Vitis 19, 230—240 (1980)

Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Die Resveratrolsynthese bei Vitaceen
Induktion und zytologische Beobachtungen

von

R. Blaich und O. Bachmann

The resveratrol synthesis in Vitaceae
Induction and cytological observations

Summary. — Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxy stilbene) is excreted by wounded leaves of all Vitaceae tested if the wound margins make contact to a cellulosic substratum (filter paper) soaked with inducer substances in aquous solution. These substances, including mono- and disaccharides, some polysaccharides and Cu^{++} ions are active down to concentrations of 0,001 %. The inducing activity is not due to pH effects, the most potent inducers are alginate and mucic acid, which is known to be a metabolite of *Botrytis cinerea* growing on *Vitis*.

Some toxic substances including phenyloxyalkylcarbonic acids and some metabolic inhibitors as desoxyglucose prevent the excretion of resveratrol, which is then accumulating in the leaf tissue at some distance around the wound margin.

Cytological observations by fluorescence microscopy have shown that *trans*-resveratrol induced in the leaf is deposited within small areas of the cytoplasm of single cells or in the periplasm, probably near plasmodesmata. From there it is distributed evenly into the cell walls. Under the influence of sunlight or after UV irradiation by the microscope lamp it is transformed to *cis*-resveratrol, which is then absorbed rapidly by the stomatal cells. This effect may be inhibited by a treatment with desoxyglucose.

Einleitung

Stilbene kommen in Pflanzen meist im verholzten Sproß oder in der Wurzel vor (Literatur bei Langcake und Pryce 1976, Rupprich *et al.* 1980). Von einigen Hydroxystilbenen ist bekannt, daß sie bei der Abwehr von pflanzlichen und tierischen Parasiten wirksam sind. Vitaceen synthetisieren in ihren Blättern unter dem Einfluß von Schädigungen das Resveratrol (*trans*-3,5,4'-Trihydroxystilben). Dieses selbst, vor allem einige Abkömmlinge, wie die Viniferine (Langcake und Pryce 1977) und das Pterostilben (Langcake *et al.* 1979), haben fungitoxische Eigenschaften und könnten mithin als Phytoalexine bezeichnet werden.

Resveratrol läßt sich in den Blättern aller bisher daraufhin untersuchten Vitaceen nach kurzwelliger UV-Bestrahlung nachweisen, wenn diese so intensiv ist, daß nach etwa einem Tag sonnenbrandähnliche Schäden auftreten. Unter natürlichen Bedingungen wird die Bildung des Stilbens u. a. durch Pilzbefall induziert. Es tritt in einer etwa 1 mm breiten Zone im gesunden Gewebe um die Pilzläsionen herum auf. Vorversuche zeigten, daß sowohl in den Zellwänden, als auch im Kulturfiltrat von *Botrytis cinerea* Stoffe enthalten sind, welche die Bildung des Resveratrols induzieren können. Analog zu den Befunden bei der Induktion anderer Phytoalexine (Literatur bei Drysdale 1978) war die Existenz von Auslösefaktoren (Elicitoren) postuliert worden. Nach Langcake und McCarthy (1979) ist die *Botrytis*-Resistenz einiger Rebsorten mit ihrer Fähigkeit zur Resveratrolbildung korreliert. Um dies bei einem breiten Spektrum von Reben testen zu können, wäre es wünschenswert,

statt der schlecht reproduzierbaren direkten *Botrytis*-Infektion einen gereinigten und definierten Induktionsstoff benutzen zu können. Reinigungsversuche zeigten jedoch bald, daß es sich um eine ganze Gruppe von Faktoren handeln mußte, deren unterschiedliche Molekülgrößen und Eigenschaften bislang Reinigung und nähere Charakterisierung verhinderten.

Deshalb wurde zunächst eine Reihe definierter chemischer Substanzen auf ihre Einsatzmöglichkeit als Induktoren geprüft. Ergänzend wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgenommen, da über den Syntheseort des Resveratrols und dessen späteres Schicksal bislang nur makroskopische Beobachtungen vorlagen.

