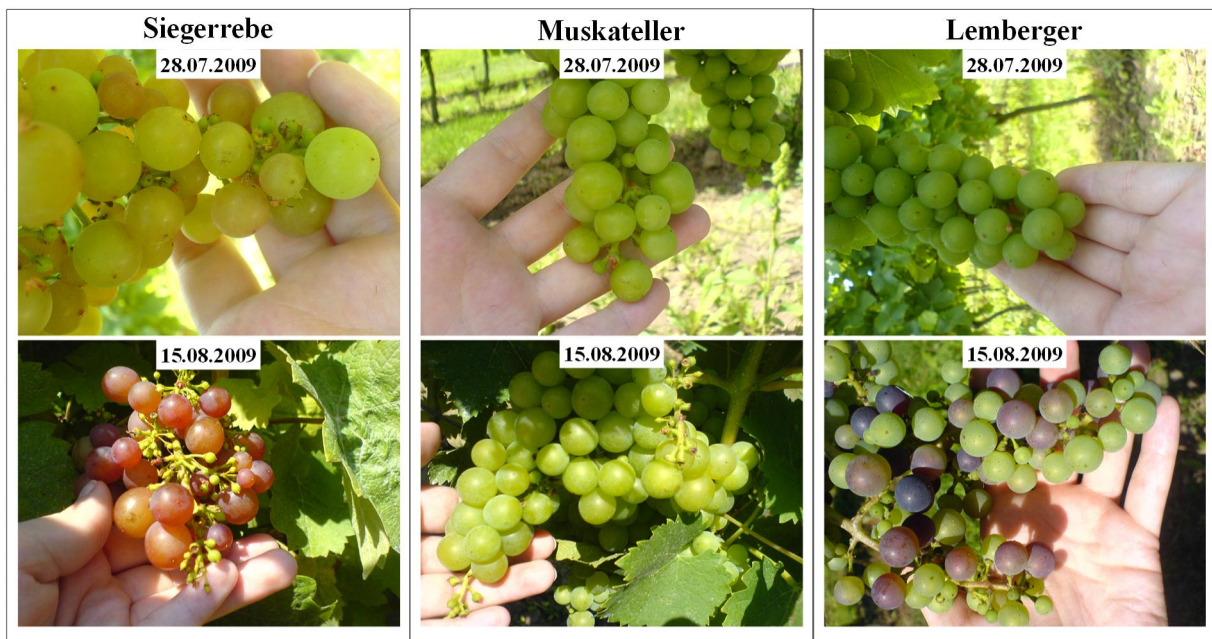


Abbildung 14: Verschiedene Rebsorten zur Preveraison (oben) und Veraison (unten). Dargestellt sind die Preveraison für Lemberger und Muskateller (28.07.2009) sowie Veraison für Lemberger und Muskateller (15.08.2009). Da die Siegerrebe durchschnittlich 4-6 Wochen früher reift entspricht der Termin 28.07.2009 bereits der Veraison und der 15.08.2009 der beginnenden Reife.

Um die reifebedingte Modulation zu untersuchen, wurden die zehn Rebsorten¹¹ aus Geisenheim in den Jahren 2009 und 2010 und die vier Bonner Rebsorten im Jahr 2012 im Reifeverlauf untersucht. Die amerikanische Wildrebe *Vitis labrusca* wurde nur 2009 beprobt. Der Zeitpunkt der Reife ist rebsortenabhängig, sodass zu einem Erntetermin nicht alle Rebsorten denselben Reifegrad aufweisen. Abweichend von den anderen Rebsorten, reifte die Siegerrebe durchschnittlich 4-6 Wochen früher. Die Rebsorten Syrah und Cabernet Sauvignon

¹¹ Der unaromatische Gewürztraminerklon wurde nicht im Reifeverlauf untersucht, sondern nur zu einzelnen Terminen beprobt

hingegen erreichten nur in den Jahren 2009 und 2010 volle Reife. Als Orientierung für den Reifegrad dient der Grad Brix (Tabelle A 1, Tabelle A 2, Tabelle A 3). Abbildung 15 zeigt den Gesamtgehalt an Sesquiterpenen für verschiedene Rebsorten im Reifeverlauf für das Jahr 2009.

Die Reifeverläufe im Jahr 2010 und 2012 verliefen analog, wobei die Probenahme 2010 erst zur Veraison begann (Tabelle A 5, Tabelle A 6).

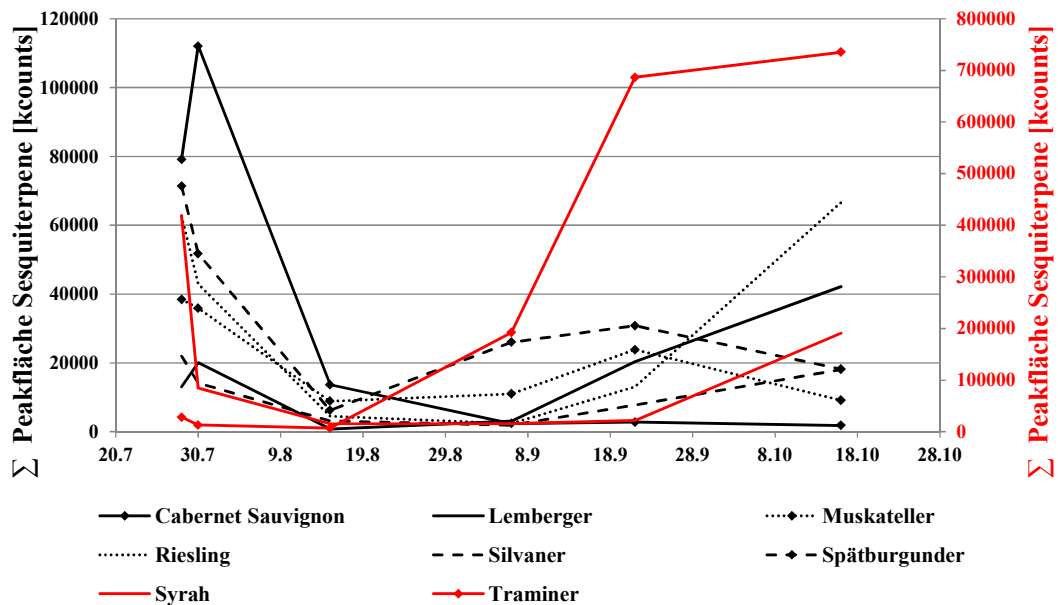


Abbildung 15: Emittierte Sesquiterpene (Summenparameter) verschiedener Rebsorten im Reifeverlauf (n=2, 2009). Die Skalierung von Cabernet Sauvignon, Lemberger, Muskateller, Riesling, Silvaner und Spätburgunder erfolgt auf der Primärachse (links, schwarz), die Skalierung von Syrah und Gewürztraminer auf der Sekundärachse (rechts, rot). Nicht dargestellt wurden die Rebsorten Siegerrebe und *Vitis labrusca*. Die zugehörigen Daten und Brix-Gehalte befinden sich im Anhang (Tabelle A 1, Tabelle A 4).

Allgemeine Veränderung des Profils im Reifeverlauf

Der in Abbildung 15 dargestellte Verlauf der Sesquiterpenakkumulation zeigt eine Abnahme zu Beginn der Veraison und anschließend einen Anstieg. Diese Alternation im Gesamtgehalt geht mit einer Profiländerung einher (Abbildung 16, Abbildung 17). Der Anteil der Sesquiterpene, die zur Preveraison präsent sind, sinkt, während diverse andere Sesquiterpene zur Reife gebildet werden. Die Ermittlung des Sesquiterpenprofils erfolgte für die in Tabelle 4 aufgelisteten Sesquiterpene über die dort angegebenen Ionenspuren. Die Bestimmung des Profils erfolgte nach der 100%-Methode.

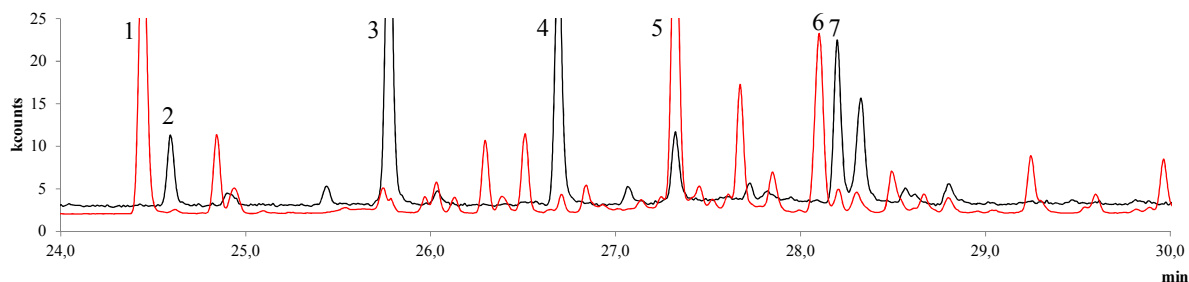


Abbildung 16: Chromatogramme zur Veränderung des Sesquiterpenprofils im Reifeverlauf für die Rebsorte Lemberger. Das schwarze Chromatogramm entspricht der Preveraison (18.07.2012), das rote Chromatogramm der Reife (22.10.2012). Ausgewählte Sesquiterpene sind wie folgt nummeriert: 1) α -Ylängen; 2) α -Copaen; 3) (*E*)- β -Caryophyllen; 4) Humulen; 5) Germacren D; 6) γ -Cadinen; 7) δ -Cadinen.

In allen Stadien der Reife dominieren die Sesquiterpene α -Humulen, (*E*)- β -Caryophyllen, Germacren D und in Abhängigkeit von der Rebsorte (*E,E*)- α -Farnesen. Im Stadium der Preveraison wird das Profil auch durch α -Copaen, Calamenen, δ -Cadinen und Cubenol bestimmt. Zur Veraison sinkt jedoch deren Anteil. Zu diesem Zeitpunkt dominiert das acyclische Sesquiterpen Farnesen den HS der meisten Rebsorten. Zum Zeitpunkt der Reife sinkt der Farnesen-Anteil wiederum. Die Sesquiterpene γ -Cadinen, α -Ylängen (jeweils Cadinan-Typ) und β -Bourbonen sind charakteristisch für dieses Reifestadium. Bei dem Peak mit dem RI 1391, der zum Teil bei allen Stadien der Beerenreife nachweisbar ist, handelt es sich um mehrere, coeluiierende Sesquiterpene¹², deren Verhältnis sich, in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium, änderte: Zur Preveraison dominert das nicht identifizierte Sesquiterpen, während zur Reife hauptsächlich β -Elemen nachweisbar ist. Eine Änderung des Sesquiterpenprofils während der Reife ist z.B. auch für *Olea europaea* beschrieben. Das untersuchte Olivenöl zeigt jedoch eine Profiländerung von bicyclischen Sesquiterpenen in frühen Entwicklungsphasen zu acyclischen Sesquiterpenen im reifen Stadium^[53].

¹² ein unidentifiziertes Sesquiterpen, β -Cubeben und β -Elemen, Tabelle 4 Nr. 6

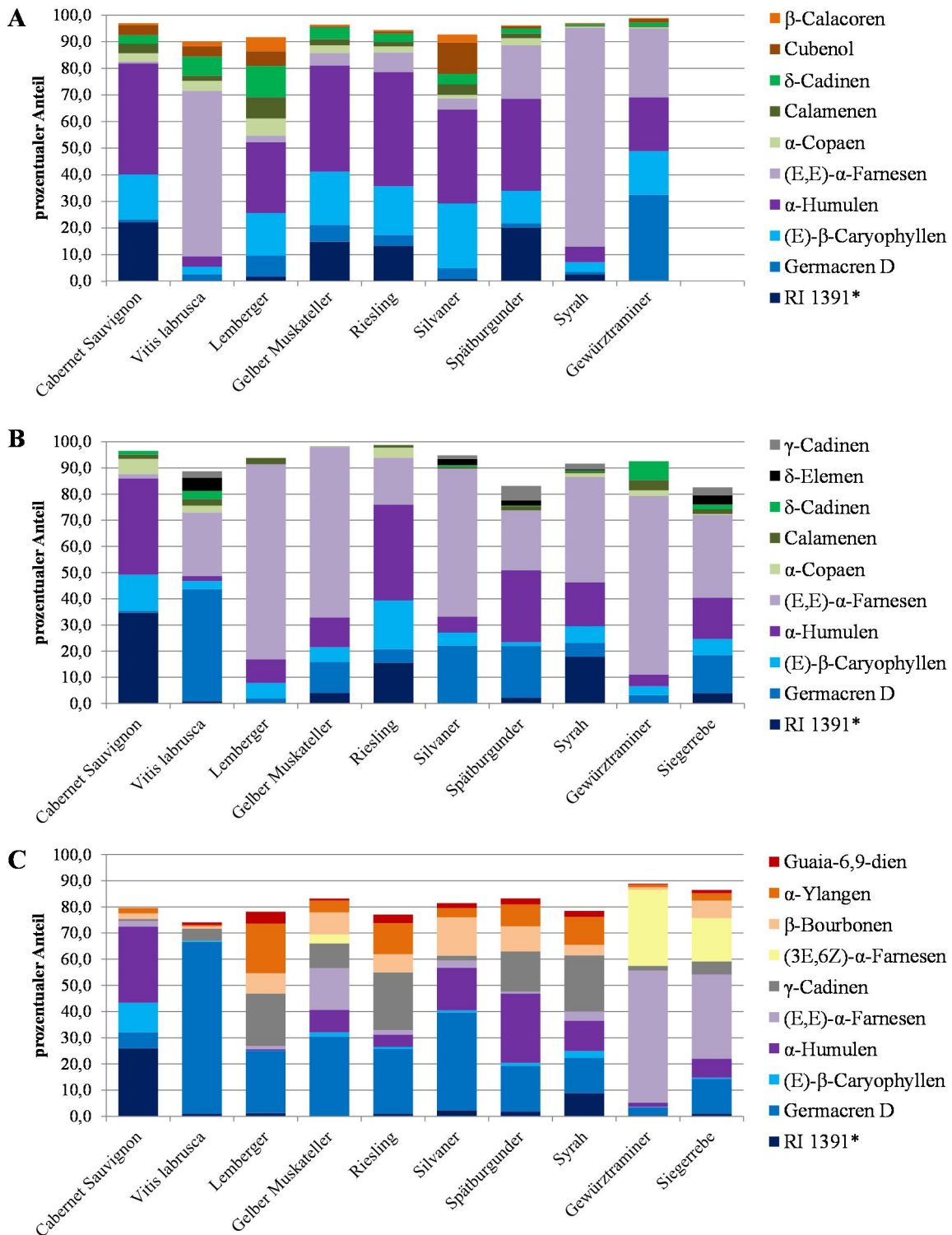


Abbildung 17: Veränderung der Sesquiterpenprofile im Reifeverlauf bei verschiedenen Rebsorten. Dargestellt sind Preveraison (A), Veraison (B) und Reife (C). Ausgewertet wurden die in Tabelle 4 angegebenen Sesquiterpene über die dort angegebenen Ionenspuren. Graphisch dargestellt wurden zehn, für die jeweiligen Termine charakteristische Sesquiterpene. Eine Auflistung aller erfassten Sesquiterpene, der Standardabweichungen sowie der Probenanzahl befinden sich im Anhang (Tabelle A 7-Tabelle A 9). Für die Siegerrebe liegen keine Messungen zur Preveraison vor.

Spezifische Unterschiede zwischen den Rebsorten und Rebsortendifferenzierung

Als wesentliche Unterscheidungsmerkmale zwischen den Rebsorten sind die Sesquiterpene (*E,E*)- α -Farnesen sowie seine Isomere zu nennen. Während der Beerenreife kann das Sesquiterpen (*E,E*)- α -Farnesen in allen untersuchten Rebsorten nachgewiesen werden, zur Veraison ist es sogar dominierend. Zum Ende der Reife sinkt der Farnesenanteil jedoch in allen Rebsorten¹³, während der Anteil an Sesquiterpenen mit Cadinan-Grundgerüst steigt. Zur Erntezeit war (*E,E*)- α -Farnesen in roten Rebsorten nicht mehr oder nur noch geringfügig nachweisbar. Weiße Rebsorten hingegen weisen zur Ernte noch einen erhöhten Anteil auf. Der Gewürztraminer und die Siegerrebe¹⁴ unterscheiden sich deutlich von anderen Rebsorten durch den hohen Anteil an (*E,E*)- α -Farnesen, aber auch (*E,Z*)- α -Farnesen, Farnesol, Methylfarnesoat und dem nicht identifizierten Sesquiterpen RI 1597. Während (*E,E*)- α -Farnesen bereits zur Prevaision und Veraison nachweisbar ist, werden die anderen Sesquiterpene jedoch erst zur Reife gebildet. Bereits Versini et al. (1994) konnten zeigen, dass Beerenhäute (Ethanolextrakt) und Tresterbrände des Gewürztraminers die Sesquiterpene Methylfarnesoat, Farnesol und 2 α -Farnesene-Isomere (3*Z*,6*E* und *E,E*) aufweisen, während im Gelben Muskateller nur Spuren dieser Sesquiterpene nachweisbar waren^[37].

Auch das Sesquiterpenprofil von Cabernet Sauvignon weicht deutlich von den anderen untersuchten Rebsorten ab. Im Gegensatz zu diesen variiert das Profil des Cabernet Sauvignons nur geringfügig während der Beerenreife. In allen Stadien der Beerenreife dominieren Humulen, Caryophyllen und die Sesquiterpene mit dem RI 1391. Sesquiterpene mit Cadinan-Grundgerüst sind zur Reife in einem deutlich geringeren Anteil vertreten, als bei den anderen untersuchten Rebsorten. Kalua und Boss (2009) wiesen ebenfalls Caryophyllen und Humulen im Headspace zerstoßener Beeren nach, wobei die besagten Sesquiterpene nur im frühen Stadium der Beerenentwicklung nachweisbar waren^[32].

Die Rebsorten Syrah, Lemberger, Riesling sowie Spätburgunder weisen zur Reife sehr ähnliche Profile auf. Es lassen sich lediglich geringe Unterschiede im Fingerprint feststellen (Tabelle A 10).

¹³ Ausnahme Gewürztraminer, Siegerrebe und Cabernet Sauvignon

¹⁴ Neuzüchtung aus Madeleine angévine x Gewürztraminer [51]

Abbildung 18 zeigt die kanonische Diskriminanzanalyse zur Differenzierung der Rebsorten. Die Analyse basiert auf Daten aus drei Jahrgängen und zwei Anbauregionen (Geisenheim und Bonn). Auch hier wird verdeutlicht, dass das Profil der Rebsorte Cabernet Sauvignon von den anderen Rebsorten abweicht. Auch die Rebsorte Gewürztraminer grenzt sich von den anderen Rebsorten ab. Nur die Siegerrebe, eine Kreuzung aus Gewürztraminer und Madeleine angevine^[51], weist Ähnlichkeiten mit dem Profil des Gewürztraminers auf. Überschneidungen liegen bei Lemberger, Riesling, Syrah und Spätburgunder sowie bei Silvaner mit dem Gelben Muskateller vor. Ähnlichkeiten im Sesquiterpenprofil treten unabhängig von der Farbe der Rebsorte (rote oder weiße, z.B. Lemberger und Riesling) oder dem Gehalt an Monoterpen (monoterpenreich oder –arm, z.B. Muskateller und Silvaner) auf.

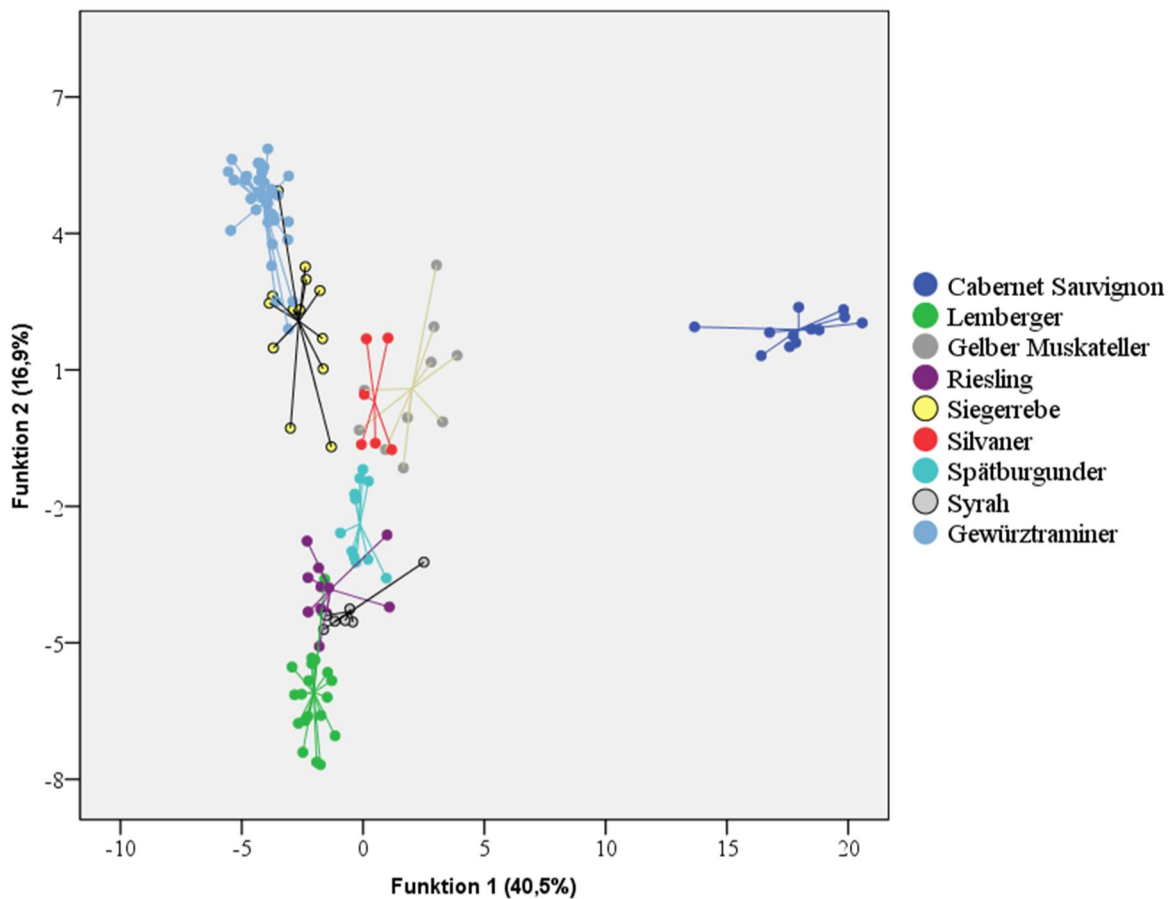


Abbildung 18: Kanonische Diskriminanzanalyse zur Unterscheidung der Sesquiterpenprofile der untersuchten Rebsorten zur Reife. Zugrunde liegende Daten basieren auf Tabelle A 9. Die Daten umfassen die Jahrgänge 2009, 2010, 2012 sowie die Regionen Geisenheim und Bonn. Die Gruppenmittelpunkte sind durch Projektionslinien mit einzelnen Datenpunkten verbunden. *Vitis labrusca* wurde wegen der geringen Probenanzahl (n=2) nicht mit einbezogen.

Dies wird ebenfalls verdeutlicht, wenn man das Headspaceprofil des Gewürztraminers mit dem unaromatischen Gewürztraminerklon vergleicht (Abbildung A 2). Der unaromatische Traminer weist im Vergleich zu anderen Traminerklonen sehr niedrige Monoterpenkonzentrationen auf^{50]}. Bezüglich des Headspaceprofils der beiden Gewürztraminer, besteht kein Unterschied im Sesquiterpenprofil, während Monoterpene beim unaromatischen Gewürztraminer nur in Spuren nachweisbar sind. Die eingeschränkte Biosynthese des unaromatischen Gewürztraminers betrifft demzufolge nur die Monoterpenbiosynthese. Die Sesquiterpenbiosynthese ist unbeeinflusst.

Korrelation zwischen spezifischen Sesquiterpenen

Die Sesquiterpene wurden zudem auf etwaige untereinander bestehende Korrelationen untersucht. Wenn zwei Sesquiterpene immer ein konstantes Verhältnis aufweisen, ist dies ein Indiz, dass beide Verbindungen über eine „multiple product“ Cyclase generiert werden. Weichen die Gehalte (Peakflächenverhältnisse) jedoch innerhalb einer Rebsorte oder zu bestimmten Entwicklungsstadien ab, sind wahrscheinlich mehrere Enzyme an der Generierung beteiligt.

Wie bereits erläutert, weist die Rebsorte Gewürztraminer die Sesquiterpene (*E,E*)- α -Farnesen aber auch (*E,Z*)- α -Farnesen, Farnesol, Methylfarnesoat und das Sesquiterpen RI 1597 auf. Abbildung 19 zeigt die Korrelation dieser Verbindungen mit (*E,E*)- α -Farnesen. Das Sesquiterpen (*E,E*)- α -Farnesen weist eine sehr hohe Korrelation mit (*E,Z*)- α -Farnesen ($R^2=0,9884$) und dem nicht identifizierten Sesquiterpen RI 1597 ($R^2= 0,9898$) auf. Die Korrelation ist unabhängig vom Beprobungsjahr und der Region. Es liegt nahe, dass diese drei Sesquiterpene im Gewürztraminer über ein Enzym generiert werden, da sie immer im selben Verhältnis zueinander stehen. Die oxygenierten Sesquiterpene Farnesol und (*E,E*)-Methylfarnesoat korrelieren hingegen kaum ($R^2=0,5008$ bzw. $R^2=0,7562$).

Abbildung 20 zeigt die Korrelation zwischen Guaia-6,9-dien und Selina-4,6-dien. In allen untersuchten Rebsorten¹⁵, unabhängig von Termin, Jahrgang und Region weisen beide Sesquiterpene ein konstantes Verhältnis auf. Hier besteht die Möglichkeit, dass beide Verbindungen über ein Enzym generiert werden (vgl. Abbildung 13), das in allen untersuchten Rebsorten aktiv ist.

¹⁵ Eine Korrelation konnte nicht für Gewürztraminer und den unaromatischen Gewürztraminer untersucht werden, weil in beiden Rebsorten zum Teil β -Farnesen nachweisbar ist und dieses mit Selina-4,6-dien coeluiert.

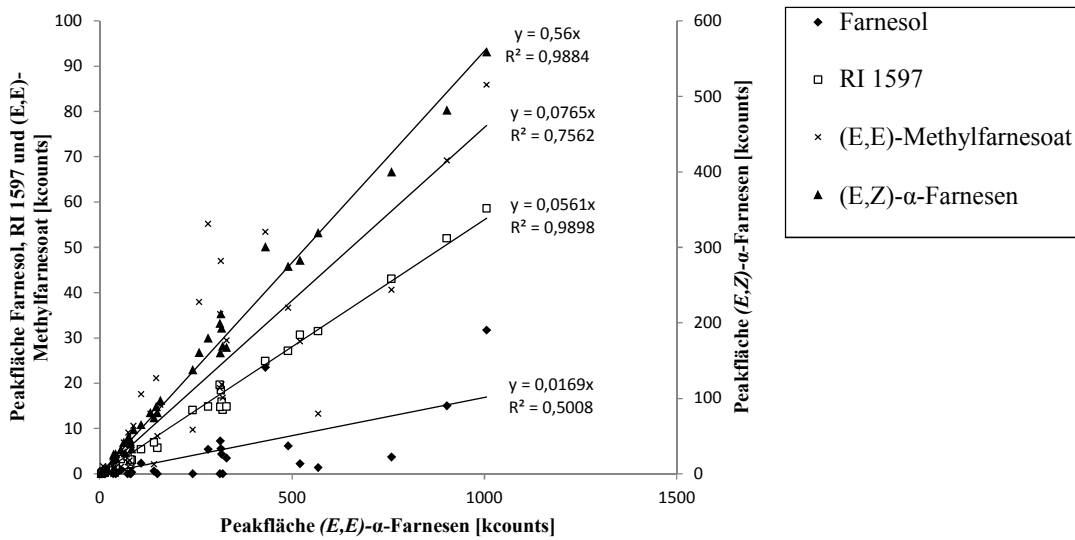


Abbildung 19: Korrelation von (E,E)- α -Farnesen mit anderen Sesquiterpenen der Rebsorte Gewürztraminer. Aufgetragen sind die Werte aus den Messungen ab Beginn der Reife (Termine > 01.09.), von beiden Regionen (Bonn und Geisenheim) aus den Jahren 2009-2012 ($\Sigma n = 43$).

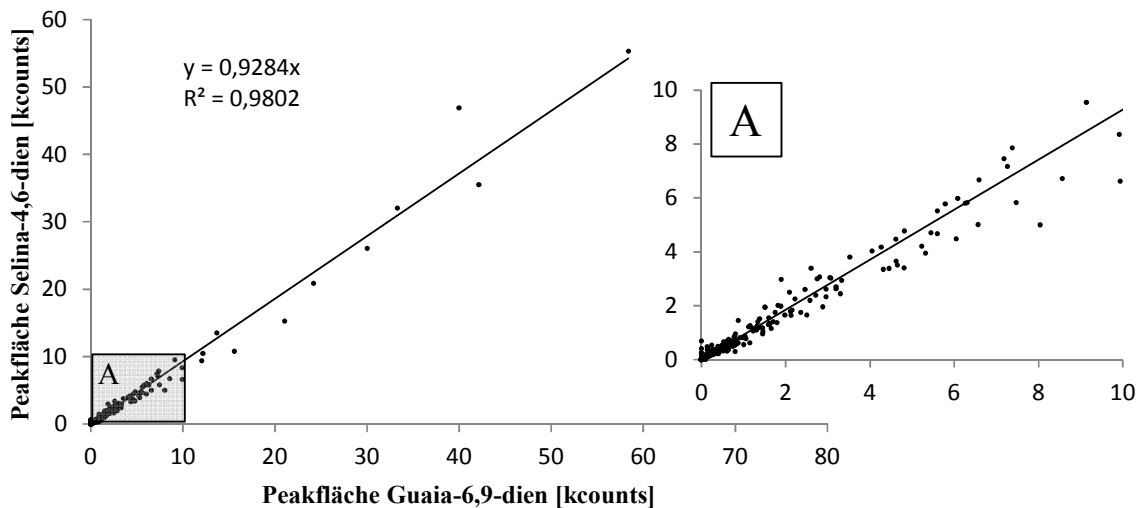


Abbildung 20: Korrelation von Guaia-6,9-dien und Selina-4,6-dien in verschiedenen Rebsorten. Aufgetragen sind die Werte aus den Messungen aller Rebsorten (ausgenommen Gewürztraminer und unaromatischer Traminer), über den gesamten Reifeverlauf, beider Regionen (Bonn und Geisenheim), aus den Jahren 2009-2012 ($\Sigma n = 362$). Der Bereich A wurde zusätzlich vergrößert dargestellt.

Aufgrund der Profiländerung während der Beerenreife besteht die Vermutung, dass vor und nach der Veraison verschiedene Synthesen aktiv sind. Diese These wird durch die beiden Sesquiterpene Humulen und Caryophyllen gestützt. Die Generierung beider Sesquiterpene kann über das *trans*-Humulyl-Kation (Abbildung A 3) erfolgen. Beide Sesquiterpene korrelieren auch in *Vitis*, jedoch zur Preveraison und Reife in unterschiedlichen Verhältnissen (Abbildung 21). Diese Änderung während der Reife konnte bei verschiedenen Rebsorten, u.a. dem Spätburgunder, beobachtet werden. Martin et al. (2010) haben verschiedene Sesquiterpensynthesen des Spätburgunders funktionell charakterisiert, u.a. eine (*E*)- β -Caryophyllen-Synthase sowie eine α -Humulen-Synthase, wobei beide Enzyme das jeweilige andere Sesquiterpen als Nebenprodukt bilden^[44].

Im Anhang (Tabelle A 11) sind weitere Korrelationen aufgeführt. Weiterhin ist zu erwähnen, dass Germacren D, das ein Schlüsselintermediat für verschiedene Sesquiterpene sein kann, kaum Korrelationen zu anderen Sesquiterpenen aufweist.

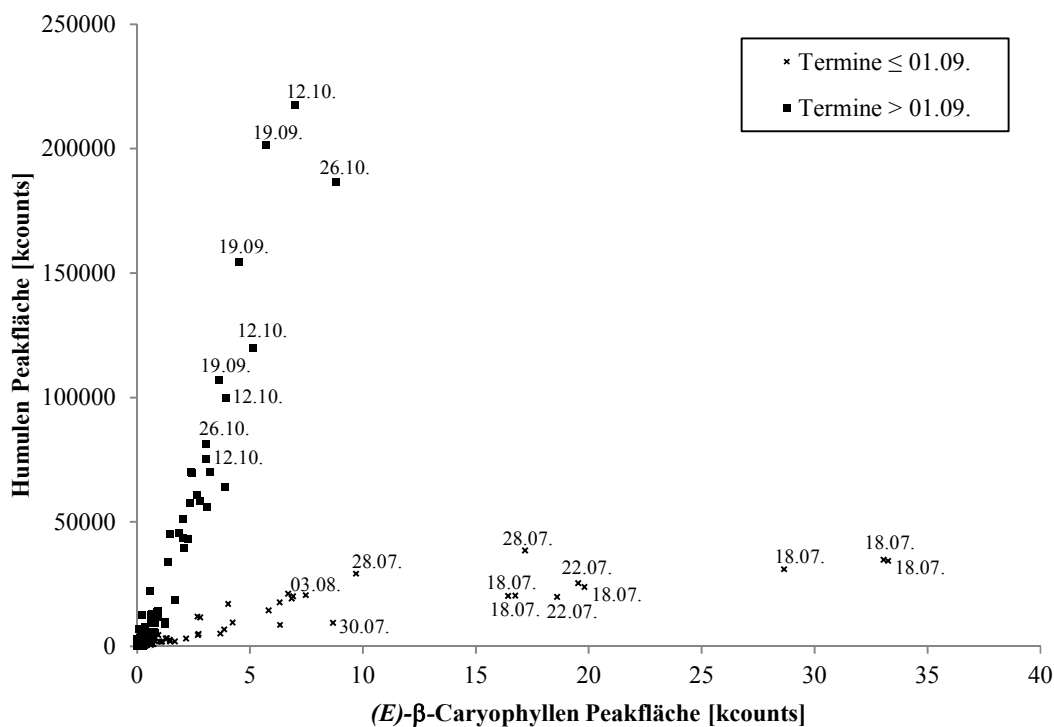


Abbildung 21: Veränderung des Caryophyllen- und Humulen-Verhältnisses im Reifeverlauf bei den Rebsorten Spätburgunder, Riesling, Siegerrebe, Silvaner, Gewürztraminer und unaromatischer Gewürztraminer. Aufgetragen sind alle Messungen von 2009-2012, beider Regionen (Geisenheim und Bonn), $\sum n = 220$.

2.3 Weitere flüchtige Verbindungen im Emissionsprofil des Exokarps

Neben Sesquiterpenen können auch Monoterpene und das Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid im Headspaceprofil des Exokarps verschiedener Rebsorten nachgewiesen werden.

Tabelle 5 informiert über die Verteilung der Mono- und Sesquiterpene sowie des Diterpens in den verschiedenen Rebsorten. Während im Headspace der roten Rebsorten ausschließlich Sesquiterpene und das Diterpen nachweisbar sind, weist der Headspace weißer Rebsorten teilweise einen hohen Anteil an Monoterpenen auf. Der prozentuale Gehalt an Monoterpenen korreliert weitgehend mit der Klassifizierung des aromatischen Charakters (Tabelle 3). Einen Überblick über die nachweisbaren Monoterpene geben Abbildung 22 und Abbildung 23. Es fällt auf, dass das Emissionsprofil des Gewürztraminers nur wenige Monoterpenalkohole aufweist. Stattdessen wird der Headspace des Gewürztraminers von Geranolsäureestern (Abbildung 22, Peak 7 und 8) dominiert. Es ist bekannt, dass das Exokarp des Gewürztraminers signifikant hohe Gehalte an Methylgeranat aufweist^[37]. Über die HS-SPME Messung kann neben Methylgeranat jedoch auch der Ethylester nachgewiesen werden. Analog ist im Gewürztraminer ebenfalls das Sesquiterpen Methylfarnesoat nachweisbar. In wesentlich geringeren Konzentrationen sind die Ester auch in der Siegerrebe und im Muskateller vertreten.

Tabelle 5: Prozentuale Anteile der Mono- und Sesquiterpene sowie des Diterpens 13-*epi*-Manoyloxid im HS-Profil verschiedener Rebsorten. Die Auswertung erfolgte über den TIC. Ausgewertet wurden Cabernet Sauvignon, Riesling, Syrah (n=5, 16.10.09, 12.10.10) Lemberger, Muskateller, Silvaner, Spätburgunder (n=4; 16.10.09, 12.10.10); Siegerrebe (n=6, 06.09.09; 21.09.09, 14.09.10); Gewürztraminer (n=6; 01.10.09, 16.10.09, 12.10.10) und der unaromatische Gewürztraminer (n=2; 19.09.11).

Rebsorte	Monoterpene [%]	Sesquiterpene [%]	Diterpen 13- <i>epi</i> -Manoyloxid [%]
Lemberger	n.n.	95 ± 6	5 ± 6
Syrah	n.n.	98 ± 1	2 ± 1
Spätburgunder	n.n.	93 ± 11	7 ± 11
Silvaner	n.n.	97 ± 2	3 ± 2
Cabernet Sauvignon	n.n.	63 ± 23	37 ± 23
Riesling	6 ± 1	93 ± 1	1 ± 0
Muskateller	65 ± 18	33 ± 17	2 ± 1
Siegerrebe	49 ± 10	46 ± 13	5 ± 5
Gewürztraminer	9 ± 5	91 ± 0	< 0,5
Unaromatischer Gewürztraminer	< 0,5	97 ± 1	2 ± 1

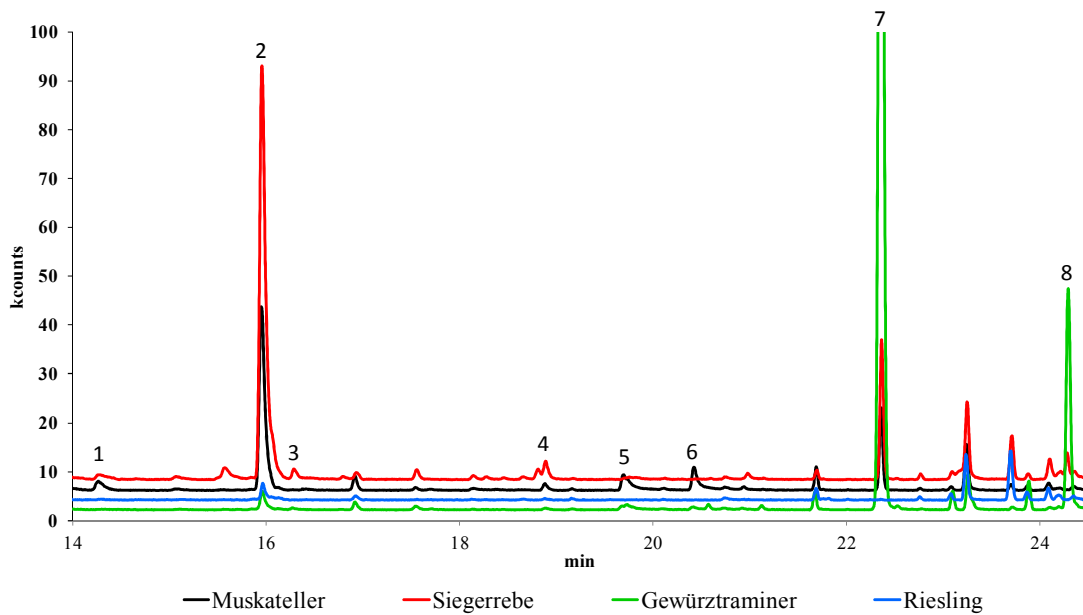


Abbildung 22: Monoterpene verschiedener aromatischer Rebsorten (Exokarp, Reife). Bezeichnung der nummerierten Monoterpene ist Abbildung 23 zu entnehmen.

