

# Phenolische Inhaltsstoffe des Weinrebenblattes

Daniel Baumgartner, Irma Roth und Hans Peter Ruffner, Eidgenössische Forschungsanstalt Wädenswil

*Analysen der in den Blattzellen gelösten sowie der an die Zellwand gebundenen, phenolischen Komponenten sollen Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung phenolische Inhaltsstoffe von Weinrebenblättern für deren Resistenz gegen die bekanntesten mikrobiellen Schadorganismen (Echter und Falscher Mehltau, Botrytis) haben. Dazu wurde ein Extraktionsverfahren ausgearbeitet, das die Erfassung einer möglichst breiten Palette von solchen Inhaltsstoffen erlaubt. Die daraus resultierenden «Phenolmuster» sollen dann in einem weiteren Schritt mit bereits vorliegenden Daten zur Resistenz der verschiedenen an der Forschungsanstalt Wädenswil (FAW) angebauten – es sind vor allem interspezifische – Rebsorten verglichen werden. Im Falle einer Übereinstimmung zwischen diesen Datensätzen können allenfalls schon bei Sämlingen Aussagen zum Resistenzpotential einer neuen Rebsorte gemacht werden, womit das Ausleseverfahren erheblich beschleunigt werden könnte.*

## Abwehrmechanismen

Für die Abwehr von pilzlichen Schädlingen haben Pflanzen ein vielfältiges Repertoire an physikalischen und chemischen Methoden zur Verfügung. Neben den passiven, mechanischen Barrieren (Blatthaare, Wachsschicht, Dicke und Festigkeit der Zellwand) sind es oft auch aktive Mechanismen, mit deren Hilfe Pflanzen einen Eindringling erkennen und ihn zum Beispiel durch Synthese zusätzlicher Hindernisse oder durch Freisetzung von chemischen Substanzen bekämpfen. Solche antimikrobiell wirkenden Komponenten werden je nach dem Zeitpunkt ihrer Synthese als präformierte, also schon vor der Infektion vorhandene, oder als induzierte, also erst nach erfolgter Infektion gebildete Resistenzfaktoren bezeichnet. Allerdings lässt diese Einteilung ausser

acht, dass sowohl Wirkungsort als auch Wirkungsmechanismus ganz entscheidend den Verlauf einer Infektion beeinflussen. Unser Interesse richtet sich deshalb besonders auf den Ort des ersten Kontakts zwischen dem Schädling und der Pflanze: die Zellwand.

## Phenolische Komponenten

Pflanzenphenole bilden eine der wichtigsten Stoffgruppen, die an der biochemischen Abwehr von Pathogenen beteiligt sind (Friend 1985, De Wit 1987, Smart 1991). Der Begriff «Phenolische Komponenten» umschreibt ein breites Spektrum an Substanzen, deren gemeinsame chemische Grundstruktur von einem sogenannten aromatischen Ringsystem gebildet wird, welches mit Hydroxylgruppen

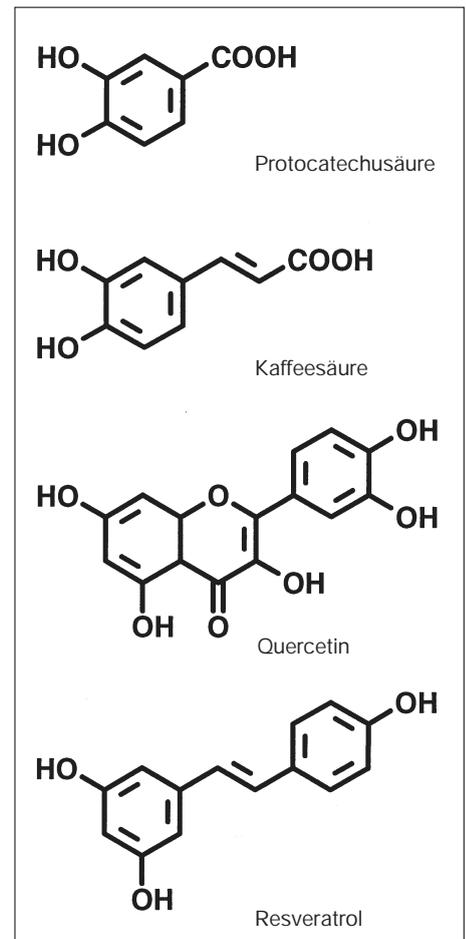


Abb. 2: Beispiele von Stammphenolen des Weinrebenblattes.