Material und Methoden

Das Rebenmaterial für die Untersuchungen an Blättern verschiedener Wildarten und Sorten wurde dem Sortiment der BFA für Rebenzüchtung entnommen (Artenliste in Bachmann 1978). Nachdem keine prinzipiellen Unterschiede zwischen einzelnen Vitaceen auftraten, wurden die weiteren Tests ausschließlich an Blattmaterial der immergrünen Arten *Tetrastigma* (früher *Vitis) lanceolaria* und *T. voineriana* durchgeführt, um auch im Winter arbeiten zu können.

Die Applikation der Testsubstanzen (Serva, Heidelberg), die in 3 verschiedenen Konzentrationen in Wasser gelöst waren (falls von der Löslichkeit her möglich: 0,1 −, 0,01 − und 0,001 %ig), geschah wie folgt:

1. Aus Vitaceen-Blättern wurden quadratische Stücke geschnitten (Kantenlänge 15 mm) und auf Filterkarton (Schleicher und Schüll, Nr. 2105) gelegt, der mit der Testlösung getränkt war.
2. Die Blätter wurden oberflächlich durch flache Einschnitte bzw. -stiche verwundet und auf die Verletzungen 50-μl-Tröpfchen der Testlösung aufgebracht; diese blieben in der feuchten Kammer mehrere Tage erhalten, ohne vom Blatt aufgesogen zu werden.
3. Mittels einer Injektionsspritze, die mit Schraube und Manometer versehen war, wurden die Lösungen mit 0,8 bar in den Stiel eines gesunden Blattes injiziert; bei diesem Druck traten nie Schädigungen des Blattes auf und es konnten — je nach Blattart — etwa 100 μl/h eingespritzt werden.

Die Identifizierung des Resveratrols erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Mikropolyamidplatten (Nr. F 1700 von Schleicher und Schüll) mit Äthylacetat/Methanol (4/1) + 3 % Essigsäure als Laufmittel anhand von Vergleichssubstanzen. Das Resveratrol wurde dazu aus dem Blatt bzw. Unterlagskarton mit Methanol herausgelöst.

Die UV-Induktion von Resveratrol geschah durch 5 min Bestrahlung mit einer Hanau-Quarzröhre (35 W, Type 5135) aus 10 cm Entfernung.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden an einem Zeiss-Photomikroskop II durchgeführt. Auflichtuntersuchungen konnten an ganzen Blattstückchen vorgenommen werden; für Durchlichtanalysen wurden die unfixierten Blätter mittels eines Vibratoms (Oxford) in etwa 30 μm dicke Flach- bzw. Querschnitte zerlegt und in Wasser unter einem Deckglas betrachtet.

Zur präparativen Isolierung von Resveratrol aus Rebholz wurde Abfallschnittholz nach Zerkleinern in einem Schnitzelwerk zu Pulver zermahlen und mit 50%igem Methanol extrahiert. Der trübe wäßrige Rückstand nach Abdampfen des Methanols wurde mit Äther ausgeschüttelt, dieser abgedampft, der Rückstand in wenig 50%igem Methanol aufgenommen und auf einer Sephadex G 25-

Substanzen, die Rebblätter zur Synthese und/oder Ausscheidung von Resveratrol aus Wunden auf eine Papierunterlage anregen

Substances inducing the formation and/or the excretion of resveratrol from wounds on a paper substratum

Testsubstanz	Ausscheidung	Induktion im Blatt	Nekrosen im Blatt
Glucose	+++[1]	−	−
Fructose, Maltose	++	−	−
Galactose	+	−	−
Arabinose, Fucose	+	−	−
Xylose, Ribose	+	−	−
Saccharose, Raffinose	++	−	−
Sorbit, Inosit, Mannit	+	−	−
Glucuronsäure	++	−	−
Galactarsäure	+++	−	−
Alginsäure	+++	−	−
Arabinogalactan	++	−	−
Ficoll-Paque[2])	+	−	−
Kethoxal[3])	+	−	−
2-Desoxy-D-ribose[4])	+	+	−
2-Desoxy-D-glucose[5])	−	++	++
Äpfelsäure	++	−	−
Ascorbinsäure	++	−	−
Acetylsalycylsäure	+	−	−
Glutaminsäure	++	−	−
Adenin	+	+	++
Thymin	+	−	−
Guanosintriphosphat	++	−	−
Adenosintriphosphat	++	−	−
NAD	+++	−	−
Thiouracil	+ (mit Verzögerung)	−	−
Chlormethylphenoxyessigsäure[6])	−	++	+
Dichlorphenoxyessigsäure[6])	+	+	+
Trijodbenzoesäure[7])	−	++	++
Hydroxymercuribenzoesäure[8])	+	+	+
4-Fluorphenylalanin[9])	+++	−	−
N-Acetyl-D,L-2-fluorphenylalanin[9])	+	−	−
Thioharnstoff	++	++	−
Carbamylphosphat	−	++	+
Chloramin T	+	+	−
Ammoniummolybdat	++	+	++
Streptomycinsulfat	++	−	−
Titriplex III	+++	++	−
Dimethylsulfoxid	+++	++	+
$CuSO_4$	−	++	−