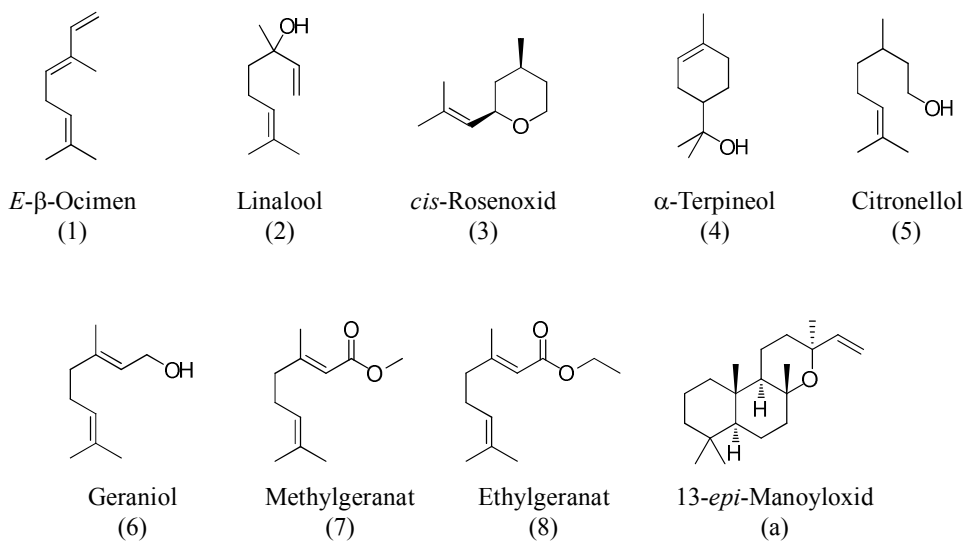


Abbildung 23: Strukturformeln der im Headspace verschiedener Rebsorten nachweisbaren Monoterpene und des Diterpenes 13-*epi*-Manoyloxid. Nummerierung der Monoterpene erfolgt nach Abbildung 22, das Diterpen ist Abbildung 9 zu entnehmen.

2.4 Headspace-Profil des Mesokarps

Neben den Messungen der über das Exokarp emittierten Sesquiterpene wurde ebenfalls das Mesokarp untersucht. Während der Beerenreife konnten keine Sesquiterpenkohlenwasserstoffe im Mesokarp der untersuchten Rebsorten nachgewiesen werden (Abbildung 24, A). Im Stadium der Vollreife wurden vereinzelt Sesquiterpene im Mesokarp der Rebsorten Syrah, Lemberger und Gewürztraminer detektiert. Die Sesquiterpenprofile für Mesokarp und Exokarp waren bei diesen Messungen annähernd identisch (Abbildung 24, C). Eine Ausnahme bildet hierbei das Sesquiterpen *epi*-Zonaren, das im Profil des Mesokarps einen höheren Anteil aufweist. Da ein positiver Nachweis von Sesquiterpenen im Mesokarp nur vereinzelt verzeichnet wurde und die Profile mit dem Exokarp annähernd identisch sind, ist nicht auszuschließen, dass ein falsch-positiver Nachweis durch unvollständiges Abtrennen des Exokarps beim Schälen erfolgte oder durch eine Diffusion der Sesquiterpene, hervorgerufen durch eine beginnende Erweichung und Desintegration des Zellgewebes im Zustand der Vollreife. Aufschluss über eine etwaige biosynthetische Aktivität im Mesokarp liefert Abschnitt 3.3.

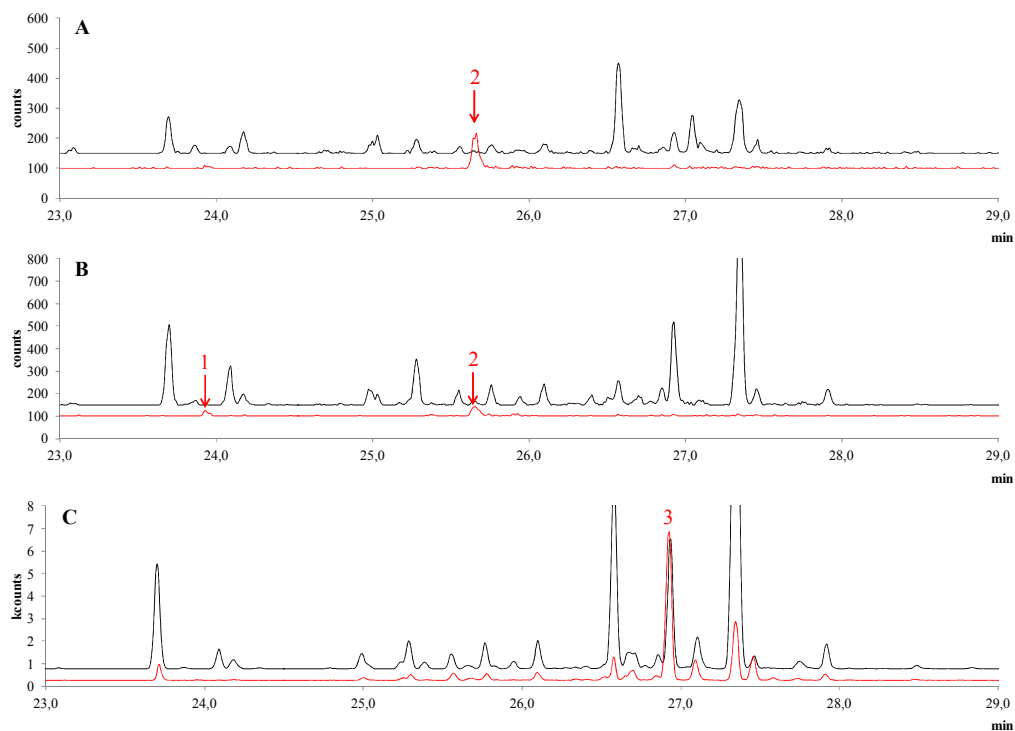


Abbildung 24: Vergleich der HS-SPME-Messungen des Meso- und Exokarps. Die Chromatogramme wurden auf die Sesquiterpen-spezifischen Ionenspur $m/z = 161$ gefiltert. Dargestellt sind: Exokarp (schwarze Ionenspur) und Mesokarp (rote Ionenspur) für Syrah vor der Reife (A, 21.09.09) sowie zur Vollreife für Spätburgunder (B, 16.10.09) und Syrah (C, 16.10.09.). Die nummerierten Peaks entsprechen β -Damascenon (1), Geranylaceton (2) und *epi*-Zonaren (3).

2.5 Möglichkeiten zur Quantifizierung

Über HS-SPME-Messungen ganzer Beeren können nur die Emissionsprofile ermittelt werden. Eine Quantifizierung ist über dieses Verfahren nicht möglich¹⁶. Um eine Aussage über den Gehalt an Sesquiterpenen im Exokarp (hier: in der Wachsschicht) sowie der Emissionsmenge treffen zu können, wurden folgende zwei Verfahren zur Quantifizierung herangezogen. Dabei wurde als interner Standard Bromdecan verwendet und der Gehalt an Sesquiterpenen als Bromdecan-Äquivalente berechnet. Bromdecan wird üblicherweise als interner Standard zur Bestimmung von Pflanzenemissionen verwendet^{[54],[55]}. Es erfolgte keine Optimierung bzw. Validierung der hier angewandten Verfahren. Die Gehaltsbestimmung soll nur als Orientierung dienen.

a) Quantifizierung der in der Wachsschicht akkumulierten Sesquiterpene

Bereits Versini et al. (1994) vermuteten, dass Sesquiterpene in der Wachsschicht der Beeren akkumuliert werden. Sie tauchten daher die Beeren in Ethanol, um die Wachsschicht zu lösen^[37]. Abweichend zu Versini et al. wurde die Wachsschicht in diesem Experiment mit Dichlormethan gelöst und der Extrakt nach Abtrennen der Wachse durch Ausfrieren analysiert (Tabelle 6). Dieses Verfahren wird häufig zur Isolation der Lipide auf Blattoberflächen angewandt^[56].

Tabelle 6: Quantitative Bestimmung der in der Wachsschicht akkumulierten Sesquiterpene

Rebsorte	Sesquiterpengehalt [mg/kg Trauben]	Termin
Gewürztraminer	1,1 mg/kg	26.10.2010
Spätburgunder	0,5 mg/kg	26.10.2010
Lemberger	0,1 mg/kg	26.10.2010
Riesling	0,1 mg/kg	26.10.2010

Die ermittelten Sesquiterpengehalte der Wachsschicht sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Versini et al. (1994)^[37], die für die Sesquiterpene Methylfarnesol, Farnesol sowie die zwei Farnesenisomere einen Gehalt von 0,6 mg/kg (Gewürztraminer, Reife), berechnet als Octanoläquivalente, ermitteln konnten.

b) Quantifizierung der emittierten Sesquiterpene

¹⁶ Eine Quantifizierung bei SPME-Messungen kann z.B. über deuteriummarkierte, interne Standards oder Standardaddition erfolgen [49]. Beim Gleichgewicht eines Analyten zwischen Exokarp und Gasphase ist der Zusatz eines internen Standards jedoch nicht möglich.

Bei diesem Verfahren wurden die Gasphase und damit die emittierten flüchtigen Verbindungen kontinuierlich über ein Tenaxröhrchen geleitet. Die Analyten wurden auf dem Tenax angereichert und konnten anschließend eluiert werden (Tabelle 7). Die sogenannte dynamische HS-Sampling-Technik wird häufig zur Analyse der Pflanzenemission herangezogen^[57].

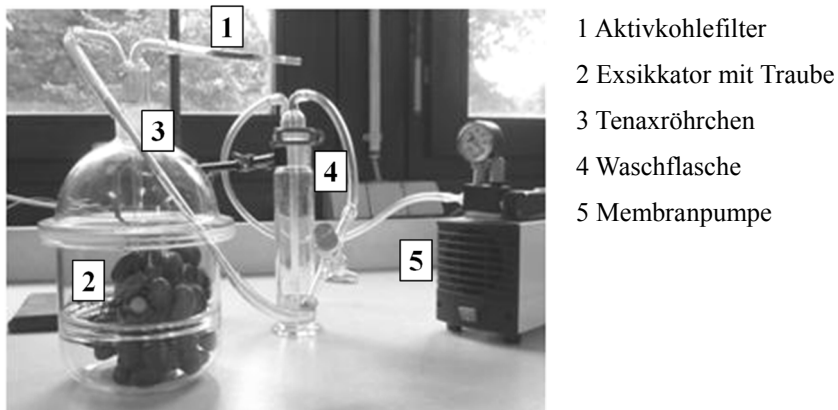


Abbildung 25: Apparatur zur dynamischen Headspace-Extraktion.

Tabelle 7: Quantitative Bestimmung der emittierten Sesquiterpene

Rebsorte	Emittierter Sesquiterpengehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Trauben *Zeit]	Termin
Lemberger	53 $\mu\text{g}/(\text{kg}*24\text{h})$	26.10.2010
Lemberger	56 $\mu\text{g}/(\text{kg}*24\text{h})$	28.09.2011
Syrah	46 $\mu\text{g}/(\text{kg}*24\text{h})$	28.09.2011
Gewürztraminer	80 $\mu\text{g}/(\text{kg}*24\text{h})$	15.09.2011

2.6 Sesquiterpenprofile der Blüten

Es ist bereits bekannt, dass Blüten von *Vitis vinifera* zahlreiche Sesquiterpene emittieren (vgl. Abschnitt 1.4). Die Analyse des Sesquiterpenprofils der Blüten über HS-SPME-GC-MS sollte nur ergänzend zu der Untersuchung der Beeren erfolgen. Die Analyse umfasste Proben aus dem Jahr 2010, Geisenheim (alle Rebsorten mit Ausnahme von *Vitis labrusca*, n = 1) und Proben aus 2013, Bonn (Lemberger, Syrah, Spätburgunder, Gewürztraminer, n = 3). Die Probenahme 2013 erfolgte an zwei Terminen während der Blütenentwicklung (Abbildung 26). Im Vergleich zu Beeren weisen Blüten eine sehr hohe Emissionsrate auf. Diese Aussage kann hier ohne absolute Quantifizierung, allein durch Betrachtung der Signalintensität (Abbildung 27) getroffen werden. Zumal jeweils nur vier Stecknadelkopf große Blüten vermessen wurden und dennoch ein Split von 1:100 gewählt werden musste, während die Beeren ohne Split vermessen wurden. Dies ist damit zu begründen, dass die Emission der Blüten primär auf das Anlocken von Insekten abzielt und eine entsprechende Signalreichweite und damit Emissionsrate gewährleistet sein muss. Durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften scheinen Terpene zudem eine wesentliche Rolle beim Schutz von Blüten und der anschließenden normalen Samenentwicklung zu spielen^[40].

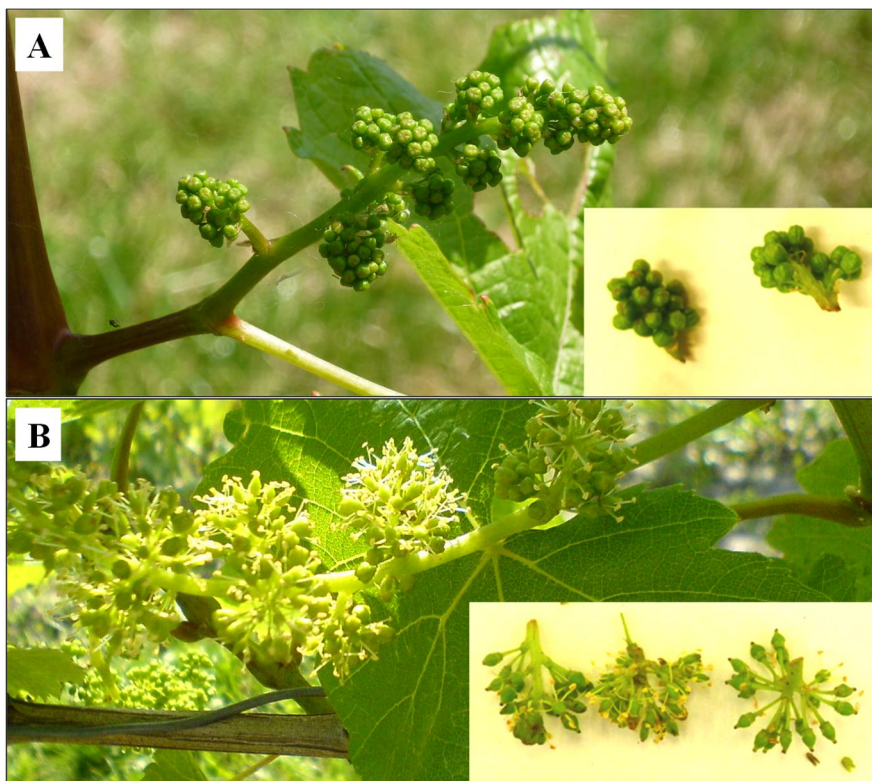


Abbildung 26: Blütenentwicklung. Dargestellt sind (A) Blütenknospen (Probenahme Termin 1, 13.06.2013) und (B) die Anthese (Probenahme Termin 2 02.07.2013). Zur Anthese sind die Blüten geöffnet, die Fruchtknoten und Staubblätter (Antheren) liegen frei.

Im Vergleich zu den Beeren weisen Blüten eine geringere Anzahl unterschiedlicher Sesquiterpene auf. Einige der in Blüten identifizierten Verbindungen sind ebenso in Beeren nachweisbar. Es besteht aber kein Zusammenhang zwischen dem Emissionsprofil der Blüten und Beeren innerhalb einer Rebsorte. So zählen z.B. *(E,E)*- α -Farnesen und seine Isomere zu den Leitverbindungen der Blüten aller untersuchten Rebsorten während diese Verbindungen in der Intensität nur in Beeren der Rebsorte Gewürztraminer detektierbar sind. Andere Verbindungen, hervorzuheben sind hier vor allem Valencen und 7-*epi*- α -Selinen, sind nur in den Blüten nachweisbar (Tabelle 8).

Die identifizierten Sesquiterpene entsprechen weitgehend den in der Literatur beschriebenen, in Blüten von *Vitis vinifera* nachgewiesenen Sesquiterpenen^{[41]-[43]}. Nicht identifiziert werden konnten jedoch β -Bisabolen, γ -Cadinen, α - und δ -Guaien, β -Selinen und α -Selinen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Buchbauer et al. (1994, 1995) neben den Rebsorten Spätburgunder, Lemberger und Gewürztraminer acht weitere Rebsorten untersuchten^{[41],[42]}.

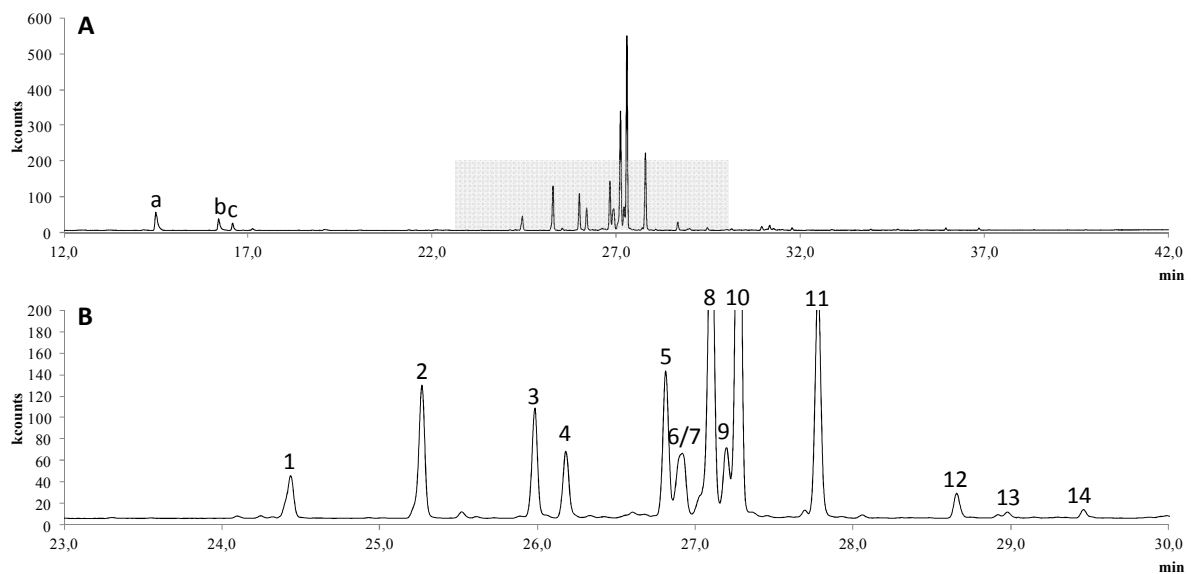


Abbildung 27: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm: Lemberger, Blüte (13.06.2013). Abbildung A zeigt den Chromatogrammausschnitt von 12-42 min. Beschriftet sind *(E)*- β -Ocimen (a), Linalool (b), 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien (DMNT, c). Abbildung B zeigt den vergrößerten Bereich von 23-30 min (in Abbildung A grau hinterlegt). Die Bezeichnung der nummerierten Sesquiterpene ist Tabelle 8 zu entnehmen.

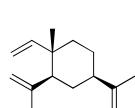
Tabelle 8: Übersicht der in Blüten identifizierten Sesquiterpene. Grau hinterlegte Sesquiterpene konnten bisher ausschließlich in Blüten, nicht in den Beeren, nachgewiesen.

Nr.	Sesquiterpen	Identifizierung ¹	RI	RI (Lit.) ²
1	β -Elemen	c	1391	1391
2	(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	a	1424	1418
3	(<i>E</i>)- β -Farnesen	a	1454	1458
4	α -Humulen	a	1460	1454
5	Germacren D	b	1485	1480
6	Aristolochen	c	1489	1486 ³
7	(<i>3Z,6E</i>)- α -Farnesen	a	1491	1480 ³
8	Valencen	b	1498	1491
9	Germacren A	c	1502	1503
10	(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	a	1504	1508
11	7- <i>epi</i> - α -Selinen	b	1526	1534 ³
12	(<i>E</i>)-Nerolidol	a	1563	1564
13	Caryophyllenoxid	c	1590	1581
14	Unbekannt RI 1597	-	1597	-

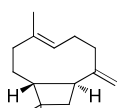
1) Identifizierung: a) mittels Standardsubstanz, b) über Massenspektrum und Retentionsindex, c) vorläufig identifiziert über Massenspektrum und Retentionsindex

2) RI (Lit.) = Retentionsindices auf einer DB5 [52]

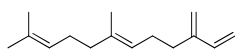
3) Retentionsindices auf einer DB1 (@Massfinder)



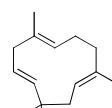
β -Elemen
(1)



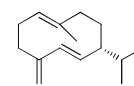
(*E*)- β -Caryophyllen
(2)



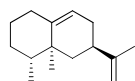
(*E*)- β -Farnesen
(3)



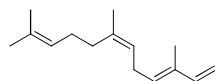
Humulen
(4)



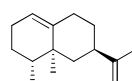
Germacren D
(5)



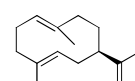
Aristolochen
(6)



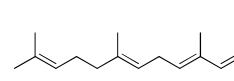
(*3E,6Z*)- α -Farnesen
(7)



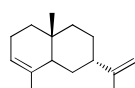
Valencen
(8)



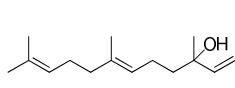
Germacren A
(9)



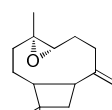
(*E,E*)- α -Farnesen
(10)



7-*epi*- α -Selinen
(11)



Nerolidol
(12)

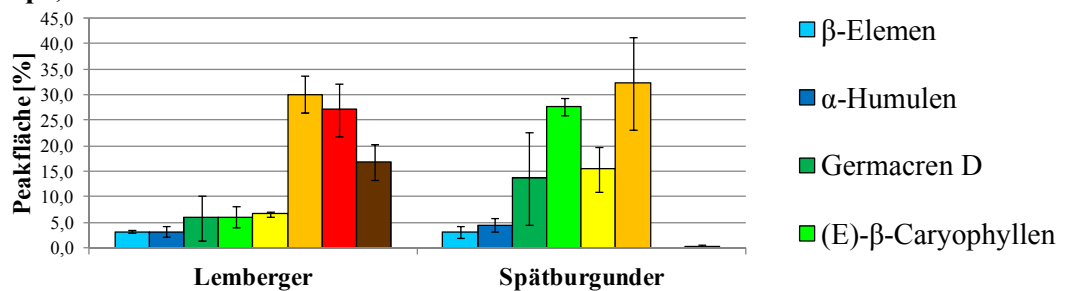


Caryophyllenoxid
(13)

Abbildung 28: Strukturformeln der in Blüten nachweisbaren Sesquiterpene

Buchbauer et al. (1994, 1995) konnten die Emissionsprofile der untersuchten Blütenrebsortenabhängig unterscheiden^{[41],[42]}. Auch im Rahmen dieser Arbeit waren signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Rebsorten nachweisbar (Abbildung 29, Tabelle A 12). Während Valencen und 7-*epi*- α -Selinen zu den Leitverbindungen in den Blüten von Lemberger, Gewürztraminer und Syrah zählten¹⁷, konnten diese Sesquiterpene bisher nicht im Emissionsprofil des Spätburgunders nachgewiesen werden. Die Rebsorten Lemberger, Gewürztraminer und Syrah wiesen jedoch ähnliche Emissionsprofile auf, signifikante Unterschiede bestanden nur im Fingerprint bei einigen Sesquiterpenen (Tabelle A 12).

Blütenknospe, 13.06.2013



Anthese, 02.07.2013

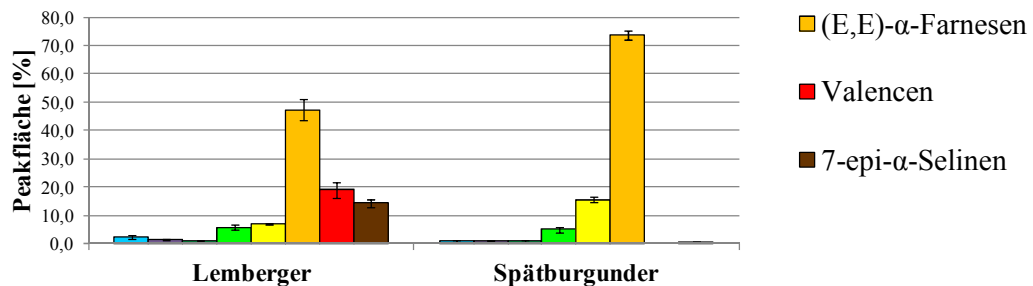


Abbildung 29: Sesquiterpenprofil der Blüten zu unterschiedlichen Terminen der Blütenentwicklung (n=3)

Im Verlauf der Blütenentwicklung konnte ebenfalls eine Änderung des Emissionsprofils festgestellt werden. Während der Anthese steigt der Anteil an Farnesen-Isomeren an, während vor der Anthese auch andere Sesquiterpene dominieren. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Lücker et al. (2004)^[43]. In dieser Studie wurden zwei Sesquiterpen-Synthasen (Valencen-Synthase (*VvVal*) sowie eine (-)-Germacren D-Synthase (*VvGerD*)) im Gewürztraminer-Genom identifiziert und funktionell charakterisiert. Die Transkriptionslevel dieser Synthasen waren in den Blütenknospen am höchsten. Lücker et al. konnten ebenfalls mittels *in vitro* Enzymassay

¹⁷ Ausnahme: Syrah (Termin 1 13.06.2013, GH)

zeigen, dass *VvVal* Farnesyldiphosphat zu (+)-Valencen (49,5 %), (-)-7-*epi*- α -Selinen (35,5 %), α -Selinen (7,0 %), Aristolochen (3,6 %) sowie (E)- β -Caryophyllen, α -Humulen und Germacren D umsetzt^[43].

Valencen und 7-*epi*- α -Selinen sind ebenso im Headspace der untersuchten Blüten nachweisbar. Ihre Peakflächen weisen eine signifikant hohe Korrelation auf ($R^2 = 0,9908$; Abbildung 30). Das Verhältnis der beiden Sesquiterpene im *in vitro* Enzymassay von 35,5%:49,5% bzw. 0,72:1^[43] entspricht annähernd exakt der Steigung der Korrelationsgerade. Somit bestätigen die Headspace-Messungen der Blüten die *in vitro* Ergebnisse von Lücker et al. (2004)^[43]. Die anderen, im Enzymassay identifizierten Sesquiterpene (z.B. Humulen, Caryophyllen) sind im Headspace der Blüten zu deutlich höheren Anteilen nachweisbar, als die Ergebnisse von Lücker et al. (2004) erwarten lassen. Zudem zeigen sie keine direkte Korrelation zu Valencen oder Selinen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass noch weitere Synthesen am Emissionsprofil der Blüten und an der Generierung dieser Sesquiterpene beteiligt sind.

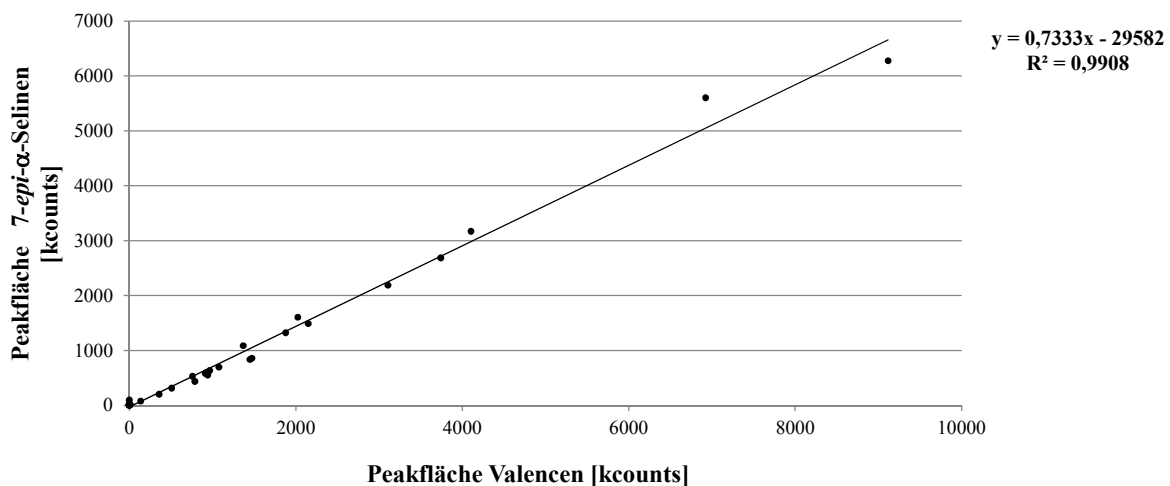


Abbildung 30: Korrelation zwischen Valencen und 7-*epi*- α -Selinen. Dargestellt sind die Messungen aller untersuchten Rebsorten während der Blüte aus den Jahren 2010 (Geisenheim) und 2013 (Bonn), (n=33).

3 Sesquiterpenbiosynthese

3.1 Versuchsmodell

Um die Beteiligung der jeweiligen Biosynthesewege zu untersuchen, wurden die deuteriummarkierten Verbindungen [5,5-²H₂]-Mevalonolacton (d₂-MVL) und [5,5-²H₂]-Deoxy-D-xylulose (d₂-DOX) nach Simpson et al. (1997) bzw. Meyer et al. (2004) synthetisiert. Die jeweiligen Verbindungen werden in der Pflanze zu d₂-MVA und d₂-DOXP umgesetzt und sind an den jeweiligen Biosynthesewegen zur Generierung von IPP und DMAPP beteiligt (Abbildung 31). Da beide Präkursoren zu denselben Markierungspositionen in IPP und DMAPP führen, wurde jeweils nur ein Präkursor pro Versuch appliziert.

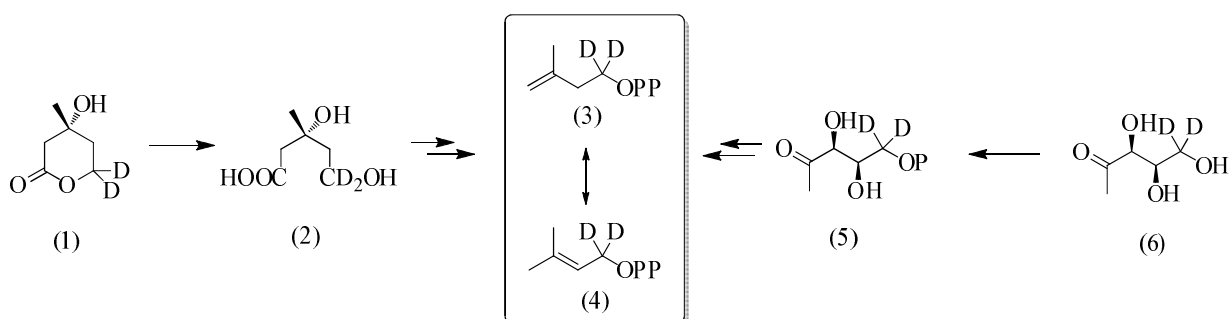


Abbildung 31: Strukturformeln eingesetzter Deuterium-markierter Präkursoren und der daraus generierten markierten Isoprenoidbausteine d₂-IPP und d₂-DMAPP. Dargestellt sind d₂-MVL (1), d₂-MVA (2), d₂-IPP (3), d₂-DMAPP (4), d₂-DOXP (5) und d₂-DOX (6).

Die Applikation erfolgte entweder durch Injektion in das Mesokarp ganzer Beeren oder durch Inkubation mit isoliertem Exokarp (Abbildung 32). Die Analysen mit dem isolierten Exokarp wurden mit den neutralen Rebsorten Lemberger und Syrah sowie mit der aromatischen Rebsorte Gewürztraminer und dem unaromatischen Gewürztraminerklon durchgeführt. Die Applikation in die Beere wurde lediglich mit der Rebsorte Lemberger durchgeführt.

Wie in Kapitel 2.3 gezeigt werden konnte, sind auch Monoterpene und das Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid über die HS-SPME-Messungen des Exokarps nachweisbar. Da die Biosynthese von Terpenen plastidischen Ursprungs miterfasst wird, ermöglicht dies einen erweiterten Einblick in die Kompartimentierung der Terpenbiosynthese.

A**B**

Abbildung 32: Applikationsmöglichkeiten der markierten Präkursoren. Dargestellt sind: A) die Injektion in das Mesokarp mittels Mikroliterspritze sowie B) die Inkubation von isoliertem Exokarp. Die Beerenhäute werden dabei auf eine wässrige Lösung der Präkursoren gelegt.

3.2 Bestimmung der Einbaurrate markierter Präkursoren

Die Generierung der Sesquiterpene erfolgt über Farnesyldiphosphat unter Verwendung von drei Bausteinen IPP und DMAPP (Abbildung 4) bzw. im Fall der deuteriummarkierten Präkursoren d_2 -IPP und d_2 -DMAPP (Abbildung 31). Folglich können maximal bis zu sechs Deuteriumatome eingebaut werden. Abbildung 33 zeigt den Elutionsbereich für Germacren D nach Applikation von d_2 -MVL. Neben markiertem Germacren D (d_6) ist immer noch unmarkiertes Germacren D (d_0) nachweisbar. Bei der gaschromatographischen Trennung eluieren Deuterium-markierte Verbindungen in Abhängigkeit des Deuterierungsgrades vor den unmarkierten Analoga (sog. inverser Isotopeneffekt)^[58].

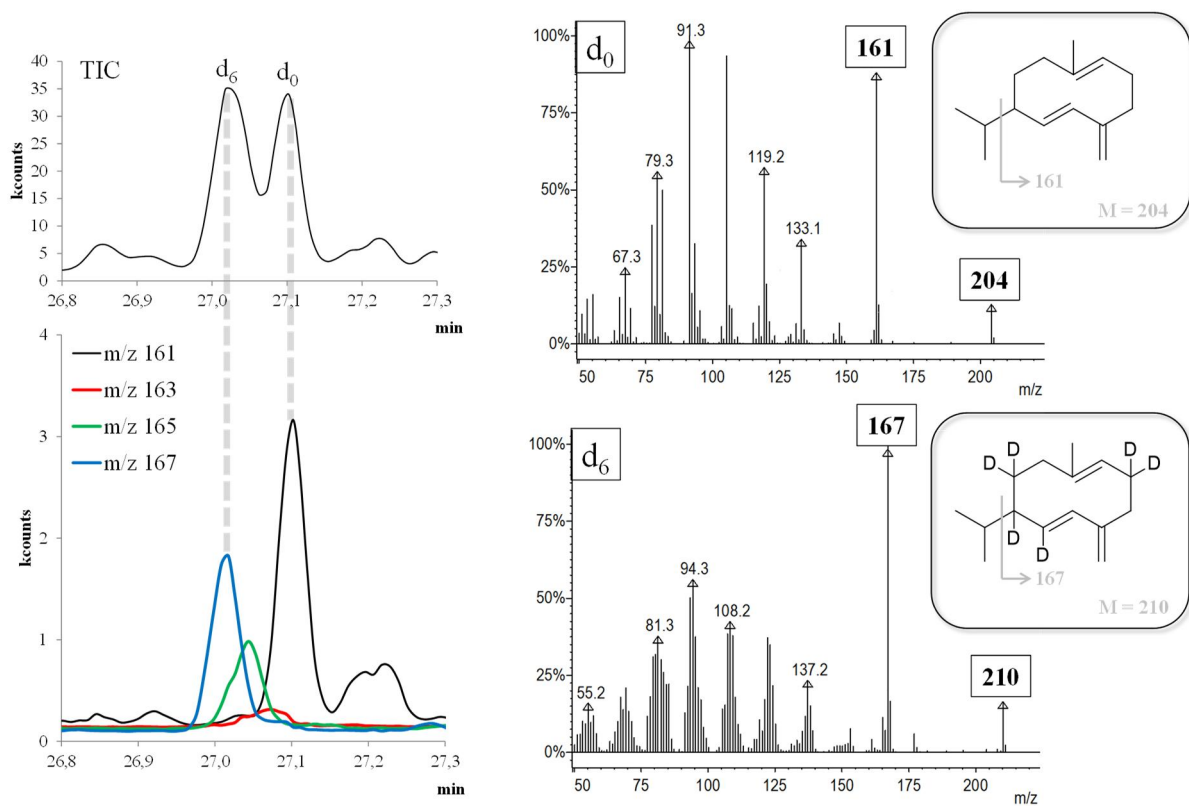


Abbildung 33: Chromatogramm und Massenspektren von markiertem und unmarkiertem Germacren D nach Applikation von d_2 -MVL. Links dargestellt ist die chromatographische Trennung von markiertem und unmarkiertem Germacren D. Links oben ist der TIC (total ion chromatogramm) gezeigt, links unten sind die charakteristischen Ionenspuren (SIS: single ion selection) für unmarkiertes Germacren D ($m/z = 161$), d_2 -Germacren D ($m/z = 163$), d_4 -Germacren D ($m/z = 165$) und d_6 -Germacren D ($m/z = 167$) dargestellt. Rechts abgebildet sind die Massenspektren von unmarkiertem (d_0 , oben) und markiertem (d_6 , unten) Germacren D sowie das erwartete Markierungsmuster (vgl. Kapitel 3.4).

Der Markierungsgrad kann über die Molekülonen $[M]^+$ ermittelt werden. Im Fall des genuinen Germacren D ist das Molekülion bei $m/z = 204$ nachweisbar. Das Molekülion des markierten Germacren D weist eine Masse von $m/z = 210$ auf und damit eine Verschiebung um sechs Einheiten, was einem Einbau von sechs Deuteriumatomen entspricht. Auch das Fragment $m/z = 167$ des markierten Germacren D weist eine Verschiebung um sechs Einheiten auf (genuin: $m/z = 161$). Über dieses Fragment kann auf einen bestimmten Cyclisierungsmechanismus bei der Generierung des Germacren D zurückgeschlossen werden (Abschnitt 3.4). Neben d_6 -Germacren D sind auch d_4 -Germacren D (Ionenspur $m/z = 165$) und d_2 -Germacren D (Ionenspur $m/z = 163$) nachweisbar. Die Auswertung erfolgte nur für vollständig markierte Sesquiterpene. Da die Fragmente $m/z = 161$ und 167 eine höhere Intensität aufweisen als die Molekülonen, wurde die Quantifizierung über diese Ionenspuren gemäß der Formel:

$$R\% = \frac{A_l}{A_g} * 100\%$$

R% = Einbaurrate [%]

A_l = Peakfläche der markierten Verbindung

A_g = Peakfläche der genuinen Verbindung

durchgeführt. Analog zum Germacren D wurden auch andere Sesquiterpene (Abbildung 34) aber auch Monoterpene und das Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid markiert und über ihre charakteristischen Ionenspuren ausgewertet (Tabelle 9).

Sesquiterpene, die starke Überlagerungen zeigten (z.B. die Sesquiterpene bei RI 1391 oder (*E*)- β -Caryophyllen und β -Ylangen) wurden nicht für die Auswertung herangezogen. Abbildung 34 verdeutlicht zudem, dass fast alle markierten Sesquiterpene, analog dem Germacren D, das Fragment $m/z = 167$ bilden, d.h. bei der Abspaltung einer Isopropylgruppe kein Verlust eines Deuteriums erfolgt. Die jeweiligen Massenspektren, postulierte Markierungsmuster und Vorschläge zu Cyclisierungsmechanismen sind in den Anhängen Abbildung A 8 bis Abbildung A 15 angegeben bzw. werden in Kapitel 3.4 näher erläutert.

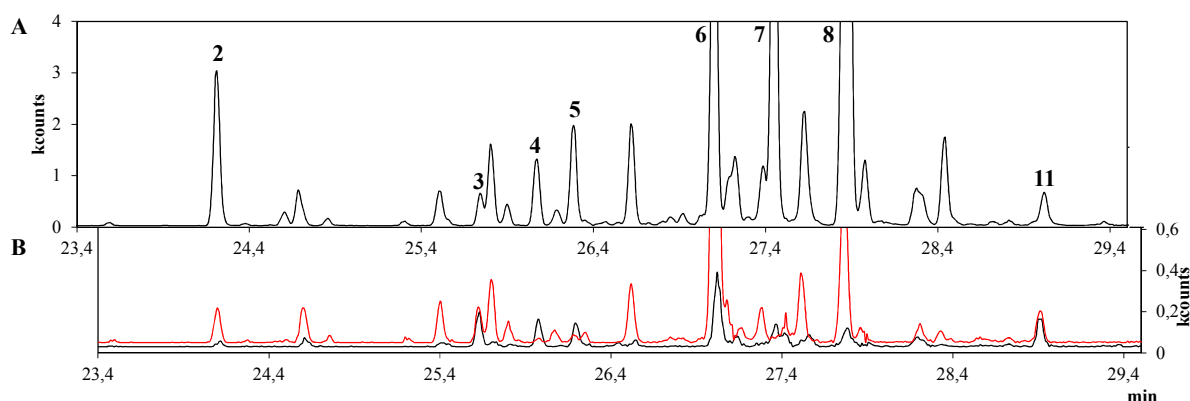


Abbildung 34: Charakteristische Ionenspuren unmarkierter und markierter Sesquiterpene nach Applikation von d_2 -MVL (Lemberger, Reife). Abbildung A zeigt die Ionenspur für unmarkierte Sesquiterpene ($m/z = 161$). Abbildung B zeigt Ionenspuren für markierte Sesquiterpene ($m/z = 167$ (rot) und $m/z = 166$ (schwarz)). Die ausgewerteten Sesquiterpene sind, entsprechend ihrer Nummerierung, Tabelle 9 zu entnehmen. Die Sesquiterpene Nr. 9 und 10 in Tabelle 9 weisen nicht die Fragmentationen auf, die im dargestellten Chromatogrammauszug extrahiert wurden. Die Chromatogramme wurden versetzt dargestellt, um eine Zuordnung visuell zu vereinfachen.