(HO-) oder davon abgeleiteten Derivaten substituiert ist (Harborne 1980). In Pflanzen liegen sie meist in Verbindung mit Zucker, Säure sowie als Oligo- oder Polymere vor (Friend 1985). Abbildung 2 zeigt exemplarisch vier in *Vitis* gefundene phenolische Komponenten.

Die weitaus meisten Untersuchungen zum Vorkommen dieser Substanzgruppe in der Weinrebe sind mit Trauben, Most und Wein gemacht worden, da der Phenolgehalt bei der Herstellung von Wein sowohl als Qualitäts- (Farbe und Geschmack), als auch als Produktionsfaktor (Gerbstoffe) bei der Fermentation und der Lagerung eine wichtige Rolle spielt. In Ergänzung dazu und aufgrund der wichtigen Stellung, die den Pflanzenphenolen als Schutzstoffe gegen einen Befall durch pflanzenschädigende Mikroorganismen zukommt, soll das Vorkommen und die Verteilung dieser Stoffgruppe auch in Rebenblättern studiert werden. Die bereits zahlreichen Forschungsprojekte auf diesem Gebiet beschäftigen sich vor allem mit den vermutlich als Phytoalexine (d.h.



Abb. 1: Léon Millot, eine der untersuchten interspezifischen Rebsorten.

pflanzliche Abwehrstoffe) wirkenden Stilbenen Resveratrol und Viniferin (z.B. Dercks *et al.* 1995, Bessis und Jeandet 1996). Dieser Substanzgruppe wird wie auch den Flavonoiden zudem eine Schutzwirkung gegen Herz-Kreislaufkrankungen nachgesagt, die auf eine Verbesserung der Lipidwerte im Blut zurückgeführt wird. Der Schwerpunkt unserer Arbeit dagegen soll auf der Analyse der mit der Zellwand assoziierten Phenole liegen. Eine Übereinstimmung von dabei gewonnenen «Phenolmustern» mit dem an der FAW in einem laufenden Projekt untersuchten Resistenzverhalten einzelner Sorten würde eine gute Grundlage für eine Vorertrags-Selektion von Neuzüchtungen bieten und damit die Einführungszeit von neuen Sorten erheblich verkürzen.

## Extraktion und Analyse

Für das experimentelle Vorgehen wurden drei Etappen definiert: 1. Extraktion und Analyse der löslichen phenolischen Komponenten, 2. Freisetzung der an die Zellwand gebundenen Phenole und 3. Erstellen einer Datenbank mit Phenolmustern unterschiedlich pilzresistenter Sorten. Im folgenden wird nur über Etappe 1 berichtet. Stufen 2 und 3 sind noch in Bearbeitung. Zur Gewinnung der in den Zellen gelösten Phenole (Abb. 3) wurden jeweils positionsgleiche Rebenblätter gepflückt, sorgfältig in 0,2% Zitronensäure gewaschen, gefriergetrocknet und in der Schlagmühle zu einem feinen Pulver gemahlen. Das Material wurde nacheinander mit siedendem Alkohol, 30% sowie 100% Methanol extrahiert und unlösliche Bestandteile jeweils durch Zentrifugation abgetrennt. Die vereinigten Überstände bildeten den Rohextrakt. Das Sediment stellte nach weiteren Extraktionen mit Aceton, Ethylacetat und Diethyläther die gereinigte Zellwandfraktion dar, welche als Ausgangsmaterial zur Bestimmung der zellwandgebundenen Phenole dienen wird. Der Rohextrakt wurde unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt, in salzsaurem 50% Methanol aufgenommen und mit Hilfe einer Festphasenextraktion an Chromabond C18ec von stark unpolaren Verbindungen befreit. Das Eluat wurde als Fraktion F50 bezeichnet und mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) analysiert. Die HPLC-Methode wurde so ausgelegt, dass möglichst viele der interessierenden phenolischen Komponenten basisliniengrennt werden konnten (Abb. 4).

Als Standard für blaubeerige Rebsorten wurden Blauburgunderblätter ausgewählt. In Abbildung 5 ist das Elutionsprofil der in den Blattzellen gelösten phenolischen Komponenten abgebildet. Die bei-