1) +++ = 30 µg Resveratrol/10 mm Blattkante in den ersten 24 h, ++ etwa 10 µg, + etwa 3 µg.
2) Polymer aus Saccharose + Epichlorhydrin.
3) Teilpolymerisiert, blockiert Guaninreste.
4) Glycolyse-Inhibitor.
5) Hemmt Membrantransport von Glucose.
6) Herbizid.
7) 2,4-D-Antagonist, eventuell membranwirksam.
8) Sulfhydrylreagenz.
9) Phenylalanin-Antagonist.

Säule fraktioniert. Resveratrol und die Viniferine ließen sich dabei trennen. Die Resveratrolfraktion wurde eingedampft und in möglichst wenig heißer 30%iger Essigsäure aufgenommen. Aus dieser kristallisierte die Substanz in spießigen Kristallen (Abb. 3 d) aus.

Ergebnisse und Diskussion

1. Induktionswirkung von Chemikalien

Da uns bislang keine fluorimetrische Methode zur Verfügung stand, um die Menge von induziertem Resveratrol in Lösung zu messen, wurde diese an einigen Beispielen durch Vergleich der Fluoreszenzintensität auf Filterkarton mit derjenigen von Verdünnungsreihen mit reinem Resveratrol ermittelt.

Die größten Mengen des Stilbens werden von Rebenblättern dann produziert, wenn man ihm Gelegenheit gibt, aus einer Wunde auf ein Zellulosesubstrat herauszudiffundieren. Als günstig hat sich dafür besonders nichtfluoreszierender Filterkarton erwiesen. Um möglichst große Wundränder zu schaffen, wurden Stücke aus dem Blatt herausgeschnitten und auf den Filterkarton ausgelegt. Dieser diente gleichzeitig als Träger für die Induktionslösung, falls sie nicht direkt auf das Blatt aufgetragen wurde.

Da Filterkarton und Luft feuchtigkeitsgesättigt waren, kann ein Verdunstungseffekt als Ursache für den Austritt des Resveratrols ausgeschlossen werden. Bringt man keimende Sporen von *Botrytis cinerea* in Nährlösung (Bachmann und Blaich 1979) auf, so tritt ebenfalls Induktion von Resveratrol und gelegentlich Keimungshemmung auf, deren Ausdehnung sich mit der Resveratrolfluoreszenz deckt (Abb. 1 a). Die Feststellung, daß die Glucose im Nährmedium den größten Anteil an der Induktionswirkung hatte, führte zu den folgenden Untersuchungen.

Zur Kontrolle wurden Blattstücke auf Karton gelegt, der nur Wasser enthielt. Dabei trat meist nach etwa 1—2 d eine geringfügige Menge von Resveratrol aus, und zwar bei jungen Blättern nur in Spuren, bei älteren etwas mehr.

Werden in dem Wasser Substanzen gelöst, so kann man diese nach ihrer Wirkung in mehrere Klassen einteilen (Tabelle):

1. Stoffe, die keine merklich höhere Produktion verursachen als die Kontrolle (nicht in die Tabelle aufgenommen); hierzu zählen u. a. Hydroxychinolin, Thiamin, Vanillin, Phenylalanin, Glycin, Äthanol, Methanol, Propanol, Pb-Acetat und $CoCl_2$.
2. Stoffe, die eine mehr oder weniger verstärkte und vor allem frühere Ausscheidung von Resveratrol aus den Wundrändern hervorrufen (Abb. 1 b), wobei dieses im Blatt selbst nur manchmal an den Rändern nachzuweisen ist, und
3. solche, die den Austritt des Resveratrols aus den Rändern blockieren, aber dafür eine Ansammlung im Blatt selbst hervorrufen (Abb. 1 d). Ferner bewirken
4. viele Substanzen gleichzeitig Ausscheidung und Induktion im Blatt selbst.