Tabelle 9: Charakteristische Fragmente genuiner und Deuterium-markierter Terpene in Lemberger und Syrah nach Applikation von d_2 -DOX und d_2 -MVL

Nr.	Verbindung	Molekülon genuin/markiert	Ionenspur für Auswertung genuin/markiert	Markierungsgrad
<i>Monoterpene</i>				
1	Geraniol	n.n. ²	69/71	4 ^b
<i>Sesquiterpene</i>				
2	α -Ylangen	204/210	161/167	6
3	γ -Elemen ¹	204/210	189/195	6
4	Guaia-6,9-dien	204/209	161/166	5
5	Selina-4,6-dien	204/209	161/166	5
6	Germacren D	204/210	161/167	6
7	<i>epi</i> -Zonaren	n.n. ²	161/166	5 ³
8	γ -Cadinen	204/210	161/167	6
9	RI 1534	n.n. ²	122/125	n.b. ⁴
10	β -Calacoren	200/204	142/146	4
11	Germacren B ¹	204/210	189/195	6
<i>Diterpene</i>				
12	13- <i>epi</i> -Manoyloxid	275/283	257/265	8

1) Deuterium-markiertes Analogon bildet die Fragmente m/z 166 und 167 nach Abspaltung der Isopropylgruppe

2) n.n. = nicht nachweisbar

3) unter Vorbehalt

4) n.b. = nicht bestimmbar

3.3 Untersuchung der Kompartimentierung der Biosynthesewege

Vorversuch: Applikation von d₂-MVL und d₂-DOX zu intakten Beeren (Lemberger)

In Kapitel 2.4 wurde bereits beschrieben, dass nur im Mesokarp einiger Rebsorten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nachweisbar waren. Um zu prüfen, ob dennoch eine biosynthetische Aktivität bzgl. der Sesquiterpene vorliegt, wurden die markierten Präkursoren in das Mesokarp der intakten Beeren appliziert und Meso- und Exokarp nach einer Inkubationszeit getrennt voneinander analysiert. Weder d₂-MVL noch d₂-DOX führten zu markierten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen im Mesokarp der Beere. Jedoch war nach Applikation von d₂-DOX, analog zu den Ergebnissen von Luan und Wüst (2002), ein Einbau in Monoterpene nachweisbar, während die Verabreichung von d₂-MVL zu keiner Markierung der Monoterpene des Mesokarps führte (Anhang, Abbildung A 4)^[21].

Zum Teil konnte nach Applikation der markierten Präkursoren zu intakten Beeren eine Markierung der vom Exokarp emittierten Sesquiterpene nachgewiesen werden. Die Sesquiterpene wiesen eine Deuteriummarkierung von max. 139 % bei Applikation von d₂-MVL und 20 % nach Verabreichung von d₂-DOX auf¹⁸. Die erfolgte Markierung im Exokarp ist auf einen Transport der Präkursoren von Meso- zu Exokarp zurückzuführen. Unklar ist hierbei, ob es sich um einen aktiven Transport handelt oder nur um Diffusion. Die Applikation von d₂-DOX führte auch hier zur Markierung von Monoterpenen und dem Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid (Anhang, Abbildung A 5). In Tabelle 10 sind die erzielten Einbauraten angegeben.

Da sich über diese Versuche zeigte, dass bzgl. der Sesquiterpenbiosynthese keine biosynthetische Aktivität im Mesokarp vorlag, wurden nachfolgende Messungen nur mit dem isoliertem Exokarp durchgeführt.

¹⁸ Maximale Einbaurate bezieht sich auf γ -Elementen

Tabelle 10: Maximal erzielter Einbau von d₂-DOX und d₂-MVL in Mono-, Sesqui- und Diterpene des Exokarps nach Applikation in intakte Beeren, n=1

Verbindung	Einbaurrate [%]	
	d ₂ -MVL	d ₂ -DOX
<i>Monoterpene</i>		
Geraniol	n.n. ¹	79
<i>Sesquiterpene</i>		
α-Ylängen	41	6
γ-Elementen	139	20
Guaia-6,9-dien	35	n.b. ²
Selina-4,6-dien	48	5
Germacren D	46	n.b. ²
<i>epi</i> -Zonaren	16	3
γ-Cadinen	47	4
Germacren B	33	6
β-Calacoren	n.b. ²	n.b. ²
<i>Diterpen</i>		
13- <i>epi</i> -Manoyloxid	n.n. ¹	3

1) n.n. = nicht nachweisbar

2) n.b. = nicht bestimmbar

Applikation zu isoliertem Exokarp

Bei der Inkubation von isoliertem Exokarp konnte bei der Rebsorte Lemberger sowohl nach Applikation von d₂-MVL, als auch von d₂-DOX eine Markierung verschiedener Sesquiterpene nachgewiesen werden. Beide markierten Präkursoren führten zu vergleichbaren Einbauraten (Abbildung 35, A). Maximale Einbauraten wurden für die Sesquiterpene Germacren D, Germacren B und γ-Elementen erzielt. Die ermittelten Einbauraten von bis zu 100% innerhalb von 48 h Inkubationszeit lassen auf eine hohe biosynthetische Aktivität im isolierten Exokarp schließen. Werden die erzielten Einbauraten für die beiden Präkursoren gegeneinander aufgetragen (Abbildung 35, B), spiegelt die Steigung den Crosstalk zwischen beiden Biosynthesewegen wieder: beide Präkursoren können demnach gleichermaßen zur Bildung von Sesquiterpenen beitragen. Die erzielten Einbauraten der jeweiligen Präkursoren zeigten zudem eine hohe Korrelation ($R^2 = 0,8937$).

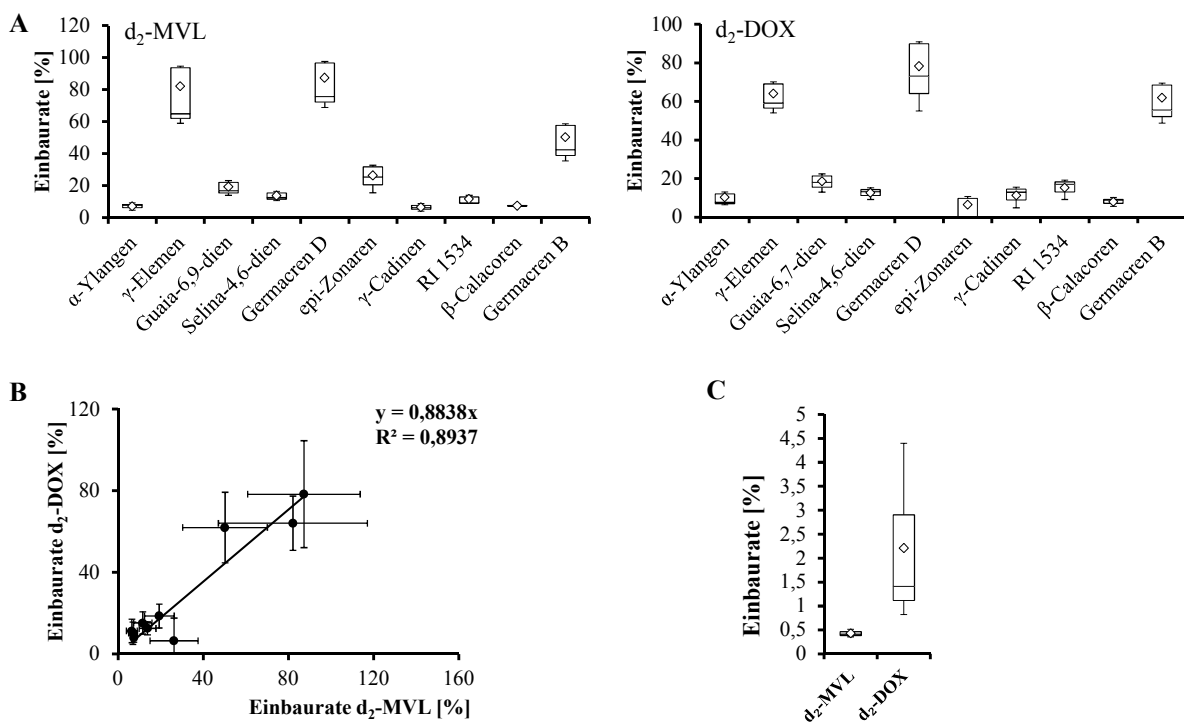


Abbildung 35: Deuteriumeinbau nach Applikation von d₂-MVL und d₂-DOX (Lemberger, Exokarp). Dargestellt sind Messungen aus 2012 (Reife, n = 4). Abbildung A zeigt Box-Whisker-Plots mit dem 25% Perzentil (1. Quartil, unten) und dem 75% Perzentil (3. Quartil, oben), getrennt durch den Median (50% Perzentil). Die Raute entspricht dem Mittelwert. Unterer Whisker ist das untere Perzentil minus den kleinsten Wert, oberer Whisker ist der größte Wert minus den oberen Perzentil. Abbildung B zeigt die Korrelation der erzielten Einbauarten der beiden Biosynthesewege. In Abbildung C sind über Box-Whisker-Plots die erzielten Einbauarten von d₂-MVL und d₂-DOX in 13-*epi*-Manoyloxid dargestellt.

Im Anhang (Abbildung A 6 und Abbildung A 7) sind die Ergebnisse für Lemberger für 2010 sowie für Syrah, Gewürztraminer und dem unaromatischen Gewürztraminer für 2012 aufgeführt. Bei allen untersuchten Rebsorten erfolgte der Einbau beider Präkursoren in der gleichen Größenordnung, obgleich der Einbau von d₂-DOX in die Sesquiterpene der Rebsorte Lemberger 2010 etwas geringer ausfiel, als bei den Applikationsstudien 2012. Analog zu den Ergebnissen von Luan und Wüst (2002)^[21] fand nur ein geringfügiger Einbau von d₂-MVL in Monoterpene statt, während d₂-DOX zu einer deutlichen Markierung führte. Auch das Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid konnte nach Applikation von d₂-DOX markiert nachgewiesen werden, wohingegen eine Markierung nach Applikation von d₂-MVL nur in Spuren nachweisbar war (Abbildung A 6). Mono- sowie Diterpen-Synthasen besitzen am N-Terminus ein Transitpeptid, um in die Plastiden zu gelangen, während Sesquiterpensynthasen im

Cytoplasma lokalisiert sind^[59]. Demzufolge kann auf einen Transport von Präkursoren vom Plastid zum Cytosol geschlossen werden. Dahingegen besteht nur ein limitierter Import von cytosolischem IPP/DMAPP in die Plastiden. Dieses Modell ist im Einklang mit der Studie von Bick und Lange (2003), die einen einfach gerichteten Transport von Isoprenoid-Intermediaten von Plastid zu Cytoplasma für isolierte Chloroplasten von Spinat, Grünkohl und Indischen Senf zeigen konnten^[19].

Der nachgewiesene Crosstalk ist unabhängig von der Rebsorte (aromatisch oder neutral), dem Jahrgang und der strukturellen Klassifizierung der Sesquiterpene (acyclisch und polycyclische Sesquiterpene). Sogar der unaromatische Gewürztraminer, dessen Monoterpenbiosynthese gehemmt ist, wies einen uneingeschränkten Einbau von d₂-DOX in Mono- und Sesquiterpene auf (Abbildung A 6). Dies lässt vermuten, dass bei dem unaromatischen Traminer die Biosynthese von DOXP gehemmt ist.

3.4 Bestimmung der Stereochemie von Germacren D und Bewertung des Markierungsmusters weiterer Sesquiterpene, Reife

Germacren D ist ein in der Natur weit verbreitetes, chirales Sesquiterpen. Wie bereits in Abschnitt 2.1 erläutert, ist Germacren D aber auch ein häufiges Schlüsselintermediat zur Generierung weiterer Sesquiterpene. Die verschiedenen Germacren D-Enantiomere sind von Relevanz, da sie unterschiedliche biologische Aktivitäten bei Pflanze-Insekt-Interaktionen aufweisen können. So konnten Stranden et al. (2002) nachweisen, dass das (S)-Germacren D einen zehnmal stärkeren Effekt auf die Rezeptorneuronen der Motte *Helicoverpa armigera* aufweist, als das (R)-Enantiomer^[60]. Auch für *Vitis sp.* konnte gezeigt werden, dass die Motte *Paralobesia viteana* (Clemens) von emittierten Terpenen der Beeren, u.a. Germacren D, angelockt wird^[61].

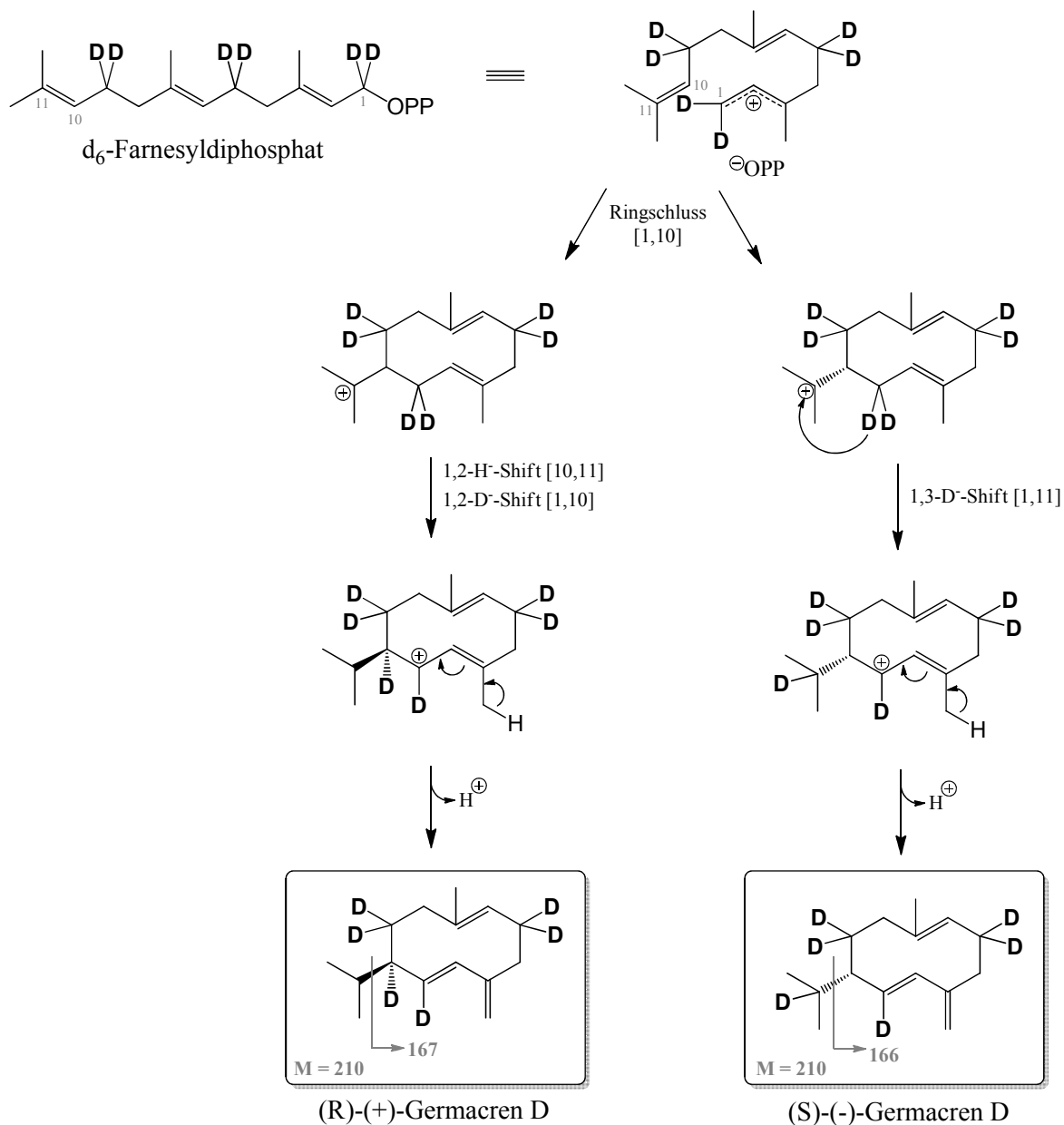


Abbildung 36: Einbau markierter Präkursoren in die Germacren D-Enantiomere. Nach dem enzymatischen Cyclisierungsmechanismus in *Solidago canadensis*^[62].

Für *Solidago canadensis* (Goldrute) ist der Cyclisierungsmechanismus zum Germacren D näher charakterisiert. In der Goldrute sind zwei verschiedene enantioselektive Enzyme an der Cyclisierung beteiligt, die jeweils über eine 1,3-Hybridverschiebung das (S)-Germacren D und über zwei hintereinander geschaltete 1,2-Hybridverschiebungen das (R)-Germacren D bilden. Steliopoulos et al. (2002) konnten den von Schmidt et al. (1999) postulierten Cyclisierungsmechanismus unter Verwendung von $[5,5\text{-}^2\text{H}_2]$ -Deoxy-D-xylulose bestätigen (Abbildung 36)^{[63],[62]}. Bei der Cyclisierung zum (S)-Germacren D kommt es zu einem Shift

der Deuteriummarkierung an Position 11, während die Markierung des (R)-Enantiomers an Position 10 verschoben wird. Beide Isomere weisen das Molekölion $m/z = 210$ auf. Das (S)-Enantiomer fragmentiert jedoch unter Abspaltung der Isopropyl-Seitenkette zu $m/z = 166$, während das (R)-Enantiomer das Fragment $m/z = 167$ bildet.

In *Vitis vinifera* fragmentiert das deuterierte Germacren D unter Bildung des Fragments $m/z = 167$ (Abbildung 33), analog zu dem (R)-Germacren D in *Solidago canadensis*. Dass es sich bei *Vitis vinifera* tatsächlich um das (R)-Enantiomer handelt¹⁹, konnte mit enantioselektiver Analyse bestätigt werden (Abbildung 37). Interessanterweise ist das (R)-Enantiomer des Germacren D eher in niederen Pflanzen, z.B. Lebermoosen präsent, während es seltener in Angiospermen nachweisbar ist^[64].

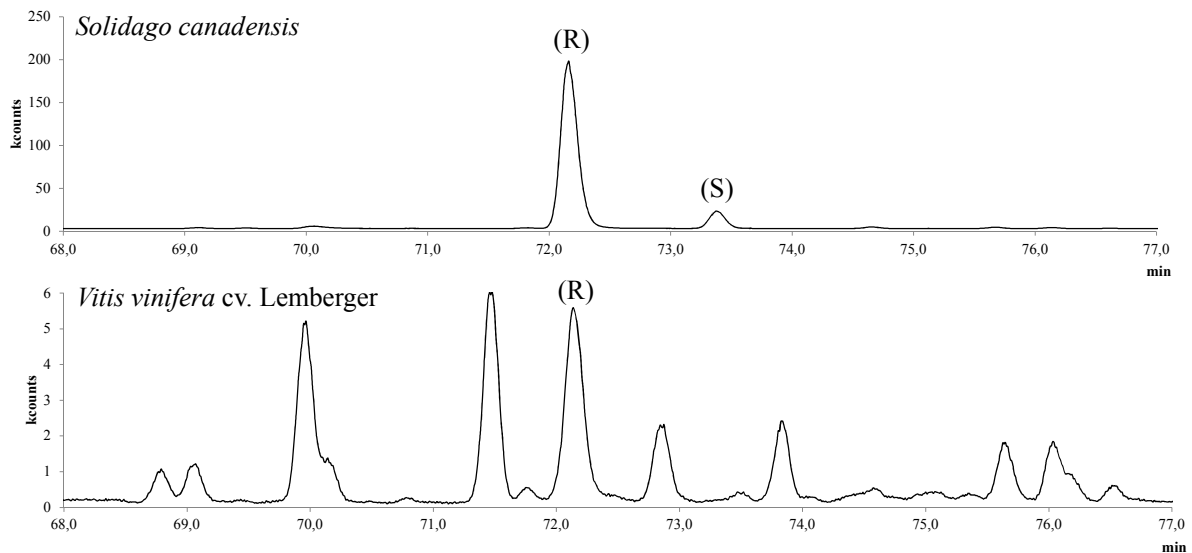


Abbildung 37: Enantioselektive Analyse der Germacren D Enantiomere in *Solidago canadensis* und *Vitis vinifera* cv. Lemberger (Reife)

¹⁹ Bei reifen Trauben. Zur Preveraison ist das (S)-Enantiomer nachweisbar, vgl. Kapitel 3.5

Ableitung möglicher Markierungsmuster weiterer Sesquiterpene

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, weisen auch eine Vielzahl weiterer Sesquiterpene analog zu dem d_6 -(R)-Germacren D das Fragment $m/z = 167$ auf. Germacren D kann als Schlüsselintermediat zur Bildung weiterer Sesquiterpene, z.B. α -Ylangen und γ -Cadinen, dienen. Weisen markierte Sesquiterpene das Fragment $m/z = 167$ auf, ist dies ebenfalls auf die Abspaltung einer $(C_3H_7\cdot)$ -Einheit, d.h. einer nicht markierten Isopropyleinheit, zurückzuführen. Dies kann auf eine Cyclisierung über die besagte 1,3-Hybridverschiebung zum (R)-Germacren D nach Schmidt et al. (1999)^[62] und anschließender Generierung der Sesquiterpene α -Ylangen und γ -Cadinen nach Steele et al. (1998)^[26] zurückgeführt werden (Abbildung A 8).

Über die Molekülonen der Sesquiterpene Guaia-6,9-dien und Selina-4,6-dien kann ein maximaler Einbau von nur fünf Deuteriumatomen abgeleitet werden (Abbildung A 12). Der Verlust eines Deuteriums ist hierbei auf die Cyclisierung zurückzuführen. Als Mechanismus kann eine Kombination der frühen Cyclisierungsschritte zum (R)-Germacren D nach Schmidt et al. (1999)^[62] und die anschließende Cyclisierung nach Steele et al. (1998)^[26] herangezogen werden (Abbildung A 9).

Das beobachtete Markierungsmuster für Germacren B stimmt ebenfalls mit dem nach Steele et al. (1999) formulierten Cyclisierungsmechanismus überein. Über eine Cope-Umlagerung kann zudem das Sesquiterpen γ -Elemen vom Germacren B abgeleitet werden (Abbildung A 10). Auffällig ist jedoch, dass beide Sesquiterpene unter Bildung gleicher Anteile an $m/z = 166$ und $m/z = 167$ fragmentieren (Abbildung A 13). Da über die Molekülonen ein vollständiger Einbau der sechs Deuteriumatome nachweisbar ist, muss die Abspaltung der Isopropylgruppe nach intramolekularer Umlagerung eines Protons oder Deuteriumatoms erfolgen.

3.5 Bestimmung der Stereochemie von Germacren D und Bewertung des Markierungsmusters weiterer Sesquiterpene, Preveraison

In Abschnitt 2.2 konnte gezeigt werden, dass sich die Sesquiterpenprofile zur Preveraison deutlich von den Profilen zur Zeit der Reife unterscheiden. Nach der Applikation von d_2 -DOX zu Beeren im frühen Entwicklungsstadium²⁰ konnten markierte Sesquiterpene nachgewiesen werden, die nicht, wie im Reifestadium, das Fragment $m/z = 167$ bildeten, sondern das Fragment $m/z = 166$ (Abbildung 38). Über die Molekülonen (am Beispiel δ -Cadinen, Abbildung 38 B) lässt sich der Einbau von sechs Deuteriumatomen ableiten. Folglich liegt hier eine Markierung der Isopropylseitenkette vor. δ -Cadinen lässt sich ebenfalls vom Germacren D ableiten (Abbildung 12). Aufgrund des Markierungsmusters von δ -Cadinen könnte die Cyclisierung über das (S)-Germacren D erfolgen. Markiertes Germacren D war bei diesen Applikationsstudien nicht nachweisbar, jedoch konnte parallel über enantioselektive Analyse das (S)-Enantiomer zur Preveraison in den untersuchten Rebsorten (Lemberger, Syrah, Gewürztraminer) nachgewiesen werden (Abbildung 39).

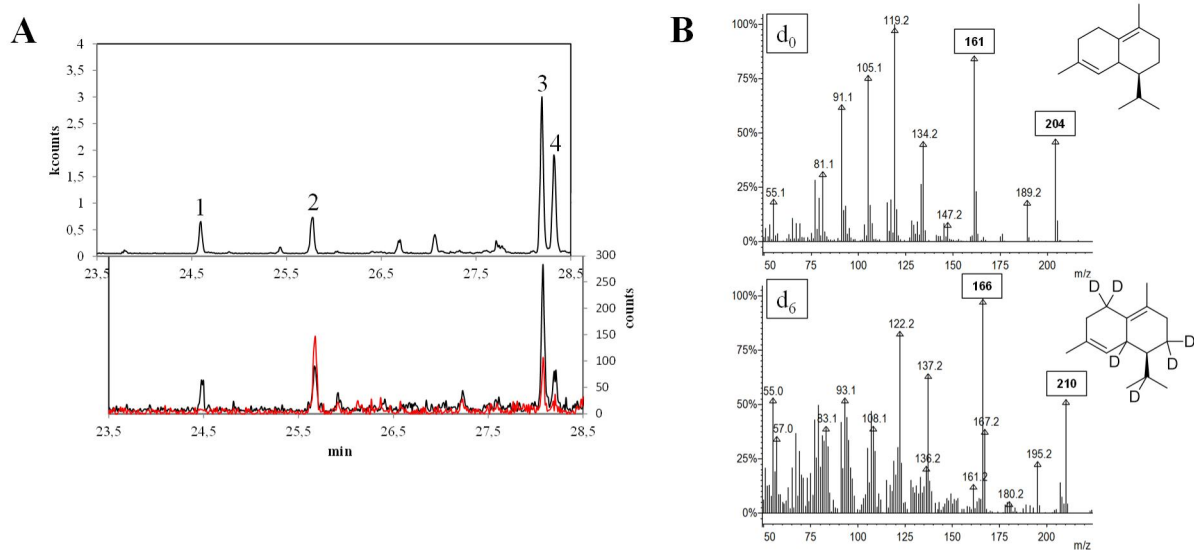


Abbildung 38: Einbau Deuterium-markierter Präkursoren in Sesquiterpene zur Preveraison. Gezeigt ist die Rebsorte Lemberger (Exokarp, 18.07.2012) nach Applikation von d_2 -DOX. Abbildung A zeigt die Ionenspur unmarkierter Sesquiterpene ($m/z = 161$, oben) sowie unten die Ionenspur für markierte Sesquiterpene ($m/z = 167$ (rot) und $m/z = 166$ (schwarz)). Folgende Sesquiterpene sind nummeriert: (1) α -Copaen, (2) Caryophyllen, (3) δ -Cadinen, (4) Zonaren. Die Chromatogramme sind versetzt dargestellt, um eine Zuordnung visuell zu vereinfachen. Abbildung B zeigt die Massenspektren von unmarkierten und markierten δ -Cadinen.

²⁰ 18.07.2012, Applikation von d_2 -DOX zu isoliertem Exokarp, n = 3

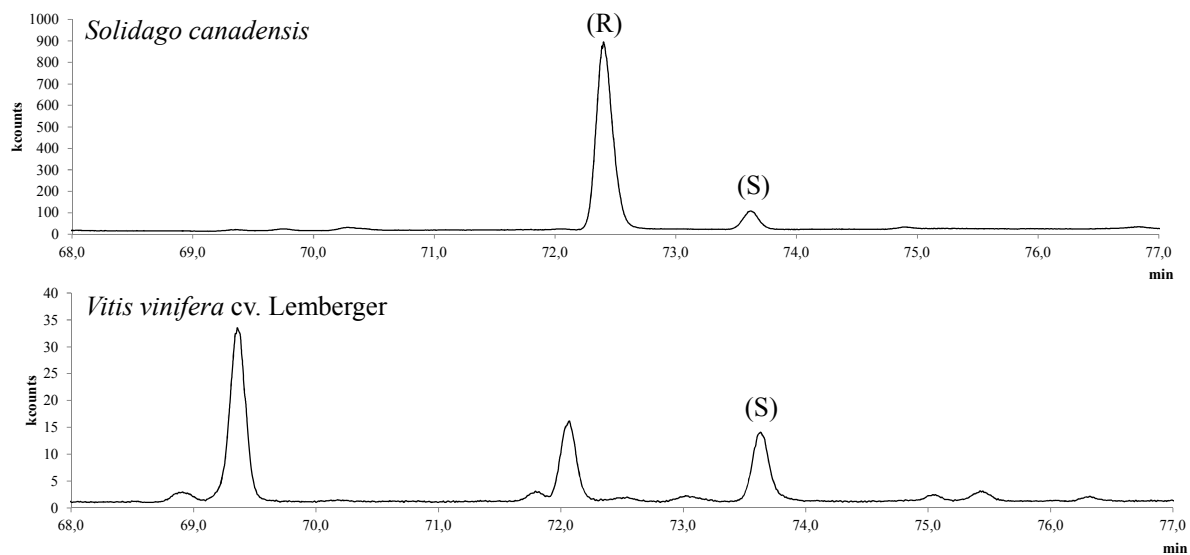


Abbildung 39: Enantioselektive Analyse der Germacren D Enantiomere in *Solidago canadensis* und *Vitis vinifera* cv. Lemberger (Preveraison)

3.6 Einfluss der mikrobiellen Flora auf die Emission von Sesquiterpenen

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde durch Entfernung der mikrobiellen Flora von Blüten die Terpenemission signifikant reduziert^[65].

Um zu ermitteln, ob die mikrobielle Flora an der Emission von Sesquiterpenen beteiligt ist oder diese beeinflusst, wurden die Trauben durch das kurzzeitige Tauchen in eine Natriumhypochloridlösung (1%) desinfiziert. Anschließend wurde das isolierte Exokarp mit den d_2 -DOX und d_2 -MVL inkubiert und nach 48 h vermessen.

Aus Abbildung 40 geht hervor, dass die Oberflächendesinfektion der Beeren die Terpenemission nicht signifikant eingeschränkt hat. Vergleicht man die jeweiligen Signale für genuine und deuteriummarkierte Sesquiterpene, lag nach der Desinfektion keine verminderte biosynthetische Aktivität vor.

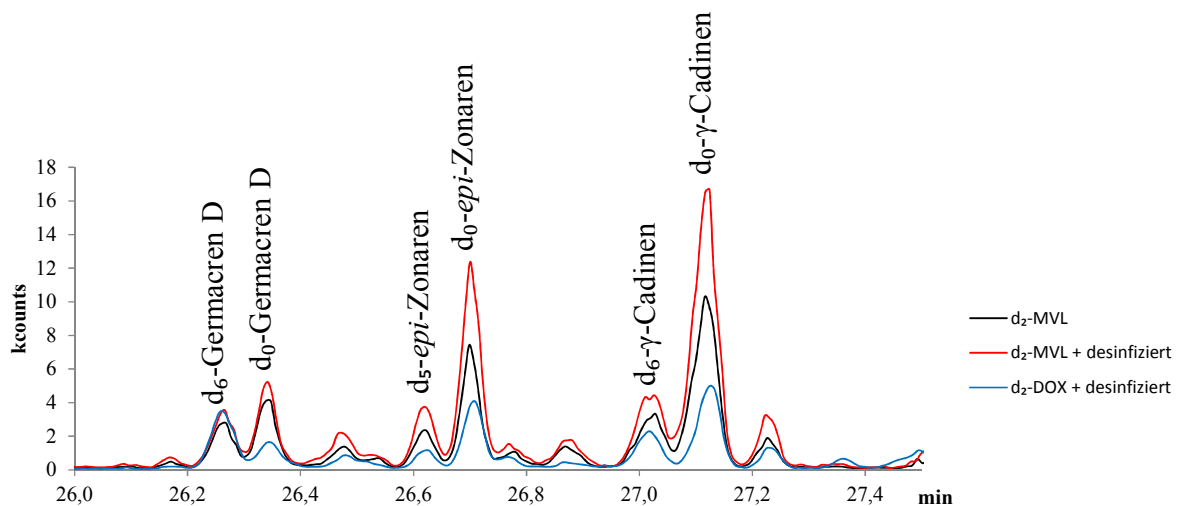


Abbildung 40: Einfluss der Oberflächendesinfektion auf des Emissionsprofil und die biosynthetische Aktivität des Exokarps

4 Methyljasmonat-induzierte Terpenbiosynthese

4.1 Grundlagen

Die Verteidigungsstrategien im Pflanzenreich

Pflanzen haben im Verlauf der Evolution eine Vielzahl von Verteidigungsstrategien gegen Schädlingsbefall (Pilze, Mikroorganismen, Insekten) entwickelt. Allgemein kann zwischen direkter und indirekter Abwehr unterschieden werden.

Zur direkten Abwehr zählt die Bildung antimikrobiell wirksamer Komponenten (z.B. Stilbene, Terpene)^[66], die Bildung von Verbindungen, die die Qualität des gefressenen Blattmaterials herabsetzen oder von verdauungshemmenden Proteinen^[67]. Bei Schädlingsbefall wird auch eine Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: active oxygen species, AOS)^[68] oder sogenannter PR-Proteine (engl.: pathogenesis-related (PR) proteins) beschrieben^[69]. Die Verteidigung gegen den Schädling kann bis hin zur hypersensitiven Reaktion (engl.: hypersensitive reaction, HR) führen, die wiederum zum nekrotischen Absterben der betroffenen Pflanzenzellen führt. Der programmierte Zelltod soll das weitere Ausbreiten des Schädlings verhindern^[70]. Andere induzierte Mechanismen können auch zur Resistenz gegen den Schädling führen (engl.: systemic acquired resistance, SAR) und damit die Pflanze dauerhaft schützen^[71].

Zur indirekten Abwehr zählt die Emission eines Duftstoffbouquets mit dem die Pflanze Fraßfeinde des angreifenden Schädlings anlocken kann. Auch eine induzierte Verteidigung in benachbarten Pflanzen wird in diesem Zusammenhang beschrieben^[72]. Die Feinregulation dieser vielzähligen Verteidigungsmechanismen erfolgt über ein Netzwerk an Phytohormonen oder hormonähnlichen Signalstoffen, u.a. Jasmonat-Konjugaten, Salicylsäure (SA) und Ethylen, die untereinander synergistisch oder antagonistisch wirken können^{[73],[74]}.

Unterscheidung nach Art des Schädlings

Wie beschrieben sind die Möglichkeiten induzierbarer Mechanismen komplex. Je nach Schädlingsbefall muss in der Pflanze jedoch der richtige Mechanismus abgerufen werden. Für *Arabidopsis thaliana* konnte z.B. gezeigt werden, dass biotrophe Schädlinge häufig salicylsäureabhängige Verteidigungsmechanismen induzieren, während jasmonat- oder ethylenabhängige Mechanismen von nekrotrophen Schädlingen hervorgerufen werden^[75]. Biotrophe Schädlinge ernähren sich von der lebenden Pflanzenzelle und sind somit auf das Überleben der Pflanze angewiesen. Nekrotrophe Schädlinge hingegen ernähren sich vom

abgetöteten Pflanzenmaterial. Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit ist die Art des physikalischen Stimulus, z.B. das Fressen einer Raupe, oder die Eiablage eines Insekts. In dem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Pflanze bei Befall mit fressenden Insekten ein anderes Profil flüchtiger Verbindungen emittiert als bei Befall mit stechenden und saugenden Insekten (Tabelle 11, Nr. 2 und 3)^[76]. Chemische Stimuli sind spezifische Verbindungen pathogenen oder pflanzeigenen Ursprungs, die ebenfalls entsprechende Mechanismen induzieren können. Hierzu zählen z.B. Sekrete des Schädling, Zellwandbestandteile des Pilzes oder Bakteriums oder pflanzeigene Bestandteile, die durch das sich zersetzende Pflanzengewebe freigesetzt werden. Als Elicitor fungieren z.B. Kohlenhydrat-Polymere, Lipide, (Glyco-) Peptide oder (Glyco-) Proteine. Das Beispiel der β -Glucosidase zeigt, wie unterschiedlich auch hier die Signalantwort bei verschiedenen Pflanzenspezies ausfallen kann. Die β -Glucosidase ist ein Enzym aus dem Regurgitat (Speichel oder Vorderdarminhalt) der Kohlweißlingsraupe (*Pieris brassicae*). In Kohllarten eliziert die β -Glucosidase Duftstoffe, die bei Befall mit der Kohlweißlingsraupe induziert werden^[77]. In der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) hingegen eliziert dasselbe Enzym Duftstoffe, die vom Befall mit Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) bekannt sind^[78].

Biosynthese von Jasmonsäure

Die Jasmonsäure zählt zu den Oxylipinen. Dies sind oxidierte Fettsäure-Derivate, die als Signalmoleküle bei Stressinduktion fungieren (hierzu gehört z.B. ebenfalls Traumatin: (*E*)-12-oxo-Dodec-10-ensäure). Die sogenannte Octadecanoid-Signalkaskade wird durch die mechanische Verwundung der Pflanzenzellmembran ausgelöst (z.B. durch das Fressen einer Raupe). Auch Elicitoren aus dem Regurgitat der Raupe (N-Acetyl-Aminosäurekonjugate oder β -Glucosidase) können diese Kaskade auslösen. Durch Phospholipasen wird Linolensäure aus der Zellmembran gelöst und über eine Lipoxygenase zu 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure und anschließend zu einem Cyclopentenon umgesetzt (12-Oxophytodiensäure, 12-OPDA). Durch anschließende β -Oxidation der Seitenkette erfolgt die Bildung der Jasmonsäure (Abbildung 41). Die β -Glucosidase hingegen, aus dem Regurgitat der Raupe, aktiviert AOS (H_2O_2), die wiederum mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Fettsäurehydroperoxiden oxidieren. Diese sind ebenfalls Ausgangsverbindungen zur Bildung von Jasmonsäure^[72]. Die eigentlich aktive Form der Jasmonsäure ist das entsprechende L-Isoleucin-Konjugat. Auch Konjugate mit L-Leucin und L-Valin werden beschrieben^[79].

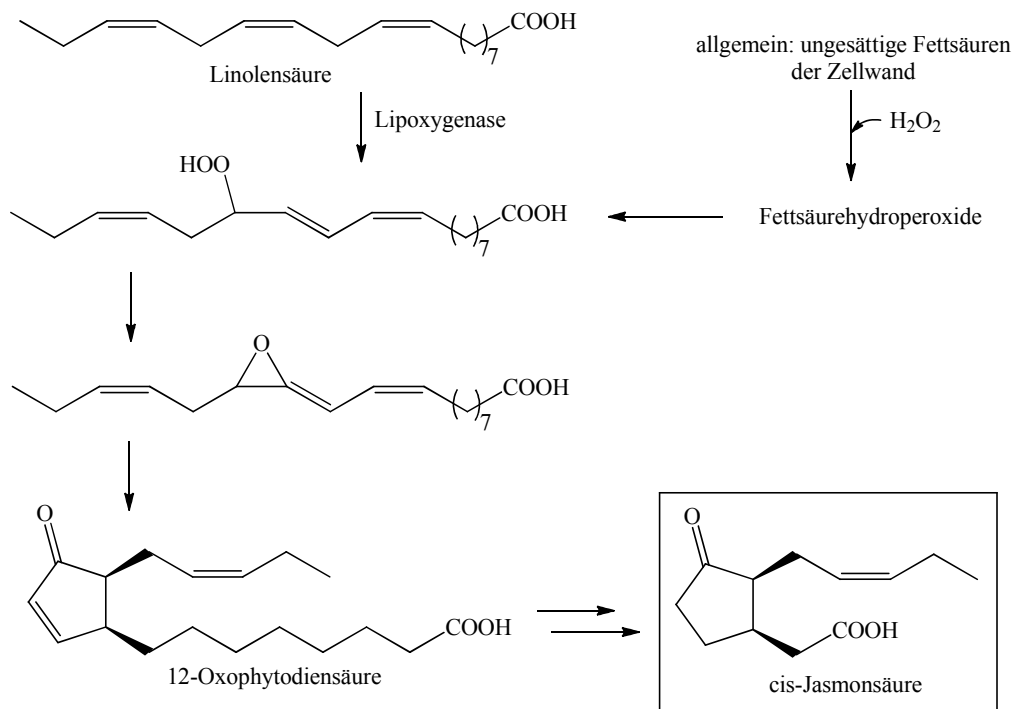


Abbildung 41: Biosynthese von Jasmonsäure

Emission eines Duftstoffbouquets

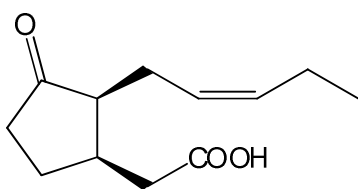
Die Unterschiede im Duftstoffbouquet, hervorgerufen durch verschiedene Schädlinge, sind weniger qualitativ, jedoch häufig quantitativ unterschiedlicher Natur. Das Duftstoffbouquet besteht meist aus Terpenen, Acetogeninen und aromatischen Verbindungen (Tabelle 11, Nr. 1-4). Pflanzenspezies übergreifend spielen v.a. die Monoterpene β -Ocimen und Linalool, die Homoterpene DMNT (4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien) und TMTT (4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen) sowie die Sesquiterpene Nerolidol, Caryophyllen und die Farnesen-Isomere eine wichtige Rolle. Die Acetogenine sind C₆-Derivate, meist Alkohole, Aldehyde oder Ester (Hexenal, Hexenol, Hexenylacetat). Sie werden auch als GLVs (engl.: green leaf volatiles) bezeichnet und entstehen durch enzymatischen Abbau aus Fettsäurehydroperoxiden. Pflanzen emittieren aber auch Duftstoffe, die aus dem Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren, dem Shikimatweg, generiert werden. Hierzu gehören Methylsalicylat und Indol^[72]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Duftstoffemission in einem diurnalen Rhythmus (Tag/Nacht-Rhythmus) erfolgt. Die Emission flüchtiger Verbindungen ist hierbei tagsüber am höchsten^[80].