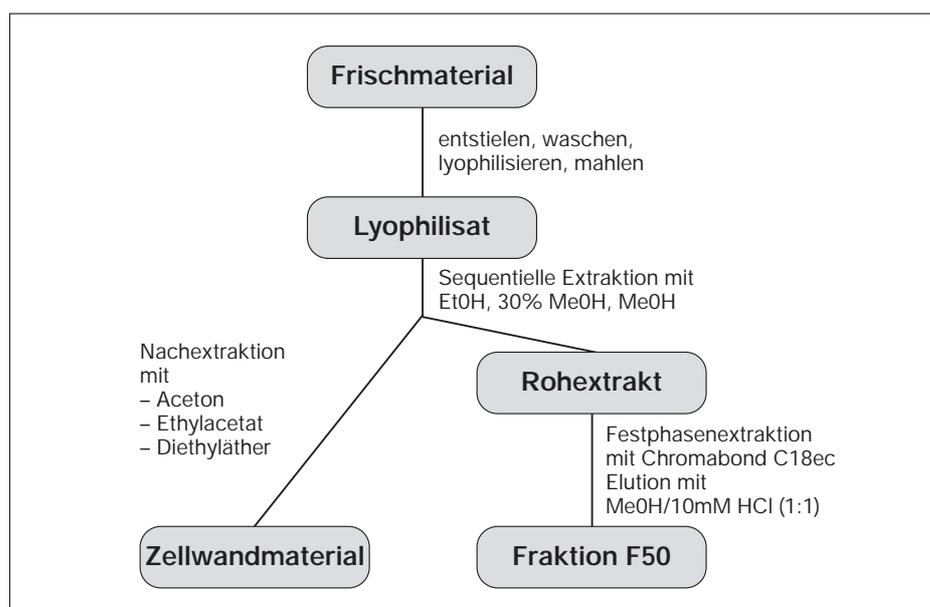


Abb. 3: Schema der Extraktion von phenolischen Komponenten aus Rebenblättern.

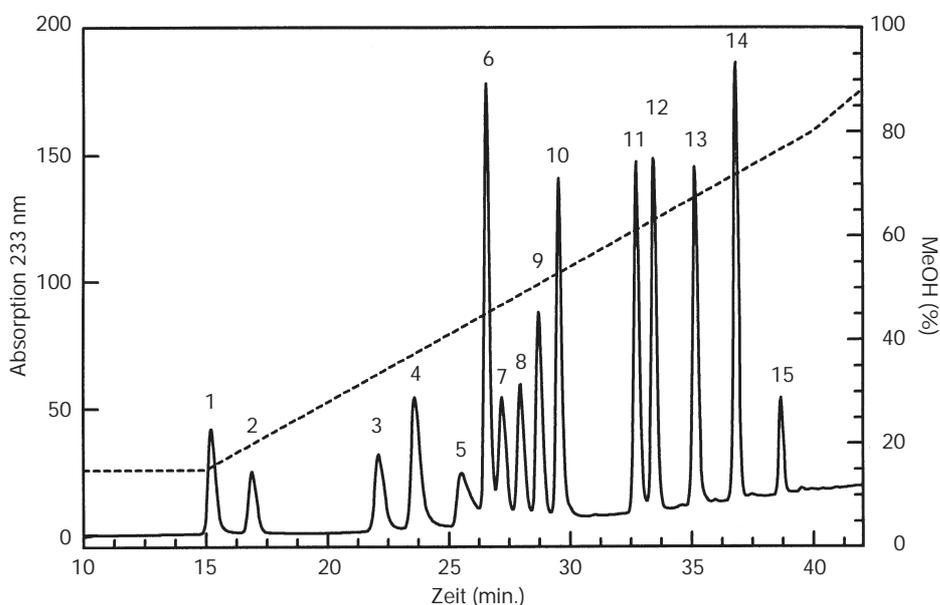


Abb. 4: HPLC-Elutionsprofil einer Referenzmischung. Säule: Nucleosil 5C18, Laufmittel: 1 ml/min 10 mM Phosphatpuffer pH 3, Methanolgradient (---), Detektionswellenlänge 233 nm (—). Referenzen: 1 = Gallussäure, 2 = 5-Hydroxymethylfurfural, 3 = Protocatechusäure, 4 = Gentisinsäure, 5 =  $\gamma$ -Resorcyssäure, 6 = Catechin, 7 = 4-Hydroxybenzoesäure, 8 =  $\beta$ -Resorcyssäure, 9 = 3-Hydroxybenzoesäure, 10 = Kaffeensäure, 11 = p-Cumarsäure, 12 = Ferulasäure, 13 = o-Cumarsäure, 14 = 3,4-Dimethoxyzimtsäure, 15 = Zimtsäure.

den Hauptbestandteile konnten durch Vergleich ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren mit publizierten Daten (Weber 1993) als Kaffeeoyltartrat (einer Verbindung zwischen Kaffeensäure und Weinsäure, Peak a) und Quercetinglucuronid (ein Flavonoid, welches mit einem Zucker verknüpft ist, Peak d) identifiziert werden. Gipfel, die von zwei nicht getrennten Substanzen stammen oder deren Flächen wegen Basislinienschwankungen nicht mengenmässig erfasst werden konnten, wurden nicht mit einem Buchstaben gekennzeichnet.