Unterschiedliche Konzentrationen der Chemikalien (0,1—0,001%) brachten keine qualitativen, sondern nur quantitative Unterschiede in der Wirkung.

Gruppe 3 enthält Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie als Hemmstoffe im Stoffwechsel fungieren, und die deshalb mehr oder weniger giftig wirken. Hierzu zählen u. a. einige Herbizide, SH-Gruppen-Reagenzien und interessanterweise auch Titriplex, von dem man annehmen kann, daß es einige Enzyme durch Blockierung ihres Co-Metalls inaktiviert.

Die Blattstücke zeigen an den Wundrändern nach 24 h meist eine 1—2 mm breite Zone, in der das Chlorophyll unter dem UV-Mikroskop nicht mehr seine typische

Fluoreszenz zeigt. Diese Zone wandert später konzentrisch nach innen. Resveratrol findet sich stets nur in dem angrenzenden gesunden Gewebe. Entsprechendes gilt für die Applikation dieser Stoffe an Verletzungen bei ganzen Blättern. Abb. 1 c zeigt ein Anfangsstadium; die dort applizierte, stark verdünnte Desoxyglucoselösung führte erst nach längerer Inkubation zum Absterben der Wundränder.

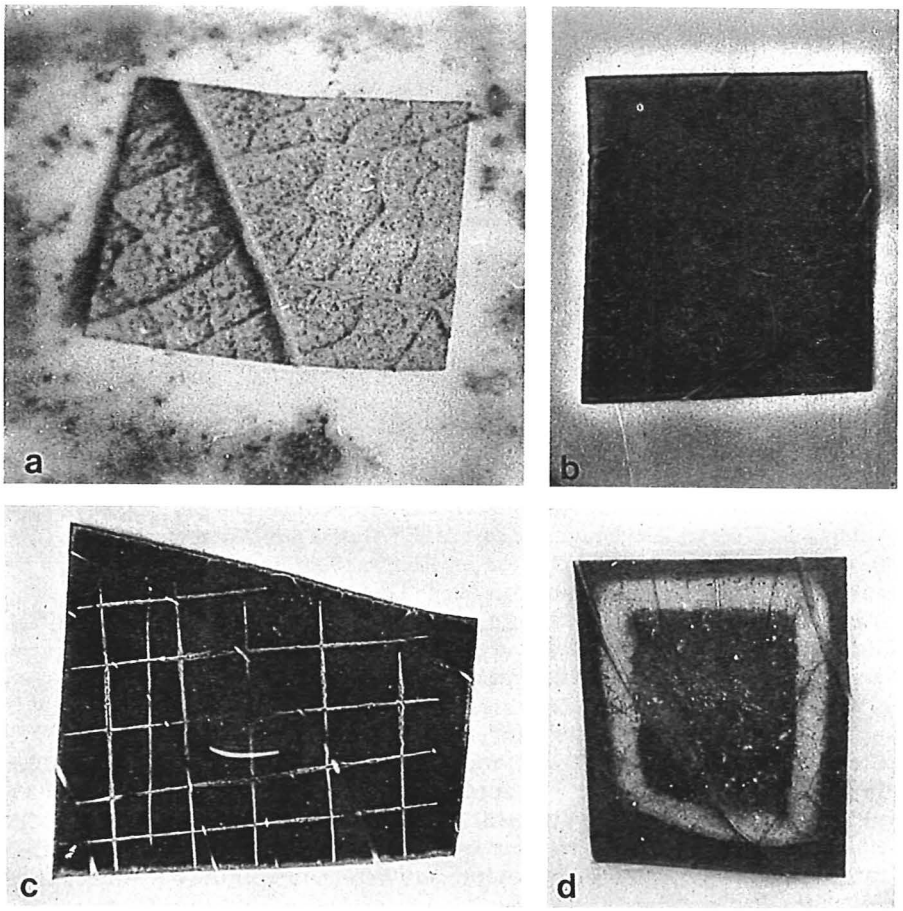


Abb. 1: Blattstücke von *Tetrastigma lanceolaria* auf Filterkarton. Einfluß verschiedener Induktionslösungen (0,001 %ig). Aufnahme im langwelligen UV-Licht nach 24 h Inkubationszeit. — a) Suspension von *Botrytis*-Konidien in glucosehaltiger Nährlösung: Eine Keimhemmzone tritt auf, die Resveratrolfluoreszenz zeigt. — b) Auf Galactarsäure: Resveratrol wird ausgeschieden. — c) Mit Nadel eingeritzt und oberflächlich mit Desoxyglucose behandelt: Resveratrol bildet sich entlang den Verletzungen. — d) Auf Chlormethylphenoxyessigsäure: Resveratrol zeigt sich im Blatt.

Leaf sectors of *Tetrastigma lanceolaria* on filter cardboard; influence of solutions (0,001 %) of different inducing substances. — Photos were taken in longwave UV light after a 24-h incubation period. — a) On a suspension of *Botrytis* conidia in nutrient solution containing glucose: Germination is inhibited within a fluorescing zone due to excreted resveratrol. — b) On mucic acid (0,001 %): Resveratrol is excreted. — c) Leaf scratched with a needle and treated with desoxyglucose: Resveratrol is formed along the injuries. — d) On chlormethylphenoxyacetic acid: Resveratrol shows up in the leaf.

In Gruppe 2 finden wir Substanzen, die nicht als giftig gelten — hauptsächlich Metabolite des normalen Stoffwechsels höherer Pflanzen oder auch Pilze. Diese regen das Blatt zu einer starken Ausscheidung von Resveratrol aus den Wundrändern an. Im Blatt selbst tritt dieses nicht oder höchstens in einer schmalen Zone am Wundrand in Erscheinung. Hier handelt es sich meist um Oligo- und Polysaccharide, organische Säuren und Phosphate. Die stärkste Wirkung geht von Zuckersäuren aus, die u. a. auch als Produkte von *Botrytis cinerea* bekannt sind (KREFFT 1977). Auch Cu^{++}-Ionen wirken induzierend, wie diese ja auch bei Bohnen imstande sind, eine Phytoalexin-Produktion hervorzurufen. Auch — von kleinen Molekülen freigewaschene — Zellwandhomogenisate von Pilzen wirken stark induzierend.

