

7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung, 14. bis 17. September 2014, Wien - Innovation entlang der Produktionskette

FSL 26 Regulationsmechanismen der Ausprägung von Chemotypen in Thymian (*Thymus vulgaris*)

Mechanisms of chemotype formation in thyme (Thymus vulgaris)

Jette Schimmel, Sandra Krause, Natalie Arndt und Jörg Degenhardt

Martin-Luther-Universität Halle, Institut für Pharmazie, Hoher Weg 8, 06120 Halle, Deutschland
joerg.degenhardt@pharmazie.uni-halle.de

DOI 10.5073/jka.2014.446.026



Zusammenfassung

Das ätherische Öl von Thymianarten hat aufgrund seiner starken antibakteriellen Wirkung vielfältige Anwendungen in der Pharmazie und der Lebensmittelindustrie. Die wertvollsten antibakteriellen Inhaltsstoffe des ätherischen Öls, die Monoterpenalkohole Carvacrol und Thymol, werden nur in einigen Kultivaren des Thymians gebildet und unterliegen einer komplizierten genetischen Kontrolle. Wir wollen die Regulation der Terpenproduktion in Thymian mit molekularen Methoden aufklären und die Züchtung von Thymianarten mit genau definiertem Terpengehalt ermöglichen.

Stichwörter: Terpensynthese, Monoterpene, Chemotypen, Thymian

Abstract

The essential oil of thyme has a strong antibacterial effect and is utilized in pharmaceutical applications as well as food production. Especially the phenolic monoterpene alcohols thymol and carvacrol are valuable due to their antibacterial, antiseptic and spasmolytical effects. Production of these compounds is subjected to a complex genetic control and found only in some cultivars of thyme. We study the molecular basis of terpene production to elucidate the mechanisms of chemotype formation.

Keywords: Terpene biosynthesis, monoterpenes, chemotypes, thyme

Einleitung

Das ätherische Öl von Thymian (*Thymus vulgaris*) variiert stark innerhalb der Art, wobei eine Anzahl von charakteristischen Ölzusammensetzungen, die sogenannten Chemotypen, wiederholt auftreten. Ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der Chemotypbildung sind sechs Chemotypen des echten Thymians (*Thymus vulgaris*) aus Südfrankreich. Ihr ätherisches Öl ist durch ein dominierendes Monoterpen charakterisiert, das in den jeweils anderen Chemotypen nicht oder nur in Spuren vorkommt. In Kreuzungsversuchen zeigte sich, dass die sechs Chemotypen in einem dominant-rezessiven Verhältnis zueinander stehen und eine epistatische Reihe bilden. Der Geranioltyp (G) ist dominant über alle anderen Chemotypen. Es folgen mit dem α -Terpineoltyp (A), dem *trans*-Sabinenhydrattyp (U) und dem Linalooltyp (L) weitere Chemotypen, die durch ein nicht-phenolisches Hauptmonoterpen charakterisiert sind. Am Ende der epistatischen Reihe stehen mit dem Carvacroltyp (C) und dem Thymoltyp (T) zwei Chemotypen, die phenolische Hauptmonoterpene bilden. Der Thymoltyp als rezessiver Chemotyp entsteht demnach nur bei der Kreuzung zweier T-Typen.

Die letzten Jahrzehnte konventioneller Züchtung von Thymian haben eine deutliche Verbesserung des ätherischen Öls gebracht, aber eine weitere Steigerung des Gehaltes und eine Verbesserung der Qualität der ätherischen Öle sind vermutlich nur durch gerichtete Züchtung mit molekularen Markern möglich. Das Verständnis der molekularen Grundlagen der Terpenbiosynthese hilft, die komplexen Mechanismen der Chemotypbildung zu erklären und liefert molekulare Marker, die in Züchtungsprogrammen eingesetzt werden können und den vorwiegend ländlichen Ölproduktionsstätten in Deutschland, Portugal und anderen Ländern helfen können.