Für 6 blaubeerige Sorten wurden die prozentualen Peakflächen der mit a bis h

bezeichneten Substanzen bestimmt (Tabelle). Dabei fällt auf, dass sich die Summe der Kolonnen a und d in einem relativ engen Bereich von 84,3 bis 90,5% bewegt, während die mengenmässig weniger gewichtigen Substanzen von Sorte zu Sorte zum Teil sehr unterschiedlich verteilt sind.

Ein Zusammenhang dieser Daten mit einer sortentypischen Pilzresistenz kann allerdings noch nicht abgeleitet werden, denn die bis anhin analysierten Proben stammen alle von einem einzigen Blattentzeitpunkt. Noch steht nicht fest, ob sich die gefundenen Unterschiede in verschiedenen Rebsorten auch zu anderen

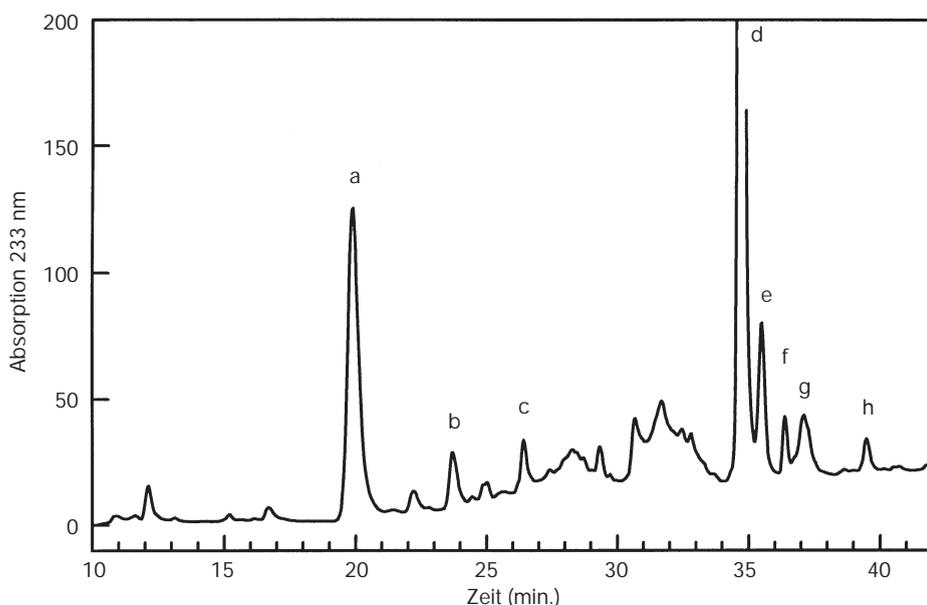


Abb. 5: HPLC-Elutionsprofil des protoplastischen Kompartiments von Blättern der Rebsorte Blauburgunder. Die HPLC-Bedingungen sind in Abbildung 3 beschrieben. Die beiden Hauptkomponenten a und d entsprechen den Verbindungen Kaffeeoyltartrat und Quercetinglucuronid. Peak b, c und e bis h wurden noch nicht identifiziert.

**Vergleich der Peakflächen von ausgewählten phenolischen Komponenten aus der löslichen Fraktion von Blättern verschiedener Rebsorten. Die Bezeichnungen a bis h entsprechen den Peaks in Abbildung 4.**

Sorte	Peak (% Fläche)							
	a	b	c	d	e	f	g	h
Blauburgunder	19,7	0,12	1,9	64,6	6,2	1,8	4,4	1,3
Léon Millot	15,1	0,09	2,5	72,9	3,6	4,2	1,5	0
Chambourcin	15,5	0,11	1,9	71,7	6,8	1,6	1,7	0,7
Maréchal Foch	19,9	0,12	0,65	70,6	4,1	2,9	1,8	0
Regent	20,3	0,10	2,0	66,9	6,7	1,9	2,2	0
«Vitis Canada» *)	23,7	0,17	1,4	60,9	4,9	1,3	2,1	5,5

\*) Inoffizieller Name einer noch nicht bestimmten Sorte von Tafeltrauben (siehe Kasten).

Erntezeitpunkten oder in unterschiedlichen Blattpositionen am selben Stock bestätigen lassen. Allerdings sind die Unterschiede gross genug, dass sie mit Sicherheit festgestellt werden können. Dies ermutigt, neben dem eigentlich anvisierten Ziel der Analyse von Phenolmustern in der Zellwand, auch weiterhin die in der Zelle frei vorliegenden phenolischen Stoffwechselprodukte zu bestimmen.