Duftstoffemission zur Rekrutierung von Fraßfeinden

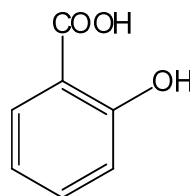
Die Duftstoffemission gehört zu den indirekten Verteidigungsstrategien über die z.B. das Anlocken von Fraßfeinden des attackierenden Schädling ermöglicht wird. So induziert die Eiablage durch die Gemeine Kiefernbuschhornblattwespe (*Diprion pini*) bei der Waldkiefer (*Pinus sylvestris*) verschiedene flüchtige Verbindungen, die wiederum *Chrysonotomyia ruforum*, einen Eiparasit, anlocken^[81]. Auch die Interaktion Pflanze-Blattlaus-Fraßfeind ist im Fokus verschiedener Studien. Das Sesquiterpen (*E*)- β -Farnesen ist ein Alarm-Pheromon der Blattlaus^[82]. Jedoch sind einige Fraßfeinde der Blattläuse in der Lage, ihre Beute gerade aufgrund dieses Pheromons aufzuspüren^{[83]-[85]}. Untersuchungen zeigten auch, dass der Befall mit Blattläusen bei einigen Pflanzenspezies die Bildung von (*E*)- β -Farnesen induzieren kann und damit Fraßfeinde durch die befallene Pflanze angelockt werden können^[84]. Bilden Pflanzen (*E*)- β -Farnesen, hat dies zudem einen abschreckenden Effekt auf die Blattläuse^[83]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für Linalool beobachtet^[86]. An Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Chardonnay konnte desweiteren gezeigt werden, dass Nerolidol, welches bei Infektion mit *Phaeoacremonium parasiticum* verstärkt gebildet wird, einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum dieses Pilzes aufweist^[87].

Einsatz exogener Induktoren - Zweck und Nutzen

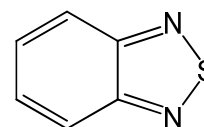
Abbildung 42 zeigt häufig eingesetzte Induktoren zur Untersuchung pflanzlicher Abwehrmechanismen. Salicylsäure wird bei Schädlingsbefall über den Shikimisäureweg aus Chorisminsäure gebildet^[88], Benzothiadiazol (BTH) ist ein strukturelles Analogon der Salicylsäure^[89].



cis-Jämonsäure



Salicylsäure



Benzothiadiazol

Abbildung 42: Verschiedene Induktoren von Abwehrmechanismen

Der Einsatz exogener Elicitoren wird kontrovers diskutiert. Natürlich kann das Applizieren einzelner Elicitoren nicht die komplexe, physiologische Reaktion einer Pflanze gegenüber Schädlingen simulieren. Zumal andere genuin induzierbare Phytohormone synergistische oder antagonistische Effekte aufweisen. Eine Pflanze ist zudem meist nicht nur von einem Schädling befallen. Die Reaktion auf mehrere Schädlinge erweist sich als ein komplexer Mechanismus^[90]. Das Applizieren von exogenen Elicitoren erfolgt häufig zu unspezifischen Zellgeweben, in meist nicht physiologisch relevanten Konzentrationen. Die Metabolisierung zum eigentlich wirksamen Derivat (z.B. hier Methyljasmonat zum *cis*-Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat) ist ungewiss. Dennoch zeigen Pflanzen bei Behandlung mit exogenen Elicitoren ähnliche Mechanismen wie bei Schädlingsbefall. Es wird die Expression typischer Gene hochreguliert, antimikrobiell wirksame Stoffe werden synthetisiert und Duftstoffe emittiert (Tabelle 11 und Tabelle 12).

Da exogene Elicitoren Verteidigungsmechanismen in Pflanzen induzieren und die Pflanzen damit eine gesteigerte Resistenz gegen verschiedene Schädlinge aufweisen können, wird auch der agrar-ökologische Aspekt betrachtet. So konnte bei Rebstöcken durch Behandlung mit den exogenen Elicitoren Methyljasmonat, Benzothiadiazol und Laminarin eine gesteigerte Resistenz gegen *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* (falscher Mehltau) und *Erysiphe necator* (echter Mehltau) nachgewiesen werden^{[92]-[94],[97]}.

Tabelle 11: Natürlich und künstlich induzierte Abwehrmechanismen verschiedener Pflanzenspezies

Nr.	Elicitor/Organismus	Pflanze	Induzierte Verbindungen	Literatur
1	<i>Epiphyas postvittana</i> (hellbraune Apfelmotte)	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala (Apfelbaum- Keimlinge)	Benzylalkohol, (<i>E</i>)- β -Ocimen, Benzylcyanid, Indol, (<i>E</i>)-Nerolidol, Linalool, DMNT, Methylsalicylat, β -Caryophyllen, Germacren D, (<i>E,E</i>)- α -Farnesen, GLVs	[91]
2	<i>Spodoptera littoralis</i> (Schneckenklee)	<i>Medicago truncatula</i> (Schneckenklee)	1-Octen-3-ol, <i>cis</i> -Hexenylacetat, β -Caryophyllen, α -Copaen, Cyclosativen, Nerolidol, α -Ylangen, DMNT, TMTT	[76]
3	<i>Tetranychus urticae</i> (Spinnmilbe)	<i>Medicago truncatula</i> (Schneckenklee)	1-Octen-3-ol, <i>cis</i> -Hexenylacetat, Cresol, 3,5-Dimethylanisol, β -Caryophyllen, α -Copaen, Cyclosativen, β -Himachalen, γ -Humulen, α -Ylangen	[76]
4	<i>Tetranychus urticae</i> (Spinnmilbe)	<i>Phaseolus lunatus</i> (Limabohne): Blätter	(<i>3Z</i>)-Hexenylacetat, (<i>E</i>)- β -Ocimen, Linalool, DMNT, Indol, <i>cis</i> -Jasmon, β -Caryophyllen, TMTT	[22]
5	Methyljasmonat	<i>Picea abies</i> L. (Fichte)	Linalool, α -Pinen, β -Pinen, (<i>E</i>)- β -Farnesen, (<i>E,E</i>)- α -Farnesen, (<i>E</i>)- α -Bisabolen, Nerolidol	[80]

Tabelle 12: Natürlich und künstlich induzierte Abwehrmechanismen von *Vitis*

Nr.	Elicitor/Organismus	Pflanze	Induzierte Verbindungen/Effekte	Literatur
1	Methyljasmonat	<i>Vitis vinifera</i> : Blätter	(<i>E</i>)- β -Ocimen, Linalool, DMNT, β -Caryophyllen, α -Humulen, Germacren D, (<i>E,E</i>)- α -Farnesen	[20]
2	Laminarin (β -D-Glucan)	<i>Vitis vinifera</i> : Zellkulturen und Rebstöcke	Einströmen von Calcium, Aktivierung von 2 Proteinkinasen, Expression von 10 verteidigungsrelevanten Genen, Bildung der Phytoalexine Resveratrol und ϵ -Viniferin	[92]
3	Benzothiadiazol	<i>Vitis vinifera</i> : Rebstöcke	Resveratrol, Anthocyane: Malvidin-3-Glucosid, Malvidin-3-(6-O-acetyl)glucosid, Malvidin-3-(6-O-p-coumaroyl)glucosid, Proanthocyanidin, Aminosäureprofil (v.a. Lysin)	[93], [94]
4	<i>Popillia japonica</i> <i>Newman</i> (Japankäfer)	<i>Vitis labrusca</i> : Blätter	GLV, Limonen, (<i>E</i>)- β -Ocimen, Linalool, DMNT, (<i>E,E</i>)- α -Farnesen, Nerolidol, Benzylalkohol, Methylsalicylat, Indol	[95]
5	<i>Phylloxera</i> (Reblaus)	<i>Vitis berlandieri</i> <i>Planch.</i> \times <i>Vitis</i> <i>riparia Michx.</i> : Wurzeln	Benzaldehyd, Methylsalicylat, β -Myrcen, Eugenol, β -Caryophyllen, Phenylmethanol	[96]
6	Methyljasmonat	<i>Vitis vinifera</i> : Blätter	Anstieg des Transkriptionslevels für PR-Proteine (saure IV Chitinase, Serin-Protease Inhibitor, Polygalacturonase-inhibierendes Protein, β -1,3-Glucanase), Enzyme für Phytoalexin-Biosynthese (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, Stilben-Synthase), Biosynthese von Stilbenen (trans-Resveratrol, ϵ -Viniferin)	[97]

Auch die Haltbarkeit von Früchten und Gemüse konnte nach der Ernte durch die Reduzierung der mikrobiellen Flora verbessert werden. Buta und Moline (1998) zeigten bereits, dass eine MeJA angereicherte Atmosphäre bei geschnittenem Sellerie sowie das Tauchen geschnittener Pfefferkörner in MeJA-Lösungen, die mikrobielle Flora signifikant reduziert und damit die Lagerfähigkeit um zwei Wochen verlängert wird. Im Rahmen dieser Studie wurde bereits vermutet, dass nicht MeJA selbst das antimikrobielle Agens ist, sondern dass im Sellerie und Pfeffer entsprechende Verteidigungsmechanismen induziert werden. Grund dafür ist, dass die mikrobielle Flora des Selleries und der Pfefferkörner bereits bei Jasmonat-Konzentrationen von 10^{-5} mol/L reduziert wurde, andere Studien aber zeigten, dass MeJA selbst das Wachstum von Bakterienkulturen erst ab Konzentrationen von 10^{-3} mol/L hemmt^[98].

Methyljasmonatstudien an Vitis vinifera

Onofrio et al. (2009) untersuchten bereits den Einfluss von Methyljasmonat, Jasmonat und Salicylsäure auf Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Es konnte gezeigt werden, dass MeJA und JA die Biosynthese einer Vielzahl von Sesquiterpenen (bis zu 25 verschiedene, u.a. β -Caryophyllen, α -Cubeben, α -Copaen und δ -Cadinen) induziert. Die Stilben-Biosynthese wurde von beiden Elicitoren angeregt, die Proanthocyanidin-Biosynthese jedoch nur durch MeJA. Salicylsäure wirkte sich antagonistisch auf die durch MeJA induzierte Biosynthese der Sesquiterpene und Proanthocyanidine, jedoch nicht auf die Stilbenbiosynthese aus. Das Maximum der Sesquiterpen-Biosynthese lag bei 72 h nach Induktion. MeJA und JA regelten drei Gene des MVA-Biosynthesewegs hoch. Dahingegen wurde durch JA die Expression von zwei Genen des DOXP-Wegs hochgeregelt, während MeJA sogar nur ein Enzym des DOXP-Wegs hochregelte^[47].

Gómez-Plaza et al. (2012) behandelten Rebstöcke während der Reife mit den Elicitoren BTH und MeJA und untersuchten, ob sich anschließend hergestellte Weine von denen unbehandelter Rebstöcke unterscheiden. Mit MeJA behandelte Trauben wiesen hohe Gehalte der GLVs Hexenal und (*E*)-2-Hexenal auf. Die Alkohole Hexenol und (*Z*)-3-Hexen-1-ol waren in den mit BTH behandelten Trauben am höchsten. Die mit BTH behandelten Trauben hatten sogar höhere Gehalte flüchtiger Verbindungen als die mit MeJA behandelten Trauben. Weine aus mit MeJA behandelten Trauben zeichneten sich vor allem durch signifikant höhere Terpengerhalte (z.B. β -Myrcen, Linalylester, Linalool, Citronellol, Farnesol) aus. In sensorischen Untersuchungen der Weine (Triangeltests) auf Farbe, Aroma und Mundgefühl wurden v.a. Unterschiede hinsichtlich des Aromas geschildert. Die Weine der behandelten Trauben (BTH und MeJA) unterschieden sich signifikant von den Kontrollweinen^[99].

Auch die endogene JA- und MeJA-Konzentration in der Beerenhaut und den Kernen wurde bereits untersucht. In Kernen und im Exokarp wurden jeweils höhere Gehalte an JA als an MeJA nachgewiesen. Zur Reife konnte im Exokarp eine JA-Konzentration von ca. 40 nmol/(kg Frischgewicht Häute) ermittelt werden sowie 16 nmol/(kg Frischgewicht Häute) an MeJA. In den Kernen wurden deutlich höhere Gehalte an JA nachgewiesen. Die JA-Konzentration betrug in den Kernen zur Reife 360 nmol/(kg Frischgewicht Kerne), die MeJA-Konzentration jedoch nur ca. 19 nmol/(kg Frischgewicht Kerne)^[100].

4.2 Methyljasmonatinduzierte Terpenbiosynthese in Exo- und Mesokarp nach direkter Applikation

Onofrio et al. (2009) zeigten bereits an Zellkulturen, dass Methyljasmonat *in vitro* Sesquiterpene induziert. In diesem Versuchsmodell sollte betrachtet werden, inwiefern auch *in vivo* eine Induktion möglich ist. Hierfür wurde Methyljasmonat mit einer Mikroliterspritze in die Beere (Mesokarp) injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden Exokarp und Mesokarp getrennt voneinander untersucht. In Kontrollansätzen erfolgte die Applikation von Wasser. Die Versuche konzentrierten sich auf die Rebsorte Lemberger (2011, 2012). Ergänzend wurden ebenfalls Syrah, Gewürztraminer sowie der unaromatische Gewürztraminerklon herangezogen.

Induzierte Verbindungen: Exokarp

Abbildung 43 zeigt ein typisches Headspaceprofil des Exokarps nach Methyljasmonat-Applikation.

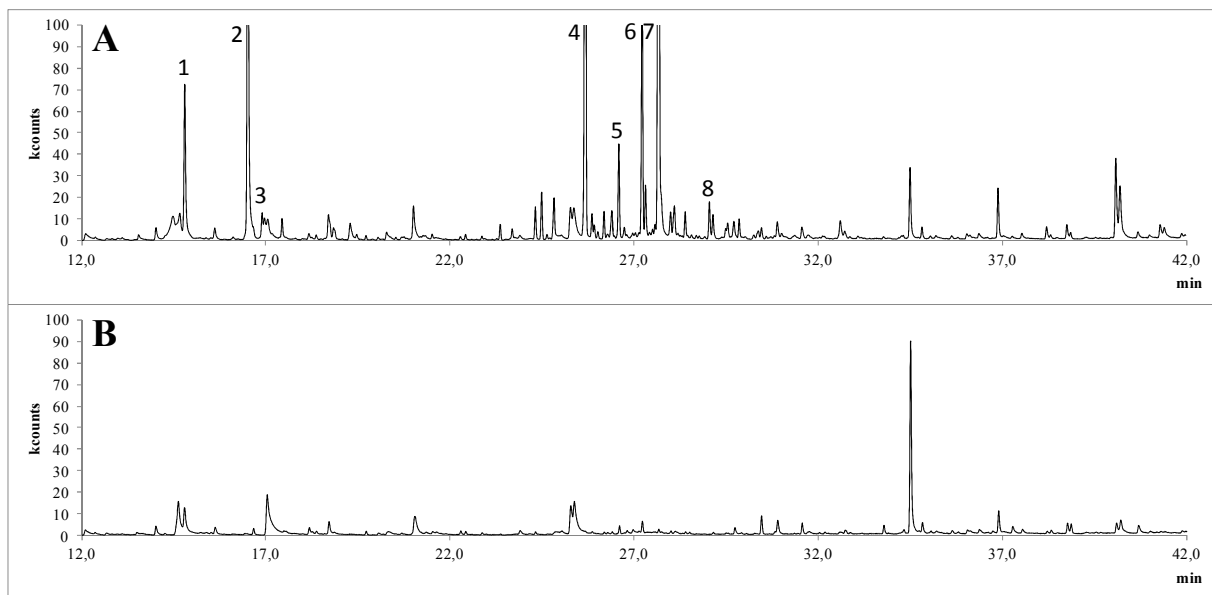


Abbildung 43: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm des Exokarps (Varietät Lemberger, 05.10.2012) nach Applikation von Methyljasmonat (A) und Wasser (B). Die Nummerierung entspricht folgenden Verbindungen: (*E*)-Ocimen (1), Linalool (2), DMNT (3), (*E*)- β -Caryophyllen (4), Humulen (5), Germacren D (6), (*E,E*)- α -Farnesen (7) und Nerolidol (8).

Neben Mono- und Sesquiterpenen wird auch das Homoterpen 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) induziert. Jüngst konnte für *Arabidopsis thaliana* bestätigt werden, dass DMNT ein über Cytochrom P450 katalysiertes Abbauprodukt des Sesquiterpens Nerolidol ist (Abbildung 44)^[101]. Die in den Beeren induzierten Verbindungen sind allgemein aus anderen Pflanzen-Schädlings-Interaktionen, bzw. aus Studien zu Elicitor induzierten Duftstoffen bekannt (vgl. Tabelle 11, Tabelle 12). In geringen Mengen konnten nach 48 h auch Indol und das Dehydroterpen Cosmen nachgewiesen werden. Diese Verbindungen werden in Abschnitt 4.3 näher erläutert.

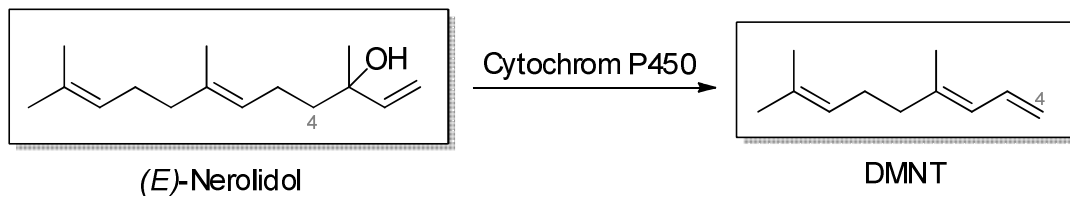


Abbildung 44: Cytochrom P450 katalysierte Bildung von DMNT aus Nerolidol

Die Applikation von Methyljasmonat im Exokarp führte zu einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0,05$) der Monoterpene und zu einem höchst signifikanten Anstieg ($p \leq 0,01$) der Sesquiterpene²¹. Die induzierten Sesquiterpene waren innerhalb einer Rebsorte und eines Zeitraums nicht immer identisch, d.h. bei einigen Proben konnte ein genereller Anstieg aller Sesquiterpene verzeichnet werden, bei anderen Ansätzen wurden bestimmte Sesquiterpene, z.B. Farnesen, Nerolidol oder Caryophyllen und Humulen induziert. Die am häufigsten induzierten Sesquiterpen-Muster sind in Abbildung 45 dargestellt.

²¹ Mit Methyljasmonat behandelte Proben: n=73, Kontrollproben n=55

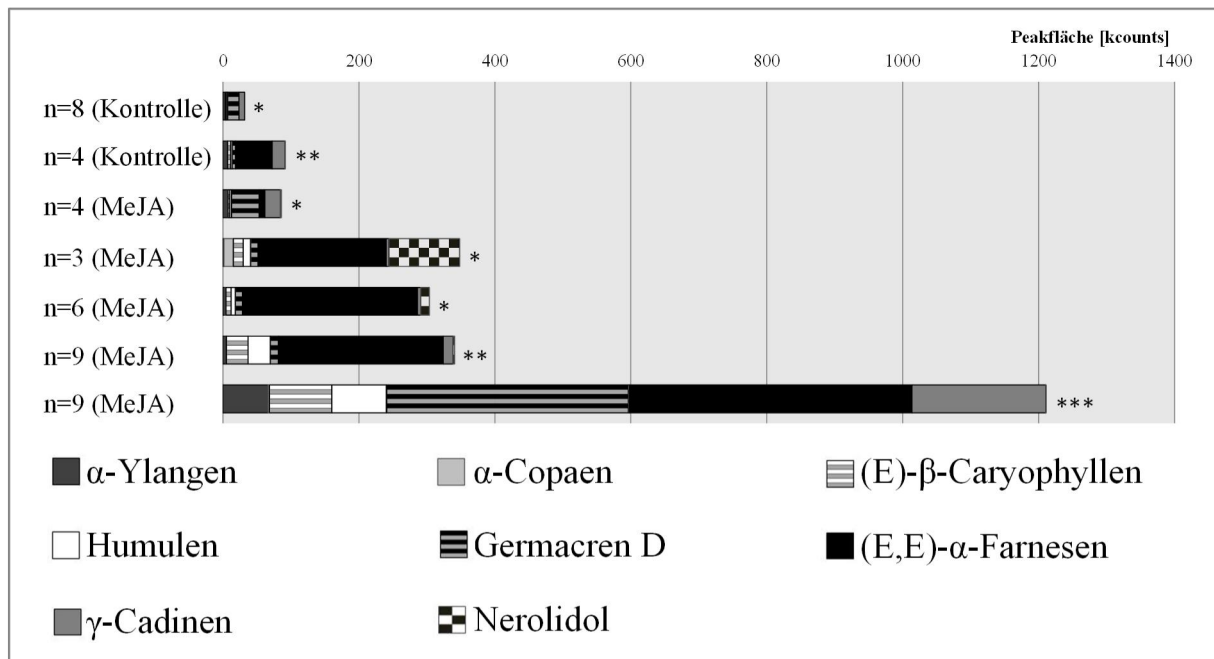


Abbildung 45: Verschiedene, über Methyljasmonat induzierbare Sesquiterpenmuster. Häufig auftretende Sesquiterpenmuster nach Applikation von Methyljasmonat (MeJA) bzw. Wasser (Kontrolle) bei Lemberger (*), Syrah (**), sowie Lemberger und Syrah (***) . n = Anzahl der Proben

Tabelle 13 zeigt die statistische Auswertung aller Methyljasmonat-Applikationen innerhalb einer Rebsorte. Innerhalb der jeweiligen Rebsorte sind wesentliche Unterschiede zwischen methyljasmonatapplizierten Proben und Kontrollproben vorhanden. Bei der Rebsorte Lemberger waren fast alle untersuchten Verbindungen signifikant erhöht, z.T. höchst signifikant, während die anderen untersuchten Rebsorten deutlich weniger signifikante Unterschiede zeigten. Die Applikation von Methyljasmonat beim unaromatischen Gewürztraminer führte zu keinem signifikanten Anstieg der Monoterpene.

Analog zu diesen Ergebnissen konnten auch Gómez-Plaza et al. (2012) zeigen, dass Weine aus mit Methyljasmonat behandelten Trauben (Rebsorte Castrell) ebenfalls signifikant erhöhte Gehalte an Linalool, Farnesol und Nerolidol aufwiesen.

Tabelle 13: Statistische Auswertung (ANOVA) induzierbarer Verbindungen in verschiedenen Rebsorten, 48 h nach Applikation, Exokarp. Die Proben umfassen verschiedene Zeitpunkte während des Reifeverlaufs und verschiedene Regionen (Bonn, Geisenheim) mit Ausnahme des Gewürztraminers. Hellgrau hinterlegte Werte bezeichnen signifikante ($p \leq 0,05$), dunkelgrau hinterlegte Werte höchst signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$).

	Lemberger	Syrah	Gewürztraminer (28.08.2012)	unaromatischer Gewürztraminer
n ¹ (Jasmonat)	37	23	3	10
n ¹ (Wasser)	32	14	3	6
<i>(E)</i> - β -Ocimen	0,001	0,002	0,025	0,064
Linalool	0,015	0,173	0,043	0,080
DMNT	0,035	0,222	0,374	0,048
Cosmen	0,002	0,005	n.n. ²	n.n. ²
Indol	0,010	0,478	n.n. ²	n.n. ²
δ -Elemen	0,012	0,106	n.n. ²	0,114
α -Cubeben	0,004	0,079	0,001	0,010
α -Ylangen	0,049	0,105	0,374	0,116
α -Copaen	0,139	0,024	0,003	0,013
RI 1391	0,002	0,118	0,017	0,063
β -Ylangen, <i>(E)</i> - β -Caryophyllen	0,063	0,000	0,115	0,043
γ -Elemen, RI 1437, RI 1440	0,010	0,115	0,374	0,095
Guaia-6,9-dien	0,047	0,098	0,374	0,115
β -Farnesen	0,047	0,162	0,374	0,112
Selina-4,6-dien	0,038	0,090	0,001	0,095
Humulen	0,069	0,003	0,030	0,088
RI 1469	0,020	0,097	n.n. ²	0,106
Germacrene D	0,002	0,094	0,020	0,077
<i>(E,Z)</i> - α -Farnesen	0,002	0,082	0,050	0,659
<i>Epi</i> -Zonaren	0,159	0,110	n.n. ²	0,119
<i>(E,E)</i> - α -Farnesen	0,000	0,007	0,047	0,606
γ -Cadinen	0,109	0,102	n.n. ²	0,113
δ -Cadinen	0,024	0,080	0,004	0,005
Calamenen	0,112	0,153	0,007	0,080
β -Calacoren	0,003	0,112	n.n. ²	0,092
Nerolidol	0,152	0,168	n.n. ²	0,014
Germacren B	0,016	0,108	n.n. ²	n.n. ²
Calacoren	0,023	0,115	n.n. ²	0,091
RI 1597	0,000	0,020	0,042	0,269
13- <i>epi</i> -Manoyloxid	0,103	0,334	0,374	0,159

1) n = Anzahl der Proben

2) n.n. = Analyt war nicht nachweisbar

Induzierte Verbindungen: Mesokarp

Es ist bekannt, dass induzierte flüchtige Verbindungen hauptsächlich sogenannte „airborn signals“ sind, also Verbindungen, die gebildet werden, um primär über die Pflanzenoberfläche an ihre Umgebung abgegeben zu werden^[80]. Da die Applikation von MeJA in das Mesokarp der Beere erfolgte, stellte sich die Frage, inwiefern auch im Mesokarp eine Aktivierung der entsprechenden Mechanismen möglich ist. Dazu wurden bei einigen Proben 48h nach Applikation, Meso- und Exokarp separiert und beides getrennt voneinander gemessen.

In Abbildung 46 sind Messungen des Mesokarps nach Methyljasmonat- sowie nach Wasser-Applikation gegenüber gestellt. Zum Teil konnte ein Anstieg einzelner Verbindungen verzeichnet werden. Nur für wenige Verbindungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Methyljasmonat- und Wasser-Applikationen festgestellt werden. Methyljasmonat induzierte keine Sesquiterpene im Mesokarp der Beeren (Tabelle 14).

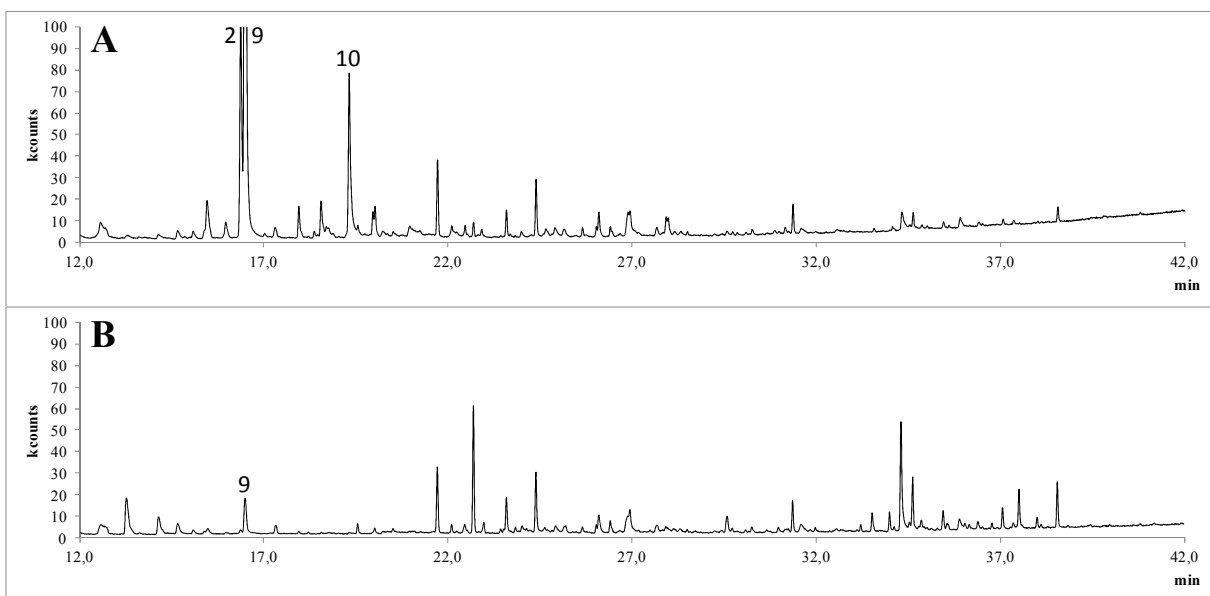


Abbildung 46: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm des Mesokarps (Rebsorte Lemberger, 05.10.2012) nach Applikation von Methyljasmonat (A) und Wasser (B). Folgende Verbindungen sind nummeriert: Linalool (2), Hotrienol (9) und α -Terpineol (10).

Tabelle 14: Statistische Auswertung (ANOVA) induzierbarer Verbindungen in verschiedenen Rebsorten, 48 h nach Applikation, Mesokarp. Die Proben umfassen verschiedene Zeitpunkte während des Reifeverlaufs und verschiedene Regionen (Bonn, Geisenheim) mit Ausnahme des Gewürztraminers. Hellgrau hinterlegte Werte bezeichnen signifikante ($p \leq 0,05$), dunkelgrau hinterlegte Werte höchst signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$).

	Lemberger	Syrah	Traminer (28.08.2012)	unaromatischer Traminer
n ¹ (Jasmonat)	24	12	3	7
n ¹ (Wasser)	18	4	3	6
<i>(E)</i> - β -Ocimen	0,892	0,582	n.n. ²	n.n. ²
Linalool	0,016	0,582	0,103	0,555
Hotrienol	0,010	0,370	0,069	0,375
Cosmen	0,075	n.n. ²	n.n. ²	n.n. ²
α -Terpineol	0,011	0,084	0,074	0,219
Indol	0,299	n.n. ²	n.n. ²	n.n. ²
α -Ylangen	0,369	0,294	n.n. ²	n.n. ²
Damascenon	0,822	0,131	0,996	0,022 ³
Geranylaceton	0,838	0,785	0,079	0,232
β -Ionon	0,820	0,738	0,048	0,943
Germacren D	0,243	0,341	n.n. ²	0,190
13- <i>epi</i> -Manoyloxid	0,771	0,805	n.n. ²	0,040

1) n = Anzahl der Proben

2) n.n. = nicht nachweisbar

3) die mit Methyljasmonat behandelten Proben wiesen eine signifikant kleinere Fläche auf

Die dargestellten Ergebnisse beschränken sich auf die Emission 48 h nach Applikation. Um zu ermitteln, ob das Emissionsprofil jedoch zeitabhängig differiert, wurde das nachfolgende Messprinzip gewählt.

4.3 Zeitabhängigkeit des Emissionsprofils

Die Messungen in Abschnitt 4.1 wurden 48 h nach Applikation durchgeführt. Durch die zeitabhängigen Emissionsmessungen sollte untersucht werden, ob bestimmte Verbindungen früher als andere emittiert werden und sich somit das Emissionsprofil im Zeitverlauf ändert. Dafür wurde Methyljasmonat in die Beeren injiziert, die Beeren unmittelbar darauf in ein HS-Vial gebracht und anschließend aus diesem Vial in definierten Zeitabständen (Probe alle 2-3 h, die Kontrolle alle 5 h) das Emissionsprofil über einen Zeitraum von 65 h gemessen. Die Versuche wurden über die Reifephase, an insgesamt drei Terminen mit der Rebsorte Lemberger durchgeführt (an jedem Termin n=2 sowie jeweils eine Kontrollprobe). Am ersten und letzten Termin erfolgte zusätzlich die Applikation von d₂-DOX (siehe Abschnitt 4.4).

Abbildung 47 zeigt die zeitabhängige Emission von verschiedenen, induzierten Terpenen und Indol. Hierbei wurden die Emissionsprofile vom 30.8.2012 und 26.09.2012 zusammengefasst. Die Messungen am 18.10.2012 wiesen abweichende Verläufe auf, was wahrscheinlich auf den fortgeschrittenen Reifezustand und eine eingeschränkte biosynthetische Aktivität zurückzuführen ist. Die Ergebnisse für diesen Termin sowie die einzelnen Verläufe für den 30.8.2012 und 26.09.2012 sind ergänzend im Anhang (Abbildung A 18) aufgeführt.

Aus Abbildung 47 geht hervor, dass sich Mono-, Homo- und Sesquiterpene sowie Indol im Zeitpunkt der Emission und im Emissionsverlauf unterscheiden. Indol, Mono- und Homoterpene werden zuerst induziert. Sie steigen zwischen 12 und 36 h nach Applikation an und fallen anschließend wieder ab. Hervorzuheben ist, dass sich Linalool in seinem Verlauf von den anderen Verbindungen unterscheidet. Linalool wird unmittelbar nach Applikation freigesetzt und ist im Headspace der Trauben bereits nach 2-5 Stunden nachweisbar. Es erreicht früher als die anderen Terpene sein Maximum, hält dieses über einen Zeitraum von teilweise 24 h oder flacht nur langsam wieder ab.

Die Emission der Sesquiterpene erreicht zu einem späteren Zeitpunkt (36 h nach Applikation) das Maximum und hält dieses über die Messdauer. Nerolidol unterscheidet sich in seinem Verlauf deutlich von den anderen Sesquiterpenen. Es steigt bis 36 h nach Inkubation an, fällt anschließend aber wieder deutlich ab.

Die sehr frühe Induktion von Linalool, aber auch der abweichende Emissionsverlauf des Nerolidols, lässt die Frage aufkommen, ob beide Alkohole als glykosidisch gebundene Präkursoren vorliegen und jasmonatinduziert freigesetzt oder sehr schnell *de novo* synthetisiert werden.

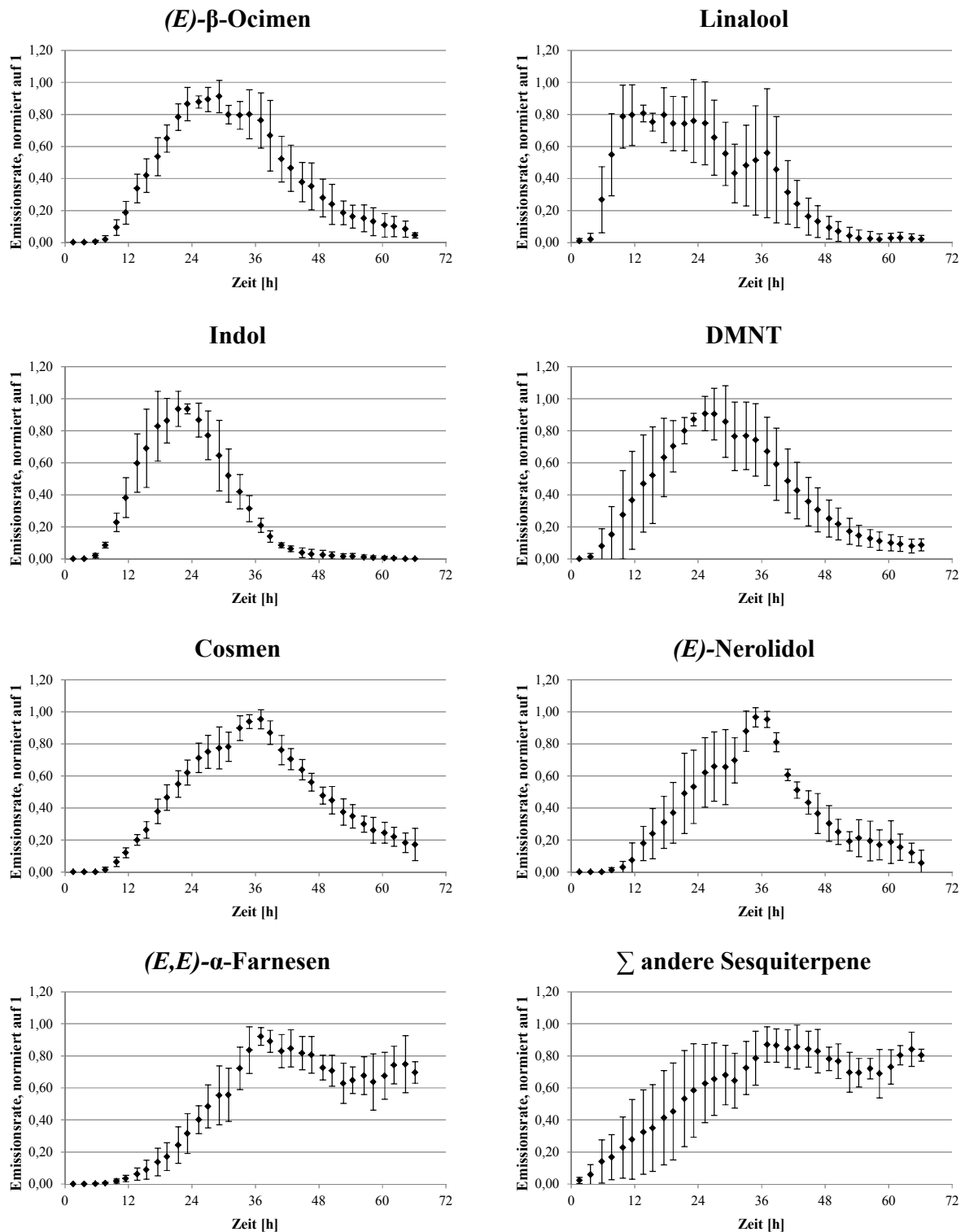


Abbildung 47: Emissionrate von Indol, Mono-, Homo- und Sesquiterpenen als Funktion der Zeit nach Methyljasmonatapplikation. Zusammenfassung der Doppelbestimmungen vom 30.8.12 und 26.9.12 durch Normierung auf 1 (n=4). Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind im Anhang Abbildung A 18 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte über die in Tabelle A 14 für die jeweilige genuine Verbindung angegebenen Ionenspuren.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde zusätzlich d₂-DOX verabreicht (Abschnitt 4.4). Dass Linalool und Nerolidol in Pflanze-Schädlinge-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, konnten bisher verschiedene Studien demonstrieren. Linalool wirkt als Repellent gegen Blattläuse^[86]. Nerolidol weist in Zellkulturen von *Vitis vinifera* einen wachstumsinhibierenden Effekt auf den Pilz *Phaeoacremonium parasiticum* auf^[87].

Das Dehydroterpen (*E,E*)-2,6-Dimethyl-1,3,5,7-Octatetraen (Cosmen) konnte erstmals in *Vitis* nachgewiesen werden. Generell ist bzgl. des Cosmens wenig bekannt. Es konnte lediglich im ätherischen Öl von *Perilla frutescens*^[102] oder in Tabakpflanzen und Schneckenklee (ausgelöst durch Pilz- bzw. Schädlingsbefall)^{[103],[76]} nachgewiesen werden. In der letztgenannten Studie wurde vermutet, dass Cosmen während der Probennahme (Anreicherung auf Aktivkohle) als Abbauprodukt aus dem Ocimen entsteht. Um dies hier ausschließen zu können, wurde eine wässrige Lösung (0,0001%) von Ocimen über HS-SPME vermessen. Über diese Messung konnte kein Cosmen nachgewiesen werden (Abbildung A 16). Zudem unterscheiden sich (*E*)- β -Ocimen und Cosmen in ihrem Emissionsverlauf (Abbildung 47).

Die Induktion von Indol war für *Vitis* bisher nur in Weinblättern, hervorgerufen durch den Japankäfer, bekannt^[95]. Die Emission von Indol wird, vergleichbar mit Linalool, sehr früh ausgelöst, steigt schnell an und fällt ebenso schnell wieder ab. Studien konnten bereits zeigen, dass Indol in Mais über Indol-3-Glycerolphosphat gebildet wird. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Volicitin, ein Fettsäurederivat aus dem Speichel des Heerwurms, gezielt das Enzym Indol-3-Glycerolphosphat-Lyase (IGL) induziert^[104].