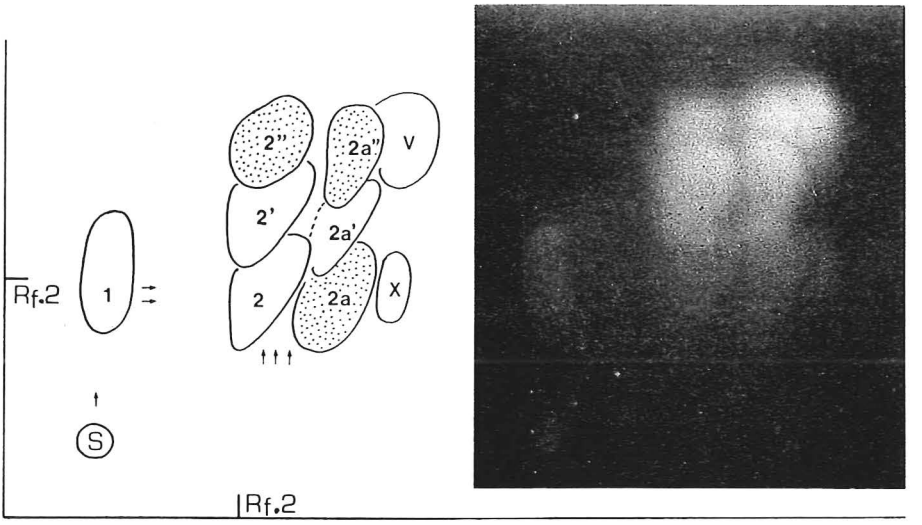
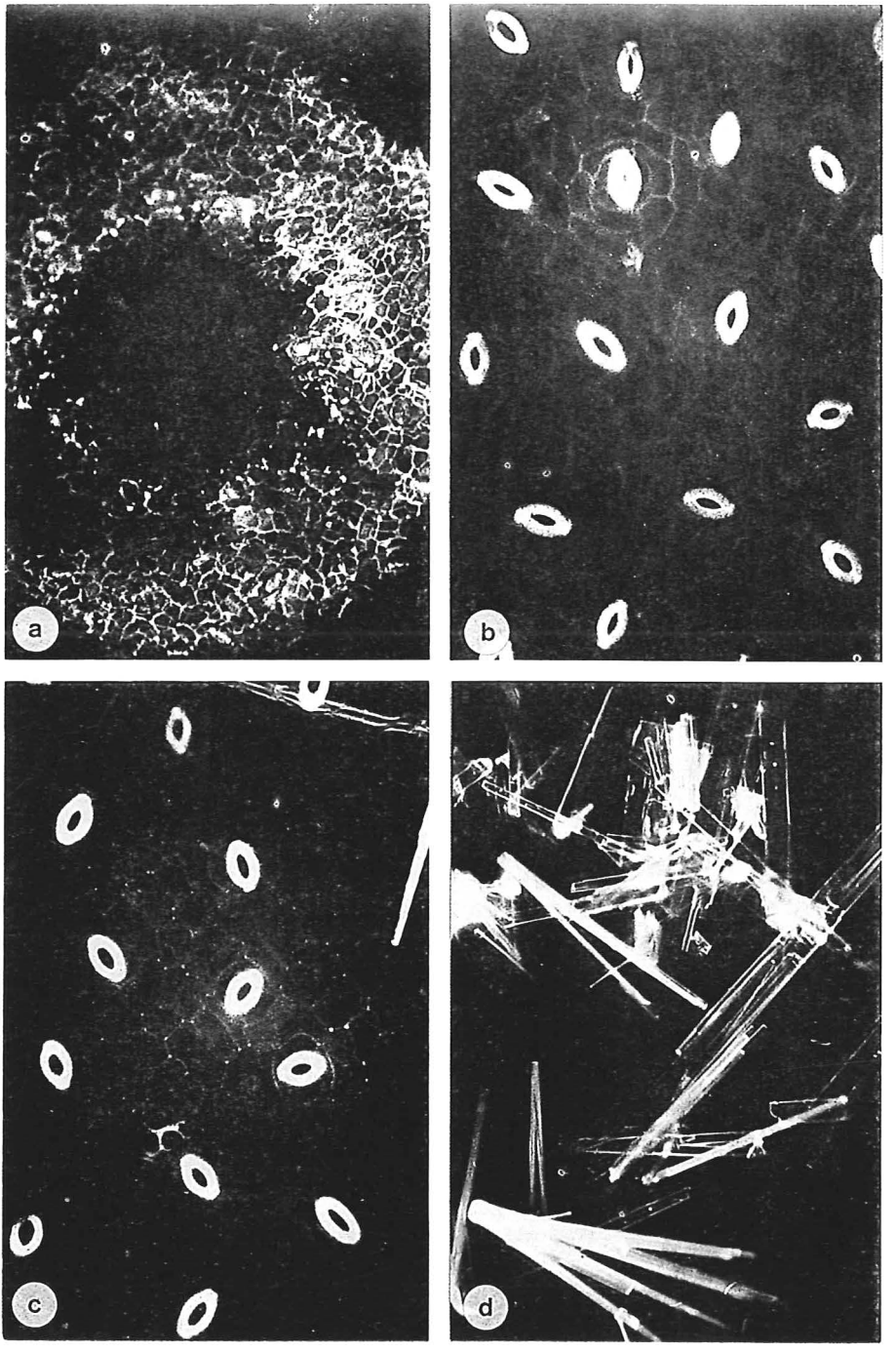


Abb. 2: TLC-Chromatogramm der Umlagerung von *trans*- zu *cis*-Resveratrol; rechts Foto (nach einem Farbdia), links erläuternde Skizze: S = Start; bei der 1. Chromatographie (einfacher Pfeil) wandert das *trans*-R. nach 1 und wird dort UV-bestrahlt; die 2. Chromatographie mit demselben Fließmittel (Doppelpfeil) trennt *trans*-R. (2) und *cis*-R. (2 a), ein Phenanthren bleibt bei 1 sitzen; die 3. Chromatographie (Dreifachpfeil) nach erneuter Bestrahlung und Lagerung im Dunkeln zeigt, daß in Fleck 2 und 2 a jeweils wieder Phenanthren (bleibt sitzen) und die beiden Resveratrole enthalten sind; die Flecken V und X sind Verunreinigungen des Präparats (Abbauprodukte u. ä., z. T. ebenfalls während des Tests durch Bestrahlung verändert). Im Original können die Stoffe leicht durch unterschiedliche Fluoreszenz differenziert werden (*trans*-R. hellblau, *cis*-R. hellgrünlichblau, Phenanthren bräunlichrosa).