**Nächster Schritt:  
Analyse der Zellwand**

Für die in Etappe 2 vorgesehene Freisetzung von phenolischen Komponenten aus der Zellwand soll eine von Weber (1993) verwendete Methode der basischen und enzymatischen Hydrolyse angewandt und gegebenenfalls adaptiert werden. In Kombination mit dem bereits etablierten HPLC-Analysesystem soll dann ebenfalls ein Inventar der zellwandgebundenen Phenole verschiedener Sorten erstellt werden. Die erhöhte Konzentration der Stammphenole Gentisinsäure, Protocatechusäure und Protocatechualde-

hyd, die Weber (1993) nach einer Infektion von Müller-Thurgau-Blättern mit *B. cinerea* in deren Zellwand beobachtet hat, lassen deutlich auf eine Beteiligung dieser Stoffe im Abwehrkampf der Pflanze schliessen. Deshalb erachten wir die qualitative und quantitative Analyse dieser zellwandassoziierten Phenole und die daraus gewonnenen Phenolmuster als einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der unterschiedlichen Toleranz einzelner Rebsorten gegenüber dem Infektionsdruck durch phytopathogene Pilze.

**Literatur**

Bessis R. und Jeandet P.: Les défenses naturelles de la vigne: une alternative à la lutte chimique. In: La viticulture à laube du IIIe millénaire, Vigne et Vin Publications Internationales, Martillac, 131-135, 1996.

Dercks W., Creasy L.L. und Luczka-Bayles C.J.: Stilbene phytoalexins and disease resistance in Vitis. In: Daniel M. und Purkayastha R.P. (Hrsg.). Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action, Marcel Dekker, New York, 287-315, 1995.

De Wit P.J.G.M.: Specificity of active resistance mechanisms in plant-fungus interactions. In:

**«Vitis Canada»**

Ein in Kanada wohnhafter Auslandschweizer führte anlässlich eines Besuches der Weinbauörtlichkeiten an der FAW einige Edelreiser einer Rebsorte in die Schweiz ein. Sie gedeihe gut und liefere ausgesprochen süsse Trauben, so der Kommentar des Besuchers. Seit 5 Jahren ist diese Sorte nun in unseren Versuchspartikeln für interspezifische Sorten in Kultur. Sie zeigt auch ohne Behandlung eine gute Resistenz und könnte als Tafeltraube durchaus überzeugen. Vom Geschmack der Beere her kann die Sorte dem Labrusca-Typ zugeordnet werden. Der Sortenname und die genaue Elternschaft sind jedoch noch nicht bekannt. Zu Ehren des Besuchers aus Kanada erhielt sie den Spitznamen «Vitis Canada».

(Persönliche Mitteilung von Pierre Basler, FAW)

Pegg G.F. und Ayres P.G. (Hrsg.). Fungal Infection of Plants, Cambridge University Press, Cambridge, 1-24, 1987.

Friend J.: Phenolic substances in plant disease. In: Van Sumere C.F. und Lea P.J. (Hrsg.). Annu. Proc. Phytochem. Soc. Europe (Vol. 25), Calderon Press, Oxford, 367-393, 1985.

Harborne J.B.: Plant phenolics. In: Bell E.A. und Charlwood B.V. (Hrsg.). Secondary Plant Products (Vol 8), Springer Verlag, Berlin, 329-402, 1980.

Smart M.G.: The plant cell wall as a barrier to fungal invasion. In: Cole G.T. und Hoch H.C. (Hrsg.). The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals, Plenum Press, London, 47-66, 1991.

Weber B.: Phenolische Komponenten des Weinrebenblattes: Identität und phytopathologische Bedeutung, Dissertation Universität Zürich, 1992.

**Substances  
phénoliques de la  
feuille de vigne**

Afin de pouvoir dresser un inventaire des substances phénoliques solubles et associées à la paroi cellulaire des feuilles de vigne de différents cépages, une méthode d'extraction appropriée a été mise au point qui s'avère efficace même lors de très nombreux prélèvements. L'extrait a été analysé par chromatographie en phase inverse dans un tampon acide au phosphate au moyen d'un gradient au méthanol. Les résultats obtenus jusqu'ici par l'analyse des substances phénoliques (tanins) du contenu soluble de cellules de différents cépages à grains bleus révèlent des différences de nature qualitative et quantitative. On ne dispose pas encore des résultats de mesure des phénols liés à la paroi cellulaire.