4.4 Zeitabhängige Emission unter Verwendung von d₂-DOX

Die sehr rasche Induktion von v.a. Linalool impliziert die Frage, ob dieses sowie die anderen Verbindungen *de novo* synthetisiert oder als glykosidisch gebundener Vorläufer freigesetzt werden. Daher erfolgte bei den zeitabhängigen Emissionmessungen an den Terminen 30.08.2012 und 18.10.2012 (Abschnitt 4.3) neben Methyljasmonat auch eine zusätzliche Applikation von d₂-DOX.

Abbildung 48 zeigt die Einbauraten von d₂-DOX als Funktion der Zeit. Dargestellt ist ein Messergebnis vom 30.8.2012²². Die anderen Messungen sind ergänzend dem Anhang (Abbildung A 19) zu entnehmen. Generell ist der Verlauf der Einbauraten wie folgt zu bewerten: liegen genuines DOX und markiertes d₂-DOX in einem konstanten Verhältnis vor, sollte die prozentuale Einbauraten zu jedem Zeitpunkt gleich sein. Sinkt der Anteil genuiner Isoprenoidbausteine, steigt die prozentuale Einbauraten, sofern die entsprechenden Terpensynthesen noch aktiv sind. Die prozentuale Einbauraten sinkt hingegen, wenn der Anteil an genuinem Präkursor ansteigt.

Linalool zeigt bereits nach vier Stunden einen Einbau (Abbildung 48 A). Dies bestätigt, dass die *de novo* Biosynthese zeitnah durch Methyljasmonat induziert wird. Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3 wurde ausschließlich d₂-DOX verwendet, um den Einbau in Mono- und Sesquiterpene zu untersuchen. Generell war die Einbauraten von d₂-DOX jedoch bei den Sesquiterpenen niedriger, als die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3 erwarten ließen. Die Einbauraten für Germacren D war im Zeitfenster von 5-15 Stunden nach der Applikation am höchsten (Abbildung 48 C), also zu einem Zeitpunkt, als die eigentliche Induktion der Sesquiterpene durch Methyljasmonat noch sehr gering war (vgl. Abbildung 47). Die anschließend sinkende Einbauraten kann auf ein Überangebot an genuinen Isoprenoidintermediaten zurückgeführt werden. Onofrio et al. (2009) konnten bereits zeigen, dass Methyljasmonat insbesondere Gene des MVA-Wegs hochregelt^[47]. Für Nerolidol konnte sogar nur ein Markierungsgrad von maximal 4 % d₂-Nerolidol²³ (Abbildung A 19) nachgewiesen werden (Abbildung 48 B). DMNT zeigt ebenso einen Einbau an d₂-DOX. Entsprechend findet auch hier eine *de novo* Biosynthese statt. Da DMNT aus Nerolidol generiert wird, sollten die Einbauraten korrelieren. Die geringere Einbauraten in DMNT im Vergleich zu Nerolidol im Zeitfenster von etwa 20-45 Stunden nach Applikation ist darauf

²² Dargestellt ist eine Probe der Doppelbestimmung vom 30.8.2012

²³ Resultierend aus einer markierten Isoprenoid-Einheit und zwei genuinen Isoprenoid-Einheiten

zurückzuführen, dass die Markierung, in Abhängigkeit von der Position im Nerolidolmolekül, bei der Generierung von DMNT abgespalten wird (Abbildung A 17).

Im Zeitfenster von 5-15 Stunden war keine Markierung für Nerolidol nachweisbar, jedoch für DMNT. Generell war in diesem Bereich die Emission von Nerolidol, vergleichbar wie bei Germacren D, noch sehr gering. Induziertes und zum Teil markiertes Nerolidol wurde wahrscheinlich direkt zu DMNT metabolisiert.

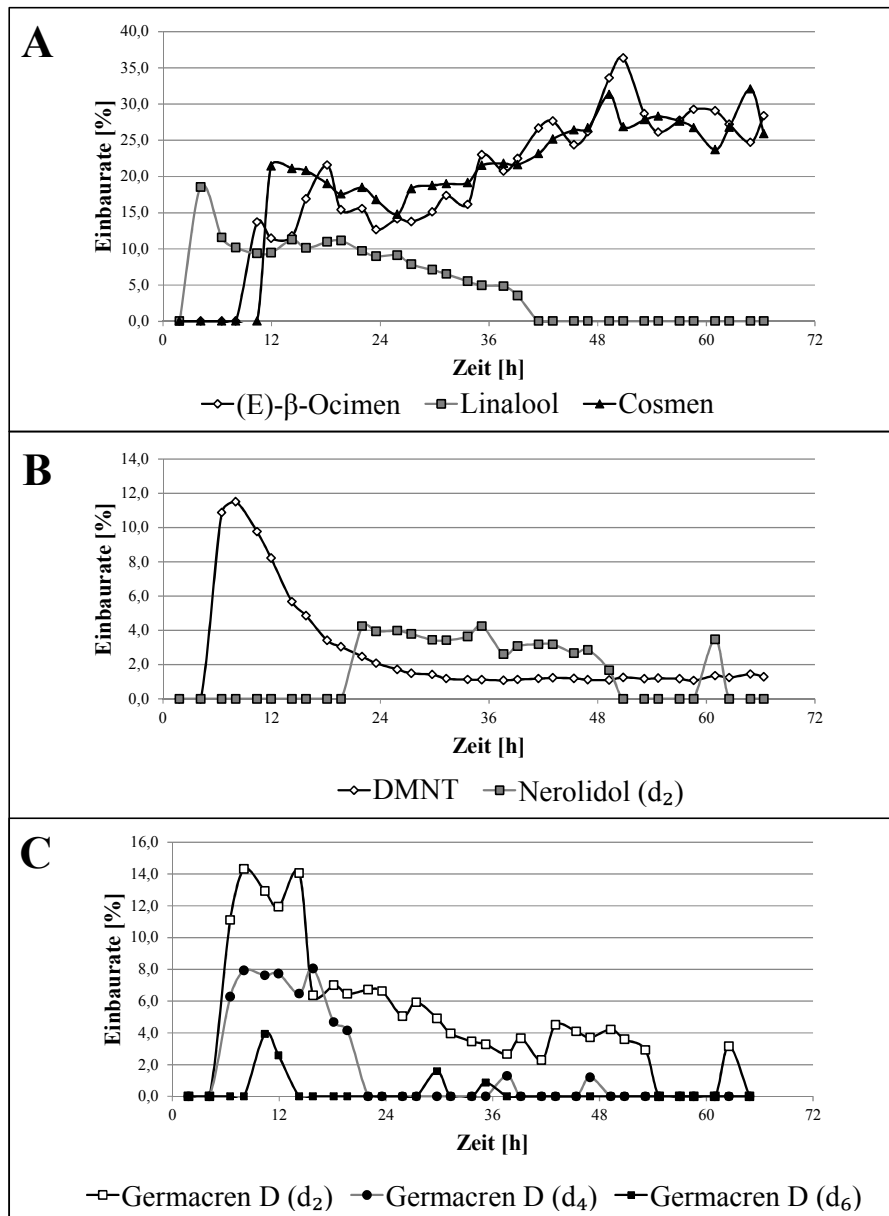


Abbildung 48: Einbauraten der zeitabhängigen Emissionsstudien nach Methyljasmonat- und d₂-DOX-Applikation. Die Ionenspuren zur Berechnung der Einbauraten sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A 14).

4.5 Freilandversuch

In einem Freilandexperiment wurde untersucht, inwiefern das Besprühen eines Rebstocks mit einer wässrigen Methyljasmonatlösung, bzw. das Verletzen des Blattwerks die Bildung flüchtiger Verbindungen in den Weintrauben hervorruft. Eine Induktion weist in diesem Zusammenhang auf eine systemische Reaktion hin. Die Versuche wurden mit freistehenden Rebstöcken der Rebsorte Lemberger durchgeführt. Zwischen dem mit Methyljasmonat behandelten Rebstock und dem Rebstock bei dem das Blattwerk eingerissen wurde, befand sich ein nicht behandelter Kontrollrebstock. Der Mindestabstand zwischen den drei Rebstöcken betrug jeweils drei Meter. Jeder Rebstock wurde für eine Doppelbestimmung beprobt.

Bei einigen Pflanzen zählt Methyljasmonat zu den durch Herbivoren induzierten flüchtigen Verbindungen^[105]. Es wird vermutet, dass Methyljasmonat, abgegeben von einer befallenen Pflanze und übertragen über die Luft, in anderen Pflanzen entsprechende Mechanismen zur Abwehr auslösen kann. Um diesen Übertragungsweg zu simulieren, können Pflanzen mit einer wässrigen Lösung von Methyljasmonat besprüht werden.

Auch in diesem Experiment konnte durch die Behandlung der Rebstöcke mit Methyljasmonat ein Anstieg der Sesquiterpen- (Abbildung 49) und Linaloolmission (Abbildung 50) verzeichnet werden. Ebenso wurde für (*E*)- β -Ocimen ein Anstieg verzeichnet (Abbildung A 20). Die Induktion der Sesquiterpene war jedoch nur in der Messreihe im Jahre 2011, die der Monoterpene in der Messreihe im Jahre 2012 nachweisbar.

Das Emissionsprofil der Beeren nach dem Behandeln des ganzen Rebstocks ist vergleichbar mit dem Emissionsprofil nach direkter Applikation von Methyljasmonat in die Beere (Abschnitt 4.3): Für die Emission der Sesquiterpene war über den Zeitverlauf der Studie ein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen, während die Linaloolmission ein Maximum bei 30 h aufwies und anschließend wieder abfiel²⁴.

²⁴ Das Emissionsprofil von Linalool (nach Behandlung des Rebstocks) ähnelt eher dem anderer Mono- und Homoterpene als dem Emissionsprofil von Linalool nach Applikation von MeJA in die Beeren (Abschnitt 4.3).

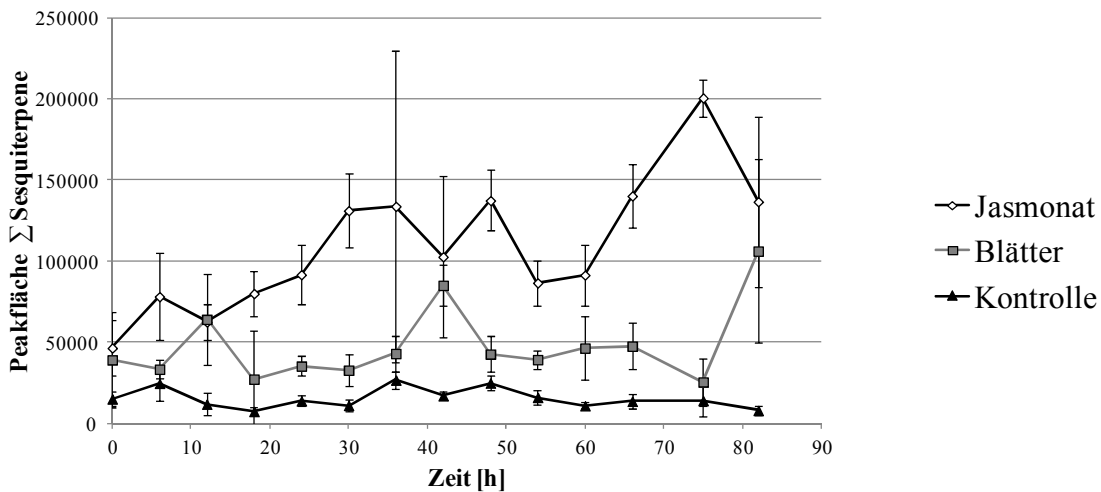


Abbildung 49: Induktion von Sesquiterpenen in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblätter. Folgende Behandlungen wurden angewandt: das Besprühen der Blätter mit Methyljasmonatlösung (Jasmonat), Verletzen des Blattwerks (Blätter). Am Kontrollrebstock erfolgte keine Behandlung (Kontrolle). Die Messungen wurden mit der Rebsorte Lemberger (2011, n = 2) durchgeführt.

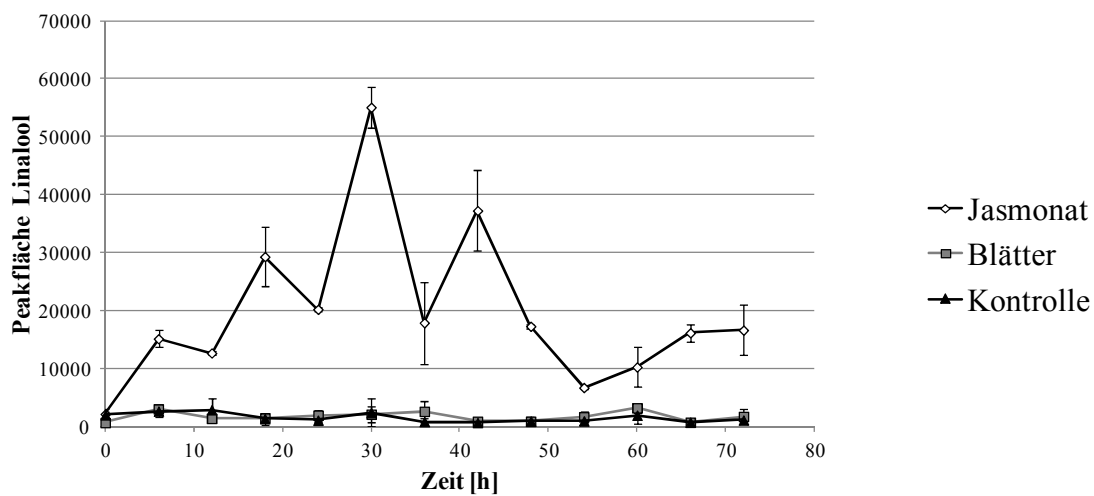


Abbildung 50: Induktion von Linalool in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblätter. Folgende Behandlungen wurden angewandt: das Besprühen der Blätter mit Methyljasmonatlösung (Jasmonat), Verletzen des Blattwerks (Blätter). Am Kontrollrebstock erfolgte keine Behandlung (Kontrolle). Die Messungen wurden mit der Rebsorte Lemberger (2012, n = 2) durchgeführt.

Eine Induktion der Terpenbiosynthese in den Beeren nach Behandlung des gesamten Rebstocks, wobei hier hauptsächlich die Blattoberfläche betroffen war, deutet auf eine systemische Reaktion hin. Dass der regionale Befall mit einem Schädling in der gesamten Pflanze eine Reaktion (systemische Reaktion) hervorrufen kann, ist bereits bekannt. Jüngst konnte der aktive Transport von *de novo* synthetisiertem Ja-Ile-Konjugat nachgewiesen werden^[106]. Glauser et al. (2008) konnten zudem zeigen, dass bei *Arabidopsis thaliana* die Verletzung von Pflanzengewebe innerhalb von wenigen Minuten zu einem Anstieg von Jasmonsäure-Derivaten in nicht verletzten Pflanzenteilen führt^[107].

Gomez-Plaza et al. (2012) konnten in einem ähnlichem Experiment zeigen, dass sich Weine aus Methyljasmonat behandelten Trauben signifikant in ihrer Zusammensetzung und ihrem Aroma von Weinen aus nicht behandelten Trauben unterscheiden. Die Weine aus behandelten Trauben wiesen unter anderem erhöhte Gehalte an Linalool, Nerolidol und Farnesol auf^[99].

In der hier durchgeführten Studie wurde zudem an einem Rebstock das Blattwerk verletzt. In der Messreihe des Jahres 2011 konnte ein geringfügiger Anstieg der Sesquiterpene verzeichnet werden (Abbildung 49). Im Jahre 2012 war kein Effekt nachweisbar. In anderen Studien wird sehr häufig beschrieben, dass das einfache, mechanische Verletzen des Blattwerks kaum oder keine Abwehrmechanismen induziert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Pflanzen zwischen einmaligem, mechanischen Verletzen, was in der Natur auch häufig über Hagel oder herabfallende Äste vorkommt, und dem kontinuierlichen Fressen einer Raupe, dem Stechen einer Blattlaus, oder der Eiablage eines parasitären Insekts unterscheiden können müssen.

5 Zusammenfassung

Mit dem Sesquiterpen Rotundon wurde 2008 erstmals ein Sesquiterpen als Schlüsselaromastoff im Wein identifiziert. Bis dato lagen nur wenige Informationen zu Sesquiterpenen in *Vitis vinifera* vor. Ziel dieser Arbeit war es daher, Untersuchungen zur Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera*) durchzuführen. Zudem wurde der Einfluss von Methyljasmonat auf die Sesquiterpenbiosynthese untersucht. Über die angewandte HS-SPME-Technik konnten mehr als 30 verschiedene Sesquiterpene nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen Sesquiterpene werden in der Wachsschicht der Beere angereichert und von dort emittiert. Das Sesquiterpenprofil unterliegt einer reifebedingten Veränderung. Aber auch zwischen den Rebsorten bestehen zum Teil deutliche Unterschiede. Die untersuchten Proben umfassten weiße und rote, monoterpenarme- und -reiche Rebsorten. Die Unterschiede im Sesquiterpenprofil waren nicht auf diese Klassifizierungen zurückzuführen, sondern rebsortenspezifisch. Vor allem Gewürztraminer und Cabernet Sauvignon grenzten sich deutlich von den anderen untersuchten Rebsorten ab. Rebsorten wie Syrah, Lemberger und Riesling wiesen sehr ähnliche Profile auf.

Weiterhin wurde durch Applikation von d₂-DOX und d₂-MVL die Beteiligung der Biosynthesewege (DOXP- und MVA-Weg) an der Sesquiterpenbiosynthese untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide Biosynthesewege zur Generierung von Sesquiterpenen in *Vitis vinifera* beitragen können. Demzufolge findet ein Transfer von Isoprenoid-Intermediaten vom Plastid zum Cytoplasma statt. Da nur ein geringer Einbau von d₂-MVL in Terpene plastidären Ursprungs (Mono- und Diterpene) erfolgte, kann auf einen limitierten Import von Intermediaten in die Plastiden geschlossen werden. Dies entspricht dem mittlerweile für mehrere Pflanzenspezies nachgewiesenen einfach gerichteten Transportmodell vom Plastid zum Cytoplasma. Die Markierungsstudien bestätigten zudem, dass die Biosynthese von Sesquiterpenen im Exokarp der Beere lokalisiert ist. Im Mesokarp konnte keine biosynthetische Aktivität festgestellt werden. Über eine enantioselektive Analyse konnte in Reifenstadium (R)-Germacren D nachgewiesen und über das Einbaumuster der zugrundeliegende Cyclisierungsmechanismus identifiziert werden. Über diesen Cyclisierungsmechanismus lassen sich ebenfalls andere Sesquiterpene ableiten.

Zudem führte die Applikation von Methyljasmonat zur Induktion der Biosynthese von Sesquiterpenen, Monoterpenen, Homoterpenen (DMNT) und Indol. Die zusätzliche Applikation von d₂-DOX bestätigte die methyljasmonatinduzierte *de novo* Biosynthese der Terpene, die bereits innerhalb weniger Stunden nach Applikation nachweisbar war.

6 Experimenteller Teil

6.1 Pflanzenmaterial

Für die Messungen standen elf Rebsorten vom Institut für Rebenzüchtung und Rebenveredlung der Hochschule Geisenheim zur Verfügung. Zusätzlich wurden Rebstöcke vom Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) Abteilung Gartenbauwissenschaft der Universität Bonn beprobt.

Von der Forschungsanstalt Geisenheim wurden folgende Rebsorten analysiert: Riesling, Silvaner, Gewürztraminer, Gelber Muskateller, Siegerrebe, Spätburgunder, Lemberger, Cabernet Sauvignon und Syrah. Die Probenahmen erfolgten 2009 und 2010 im Reifeverlauf sowie jeweils am 19.09.2011 und 19.09.2012. Für ausgewählte Messungen wurden zudem der unaromatische Gewürztraminer (19.09.2011) und Beeren von *Vitis labrusca* (Reifeverlauf 2009) herangezogen.

Von den Gartenbauwissenschaften, Universität Bonn, wurden folgende Rebsorten beprobt: Lemberger, Syrah, Gewürztraminer und Spätburgunder. Die Probenahme erfolgte 2012 im Reifeverlauf sowie jeweils am 29.08. und 15.09.2011.

Zur Bestimmung des Reifegrades an den einzelnen Beprobungsterminen wurde der Zuckergehalt in Brix gemessen. Die Geisenheimer Proben wurden extern von der Forschungsanstalt Geisenheim vermessen. Die Bestimmung der Zuckergehalte der Bonner Trauben erfolgte mit Hilfe eines Refraktometers.

Ebenso wurde das Sesquiterpenprofil der Blüten analysiert. Die Probenahmen erfolgten am 16.06.2010 (Geisenheim) sowie am 13.06.2013 und 02.07.2013 (Bonn).

Für die Bestimmung des Sesquiterpenprofils wurden jeweils vier Beeren bzw. vier Blüten in ein Headspace-Vial gebracht und über die in Abschnitt 6.7 beschriebene Methode analysiert. Alternativ erfolgten zuvor die in Abschnitt 6.4 bis 6.5 beschriebenen Behandlungen.

6.2 Dynamische Headspace-Extraktion

Trauben (200-300g) wurden in einem Exsikkator gelagert und die Gasphase im Exsikkator kontinuierlich mittels Membranpumpe über ein Tenaxröhrchen geleitet. In den Exsikkator einströmende Luft wurde zuvor über einen Aktivkohlefilter geleitet. Über die Membranpumpe wurde ein Fluss von maximal 1 mL/sec eingestellt. Die Dauer der dynamischen Headspace-Extraktion war variabel (zwischen 3-24 h). Nach erfolgter Anreicherung wurden die Analyten mit 20 mL MTBE eluiert und mit internem Standard versetzt (1-Bromdecan, 20µL, 0,01%ig). Die Probe wurde anschließend mittels Mikrodestille auf ca. 100 µL eingengt. Die Lösung wurde über GC-MS (Flüssiginjektion) vermessen, die Quantifizierung der Sesquiterpene erfolgte als 1-Bromdecanäquivalente.

6.3 Quantifizierung der Sesquiterpene in der Wachsschicht

Ca. 20 g Trauben wurden in 50-100 mL Dichlormethan getaucht und 5 µg 1-Bromdecan als interner Standard hinzu dotiert. Die Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die Lösung abdekantiert, auf ca. 20 mL aufkonzentriert und für 48 h bei -20°C ausgefroren. Im Anschluss wurde das auskristallisierte Wachs abfiltriert und das Filtrat auf ca. 100 µL eingengt. Die Lösung wurde über GC-MS (Flüssiginjektion) vermessen, die Quantifizierung der Sesquiterpene erfolgte als 1-Bromdecanäquivalente.

6.4 In vivo Applikationen von d₂-DOX, d₂-MVL oder MeJA

Inkubation ganzer Beeren: Wässrige Lösungen von Methyljasmonat (10 µL, 0,1%) bzw. der Präkursoren (10µL, 1%) wurden durch den Blütenboden (Receptaculum) in die Beere injiziert. Das Injizieren durch den Stiel, im Vergleich zur Injektion durch die Haut der Beere hat den Vorteil, dass das Gewebe des Stiels die Nadel besser umschließt, bzw. sich der Einstich nach Herausziehen der Nadel wieder verschließt und damit das Herauslaufen der Lösungen verhindert wird. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Beeren geschält und Exo- und Mesokarp getrennt voneinander über SPME-GC-MS vermessen. Das Mesokarp wurde zuvor homogenisiert und zusätzlich mit NaCl gesättigt.

Für die Jasmonatstudie wurde als Kontrollversuch Wasser, anstelle von MeJA in die Beeren appliziert.

Inkubation des Exocarps mit d₂-DOX oder d₂-MVL: wässrige Lösungen der Präkursoren (100 µL, 0,1 %) wurden in ein 10 mL Headspacevial pipettiert und isoliertes Exocarp (ca. 1 cm², durch Schälen der Beeren gewonnen) mit der Innenseite auf diese Lösung gelegt. Das Headspacevial wurde verschlossen und nach 48 h Inkubation vermessen.

Zusätzlich erfolgte bei ausgewählten Messungen zuvor eine Oberflächendesinfektion der Beeren. Hierbei wurden die Beeren für wenige Sekunden in eine Lösung von Natriumhypochlorit (1%) getaucht. Anschließend wurden die Beeren geschält und das isolierte Exocarp wie zuvor beschrieben mit d₂-DOX oder d₂-MVL inkubiert.

6.5 Kontinuierliche Headspace-Messung nach MeJA-Applikation bzw. Applikation von MeJA und d₂-DOX

Die Versuche wurden mit der Rebsorte Lemberger (BN) durchgeführt.

Applikation von MeJA (5 µL, wässrige Lösung, 0,2%ig), 26.09.2012: Die Lösung wurde nach 6.4 in die intakten Beeren injiziert (n=2). Zusätzlich erfolgte ein Kontrollansatz, bei dem statt MeJA-Lösung Wasser injiziert wurde. Jeweils vier Beeren der drei Ansätze wurden direkt in ein HS-Vial verbracht und unmittelbar gemessen. Die Vials wurden über einen Zeitraum von drei Tagen abwechselnd vermessen, um ein zeitabhängiges Emissionsprofil zu erstellen.

Applikation von MeJA und d₂-DOX (5µL, wässrige Lösung, Gemisch aus 0,2% MeJA und 2 % d₂-DOX), Termine: 30.08.2012, 18.10.2012: Die Durchführung erfolgte analog zur Applikation von MeJA.

6.6 Freilandversuch

In einem Freilandversuch wurden drei räumlich getrennte Rebstöcke (ca. 3 m, Lemberger, Bonn) unterschiedlich behandelt. Ein Rebstock wurde mit einer wässrigen Lösung von Methyljasmonat (0,1%) besprüht. Die Sprühlösung enthielt zusätzlich 0,3 % BT 233, ein Tensid zum Herabsetzen der Oberflächenspannung des Wassers zur besseren Benetzung der Blattoberfläche. Am dritten Rebstock wurden die Blätter durch Einreißen verletzt. Der mittlere Rebstock diente als Kontrolle und wurde nicht behandelt. Über vier Tage wurden in zeitlichen Abständen (alle 6 h) Beeren geerntet und das Exocarp unmittelbar über HS-SPME-

GC-MS vermessen (pro Rebstock: n=2). Die Messungen wurden an drei Terminen durchgeführt (23.09.2011, 01.10.2012, 10.10.2012).

6.7 Analytik

6.7.1 SPME

SPME-Faser: 85µm PA, Supelco (Bellafonte, PA, USA)

Automatisierung: CTC CombiPal (CTC Analytics AG, Schweiz)

Tabelle 15: SPME-Bedingungen der durchgeführten Versuche

Versuchsmodell	HS-Vial	Extraktions- und Konditionierungstemperatur	Konditionierungsdauer	Extraktionsdauer	Desorptionsdauer
Profilmessungen	20 mL	45 °C	30 min	10 min	10 min
Biosynthesestudien, MeJA-Studien, Abschnitt 4.2, 4.5	10 mL	60°C	30 min	10 min	10 min
MeJA-Studien, Abschnitt 4.3, 4.4	20 mL	RT	-	20 min	10 min

In Abhängigkeit vom Versuchsmodell mussten unterschiedliche SPME-Methoden entwickelt werden. 20 mL Vials wurden für Versuchsansätze verwendet, bei denen ganze Beeren vermessen wurden. Als Konditionierungs- und Extraktionstemperatur der Profilmessungen wurden 45°C gewählt, da Beeren in frühen Reifestadien bei Temperaturen von 60 °C Braunfärbungen und Flüssigkeitsaustritt zeigten.

Die HS-Messungen für Abschnitt 4.3 und 4.4 mussten bei Raumtemperatur durchgeführt werden, da die Trauben über einen Zeitraum von drei Tagen und trotz mehrfacher Messung biosynthetisch aktiv bleiben mussten. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde daher die Extraktionszeit verlängert.

6.7.2 GC-MS-System

Autosampler:	CTC CombiPal (CTC Analytics AG, Schweiz)
GC:	Varian 450 GC (Palo Alto, CA, USA)
MS:	Varian 240 MS (Palo Alto, CA, USA), Iontrap
Säule:	DB5 (Varian, 30 m × 0,25 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke)
Auswertesoftware:	VarianWorkstation Starbar

6.7.3 GC-MS-Messung

Injektortemperatur:	220°C
Split (SPME):	0-3 min Splitless; 3-10 min Split 1:100; ab 10 min Split 1:20
Split (lq):	0-1,5 min Splitless; ab 1,5 min Split 1:20
GC-Temperaturprogramm:	35°C für 3 min, auf 250°C mit 5°C/min
Transferlinetemperatur:	260°C
Iontrap-Temperatur:	150°C
Ionisierung:	EI (Elektronenstoß-Ionisation), 70eV
Scanmodus:	fullscan, m/z 35-350, Scanrate: 0,64 s/scan

6.7.4 Chirale Messungen

Die chiralen Messungen wichen in folgenden Parametern von 6.7.2 und 6.7.3 ab:

Säule:	Fused silica Kapillarsäule, (30 m × 0,25mm i.D.), Heptakis-(2,3-di- <i>O</i> -methyl-6- <i>O</i> -tert-butyldimethylsilyl)- β - cyclodextrin (20%) in BGB 15 (Filmdicke 0,25 µm)
GC-Temperaturprogramm:	60°C für 3 min, auf 160°C mit 1°C/min, Endtemperatur 10 min halten

6.7.5 GC×GC-qMS - Messungen

Geräteparameter:

GC×GC	Trace GC × GC Ultra, ThermoFisher Scientific (Dreieich, Deutschland)
MS	DSQ Quadrupol MS, ThermoFisher Scientific
Autosampler	TriPlus Autosampler mit SPME Option, ThermoFisher Scientific
Software	Xcalibur, Version 1.4, ThermoFisher Scientific HyperChrom, Version 2.4.1, ThermoFisher Scientific

Methode:

Injektortemperatur:	240°C
Split:	Splitless
GC-Temperaturprogramm:	50°C für 5 min, auf 245°C mit 6°C/min
Transferlinetemperatur:	260°C
Modulationszeit:	6 sec
Scanmodus:	fullscan, m/z 40-250

6.7.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) über einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-hoc-LSD-Test (least significant difference) sowie kanonischer Diskriminanzanalyse.

6.8 Synthesen

6.8.1 Synthese von [²H₂-5,5]-Deoxy-D-xylulose

Die Synthese von [²H₂-5,5]-Deoxy-D-xylulose wurde nach Meyer et al. (2004) durchgeführt^[108]. Hierbei handelt es sich um eine fünfstufige Synthese. In Schritt (1) erfolgt die Reduktion des (+)-Dimethyl-2,3-*O*-benzyliden-D-tartrats mittels Lithiumaluminiumdeuterid (LiAlD₄). Anschließend wird eine OH-Gruppe des Diols durch Einführung einer Schutzgruppe mittels Benzylbromid (BnBr) maskiert (Schritt (2)). In Schritt (3) erfolgt über die Swern-Ireland-Reaktion die Oxidation des nicht geschützten, primären Alkohols und die anschließende nukleophile Addition von Methyl. Der gebildete sekundäre Alkohol wird in Schritt (4) oxidiert. In Schritt (5) erfolgt über Hydrierung die Entfernung der Schutzgruppen zu [²H₂-5,5]-Deoxy-D-xylulose. Nach jeder Stufe erfolgte die Aufreinigung des Zwischen- bzw. Rohprodukts über Flashchromatographie.

Ausbeute: 32 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,38 (s, CH₃, Furanoseanomer); 1,43 (s, CH₃, Furanoseanomer); 2,25 (s, 1-H, offenkettig); 3,66 (m, Furanoseanomer); 3,81 (m, Furanoseanomer); 4,00 (s, 4-H, offenkettig); 4,09 (s, Furanoseanomer), 4,22 (d, 3-H, offenkettig)

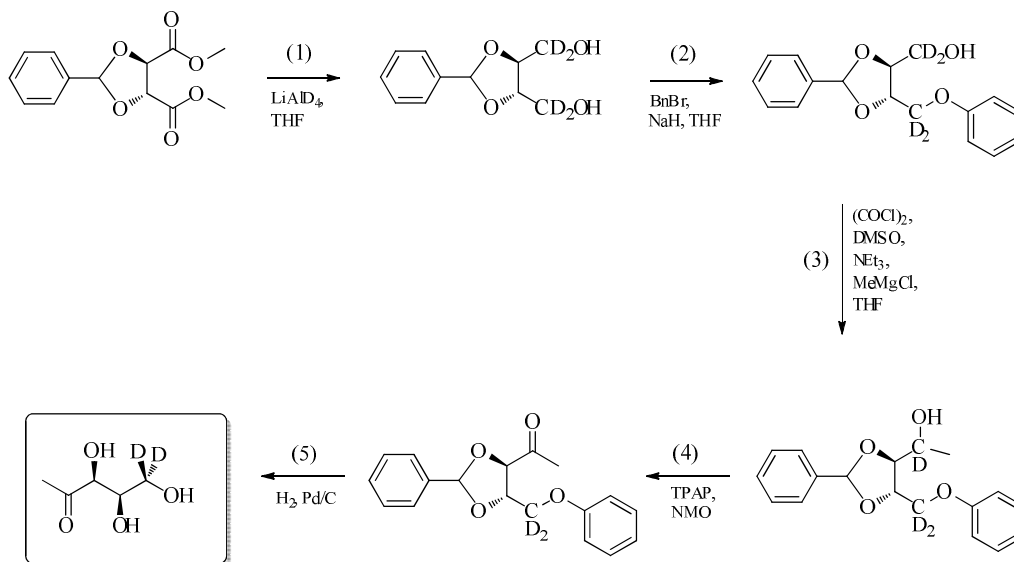


Abbildung 51: Synthese von [²H₂-5,5]-Deoxy-D-Xylulose erfolgte nach Meyer et al. (2004)^[108]. Folgende Chemikalien wurden verwendet: Lithiumaluminiumdeuterid (LiAlD₄), Tetrahydrofuran (THF), Benzylbromid (BnBr), Natriumhydrid (NaH), Oxalylchlorid ((COCl)₂), Dimethylsulfoxid (DMSO), Triethylamin (NEt₃), Methylmagnesiumchlorid (MeMgCl), Tetrapropylammoniumpererruthenat (TPAP), *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) und Palladium-Kohlenstoff (Pd/C, Katalysator).

6.8.2 Synthese von [²H₂-5,5]-Mevalonolacton

Die Synthese des [²H₂-5,5]-Mevalonolactons (Abbildung 52, (3)) erfolgte nach Simpson et al. (1997) über 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutarsäure (1)^[109]. Durch Umsatz mit Essigsäureanhydrid entsteht das Anhydrid der Glutarsäure (2). Überschüssiges Essigsäureanhydrid sowie Essigsäure können über eine Kugelrohrdestille abgezogen werden. Anschließend erfolgt die Reduktion mittels Natriumbordeuterid zum [²H₂-5,5]-Mevalonolacton. Das erhaltene Rohprodukt wird angesäuert, über Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Perforator in eine organische Phase (Diethylether) extrahiert und das Lösungsmittel anschließend abrotiert.

Ausbeute: 28 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1,31 (s, CH₃); 1,70 (m, 2H); 2,52 (m, 2H)

MS (CI): 133 (100), 115 (21), 71 (11); *m/z*: 133 (M+H⁺)

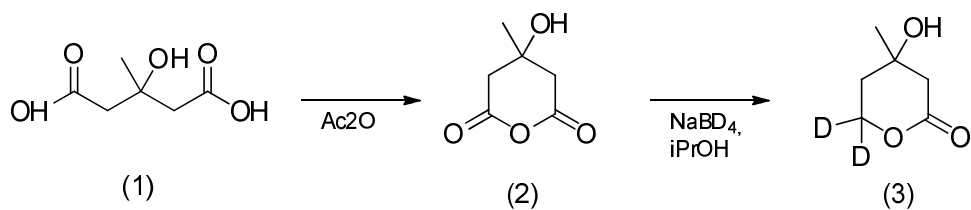


Abbildung 52: Synthese von [²H₂-5,5]-Mevalonolacton erfolgte nach Simpson et al. (1997). Folgende Chemikalien wurden verwendet: Essigsäureanhydrid (Ac₂O), Natriumbordeuterid (NaBD₄) und Isopropanol (iPrOH).

Anhang

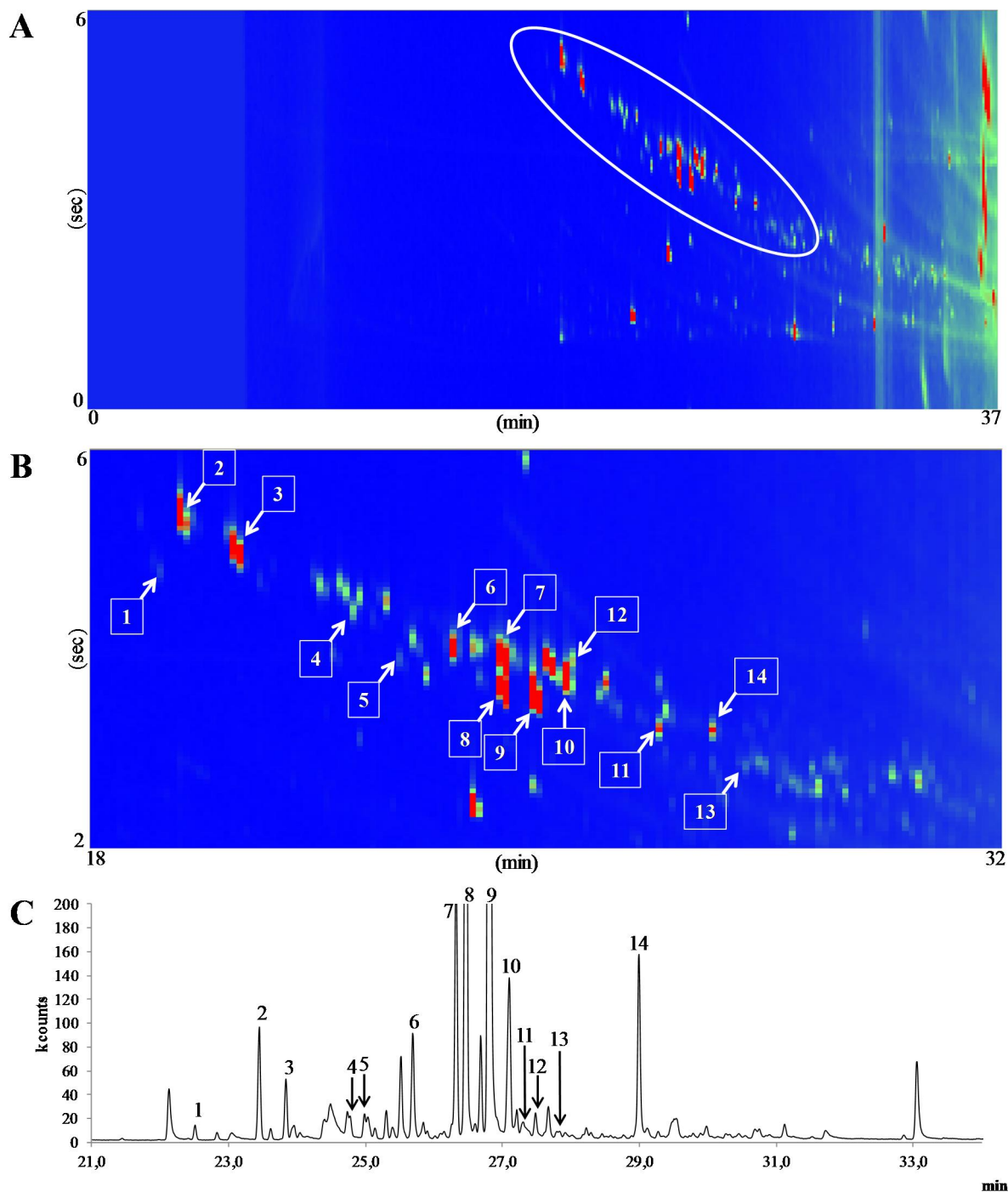


Abbildung A 1: HS-SPME-GC×GC-qMS-Analyse und Vergleich mit eindimensionaler Trennung (Gewürztraminer). Die Abbildungen A und B zeigen das GC×GC-qMS-Chromatogramm. In Abbildung B ist der Bereich von 18-32 min (1. Dimension) bzw. 2-6 sec (2. Dimension) vergrößert dargestellt. Abbildung C zeigt ein HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm. Folgende Sesquiterpene sind nummeriert: δ -Elemen (1), α -Ylangen (2), β -Bourbonen (3), Caryophyllen (4), γ -Elemen (5), Humulen (6), Germacren D (7), (*E,Z*)- α -Farnesen (8), (*E,E*)- α -Farnesen (9), γ -Cadinen (10), Calamenen (11), unbekannt (12, RI 1533), β -Calacoren (13), unbekannt (14, RI 1597)

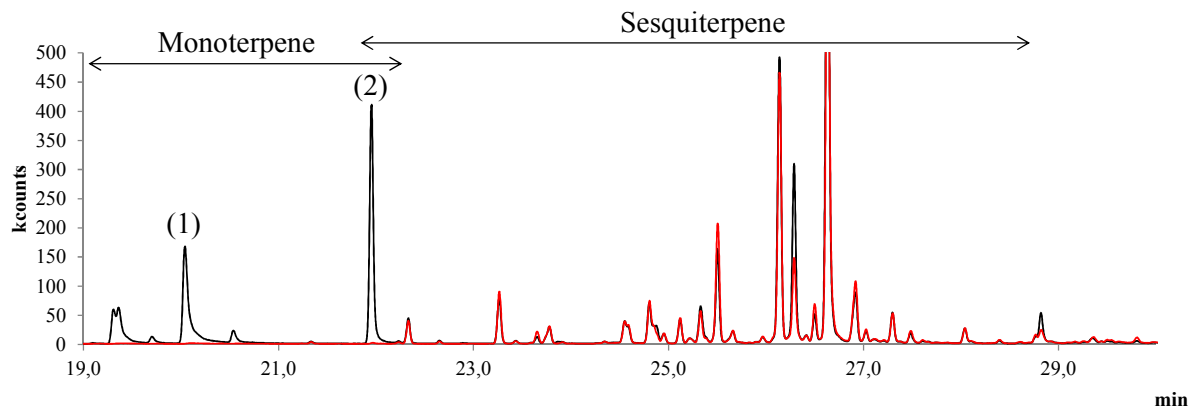


Abbildung A 2: Vergleich der HS-SPME-GC-MS Chromatogramme von Gewürztraminer und dem unaromatischen Gewürztraminer klon. Dargestellt sind die Chromatogramme (TIC) für Gewürztraminer (schwarz) und dem unaromatischer Gewürztraminer (rot) vom 19.09.2011. Der Elutionsbereich von Mono- und Sesquiterpenen ist über dem Chromatogramm angegeben. Folgende Verbindungen sind nummeriert: Geraniol (1) und Methylgeranat (2).