Material und Methoden

Es wurde mit verschiedenen Kultivaren des echten Thymians (*Thymus vulgaris*) gearbeitet, die von John D. Thompson (CNRS Montpellier) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Pflanzen exprimierten jeweils den Geranioltyp (G), α -Terpineoltyp (A), *trans*-Sabinenhydrattyp (U), Linalooltyp (L), Carvacroltyp (C) und Thymoltyp (T). Die Kultivierung der *Thymus vulgaris*-Chemotypen erfolgte im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen: 13 h Tag, Temperatur Tag: 20-22 °C, Temperatur Nacht: 18-20 °C, Luftfeuchte ca. 55 %. Um einen jahreszeitlichen Rhythmus zu gewährleisten, wurde von Dezember bis März eine Winter-Temperatur von ca. 15 °C eingestellt. Zu den molekularbiologischen Methoden zählten die Isolation von genomischer RNA und DNA und der Herstellung von Genbanken. Zur Klonierung und heterologen Expression wurden molekulare Standardverfahren genutzt und die Transkriptmengen von Genen mit quantitativer real time polymerase chain reaction bestimmt.

Ergebnisse

Um Mechanismen zu identifizieren, die zu der Ausprägung der Chemotypen führen, sollten die Enzyme der Terpenbiosynthese identifiziert werden, die für die Produktion der jeweiligen Monoterpene verantwortlich sind. Biochemische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die meisten Monoterpene von Terpensynthasen und Monooxygenasen produziert werden (Polouse und Croteau, 1978, 1978a). Aus den jeweiligen Chemotypen wurden Monoterpensynthasen identifiziert und hinsichtlich ihres Produktspektrums charakterisiert. Die identifizierten Enzyme produzierten die Hauptmonoterpene sowie weitere Bestandteile des ätherischen Öls der jeweiligen Chemotypen. Um die Rolle der Chemotypbildung durch allelischen Polymorphismus zu untersuchen, wurde das Strukturgen der γ -Terpinensynthase TvTPS2 von dem Genom aller Chemotypen isoliert. Alle Chemotypen kodieren mindestens ein enzymatisch aktives Allel TvTPS2, obwohl die Produkte dieses Gens nur in zwei Chemotypen gebildet werden. Allelischer Polymorphismus ist deshalb nicht ausreichend, um die Ausprägung der Chemotypen zu bestimmen. Die katalytischen Eigenschaften der verschiedenen Monoterpensynthasen sind relativ ähnlich, so dass sie nicht zur Bildung der Epistasen beitragen können (Krause et al., 2012). Anschließend wurde die Expression der Terpensynthasen in den verschiedenen Chemotypen untersucht. Die Gene wurden nahezu ausschließlich in den Chemotypen transkribiert, in denen die Enzymprodukte einen hohen Anteil am Gesamtterpengehalt haben. Die differentielle Expression der Terpensynthasen bestimmt daher die Ausprägung eines Chemotyps.

Weitergehend wurde untersucht, welche Mechanismen die Expression der Gene steuert. Ein Fragment des Promotors der γ -Terpinensynthase TvTPS2 wurde aus allen Chemotypen über Genome Walking identifiziert und hinsichtlich ihrer regulatorischen Elemente untersucht. Da in der genomischen Sequenz des Gens und in dessen Promotorregion keine Erklärung für die differentielle Expression in den Chemotypen gefunden werden konnte, sind vermutlich transbindende Faktoren für den Regulationsmechanismus verantwortlich.

Literatur

- CROCOLL, C., ASBACH, J., NOVAK, J., GERSHENZON, J. und J. DEGENHARDT, 2010: Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology* **73**: 587-603.
- DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T.G. und J. GERSHENZON, 2009: Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**: 1621-1637.
- GRANGER, R. und J. PASSET, 1973: *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry* **12**: 1683-1691.
- KRAUSE, S.T., KÖLLNER, T.G., ASBACH, J. und J. DEGENHARDT, 2012: Stereochemical mechanism of two sabinene hydrate synthases forming antipodal monoterpenes in thyme (*Thymus vulgaris*). *Archives of biochemistry and biophysics* **529**: 112-121.
- LIMA, A.S., SCHIMMEL, J., LUKAS, B., NOVAK, J., BARROSO, J.G., FIGUEIREDO, A.C., PEDRO, L.G., DEGENHARDT, J. und H., TRINDADE, 2013: Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). *Planta* **238**: 191-204.
- POULOSE, A. und R. CROTEAU R, 1978a: γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Archives of biochemistry and biophysics* **191**: 400-411.

POULOSE, A. und R. CROTEAU, 1978b: Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. Archives of biochemistry and biophysics **187**: 307-314.

THOMPSON, J.D., MANICACCI, D. und M.L. TARAYRE, 1998: Thirty-five years of thyme: a tale of two polymorphisms. BioScience **48**: 805-815.