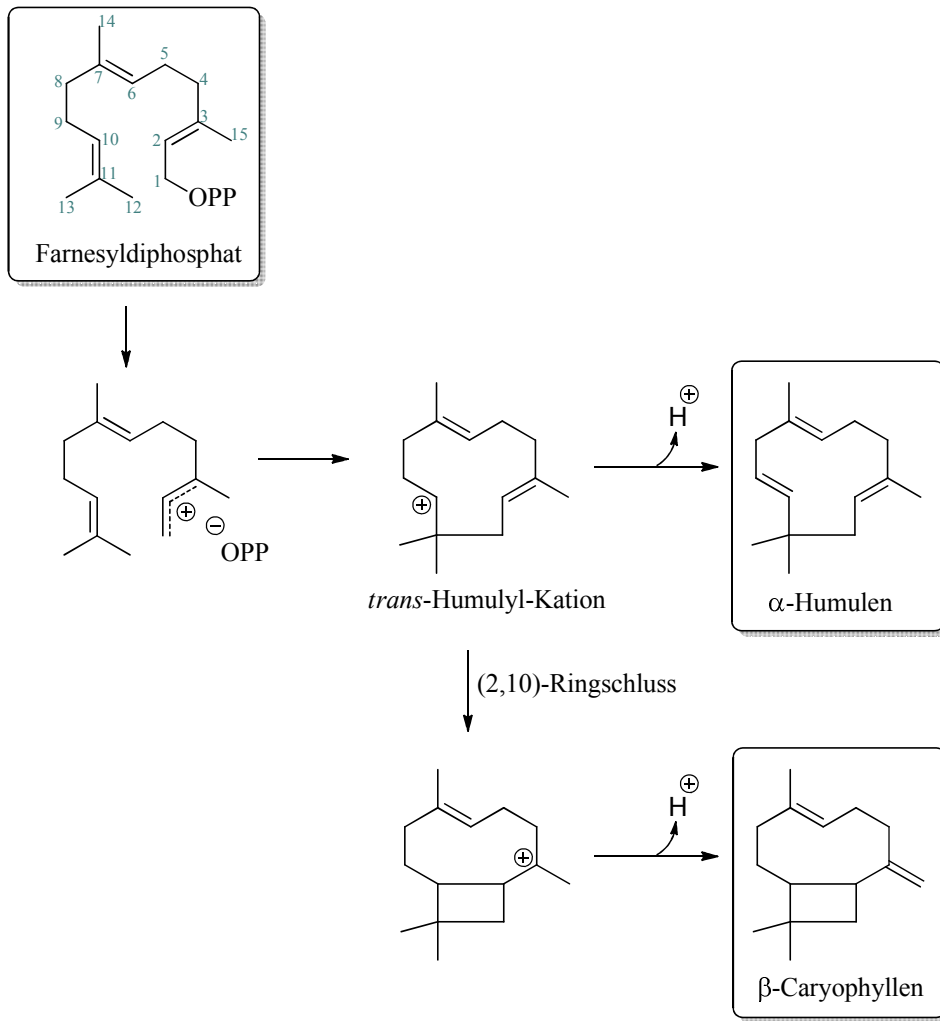


Abbildung A 3: Mögliche Bildung von Humulen und Caryophyllen^[25]

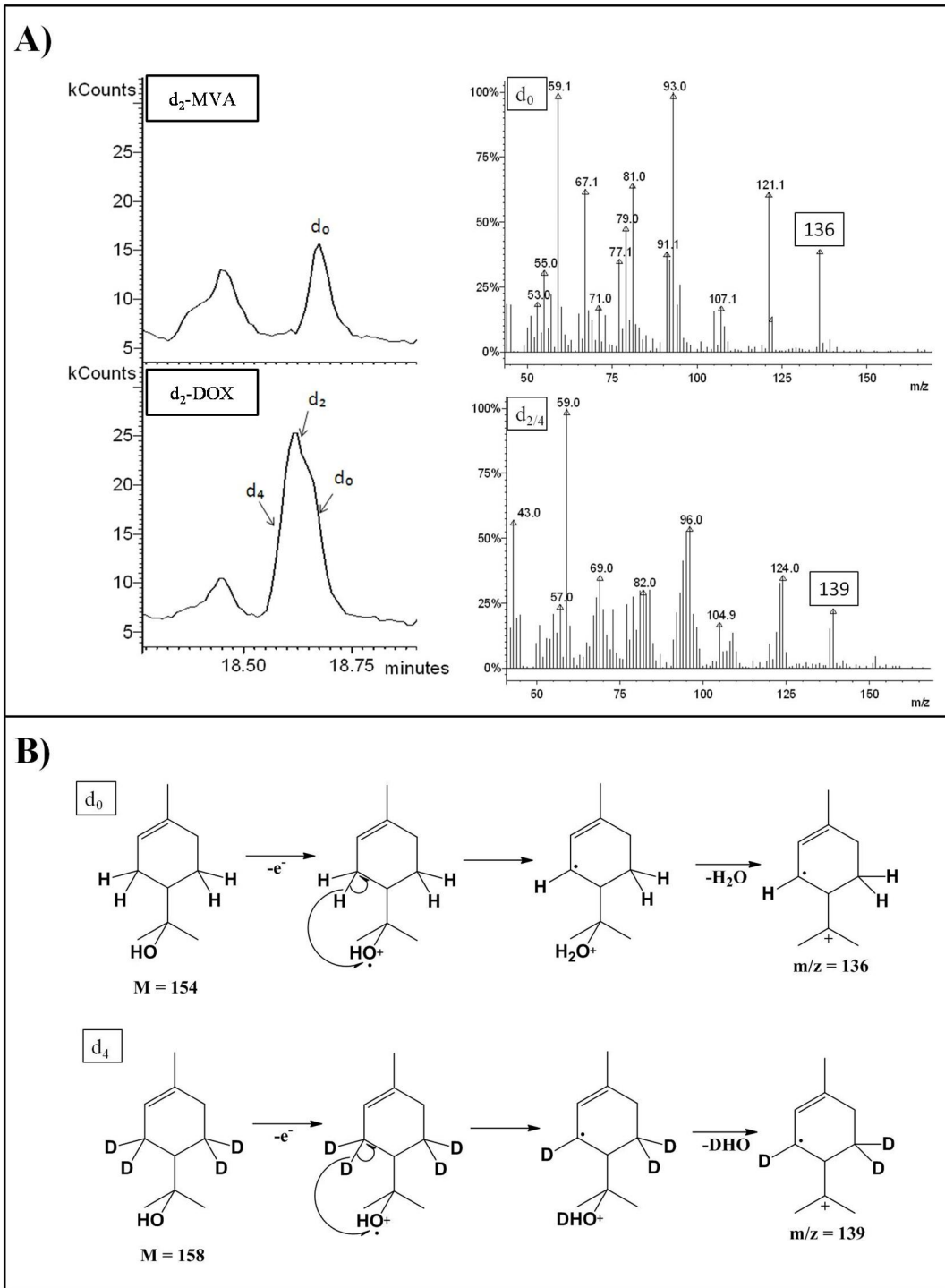


Abbildung A 4: Einbau deuteriummarkierter Präkursoren in Monoterpene des Mesokarps am Beispiel α -Terpineol. In Abbildung A sind die HS-SPME-GC-MS Chromatogramme (TIC) nach Applikation von d_2 -MVL bzw. d_2 -DOX (links) zur Rebsorte Lemberger sowie die Massenspektren von genuinem und markiertem α -Terpineol (rechts) dargestellt. In Abbildung B ist der mögliche Fragmentierungsmechanismus von genuinem und markiertem α -Terpineol angegeben.

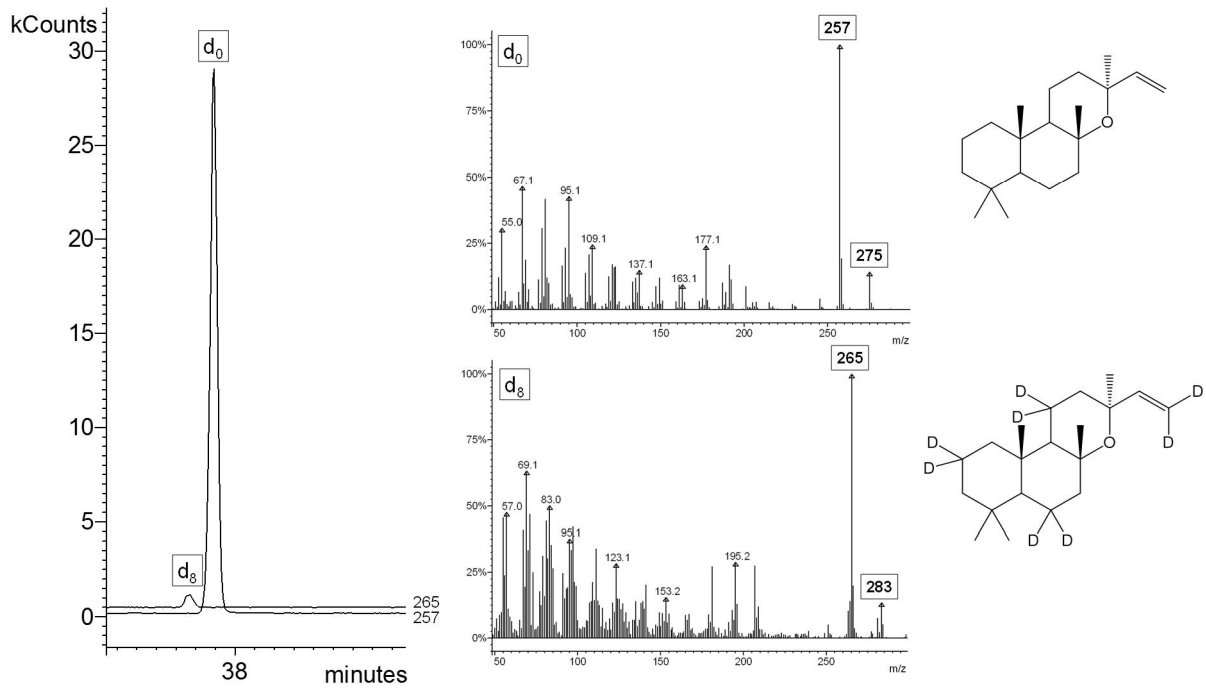


Abbildung A 5: Einbau deuteriummarkierter Präkursoren in das Diterpen 13-*epi*-Manoyloxid. Einbau von d_2 -DOX, gezeigt für die Rebsorte Lemberger (Exokarp). Links dargestellt ist der Chromatogrammausschnitt (Ionenspuren, SIS) für das genuine ($m/z = 257$) und markierte ($m/z = 265$) Diterpen. In der Mitte sind die Massenspektren von d_0 -13-*epi*-Manoyloxid und d_8 -13-*epi*-Manoyloxid angegeben. Die Fragmente $m/z = 275$ und $m/z = 283$ entsprechen den Moleküllionen, die Fragmente $m/z = 257$ bzw. $m/z = 265$ sind auf die Abspaltung einer Methylgruppe (CH_3) zurückzuführen. Die Strukturformeln mit prognostiziertem Markierungsmuster sind rechts aufgeführt.

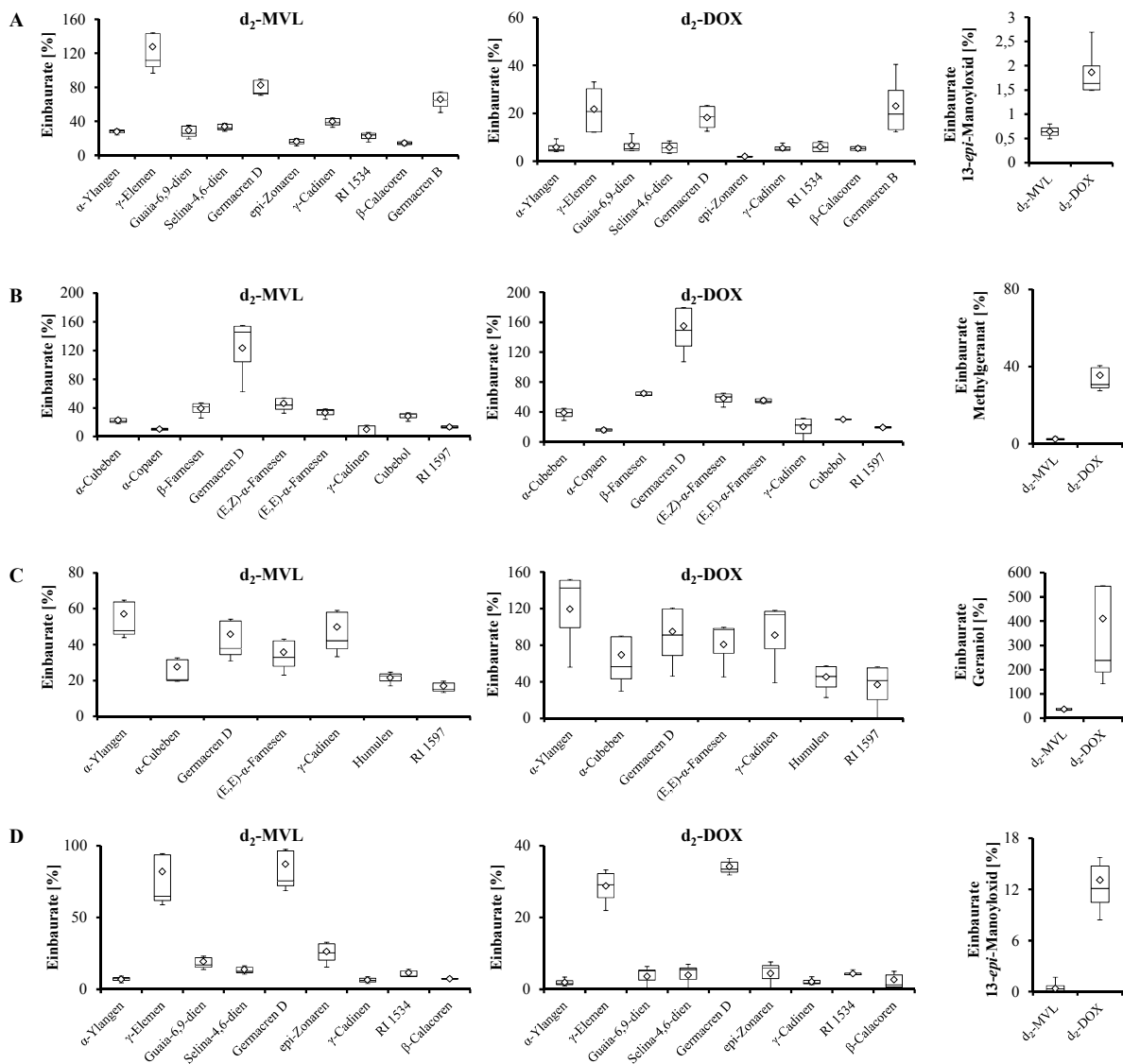


Abbildung A 6: Einbau von Deuterium nach Applikation von d_2 -MVL und d_2 -DOX in Sesqui-, Mono- und Diterpene, verschiedene Rebsorten (Exokarp). Aufgeführt sind: A) Lemberger (2010, $n=4$), B) Gewürztraminer (2012; $n=3$), C) unaromatischer Gewürztraminer (2012, $n=3$) und D) Syrah (2012; $n=3$). Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit dem 25% Perzentil (1. Quartil, unten) und dem 75% Perzentil (3. Quartil, oben), getrennt durch den Median (50% Perzentil). Die Raute entspricht dem Mittelwert. Unterer Whisker ist das untere Perzentil minus dem kleinsten Wert, oberer Whisker ist der größte Wert minus dem oberen Perzentil.

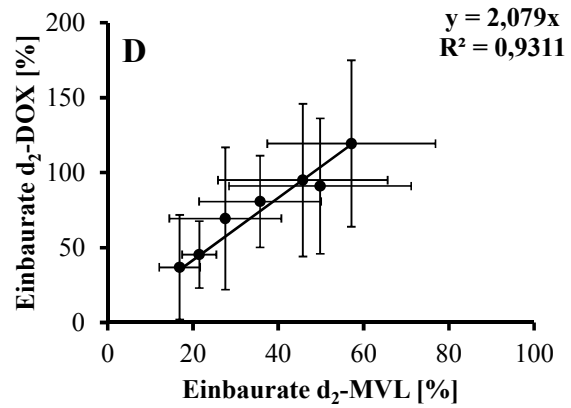
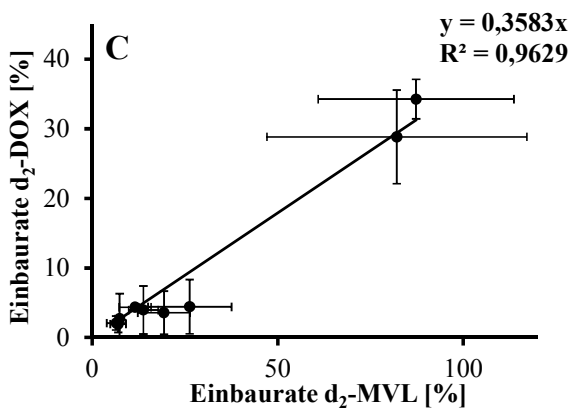
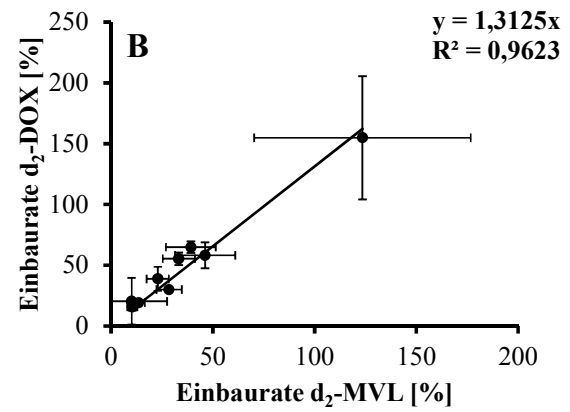
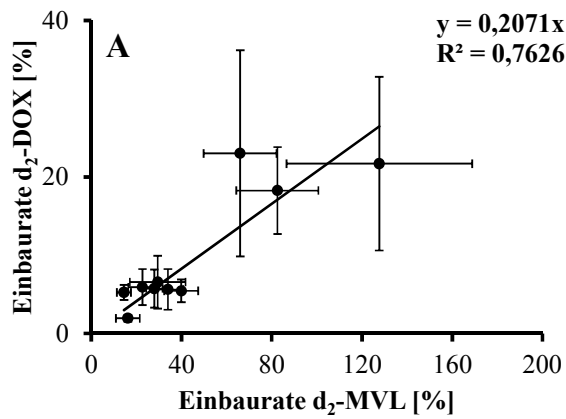


Abbildung A 7: Korrelation der erzielten Einbaureaten nach Applikation von d₂-MVL und d₂-DOX, verschiedene Rebsorten (Exokarp). Aufgeführt sind: A) Lemberger (2010, n=4), B) Gewürztraminer (2012; n=3), C) unaromatischer Gewürztraminer (2012, n=3) und D) Syrah (2012; n=3).

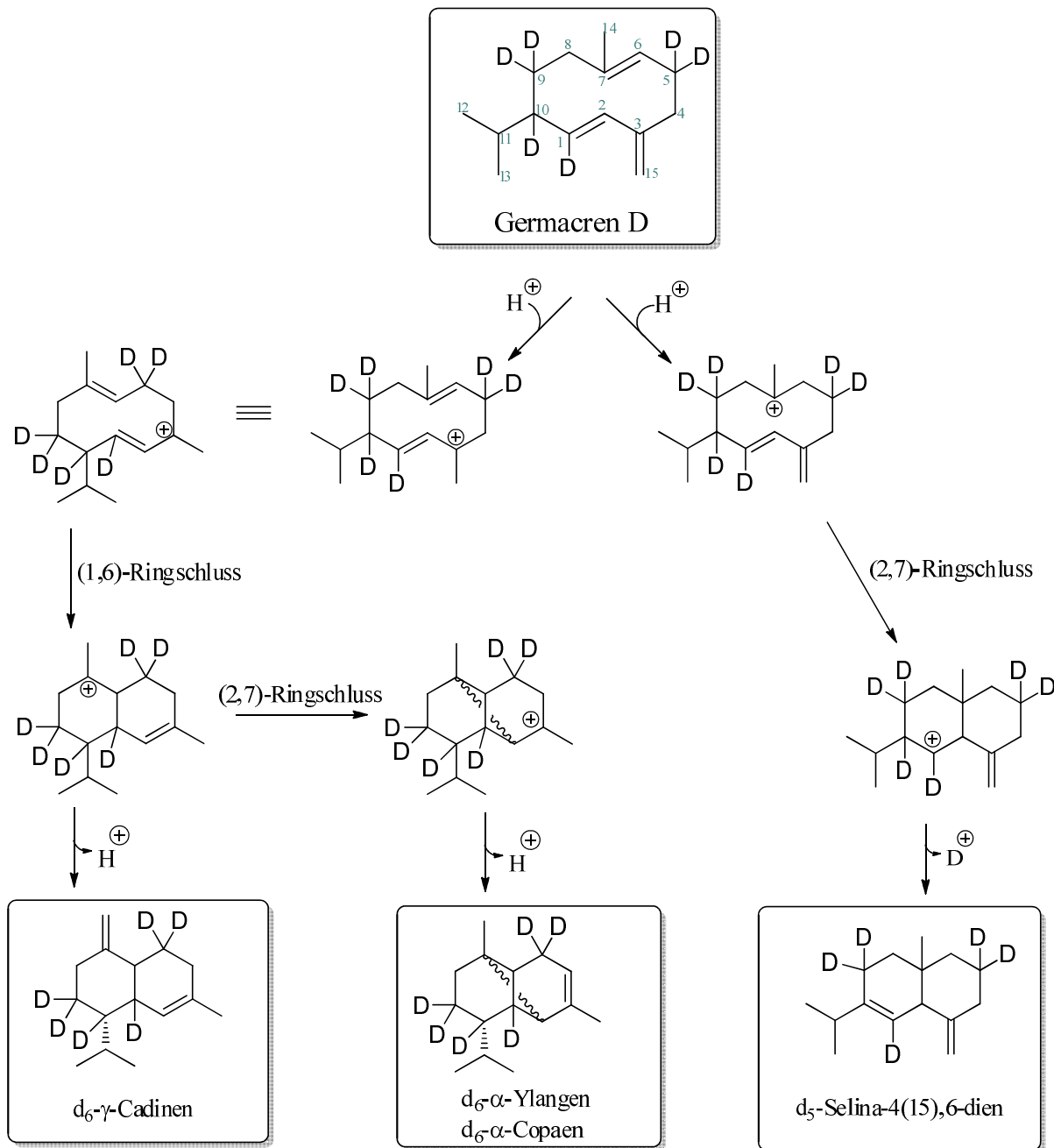


Abbildung A 8: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene γ -Cadinen, α -Ylangen, α -Copaen und Selina-4,6-dien über d_6 -(R)-Germacren D nach Steele et al. (1998)

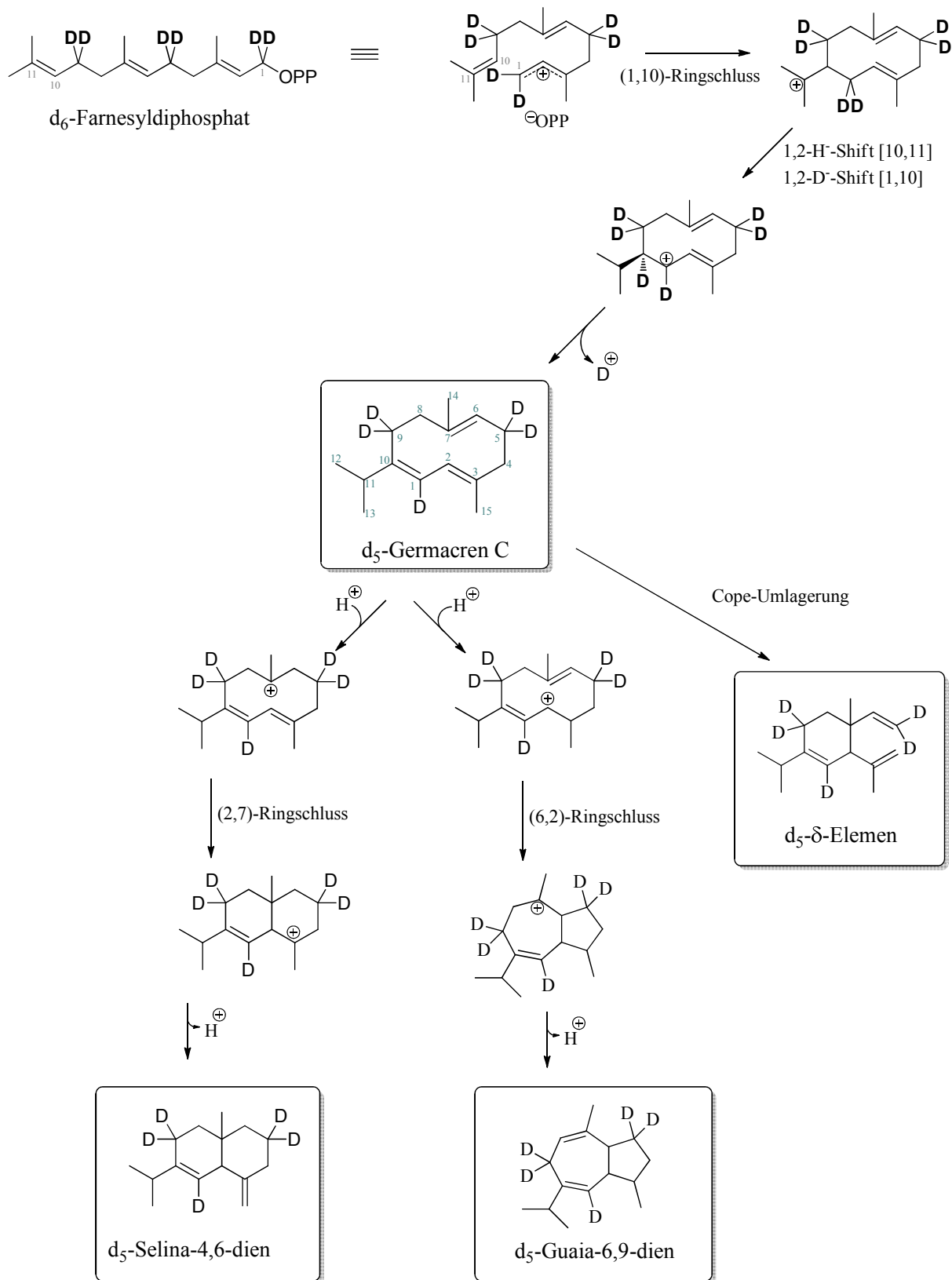


Abbildung A 9: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene Guaia-6,9-dien, δ-Elemen und Selina-4,6-dien über d₅-Germacren C nach Steele et al. (1998)

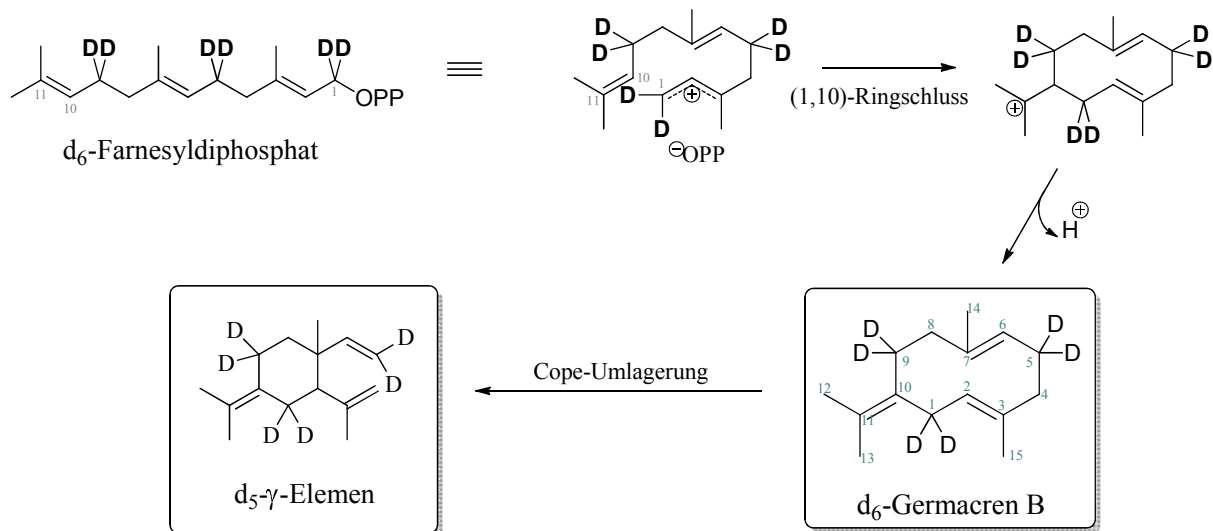


Abbildung A 10: Möglicher Einbau markierter Präkursoren in die Sesquiterpene Germacren B und γ -Elemen nach Steele et al. (1998)

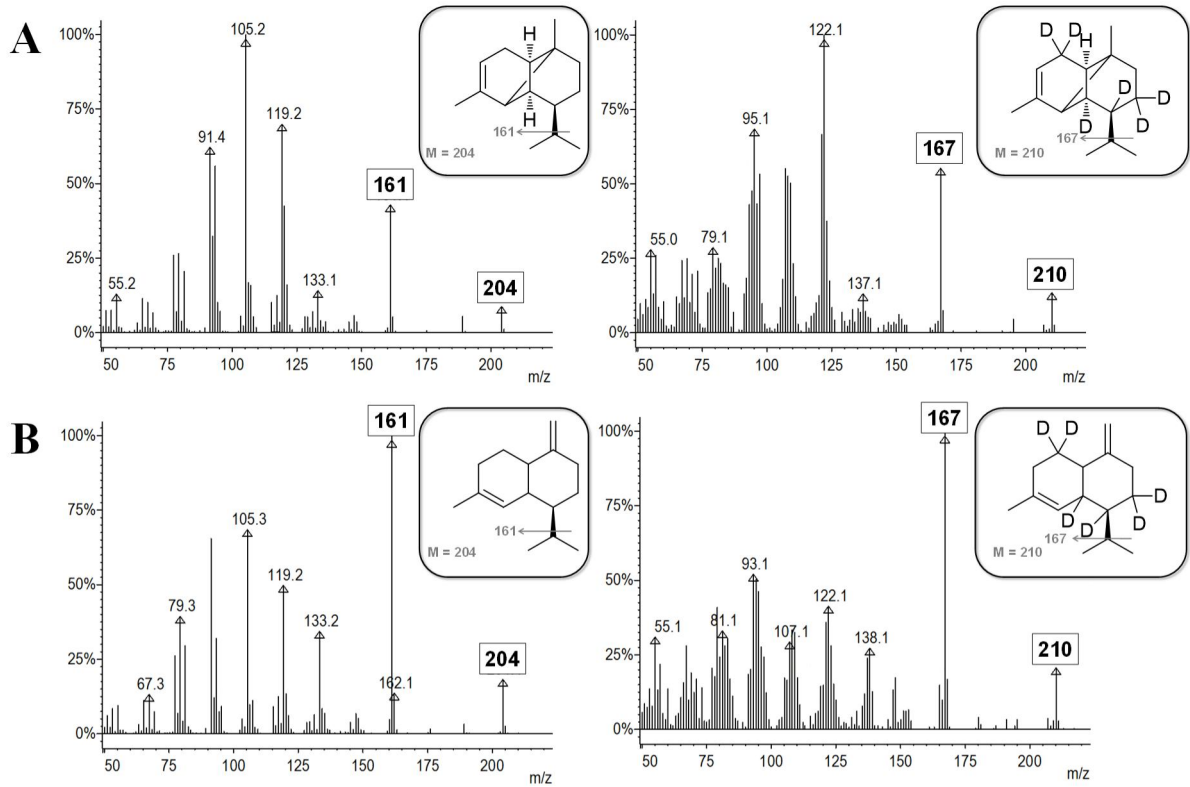


Abbildung A 11: Massenspektren von unmarkierten und markierten α -Ylangen (A) und γ -Cadinen (B) sowie die Markierungsmuster. Der zugrunde liegende postulierte Cyclisierungsmechanismus ist in Abbildung A 8 angegeben.

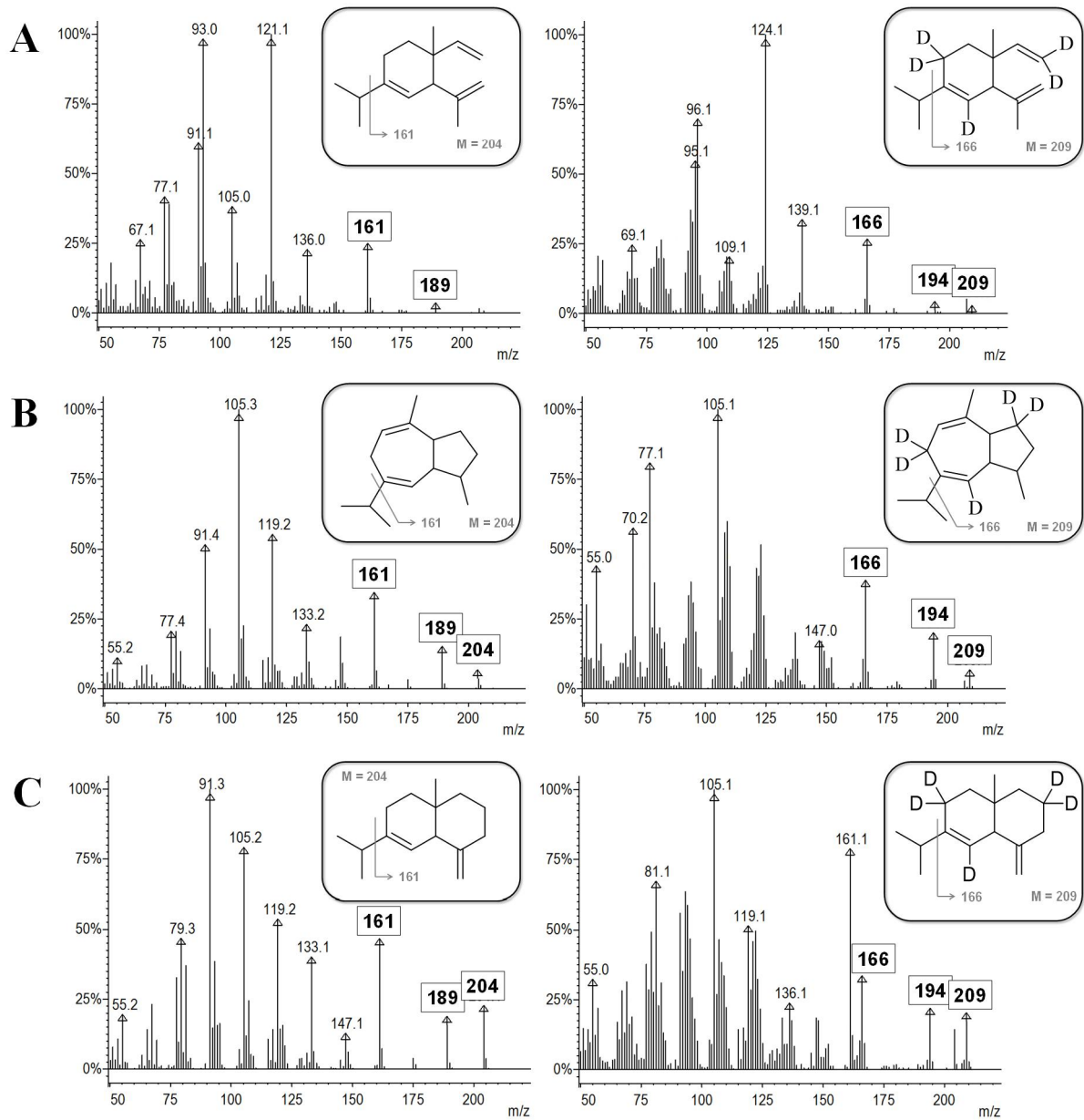


Abbildung A 12: Massenspektren von unmarkierten und markierten δ -Elemen (A), Guaia-6,9-dien (B) und Selina-(4,6)-dien (C) sowie die Markierungsmuster. Der zugrunde liegende postulierte Cyclisierungsmechanismus ist in Abbildung A 9 angegeben.

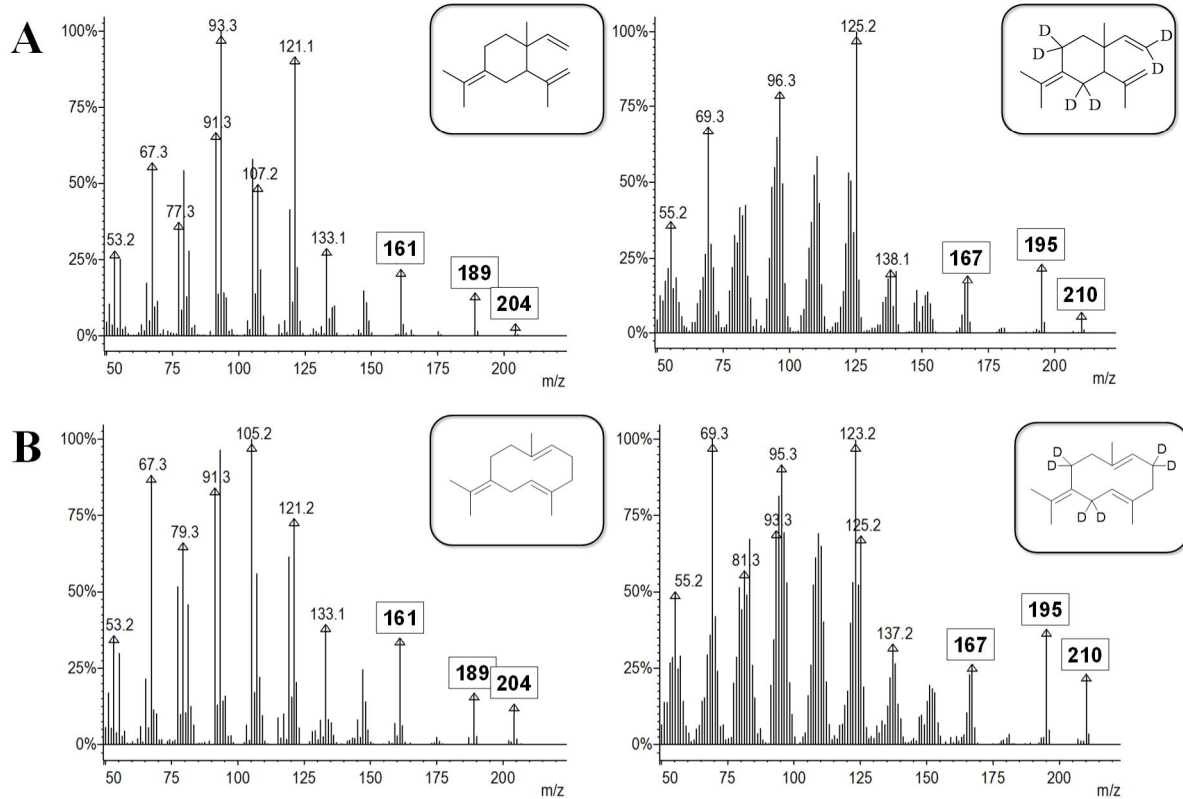


Abbildung A 13: Massenspektren von unmarkierten und markierten γ -Elemen (A) und Germacren B (B) sowie die Markierungsmuster. Der zugrunde liegende postulierte Cyclisierungsmechanismus ist in Abbildung A 10 angegeben.

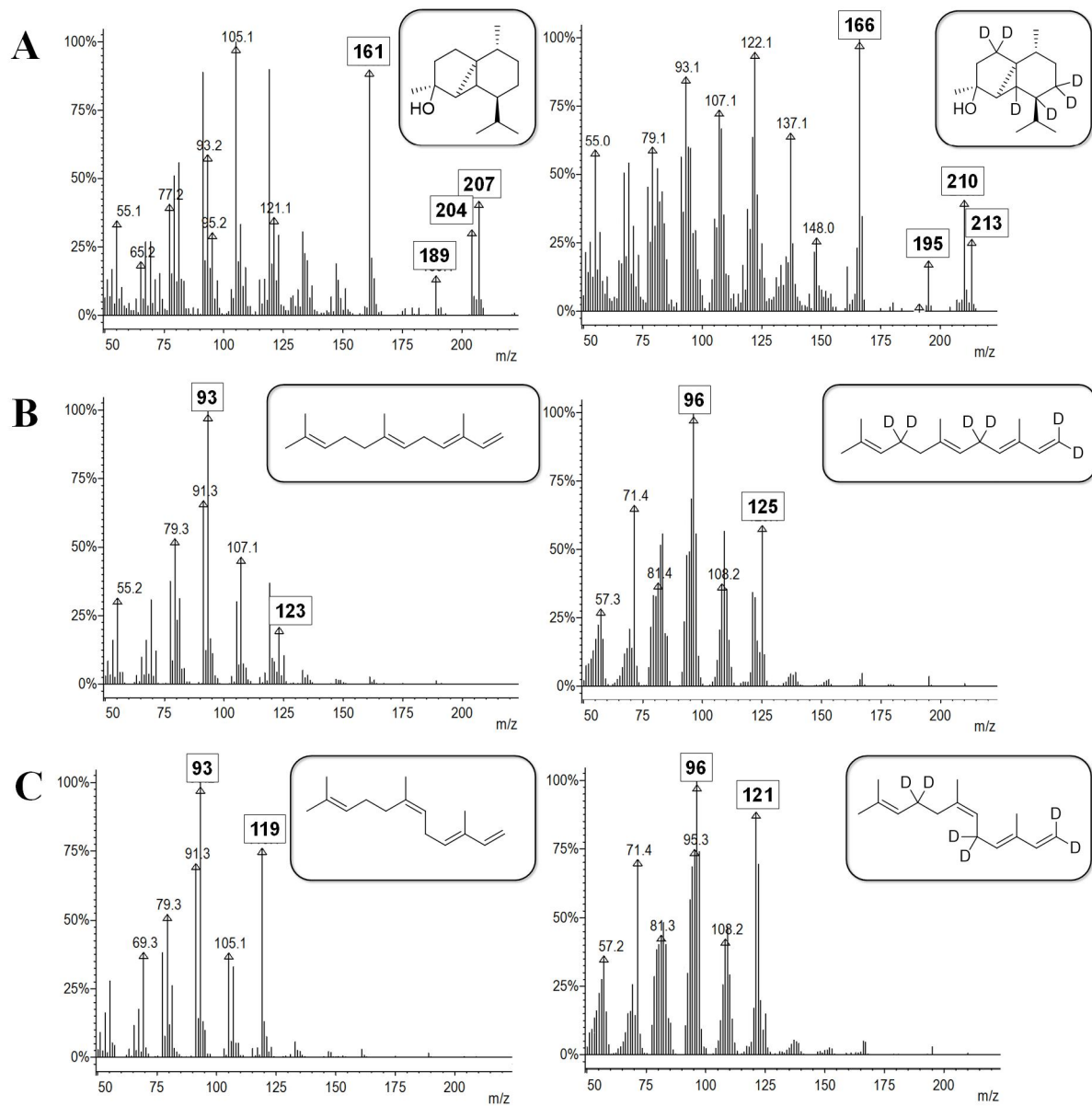


Abbildung A 14: Massenspektren von unmarkierten und markierten Cubebol (A), (*E,E*)- α -Farnesen (B) und (*E,Z*)- α -Farnesen (C) sowie die Markierungsmuster.

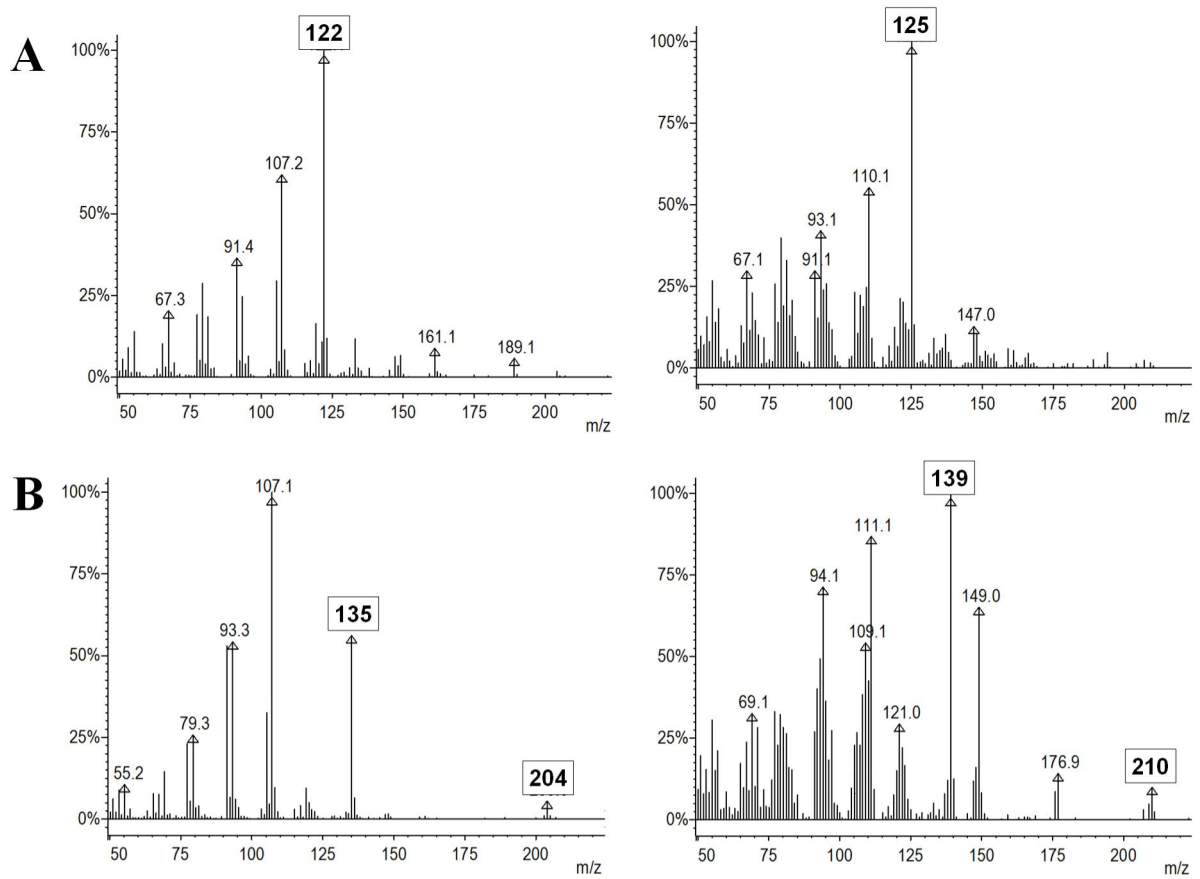


Abbildung A 15: Massenspektren von nicht identifizierten, unmarkierten und markierten Sesquiterpenen (A: RI 1533; B: RI 1597).

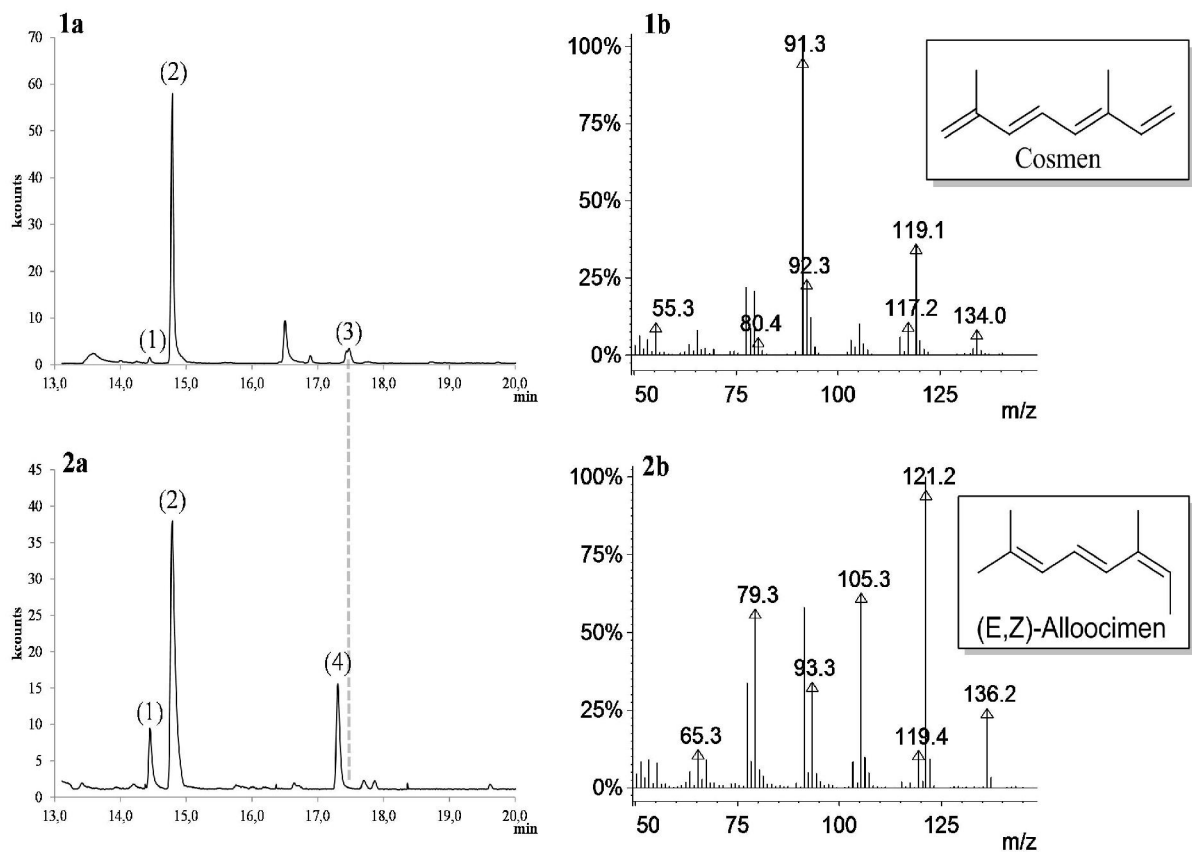


Abbildung A 16: HS-SPME-GC-MS Messung von Ocimen, zur Bestimmung einer etwaigen Umsetzung zu Cosmen. Es wurde untersucht, ob unter den angewandten Bedingungen eine Bildung von Cosmen aus Ocimen möglich ist. Abbildung 1a zeigt die HS-Messung von Weinbeeren nach Applikation von Jasmonat und d_2 -DOX (siehe Abschnitte 4.3 und 4.4). Abbildung 2a zeigt die HS-Messung eines wässrigen Isomerenmischs von Ocimen. Folgende Verbindungen sind nummeriert: (*Z*)-Ocimen (1), (*E*)-Ocimen (2), Cosmen (3), (*E,Z*)-Alloocimen (4). Die Abbildungen 1b und 2b zeigen die jeweiligen Massenspektren der Verbindungen (3) und (4).

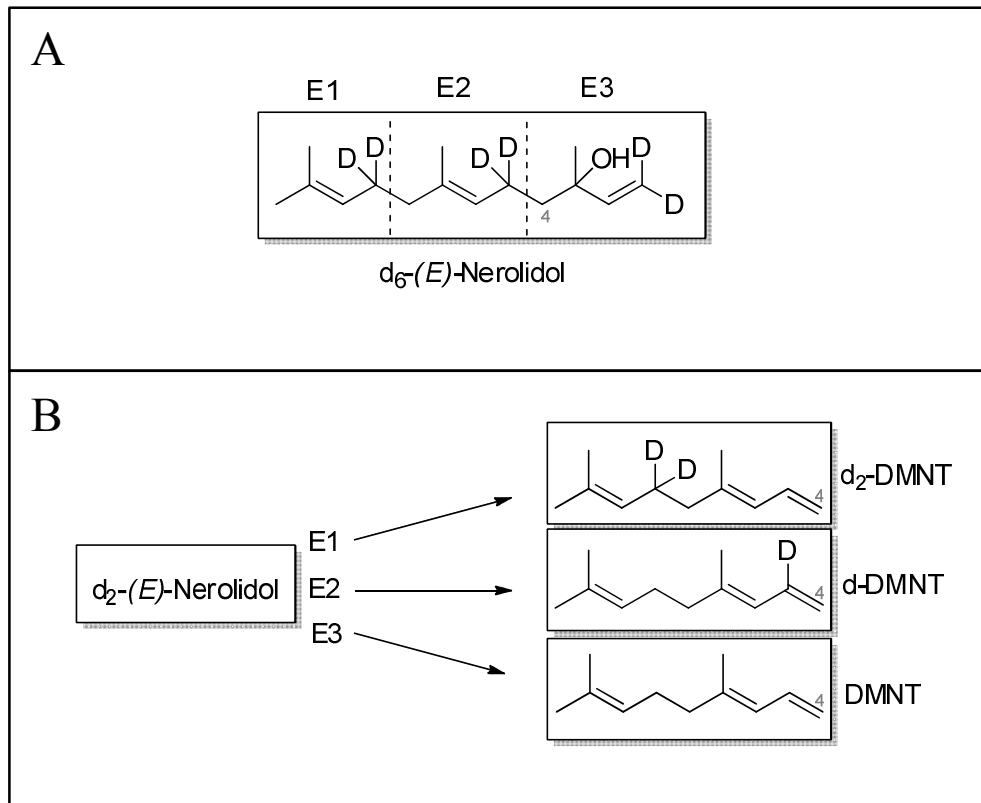


Abbildung A 17: Markierungsmuster von d_6 -Nerolidol (A) und mögliche Markierungsmuster von DMNT aus d_2 -Nerolidol (B). E1-E3 bezeichnet die jeweiligen Isoprenoid-Einheiten, die in Abbildung A durch gestrichelte Linien abgegrenzt sind. Abbildung B zeigt die mögliche Positionierung der Markierung in DMNT in Abhängigkeit der markierten Isoprenoideinheit (E1-E3) von d_2 -(E)-Nerolidol.

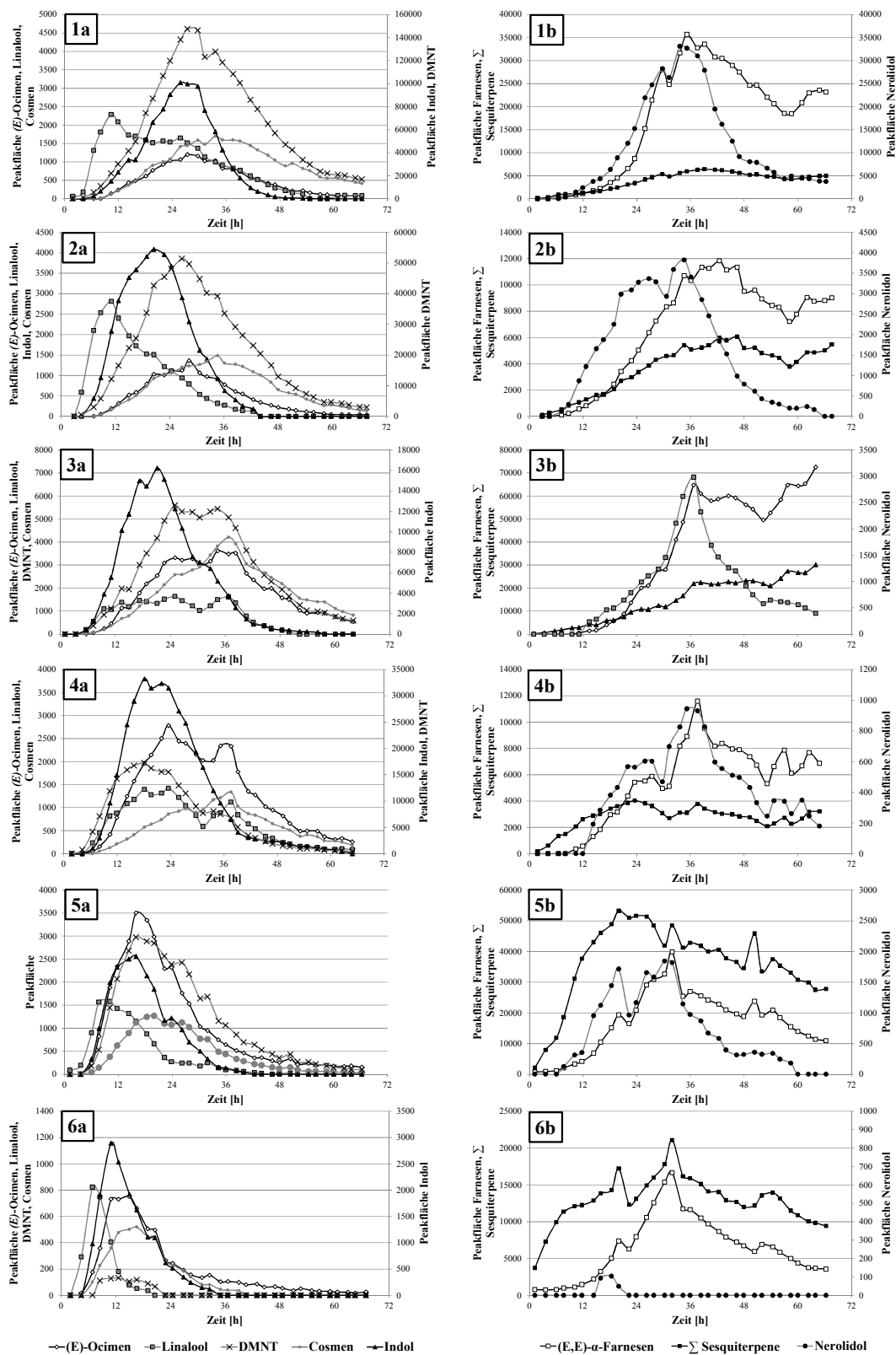
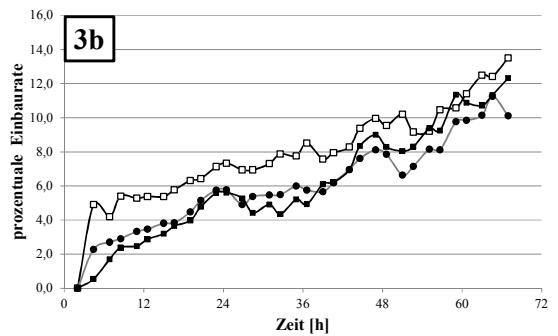
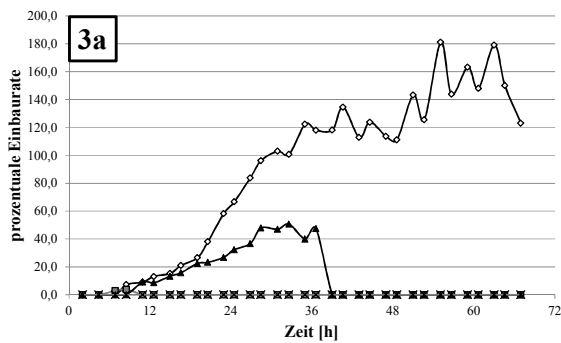
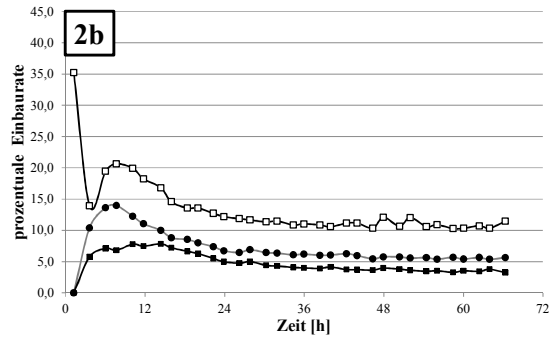
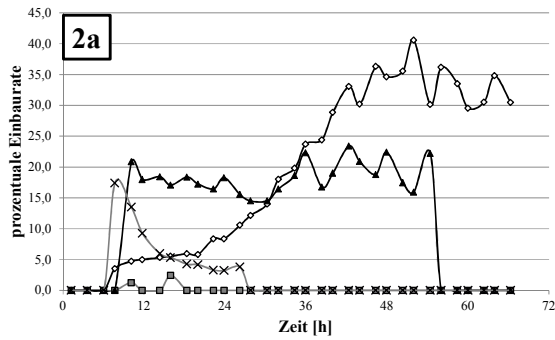
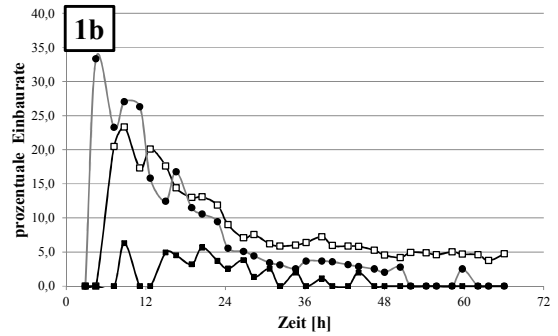
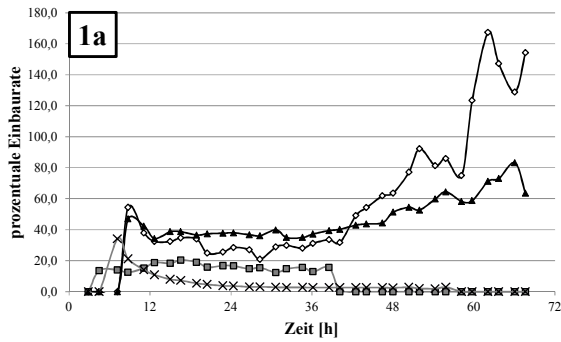


Abbildung A 18: Zeitabhängige Emission von Monoterpenen, Sesquiterpenen, dem Homoterpen DMNT und Indol nach Methyljasmonatapplikation. a): (*E*)-Ocimen, Linalool, Indol, 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien (DMNT), Cosmen. b): (*E,E*)- α -Farnesene, Nerolidol sowie andere Sesquiterpene. 1-6: verschiedene Termine (Doppelbestimmung): 1, 2 = 30.08.2012; 3, 4 = 29.09.2012; 5, 6 = 18.10.2012. Die Auswertung erfolgte über die in Tabelle A 14 für die jeweilige genuine Verbindung angegebenen Ionenspuren.



○ (E)-Ocimen (d4) □ Linalool (d4)
 ▲ Cosmen (d3) × DMNT (d2/d4)

□ Germacren D (d2) ● Germacren D (d4)
 ▲ Germacren D (d6)

Abbildung A 19: Prozentuale Einbaurrate von d₂-DOX nach Methyljasmonatapplikation als Funktion der Zeit. a): (*E*)-Ocimen (d4), Linalool (d4), Cosmen (d2/d3), 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien (DMNT, d2/d4). b): Germacren D (d2, d4, d6). 1-3: verschiedene Termine (Doppelbestimmung): 1 = 30.08.2012 (zweite Bestimmung ist in Abschnitt 4.4 dargestellt); 2, 3 = 18.10.2012. Die Auswertung erfolgte über die in Tabelle A 14 für die jeweilige genuine Verbindung angegebenen Ionenspiren.

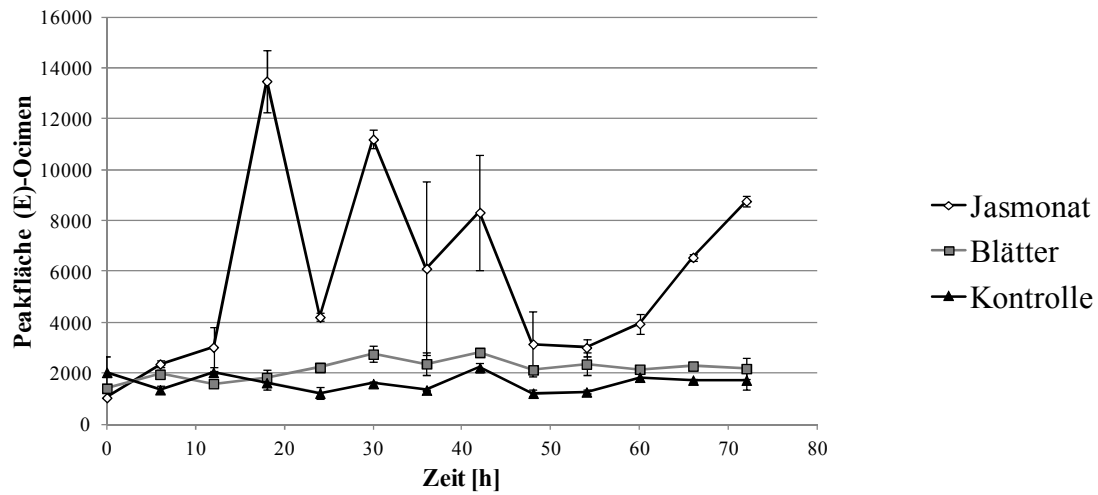


Abbildung A 20: Induktion von (*E*)- β -Ocimen in Weinbeeren als systemische Reaktion auf die Behandlung der Weinblätter. Folgende Behandlungen wurden angewandt: das Besprühen der Blätter mit Methyljasmonatlösung (Jasmonat), Verletzen des Blattwerks (Blätter). Am Kontrollrebstock erfolgte keine Behandlung (Kontrolle). Die Messungen wurden mit der Rebsorte Lemberger (2012, n = 2) durchgeführt.

Tabelle A 1: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2009, Geisenheim)

	28.07.	03.08.	18.08.	08.09.	18.09.	02.10.	09.10.
Cabernet Sauvignon			12,1	17,6	19,9	20,9	22,2
Lemberger			12,8	17,2	19,6	19,9	21,8
Gelber Muskateller			11,8	17,2	19,3	20,0	19,7
Riesling	4,4	4,6	8,1	17,7	19,3	18,0	19,6
Siegerrebe		15,7	19,6	22,2	25,4	26,3	26,3
Silvaner			11,8	17,2	18,0	20,8	21,3
Spätburgunder	6,6	7,1	15,2	20,0	21,5	24,0	23,0
Syrah			8,7	17,2	20,3	21,5	20,8
Gewürztraminer			15,7	20,9	21,6	21,8	22,0
<i>Vitis labrusca</i>			4,4	11,3	13,2	19,1	20,5

Tabelle A 2: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2010, Geisenheim)

	23.08.	30.08.	13.09.	27.09.	12.10.	26.10.
Cabernet						
Sauvignon	11,4	13,3	16,4	18,6	18,9	16,4
Lemberger	12,0	11,6	15,3	17,4	17,6	18,8
Gelber Muskateller	11,8	12,9	15,6	16,2	15,7	19,0
Riesling	6,5	8,0	14,5	18,2	18,5	16,8
Siegerrebe	19,1	17,3	21,1			
Silvaner	12,0	12,3	16,2	19,3		
Spätburgunder	14,9	14,9	18,2	20,3		
Syrah	11,7	13,3	17,9	19,2	19,3	16,8
Gewürztraminer	14,4	16,0	18,4	20,7	20,1	22,5

Tabelle A 3: Zuckergehalte in Brix der im Reifeverlauf untersuchten Rebsorten (2012, Bonn)

	18.07.	03.08.	16.08.	24.09.	01.10.	05.10.	15.10.	22.10.
Lemberger	4,1	3,1	3,8	11,9	17,1	15,0	19,6	21,2
Spätburgunder	2,5	2,2	3,3	12,8	19,2	18,8	20,8	19,2
Syrah	2,5	2,2	2,0	8,9	11,4	14,6	15,6	12,2
Gewürztraminer	2,5	2,2	5,6	18,0	19,2	20,6	21,8	21,4

Tabelle A 4: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Geisenheim, 2009, n=2)

	28.07.	30.07.	15.08.	06.09.	21.09.	01.10.	16.10.
Cabernet Sauvignon	79,1 ± 10,1	112,0	13,7 ± 6,4	2,4 ± 0,2	2,8 ± 1,1	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,5
Lemberger	13,0 ± 3,5	20,0	0,8 ± 0,2	3,0 ± 0,8	20,3 ± 13,3	3,4 ± 1,6	42,2 ± 48,7
Gelber Muskateller	38,4 ± 9,9	35,9	8,9 ± 6,0	11,0 ± 3,0	23,8 ± 5,5	53,6 ± 30,2	9,1 ± 1,9
Riesling	62,6 ± 42,4	42,9	4,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	13,0 ± 11,5	7,4 ± 4,8	66,6 ± 38,9
Siegerrebe	68,1 ± 64,7	9,0	34,3 ± 15,6	43,0 ± 9,5	125,5	18,7 ± 8,4	5,0 ± 0,8
Silvaner	21,9 ± 1,3	14,1	3,1 ± 0,2	1,9 ± 0,4	7,7 ± 8,9	26,8 ± 31,6	18,1 ± 17,4
Spät- Burgunder	71,4 ± 30,2	51,7	6,3 ± 4,3	26,0 ± 35,6	30,8 ± 21,3	13,7 ± 16,8	18,2 ± 0,9
Syrah	418,6 ± 191,1	84,7	15,5 ± 2,7	16,0 ± 6,5	21,8 ± 13,3	21,8 ± 10,1	190,6 ± 79,8
Gewürz- traminer	28,0 ± 24,4	13,0	7,0 ± 6,8	192,3 ± 77,3	686,3 ± 189,3	562,8 ± 40,9	735,3 ± 750,6
<i>Vitis</i> <i>labrusca</i>	15,2 ± 1,0	k.P. ¹	11,6 ± 15,4	4,4	k.P. ¹	10,9 ± 10,1	0,9 ± 0,2

1) k.P. keine Probenahme

Tabelle A 5: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Geisenheim, 2010, n=3). Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Sesquiterpengehalten.

	20.08.	01.09.	15.09.	29.09.	12.10.	26.10.
Cabernet	20,4 ± 3,2	4,7 ± 2,4	1,9 ± 2,0	31,8 ± 7,1	30,1 ± 10,8	31,1 ± 8,0
Sauvignon	a	b	b	a	a	a
Lemberger	7,4 ± 7,7	12,3 ± 4,7	13,5 ± 7,2	79,0 ± 49,5	531,9 ± 682,8	685,2 ± 424,3
	a	a	a	a	ab	a
Gelber	10,8 ± 6,9	18,2 ± 10,8	55,4 ± 33,2	61,0 ± 62,3	128,4 ± 38,2	73,4 ± 12,5
Muskateller	a	ac	ac	ac	b	bc
Riesling	11,2 ± 3,5	6,5 ± 8,8	17,5 ± 9,9	69,7 ± 42,8	202,3 ± 53,2	106,6 ± 77,0
	a	a	a	ac	b	c
Siegerrebe	15,4 ± 5,1	71,3 ± 26,7	164,5 ± 65,7	433,4 ± 253,1		
	a	a	a	b		
Silvaner	30,0 ± 34,1	3,9 ± 2,4	22,5 ± 27,3	48,0 ± 50,8	405,9 ± 86,6	296,4 ± 137,3
	a	a	a	a	b	b
Spät- burgunder	5,8 ± 6,5	4,0 ± 2,9	30,7 ± 12,5	92,0 ± 31,7	437,5 ± 233,9	207,3 ± 156,9
	a	a	a	a	b	a
Syrah	118,8 ± 38,2	117,9 ± 125,2	178,5 ± 41,8	386,9 ± 247,1	254,8 ± 201,9	52,6 ± 29,9
	a	a	ab	b	bc	ac
Gewürz- traminer	0,8 ± 0,8	35,1 ± 23,1	164,7 ± 61,5	1364,8 ± 627,9	1657,2 ± 55,5	1425,7 ± 675,5
	a	a	a	b	b	b

Tabelle A 6: Verlauf der Sesquiterpenakkumulation während des Reifeverlaufs für verschiedene Rebsorten, Summenparameter der Peakflächen (Bonn, 2012, n=3). Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Sesquiterpengehalten.

	18.07.	22.07.	03.08.	16.08.	24.09.	30.09.	06.10.	15.10.	22.10.
Lemberger	64,7 ± 13,0 a	55,2	12,8 ± 4,4 cd	3,6 ± 0,9 a	22,8 ± 7,6 bc	25,9 ± 6,2 bc	26,2 ± 11,5 bc	54,7 ± 45,6 ab	46,3 ± 33,4 abd
Spät- Burgunder	424,2 ± 263,4 a	47,5	186,9 ± 159,2 b	72,6 ± 50,4 b	8,1 ± 6,5 b	4,9 ± 4,7 b	20,5 ± 16,9 b	29,3 ± 13,6 b	15,3 ± 9,1 b
Syrah	941,0 ± 799,2 a	86,4	99,8 ± 84,6 b	110,8 ± 109,8 b	9,0 ± 1,5 b	35,9 ± 48,1 b	15,0 ± 6,6 b	111,1 ± 81,3 b	25,9 ± 23,9 b
Gewürztraminer	110,0 ± 25,2 ab	119,6	52,0 ± 43,2 a	5,7 ± 4,3 a	51,4 ± 44,3 a	77,9 ± 49,4 a	237,6 ± 82,9 bc	273,0 ± 200,1 c	145,8 ± 58,3 abc

Tabelle A 7: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Preveraison

	Cabernet Sauvignon	Vitis labrusca	Lemberger	Muska- teller	Riesling	Silvaner	Spät- burgunder	Syrah	Gewürz- traminer
	n = 2	n = 2	n = 9	n = 2	n = 2	n = 3	n = 3	n = 5	n = 4
Cadalen	1,0 ± 0,3	4,1 ± 2,8	6,0 ± 6,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0	5,2 ± 1,9	0,7 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1
γ-Calacoren	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
β-Calacoren	0,8 ± 0,0	1,7 ± 0,5	5,3 ± 1,9	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	3,0 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
α-Calacoren	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,9	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
δ-Elemen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2
Cubenol	3,7 ± 0,2	3,9 ± 2,1	5,6 ± 5,8	0,3 ± 0,4	0,9 ± 0,2	11,7 ± 1,9	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,2	1,3 ± 0,9
δ-Cadinen	3,3 ± 0,2	7,2 ± 1,2	11,7 ± 5,3	4,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,4	1,5 ± 0,2
γ-Cadinen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,6	0,3 ± 0,5	0,6 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
α-Cubeben	1,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,6	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
(E,E)-α-Farnesen	0,7 ± 1,0	62,2 ± 7,3	2,4 ± 4,4	4,6 ± 0,2	7,2 ± 4,2	4,2 ± 7,3	20,0 ± 11,5	82,2 ± 12,3	25,8 ± 1,8
α-Humulen	41,7 ± 2,6	4,0 ± 0,5	26,7 ± 5,9	39,9 ± 0,1	42,9 ± 1,9	35,2 ± 5,6	34,6 ± 2,9	5,9 ± 4,4	20,2 ± 2,8
RI 1533	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
(E)-β-Caryophyllen	16,9 ± 3,5	2,8 ± 0,5	16,0 ± 4,6	20,0 ± 1,0	18,2 ± 0,5	24,4 ± 6,8	12,1 ± 1,5	3,7 ± 2,0	16,4 ± 2,2
Calamenen	3,5 ± 0,8	2,0 ± 0,7	8,1 ± 2,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,0	3,9 ± 1,2	1,8 ± 0,5	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,2
γ-Elemen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Germacren D	0,9 ± 0,4	2,6 ± 0,6	7,9 ± 3,1	6,4 ± 0,6	4,2 ± 3,9	4,0 ± 1,1	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,7	32,1 ± 8,4
Selina-4,6-dien	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,9
Guaia-6,9-dien	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,9
RI 1391	22,3 ± 5,1	0,0 ± 0,0	1,7 ± 1,1	14,8 ± 0,3	13,3 ± 3,7	0,9 ± 0,9	20,1 ± 6,3	2,5 ± 2,8	0,4 ± 0,4
α-Copaen	3,2 ± 0,6	3,7 ± 0,6	6,4 ± 2,2	2,9 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2	2,7 ± 0,6	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,3
α-Ylangen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Epi-Zonaren	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
β-Bourbonen	0,1 ± 0,2	2,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,8	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
(E,E)-Methylfarnesoat	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
(E,Z)-α-Farnesen	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,6	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,7	1,1 ± 0,4	2,6 ± 2,1	0,0 ± 0,0

Tabelle A 8: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Veraison

	Cabernet Sauvignon n = 8	Vitis labrusca n = 2	Lemberger n = 5	Muska- teller n = 3	Riesling n = 5	Silvaner n = 7	Spät- burgunder n = 6	Syrah n = 11	Gewürz- traminer n = 9	Siegerrebe n=3
Cadalen	0,2 ± 0,2	1,3 ± 0,0	4,0 ± 4,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	1,5 ± 2,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	2,9 ± 5,1	0,9 ± 0,4
γ-Calacoren	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
β-Calacoren	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,9 ± 1,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,8	0,7 ± 0,2
α-Calacoren	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
δ-Elementen	0,0 ± 0,0	5,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,4 ± 4,4	2,0 ± 2,2	0,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	3,5 ± 2,8
Cubenol	0,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,6 ± 0,5
δ-Cadinen	1,4 ± 0,9	3,2 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 1,1	0,2 ± 0,5	0,3 ± 0,5	7,1 ± 11,0	1,8 ± 0,2
γ-Cadinen	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 3,5	5,6 ± 4,7	2,2 ± 4,4	0,0 ± 0,0	3,0 ± 3,0
α-Cubeben	2,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,8	2,3 ± 5,0	0,2 ± 0,3
(<i>E,E</i>)-α-Farnesen	1,6 ± 2,3	24,3 ± 4,6	74,6 ± 17,0	65,1 ± 31,9	18,0 ± 12,1	56,5 ± 29,5	22,9 ± 20,8	40,1 ± 29,9	68,2 ± 24,6	31,6 ± 19,7
α-Humulen	36,8 ± 1,4	1,9 ± 2,6	9,0 ± 12,4	11,4 ± 10,2	36,6 ± 5,5	6,1 ± 6,8	27,4 ± 13,6	16,8 ± 13,6	4,5 ± 5,2	15,8 ± 5,4
RI 1533	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,6	0,9 ± 1,1	0,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,4
(<i>E</i>)-β-Caryophyllen	13,7 ± 1,2	3,1 ± 1,5	5,9 ± 7,6	5,7 ± 5,4	18,7 ± 4,8	5,0 ± 7,1	1,4 ± 1,3	6,4 ± 5,1	3,4 ± 3,8	6,1 ± 1,9
Calamenen	1,6 ± 0,8	2,5 ± 0,5	2,4 ± 2,8	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,6	0,7 ± 1,1	1,7 ± 2,1	0,8 ± 0,8	3,9 ± 4,9	1,8 ± 0,5
γ-Elementen	0,0 ± 0,0	4,0 ± 1,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,0	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,3
Germacren D	0,8 ± 0,7	42,8 ± 14,8	1,9 ± 4,3	11,7 ± 14,6	5,1 ± 1,6	22,1 ± 15,1	19,8 ± 5,8	5,3 ± 8,4	3,2 ± 5,9	14,5 ± 11,1
Selina-4,6-dien	0,0 ± 0,0	0,7 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,3	0,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	2,1 ± 1,6
Guaia-6,9-dien	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,4	0,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,9
RI 1391	34,7 ± 2,5	0,9 ± 1,3	0,0 ± 0,0	4,1 ± 3,4	15,6 ± 6,0	0,0 ± 0,0	2,3 ± 2,2	17,8 ± 13,9	0,0 ± 0,0	4,0 ± 2,1
α-Copaen	5,8 ± 1,5	2,6 ± 2,2	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	3,8 ± 1,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 1,3	2,2 ± 4,7	0,4 ± 0,7
α-Ylangen	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 1,2	3,1 ± 2,9	1,9 ± 3,8	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,7
<i>Epi</i> -Zonaren	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 1,4	0,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
β-Bourbonen	0,0 ± 0,0	1,7 ± 2,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,7 ± 3,3	7,8 ± 9,5	2,1 ± 3,7	0,1 ± 0,3	4,3 ± 4,3
(<i>E,E</i>)-Methylfarnesoat	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
(<i>E,Z</i>)-α-Farnesen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,8	1,6 ± 1,4	0,0 ± 0,0	1,2 ± 2,1	0,3 ± 0,8	1,5 ± 1,3	1,5 ± 2,1	4,7 ± 1,3

Tabelle A 9: Sesquiterpenprofile und Standardabweichung, Reife

	Cabernet Sauvignon n = 12	Vitis labrusca n = 2	Lemberger n = 20	Muska- teller n = 10	Riesling n = 11	Silvaner n = 6	Spät- burgunder n = 11	Syrah n = 8	Gewürz- traminer n = 35	Siegerrebe n=13
Cadalen	0,6 ± 0,5	1,0 ± 0,6	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
γ-Calacoren	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
β-Calacoren	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4
α-Calacoren	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
δ-Elementen	0,7 ± 0,8	7,2 ± 0,8	1,2 ± 0,7	3,0 ± 2,3	1,4 ± 0,8	7,4 ± 1,9	2,8 ± 1,7	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,4	1,9 ± 1,2
Cubenol	0,1 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3
δ-Cadinen	2,6 ± 4,7	3,8 ± 0,9	1,3 ± 0,6	2,2 ± 2,5	1,9 ± 1,0	1,5 ± 1,4	0,9 ± 0,7	1,4 ± 1,3	1,2 ± 1,4	1,9 ± 2,1
γ-Cadinen	0,7 ± 1,3	4,7 ± 2,2	19,9 ± 6,3	9,5 ± 4,6	22,1 ± 6,0	1,9 ± 1,0	15,3 ± 7,6	21,4 ± 9,0	1,9 ± 2,0	5,0 ± 2,6
α-Cubeben	5,0 ± 3,0	0,6 ± 0,9	0,2 ± 0,2	1,7 ± 1,7	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,9	0,2 ± 0,2	1,9 ± 2,6	1,0 ± 1,2	0,5 ± 0,6
(E,E)-α-Farnesen	2,2 ± 5,5	0,0 ± 0,0	1,3 ± 3,4	15,9 ± 13,2	1,6 ± 2,1	2,7 ± 1,7	0,7 ± 0,9	3,6 ± 3,2	50,5 ± 8,1	32,1 ± 15,4
α-Humulen	29,1 ± 5,7	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,9	8,6 ± 3,8	4,8 ± 2,4	16,3 ± 4,3	26,5 ± 15,2	11,5 ± 6,2	1,6 ± 1,5	7,3 ± 5,0
RI 1533	0,1 ± 0,2	0,9 ± 1,3	3,1 ± 1,1	0,8 ± 0,8	2,6 ± 0,7	0,9 ± 0,5	1,4 ± 0,8	2,3 ± 1,2	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,5
(E)-β-Caryophyllen	11,2 ± 2,7	0,4 ± 0,6	0,2 ± 0,2	1,6 ± 0,9	0,8 ± 0,6	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,4	2,7 ± 3,5	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Calamenen	4,2 ± 2,5	2,6 ± 1,0	2,3 ± 0,9	2,2 ± 1,6	2,3 ± 0,9	1,5 ± 1,3	2,2 ± 1,6	2,9 ± 2,1	0,7 ± 0,6	1,3 ± 0,8
γ-Elementen	0,0 ± 0,0	2,1 ± 2,9	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,6	1,3 ± 0,6	2,8 ± 1,6	1,0 ± 0,9	0,5 ± 0,4	0,1 ± 0,2	1,0 ± 0,8
Germacren D	6,2 ± 4,8	65,7 ± 1,6	23,7 ± 9,3	30,3 ± 9,7	24,8 ± 8,9	37,5 ± 10,4	17,5 ± 9,6	13,5 ± 9,4	3,2 ± 3,3	13,2 ± 7,6
Selina-4,6-dien	0,0 ± 0,0	0,9 ± 1,2	3,9 ± 0,7	0,7 ± 0,9	3,1 ± 0,7	1,5 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,5 ± 1,1	0,7 ± 0,3	1,5 ± 0,6
Guaia-6,9-dien	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,5	4,6 ± 1,1	0,8 ± 1,1	3,2 ± 0,7	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,7	2,3 ± 1,1	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,8
RI 1391	25,9 ± 12,1	0,9 ± 1,3	1,2 ± 0,5	0,1 ± 0,4	0,9 ± 1,5	2,3 ± 0,4	1,8 ± 0,5	8,9 ± 13,2	0,2 ± 0,3	1,0 ± 0,6
α-Copaen	6,6 ± 4,0	6,3 ± 5,3	0,3 ± 0,3	2,3 ± 3,3	0,8 ± 0,6	1,1 ± 1,2	0,5 ± 0,4	1,4 ± 1,8	1,5 ± 1,8	0,9 ± 1,1
α-Ylangen	2,0 ± 2,0	0,4 ± 0,6	18,9 ± 6,7	4,5 ± 2,2	11,8 ± 5,8	3,5 ± 1,0	8,3 ± 6,1	10,7 ± 3,8	1,1 ± 1,0	2,8 ± 1,6
Epi-Zonaren	0,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	6,9 ± 3,2	3,0 ± 1,2	7,5 ± 2,9	0,4 ± 0,4	4,6 ± 2,3	6,3 ± 2,3	0,7 ± 0,8	2,3 ± 1,5
β-Bourbonen	2,2 ± 3,2	1,0 ± 1,4	7,8 ± 4,9	8,5 ± 4,8	7,0 ± 4,5	14,5 ± 5,3	9,6 ± 5,5	4,0 ± 1,9	0,9 ± 1,0	6,7 ± 5,1
(E,E)-Methylfarnesoat	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,7 ± 6,5	0,2 ± 0,2
(E,Z)-α-Farnesen	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,3 ± 5,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	29,1 ± 5,1	16,6 ± 7,6

Tabelle A 10: Signifikante Unterschiede im Sesquiterpenprofil der Rebsorten Lemberger, Riesling, Spätburgunder und Syrah

Sesquiterpen	Lemberger	Riesling	Spätburgunder	Syrah
β -Bourbonen	ab	ab	a	b
<i>epi</i> -Zonaren	a	a	b	ab
α -Ylangen	a	b	b	b
Guaia-6,9-dien	a	b	c	bc
Selina-4,6-dien	a	b	c	b
Germacren D	a	a	ab	b
γ -Elemen	a	b	ab	ab
Caryophyllen	a	ab	b	b
RI 1533	a	a	b	a
α -Humulen	a	ac	b	c
γ -Cadinen	ab	a	b	a
δ -Elemen	a	a	b	a

Tabelle A 11: Korrelationen diverser Sesquiterpene

Korrelierende Sesquiterpene		Rebsorte	Termin	R ²	Steigung
Guaia-6,9-dien	RI 1533	alle	alle	0,9537	0,9242
Copaen	α -Cubeben	alle	Reife	0,9052	0,7943
<i>Epi</i> -Zonaren	γ -Cadinen	alle	alle	0,9576	2,5271
<i>Epi</i> -Zonaren	α -Ylangen	alle	alle	0,9052	1,1032
α -Ylangen	γ -Cadinen	alle	alle	0,9534	2,1858
Germacren D	δ -Elemen	alle, außer: Gewürztraminer, Syrah, Lemberger	Reife	0,9744	0,2118
Germacren D	δ -Elemen	Gewürztraminer, Syrah, Lemberger	Reife	0,9191	0,0929
δ -Cadinen	β -Calacoren	alle, außer: Gewürztraminer, Silvaner, Siegerrebe	Reife	0,9575	0,7342
α -Ylangen	Calamenen	Gewürztraminer, Siegerrebe	Reife	0,9603	0,2554
α -Ylangen	Calamenen	Spätburgunder	Reife	0,9802	0,4023
Guaia-6,9-dien	Germacren D	Riesling, Syrah	Reife	0,9097	5,6346
Guaia-6,9-dien	γ -Elemen	Gewürztraminer, Siegerrebe	Reife	0,9311	0,8018

Tabelle A 12: Sesquiterpenprofil der Blüten verschiedener Rebsorten. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Messungen der Blütenknospen (13.06.2013, Bonn) und der geöffneten Blüten (02.07.2013, Bonn und 16.06.2010, Geisenheim). Angegeben sind die prozentualen Anteile (ermittelt nach der 100%-Methode über den TIC) sowie die Standardabweichungen. Die Buchstaben geben die signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Rebsorten innerhalb eines Termins an. Mit *) bezeichnete prozentuale Anteile unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Probenahmeterminen 13.06.2013 und 02.07.2013.

Termin	Sesquiterpen	Lemberger	Spätburgunder	Syrah	Gewürztraminer
13.06.2013 (n=3)	β -Elemen	3,1 \pm 0,3 ab	3,1 \pm 1,2 ab	1,3 \pm 1,5 a	3,4 \pm 0,5 b
	(E)- β -Caryophyllen	6,0 \pm 2,1 a	27,6 \pm 1,7 b	12,4 \pm 5,9 c	5,3 \pm 1,6 a
	β -Farnesen	6,7 \pm 0,5 a	15,4 \pm 4,4 b	0,8 \pm 0,4 c	5,7 \pm 1,2 a
	α -Humulen	3,2 \pm 1,0 ab	4,4 \pm 1,3 ab	6,6 \pm 3,2 a	2,6 \pm 0,5 b
	Germacren D	5,8 \pm 4,4 a	13,6 \pm 9,1 ab	20,5 \pm 8,8 b	11,7 \pm 5,0 ab
	Valencen	27,1 \pm 5,2 a	0,0 \pm 0,0 b	4,6 \pm 4,0 b	23,1 \pm 4,8 a
	(E,E)- α -Farnesen	30,1 \pm 3,7 a	32,2 \pm 9,1 a	49,3 \pm 8,0 b	32,9 \pm 0,6 a
	7- <i>epi</i> - α -Selinen	16,8 \pm 3,6 a	0,4 \pm 0,2 b	2,6 \pm 2,2 b	13,2 \pm 3,0 a
	Nerolidol	0,8 \pm 0,6 a	2,8 \pm 1,1 a	1,9 \pm 0,8 a	1,9 \pm 1,7 a
	RI 1597	0,5 \pm 0,1 a	0,4 \pm 0,2 a	0,1 \pm 0,2 b	0,3 \pm 0,0 ab
02.07.2013 (n=3)	β -Elemen	2,2 \pm 0,6 a	0,7 \pm 0,3 b*	2,0 \pm 0,2 a	2,1 \pm 0,5 a*
	(E)- β -Caryophyllen	5,8 \pm 0,8 a	5,0 \pm 0,8 a*	15,1 \pm 2,0 b	5,7 \pm 3,1 a
	β -Farnesen	6,8 \pm 0,3 a	15,6 \pm 0,9 b	6,1 \pm 0,8 a*	9,4 \pm 2,5 c
	α -Humulen	1,4 \pm 0,1 a*	0,9 \pm 0,2 a*	2,7 \pm 0,1 b	1,2 \pm 0,5 a*
	Germacren D	1,1 \pm 0,3 a	0,9 \pm 0,5 a	0,5 \pm 0,1 a*	0,9 \pm 0,3 a*
	Valencen	18,9 \pm 2,9 a	0,0 \pm 0,0 b	17,7 \pm 5,4 a*	16,7 \pm 6,1 a
	(E,E)- α -Farnesen	47,2 \pm 3,7 a*	73,7 \pm 1,8 b*	41,6 \pm 6,2 a	50,2 \pm 6,9 a*
	7- <i>epi</i> - α -Selinen	14,3 \pm 1,4 a	0,3 \pm 0,3 b	12,7 \pm 3,2 a*	12,1 \pm 5,4 a
	Nerolidol	0,7 \pm 0,2 a	1,2 \pm 0,4 b	0,5 \pm 0,1 a*	0,6 \pm 0,1 a
	RI 1597	1,5 \pm 0,1 a*	1,6 \pm 0,5 a*	1,2 \pm 0,1 a*	1,1 \pm 0,9 a
16.06.2010 (n=1)	β -Elemen	1,3	1,3	1,7	1,3
	(E)- β -Caryophyllen	4,3	20,8	5,4	6,2
	β -Farnesen	9,9	21,6	2,4	9,4
	α -Humulen	1,0	1,8	2,0	1,7
	Germacren D	0,4	0,2	0,6	0,4
	Valencen	18,9	0,0	40,5	15,7
	(E,E)- α -Farnesen	50,7	53,7	19,0	55,9
	7- <i>epi</i> - α -Selinen	12,3	0,0	28,4	8,7
	Nerolidol	0,9	0,4	0,0	0,4
	RI 1597	0,2	0,2	0,0	0,2

Tabelle A 13: Charakteristische Fragmente genuiner und deuteriummarkierter Terpene in Gewürztraminern nach Applikation von d₂-DOX und d₂-MVL

Verbindung	Molekülion genuin/markiert	Ionenspur für Auswertung genuin/markiert	Markierungsgrad
<i>Monoterpene</i>			
Methylgeranat	n.n.	69/71	2
Geraniol	n.n.	69/71	4
<i>Sesquiterpene</i>			
α -Cubeben	204/209	161/166	5
α -Ylangen	204/210	161/167	6
α -Copaen	n.n.	161/166	5
Germacren D	204/210	161/167	6
γ -Cadinen	204/210	161/167	6
Humulen	204/209	147/151+152	5
β -Farnesen	204/210	161/166+167	6
(<i>E,Z</i>)- α -Farnesen	204/210	161/166+167	6
(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	204/210	161/166+167	6
Cubebol	n.n.	207/212	6
RI 1597	204/210	135/139 ^a	6

Tabelle A 14: Ionenspuren zur Berechnung des Deuteriumeinbaus nach Applikation von d₂-DOX und Methyljasmonat, Abschnitt 4.4

Verbindung	Quantifier		Deuteriumeinbau (x)
	genuine (d ₀)	markiert (d _x)	
(<i>E</i>)-β-Ocimen	136	140	d ₄
Linalool	121	124 ^a	d ₄
DMNT	69	71	d ₂ /d ₃ ^b
Cosmen	134	137	d ₃
Germacren D	161	163/165/167	d ₂ /d ₄ /d ₆
Nerolidol	161	163	d ₂
(<i>E,E</i>)-α-Farnesen	93 ^c	-	-
Indol	117 ^d	-	-

a) Verlust eines Deuteriums durch Fragmentierung

b) Über die gewählten Ionenspuren kann der genaue Markierungsgrad nicht bestimmt werden

c) Es wurde kein Deuteriumeinbau für (*E,E*)-α-Farnesen aufgrund der unspezifischen Fragmentationen berechnet

d) kein Isoprenoid

Literaturverzeichnis

- 1 Ferreira, V.;Cacho, J. Identification of Impact Odorants of Wines. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (Eds.); Springer New York: New York, **2009**.
- 2 Dunlevy, J. D.;Kalua, C. M.;Keyzers, R. A.;Boss, P. K. The Production of Flavour & Aroma Compounds in Grape Berries. In: *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Roubelakis-Angelakis, K. A. (Ed.); Springer Netherlands: Dordrecht, **2009**.
- 3 Rapp, A. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, **1998**, 42 (6), 351–363.
- 4 Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (10), 3738–3744.
- 5 Parker, M.; Pollnitz, A. P.; Cozzolino, D.; Francis, I. L.; Herderich, M. J. Identification and Quantification of a Marker Compound for 'Pepper' Aroma and Flavor in Shiraz Grape Berries by Combination of Chemometrics and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55 (15), 5948–5955.
- 6 Ishihara, M.; Tsuneya, T.; Uneyama, K. Guaiane sesquiterpenes from agarwood. *Phytochemistry*, **1991**, 30 (10), 3343–3347.
- 7 Kapadia, V. H.; Naik, V. G.; Wadia, M. S.; Dev, S. Sesquiterpenoids from the essential oil of cyperus rotundus. *Tetrahedron Letters*, **1967**, 8 (47), 4661–4667.
- 8 Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P. Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (10), 3745–3748.
- 9 Mattivi, F.; Caputi, L.; Carlin, S.; Lanza, T.; Minozzi, M.; Nanni, D.; Valenti, L.; Vrhovsek, U. Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25 (4), 483–488.
- 10 Caputi, L.; Carlin, S.; Ghiglieno, I.; Stefanini, M.; Valenti, L.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. Relationship of Changes in Rotundone Content during Grape Ripening and Winemaking to Manipulation of the 'Peppery' Character of Wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59 (10), 5565–5571.
- 11 Capone, D. L.; Jeffery, D. W.; Sefton, M. A. Vineyard and fermentation studies to elucidate the origin of 1,8-cineole in Australian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60 (9), 2281–2287.
- 12 Huang, A.-C.; Burrett, S.; Sefton, M. A.; Taylor, D. K. Production of the Pepper Aroma Compound, (–)-Rotundone, by Aerial Oxidation of α -Guaiene. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62 (44), 10809–10815.
- 13 Breitmaier, E. *Terpene. Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- 14 Lichtenthaler, H. K. The Non-mevalonate DOXP/MEP (Deoxyxylulose 5-Phosphate/Methylerythritol 4-Phosphate) Pathway of Chloroplast Isoprenoid and Pigment

- Biosynthesis. In: *The Chloroplast. Basics and Applications*. Rebeiz, C. A., Benning, C., Daniell, H., Hooper, J. K., Lichtenthaler, H. K., Portis, A. R., Tripathy, B. C. (Eds.); Springer Netherlands: Dordrecht, **2010**.
- 15 Phillips, M.; Leon, P.; Boronat, A.; Rodriguezconcepcion, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, **2008**, *13* (12), 619–623.
 - 16 Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahn, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*, **1993**, *295* (Pt 2), 517–524.
 - 17 Schwender, J.; Seemann, M.; Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.*, **1996**, *316* (Pt 1), 73–80.
 - 18 Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*, **1997**, *400* (3), 271–274.
 - 19 Bick, J. A.; Lange, B. M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, *415* (2), 146–154.
 - 20 Hampel, D.; Mosandl, A.; Wüst, M. Induction of de Novo Volatile Terpene Biosynthesis via Cytosolic and Plastidial Pathways by Methyl Jasmonate in Foliage of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53* (7), 2652–2657.
 - 21 Luan, F.; Wüst, M. Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry*, **2002**, *60* (5), 451–459.
 - 22 Bartram, S.; Jux, A.; Gleixner, G.; Boland, W. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, **2006**, *67* (15), 1661–1672.
 - 23 Hampel, D.; Mosandl, A.; Wüst, M. Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry*, **2005**, *66* (3), 305–311.
 - 24 Opitz, S.; Nes, W. D.; Gershenzon, J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. *Phytochemistry*, **2014**, *98*, 110–119.
 - 25 Davis, E.; Croteau, R. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. In *Biosynthesis*. Leeper, F., Vederas, J., Eds.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg, **2000**; pp 53-95.
 - 26 Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273* (4), 2078–2089.
 - 27 Bülow, N.; König, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*, **2000**, *55* (2), 141–168.
 - 28 Yoshihara, K.; Ohta, Y.; Sakai, T.; Hirose, Y. Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes. *Tetrahedron Letters*, **1969**, *10* (27), 2263–2264.

- 29 Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Trauben. *Z Lebensm Unters Forsch*, **1976**, *160*, 271–274.
- 30 Todorova, I. T.; Batovska, D. I.; Parushev, S. P.; Djakova, G. J.; Popov, S. S. Surface metabolic composition of berries collected from 13 Bulgarian grapevine plants. *Nat Prod Res*, **2010**, *24* (10), 935–941.
- 31 Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. "Baga" ripening. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, *563*, 204–214.
- 32 Kalua, C. M.; Boss, P. K. Evolution of volatile compounds during the development of cabernet sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem*, **2009**, *57* (9), 3818–3830.
- 33 Kalua, C. M.; Boss, P. K. Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2010**, *16* (2), 337–348.
- 34 Alves, R. F.; Nascimento, A. M. D.; Nogueira, J. M. F. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, *546* (1), 11–21.
- 35 Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Heymann, H.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D. Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **2011**, *1218* (3), 504–517.
- 36 Weldegergis, B. T.; Crouch, A. M.; Górecki, T.; Villiers, A. de. Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, *701* (1), 98–111.
- 37 Versini, G.; Rapp, A.; Dalla Serra, A.; Pichler, U.; Ramponi, M. Methyl trans geranate and farnesoate as markers for Gewürztraminer grape skins and related distillates. *Vitis*, **1994**, *33* (3), 139–142.
- 38 Lukić, I.; Miličević, B.; Banović, M.; Tomas, S.; Radeka, S.; Peršurić, Đ. Characterization and Differentiation of Monovarietal Grape Marc Distillates on the Basis of Varietal Aroma Compound Composition. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58* (12), 7351–7360.
- 39 López-Vázquez, C.; Bollaín, M. H.; Moser, S.; Orriols, I. Characterization and Differentiation of Monovarietal Grape Pomace Distillate from Native Varieties of Galicia. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58* (17), 9657–9665.
- 40 Huang, M.; Sanchez-Moreiras, A. M.; Abel, C.; Sohrabi, R.; Lee, S.; Gershenzon, J.; Tholl, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*, **2012**, *193* (4), 997–1008.
- 41 Buchbauer, G.; Jirovetz, L.; Wasicky, M.; Herlitschka, A.; Nikiforov, A. Aroma von Weißweinblüten: Korrelation sensorischer Daten mit Headspace-Inhaltsstoffen. *Z Lebensm Unters Forsch*, **1994**, *199*, 1–4.
- 42 Buchbauer, G.; Jirovetz, L.; Wasicky, M.; Herlitschka, A.; Nikiforov, A. Aroma von Rotweinblüten: Korrelation sensorischer Daten mit Headspace-Inhaltsstoffen. *Z Lebensm Unters Forsch*, **1995**, *200*, 443–446.

- 43 Lücker, J.; Bowen, P.; Bohlmann, J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*, **2004**, *65* (19), 2649–2659.
- 44 Martin, D. M.; Aubourg, S.; Schouwey, M. B.; Daviet, L.; Schalk, M.; Toub, O.; Lund, S. T.; Bohlmann, J. Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays. *BMC Plant Biology*, **2010**, *10*, 226.
- 45 Matarese, F.; Scalabrelli, G.; D'Onofrio, C. Analysis of the expression of terpene synthase genes in relation to aroma content in two aromatic *Vitis vinifera* varieties. *Functional Plant Biol.*, **2013**, *40* (6), 552–565.
- 46 Martin, D. M.; Chiang, A.; Lund, S. T.; Bohlmann, J. Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewürztraminer grapes. *Planta*, **2012**, *236* (3), 919–929.
- 47 Onofrio, C. D.; Cox, A.; Davies, C.; Boss, P. K. Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Funct. Plant Biol.*, **2009**, *36* (4), 323–338.
- 48 Pawliszyn, J. *Handbook of solid phase microextraction*; Elsevier: Chennai, Oxford, **2011**.
- 49 Bicchi, C.; Ruosi, M. R.; Cagliero, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B. Quantitative analysis of volatiles from solid matrices of vegetable origin by high concentration capacity headspace techniques: Determination of furan in roasted coffee. *Journal of Chromatography A*, **2011**, *1218* (6), 753–762.
- 50 Versini, G.; Rapp, A.; Volkmann, C.; Scienza, A. Flavour compounds of clones from different grape varieties. *Vitis*, **1990**, *Special issue*, 513–524.
- 51 Bergner, K.-G.; Lemperle, E. *Weinkompodium. Botanik, Sorten, Anbau, Bereitung*, 3. Auflage; Hirzel: Stuttgart, **2001**.
- 52 Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4. Auflage; Allured Business Media: Carol Stream, Illinois, **2007**.
- 53 Vichi, S.; Lazzez, A.; Kamoun, N. G.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Evolution of Sesquiterpene Hydrocarbons in Virgin Olive Oil during Fruit Ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58* (11), 6972–6976.
- 54 Koch, T.; Krumm, T.; Jung, V.; Engelberth, J.; Boland, W. Differential Induction of Plant Volatile Biosynthesis in the Lima Bean by Early and Late Intermediates of the Octadecanoid-Signaling Pathway. *Plant Physiology*, **1999**, *121* (1), 153–162.
- 55 Thiele, T.; Kost, C.; Roces, F.; Wirth, R. Foraging Leaf-Cutting Ants Learn to Reject *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* Plants that Emit Herbivore-Induced Volatiles. *J Chem Ecol*, **2014**, *40* (6), 617–620.
- 56 Linskens, H.-F., Jackson, J. F., Adams, R. P. Essential oils and waxes. In: *Modern methods of plant analysis*. Linskens, H.-F., Jackson, J. F., Adams, R. P. (Eds.); Springer: Berlin, **1991**.
- 57 Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Röse, U. S.; Schnitzler, J.-P. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, **2006**, *45* (4), 540–560.

- 58 Matucha, M.; Jockisch, W.; Verner, P.; Anders, G. Isotope effect in gas-liquid chromatography of labelled compounds. *J Chromatogr A*, **1991**, 588, 251–258.
- 59 Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95 (8), 4126–4133.
- 60 Stranden, M.; Borg-Karlson, A.; Mustaparta, H. Receptor neuron discrimination of the germacrene D enantiomers in the moth *Helicoverpa armigera*. *Chem Senses*, **2002**, 27 (2), 143–152.
- 61 Cha, D. H.; Linn, C. E.; Teal, Peter E. A.; Zhang, A.; Roelofs, W. L.; Loeb, G. M.; Marion-Poll, F. Eavesdropping on Plant Volatiles by a Specialist Moth: Significance of Ratio and Concentration. *PLoS ONE*, **2011**, 6 (2), e17033.
- 62 Schmidt, C. O.; Bouwmeester, H. J.; Franke, S.; König, W. A. Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. *Chirality*, **1999**, 11 (5-6), 353–362.
- 63 Steliopoulos, P.; Wüst, M.; Adam, K.-P.; Mosandl, A. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ¹³C and (2)H labeling studies. *Phytochemistry*, **2002**, 60 (1), 13–20.
- 64 König, W. A.; Bülow, N.; Fricke, C.; Melching, S.; Rieck, A.; Muhle, H. The sesquiterpene constituents of the liverwort *Preissia quadrata*. *Phytochemistry*, **1996**, 43 (3), 629–633.
- 65 Peñuelas, J.; Farré-Armengol, G.; Llusia, J.; Gargallo-Garriga, A.; Rico, L.; Sardans, J.; Terradas, J.; Filella, I. Removal of floral microbiota reduces floral terpene emissions. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 6727.
- 66 Duffey, S. S.; Stout, M. J. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **1996**, 32 (1), 3–37.
- 67 Chen, H.; Wilkerson, C. G.; Kuchar, J. A.; Phinney, B. S.; Howe, G. A. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, 102 (52), 19237–19242.
- 68 Baker, C. J.; Orlandi, E. W. Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1995**, 33, 299–321.
- 69 van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2006**, 44, 135–162.
- 70 Morel, J. B.; Dangl, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ*, **1997**, 4 (8), 671–683.
- 71 Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, a. J. P. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1997**, 35, 235–270.
- 72 Schulze, B.; Kost, C.; Arimura, G.-I.; Boland, W. Duftstoffe: Die Sprache der Pflanzen. Signalrezeption, Biosynthese und Ökologie. *Chemie in unserer Zeit*, **2006**, 40 (6), 366–377.
- 73 Beckers, G. J. M.; Spoel, S. H. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biology*, **2006**, 8 (1), 1–10.
- 74 Shoji, T.; Nakajima, K.; Hashimoto, T. Ethylene Suppresses Jasmonate-Induced Gene Expression in Nicotine Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **2000**, 41 (9), 1072–1076.

- 75 Thomma, B. P.; Penninckx, I. A.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol.*, **2001**, *13* (1), 63–68.
- 76 Leitner, M.; Boland, W.; Mithöfer, A. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol.*, **2005**, *167* (2), 597–606.
- 77 Mattiacci, L.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1995**, *92* (6), 2036–2040.
- 78 Hopke, J.; Donath, J.; Blechert, S.; Boland, W. Herbivore-induced volatiles: The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters*, **1994**, *352* (2), 146–150.
- 79 Svoboda, J.; Boland, W. Plant defense elicitors: Analogues of jasmonoyl-isoleucine conjugate. *Phytochemistry*, **2010**, *71* (13), 1445–1449.
- 80 Martin, D. M.; Gershenzon, J.; Bohlmann, J. Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology*, **2003**, *132* (3), 1586–1599.
- 81 Hilker, M.; Kobs, C.; Varama, M.; Schrank, K. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *J Exp Biol*, **2002**, *205* (Pt 4), 455–461.
- 82 Vandermoten, S.; Mescher, M. C.; Francis, F.; Haubruge, E.; Verheggen, F. J. Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **2012**, *42* (3), 155–163.
- 83 Beale, M. H.; Birkett, M. A.; Bruce, T. J. A.; Chamberlain, K.; Field, L. M.; Huttly, A. K.; Martin, J. L.; Parker, R.; Phillips, A. L.; Pickett, J. A.; Prosser, I. M.; Shewry, P. R.; Smart, L. E.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M.; Zhang, Y. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**, *103* (27), 10509–10513.
- 84 Harmel, N.; Almohamad, R.; Fauconnier, M.-L.; du Jardin, P.; Verheggen, F.; Marlier, M.; Haubruge, E.; Francis, F. Role of terpenes from aphid-infested potato on searching and oviposition behavior of *Episyrphus balteatus*. *Insect Science*, **2007**, *14* (1), 57–63.
- 85 Al Abassi, S.; Birkett, M. A.; Pettersson, J.; Pickett, J. A.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. Response of the Seven-spot Ladybird to an Aphid Alarm Pheromone and an Alarm Pheromone Inhibitor is Mediated by Paired Olfactory Cells. *J Chem Ecol*, **2000**, *26* (7), 1765–1771.
- 86 Aharoni, A. Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants. *The Plant Cell Online*, **2003**, *15* (12), 2866–2884.
- 87 Escoriza, G.; Sansberro, P.; García-Lampasona, S.; Gatica, M.; Bottini, R.; Piccoli, P. In vitro cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay synthesize the phytoalexin nerolidol upon infection by *Phaeoacremonium parasiticum*. *Phytopathologia Mediterranea*, **2013**, *52* (2), 289–297.
- 88 Loake, G.; Grant, M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, **2007**, *10* (5), 466–472.
- 89 Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K. H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **1996**, *8* (4), 629–643.

- 90 Dicke, M.; van Loon, J. J. A.; Soler, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Biol*, **2009**, *5* (5), 317–324.
- 91 Suckling, D. M.; Twidle, A. M.; Gibb, A. R.; Manning, L. M.; Mitchell, V. J.; Sullivan, T. E. S.; Wee, S. L.; El-Sayed, A. M. Volatiles from Apple Trees Infested with Light Brown Apple Moth Larvae Attract the Parasitoid *Dolichogenidia tasmanica*. *J Agric Food Chem*, **2012**, *60* (38), 9562–9566.
- 92 Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Bézier, A.; Lambert, B.; Joubert, J.-M.; Pugin, A. Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2003**, *16* (12), 1118–1128.
- 93 Iriti, M.; Rossoni, M.; Borgo, M.; Faoro, F. Benzothiadiazole Enhances Resveratrol and Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine, Meanwhile Improving Resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52* (14), 4406–4413.
- 94 Iriti, M.; Rossoni, M.; Borgo, M.; Ferrara, L.; Faoro, F. Induction of Resistance to Gray Mold with Benzothiadiazole Modifies Amino Acid Profile and Increases Proanthocyanidins in Grape: Primary versus Secondary Metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53* (23), 9133–9139.
- 95 Loughrin, J. H.; Potter, D. A.; Hamilton-Kemp, T. R.; Byers, M. E. Diurnal emission of volatile compounds by Japanese beetle-damaged grape leaves. *Phytochemistry*, **1997**, *45* (5), 919–923.
- 96 Lawo, N. C.; Weingart, G. J. F.; Schuhmacher, R.; Forneck, A. The volatile metabolome of grapevine roots: First insights into the metabolic response upon phylloxera attack. *Plant Physiol Biochem*, **2011**, *49* (9), 1059–1063.
- 97 Belhadj, A.; Saigne, C.; Telef, N.; Cluzet, S.; Bouscaut, J.; Corio-Costet, M.-F.; Mérillon, J.-M. Methyl Jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against *Erysiphe necator*. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54* (24), 9119–9125.
- 98 Buta, J. G.; Moline, H. E. Methyl Jasmonate Extends Shelf Life and Reduces Microbial Contamination of Fresh-Cut Celery and Peppers. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46* (4), 1253–1256.
- 99 Gómez-Plaza, E.; Mestre-Ortuño, L.; Ruiz-García, Y.; Fernández-Fernández, J. I.; López-Roca, J. M. Effect of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on the Volatile Compound Composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell Grapes and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2012**, *63* (3), 394–401.
- 100 Kondo, S.; Fukuda, K. Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Scientia Horticulturae*, **2001**, *91* (3-4), 275–288.
- 101 Lee, S.; Badieyan, S.; Bevan, D. R.; Herde, M.; Gatz, C.; Tholl, D. Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2010**, *107* (49), 21205–21210.
- 102 Tian, J.; Zeng, X.; Zhang, S.; Wang, Y.; Zhang, P.; Lü, A.; Peng, X. Regional variation in components and antioxidant and antifungal activities of *Perilla frutescens* essential oils in China. *Industrial Crops and Products*, **2014**, *59*, 69–79.
- 103 Quaglia, M.; Fabrizi, M.; Zizzerini, A.; Zadra, C. Role of pathogen-induced volatiles in the *Nicotiana tabacum*–*Golovinomyces cichoracearum* interaction. *Plant Physiol Biochem*, **2012**, *52*, 9–20.

- 104 Frey, M.; Stettner, C.; Pare, P. W.; Schmelz, E. A.; Tumlinson, J. H.; Gierl, A. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, *97* (26), 14801–14806.
- 105 Karban, R.; Baldwin, I. T.; Baxter, K. J.; Laue, G.; Felton, G. W. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia*, **2000**, *125* (1), 66–71.
- 106 Matsuura, H.; Takeishi, S.; Kiatoka, N.; Sato, C.; Sueda, K.; Masuta, C.; Nabeta, K. Transportation of de novo synthesized jasmonoyl isoleucine in tomato. *Phytochemistry*, **2012**, *83*, 25–33.
- 107 Glauser, G.; Grata, E.; Dubugnon, L.; Rudaz, S.; Farmer, E. E.; Wolfender, J.-L. Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in Arabidopsis in Response to Wounding. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283* (24), 16400–16407.
- 108 Meyer, O.; Hoeffler, J.-F.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Practical synthesis of 1-deoxy-d-xylulose and 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate allowing deuterium labelling. *Tetrahedron*, **2004**, *60* (52), 12153–12162.
- 109 Simpson, T. J.; Ahmed, S. A.; Rupert McIntyre, C.; Scott, F. E.; Sadler, I. H. Biosynthesis of polyketide-terpenoid (meroterpenoid) metabolites andibenin B and andilesin A in *Aspergillus varicolor*. *Tetrahedron*, **1997**, *53* (11), 4013–4034.

Danksagung

In diesem Rahmen möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Matthias Wüst, für die Überlassung des Themas danken sowie für das mir entgegen gebrachte Vertrauen, dass ich dieses Thema weitgehend frei gestalten durfte. Ich danke ihm vor allem, dass er jederzeit bei wissenschaftlichen Fragestellungen behilflich war und durch sein eigenes Engagement mich selbst in meiner Arbeit motivierte und bestärkte.

Ebenso danke ich dem Institut für Rebenzüchtung und Rebenveredlung (Hochschule Geisenheim) und dem Institut für Nutzpflanzenkunde und Ressourcenschutz (INRES), Abteilung Gartenbauwissenschaft (Universität Bonn), für die Bereitstellung der Rebstöcke. Hierbei danke ich insbesondere den Mitarbeitern der Institute für die Pflege der Reben.

Ich möchte mich auch bei Dr. Stefan Kehraus vom Institut für Pharmazeutische Biologie (Universität Bonn) für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Bernd Markus Lange (Washington State University) möchte ich hinsichtlich der wertvollen Anregungen zu biosynthetischen Aspekten meinen Dank aussprechen sowie Herrn Dr. Hans-Georg Schmarr (DLR Rheinland) für die Ermöglichung der GC×GC-qMS-Messungen und die interessanten Einblicke in analytische Möglichkeiten.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Abteilungen Bioanalytik und Lebensmittelchemie, dass ich in beiden Arbeitskreisen so herzlich aufgenommen wurde und dass ich von ihnen immer Unterstützung in den mir übertragenen Aufgaben fand. Insbesondere danke ich Frau Dr. Ursula Wölwer-Rieck, Frau Bauerdick und Andreas Wawrzun. Frau Dr. Ursula Wölwer-Rieck und Frau Bauerdick waren mir stets bei organisatorischen Angelegenheiten behilflich. Andreas Wawrzun danke ich für die Unterstützung bei instrumentell analytischen Problemen und den Synthesen.

Insbesondere danke ich Dr. Jochen Fischer und Dr. Sarah Stanitzek sowie Anne Oehme, Christoph Gerlach, Ines Botscher und Dr. Maike Gleichenhagen. Neben den wertvollen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen werden mir vor allem unser schönes Arbeitsklima und unsere gemeinsame Zeit in Erinnerung bleiben.

Publikationsliste

Beiträge in Zeitschriften mit Fachbegutachtung:

May, B.; Lange, B.M.; Wüst, M.

Biosynthesis of sesquiterpenes in grape berry exocarp of *Vitis vinifera* L.: Evidence for a transport of farnesyl diphosphate precursors from plastids to the cytosol. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 135-144.

May, B.; Wüst, M.

Temporal development of sesquiterpene hydrocarbon profiles of different grape varieties during ripening. *Flav. Fragr. J.* **2012**, *27*, 280-285

Beiträge in Proceedings-Bänden mit Fachbegutachtung:

May, B.; Wüst, M.

Induction of de novo mono- and sesquiterpene biosynthesis by methyl jasmonate in grape berry exocarp. In: *ACS Books: Advances in Wine Research*. American Chemical Society, Washington, DC, *in press*

May, B.; Wüst, M.

Jasmonate induced terpene biosynthesis in grape berries. In: *Current Topics in Flavor Chemistry & Biology*. T. Hofmann, W. Meyerhof, P. Schieberle (Eds.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, **2014**, 333-337

May, B.; Wüst, M.

Demonstration of sesquiterpene biosynthesis in grape berry exocarp by deuterium labelling studies. In: *Flavour Science - Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*. Ferreira, V.; Lopez, R. (Eds.), Academic Press, **2013**, 347-351

May, B.; Wüst, M.

Sesquiterpene profiles of different grape varieties. In: *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*. T. Hofmann, W. Meyerhof, P. Schieberle (Eds.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, **2011**, 323-327

Vorträge:

Jasmonat induzierte Terpenbiosynthese in Weinbeeren, Sitzung der AG Wein (LChG) / Frankfurt am Main, **2014**

Sesquiterpenbiosynthese in Weintrauben – *in vivo* Studien mit stabilisotopenmarkierten Präkursoren, Deutscher Lebensmittelchemikertag / Halle, **2011**

Biosynthesis and analysis of sesquiterpenes in grape berry mesocarp and exocarp, In *Vino Analytica Scientia* / Graz, **2011**

Sonstige Publikationen:

Wölwer-Rieck, U.; May, B.; Lankes, C.; Wüst, M.

Methylerythritol and Mevalonate Pathway Contributions to Biosynthesis of Mono-, Sesqui- and Diterpenes in Glandular Trichomes and Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(11), 2428-35

Pour Nikfardjam, M.; May, B.; Tschiersch, C.

Analysis of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol in wines from the Württemberg region (Germany). *Mitteilungen Klosterneuburg* **2009**, 59, 84-89.

Pour Nikfardjam, M.; May, B.; Tschiersch, C. 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol contents in bottled wines from the German Württemberg region. *European Food Research and Technology*, **2009**, 230(2), 333-341

Kunsági-Máté, S.; May, B.; Tschiersch, C.; Fetzer, D.; Horváth, I.; Kollár, L.; Pour Nikfardjam, M.

Transformation of stacked pi-pi-stabilized malvidin-3-O-glucoside - Catechin complexes towards polymeric structures followed by anisotropy decay study. *Food Research International*, **2011**, 44(1), 23-27