TLC-chromatogram of the interconversion of *trans*-resveratrol to *cis*-resveratrol (from a colour slide). On the left, explanatory sketch: S = start; during the first development single arrow) the *trans*-r. migrates to 1 and is UV-irradiated there; the second development (same eluent, double arrow) separates *trans*-r. (2) and *cis*-r. (2 a), a phenanthrene rests on 1; the third development (triple arrow), after another irradiation and some hours in the dark, shows spots 2 and 2 a, respectively, to contain again both resveratrols and phenanthrene; spots V and X are contaminations (degreadation products, partly due to irradiation). The identification on the chromatogram is easy, due to the different colour of fluorescence (*trans*-r. light blue, *cis*-r. light greenish-blue, phenanthrene brownish-pink).


a
b
c
d

Werden Stoffe aus den Gruppen 2 und 3 gemischt appliziert, so dominiert die Giftwirkung; d. h. eine induzierte Ausscheidung wird durch das Zellgift verhindert. Allerdings tritt die Giftwirkung langsamer ein als die Induktion.

Meist reagieren die wäßrigen Lösungen der getesteten Verbindungen neutral oder leicht sauer. Um im letzteren Fall den Induktionseffekt der Substanz von der Wirkung des pH-Werts ihrer Lösung differenzieren zu können, wurden auch Versuche mit Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung gemacht. Hierbei zeigten sich Induktionen im basischen Bereich, bei Phosphatpuffern auch Wirkungen durch höhere Phosphatkonzentrationen. Die geringste oder keine Wirkung trat jedoch bei dem leicht sauren pH (3—4) auf, den auch die wäßrigen Lösungen unserer stärksten Induktoren (Alginsäure und Galactarsäure) aufweisen.

Durch Injektion der Testsubstanzen in den Blattstiel wird eine Resveratrolbildung nur dann induziert, wenn der Druck soweit gesteigert wird (über 1 bar), daß es im Gefäßsystem zu Zerreißungen mit Austritt von Flüssigkeit ins Gewebe kommt.

2. Zytologische Beobachtungen

Wenn Resveratrol chemisch über eine Verletzung oder durch *Botrytis*-Befall induziert wird, so kann man unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten, daß es zunächst nicht gleichmäßig in Zellen oder Zellwänden verteilt ist, sondern daß innerhalb der Zelle lokale Anhäufungen auftreten. Ob diese im Zytoplasmaschlauch selbst und/oder außerhalb, im periplasmatischen Raum lokalisiert sind, konnte bislang noch nicht festgestellt werden. Nach Rupprich und Kindl (1978) ist die Resveratrolsynthase-Aktivität bei *Rheum* mit Zellmembranen — wahrscheinlich bestimmten Organellen — assoziiert. Anhäufungen innerhalb benachbarter Zellen liegen sich oft gegenüber, scheinen also mit Plasmodesmen in Verbindung zu stehen. Schließzellen mit einer derartigen Resveratrolbildung wurden nicht beobachtet. Nach einigen Stunden lösen sich die Anhäufungen wieder auf, und die Substanz verteilt sich gleichmäßig in die Zellwände, die gewissermaßen „imprägniert" erscheinen. Dies paßt zu der Beobachtung, daß Resveratrol *in vitro* eine starke Affinität zu Zellulosefasern hat.

Nach Induktion in der Epidermis durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht werden die beschriebenen Anhäufungen seltener beobachtet, die Fluoreszenz findet sich meist von Anfang an gleichmäßig verteilt. Schließzellen fallen dabei zunächst nicht besonders auf, sondern erscheinen wie normale Epidermiszellen. Blattquerschnitte zeigen, daß die stärkste Stilbenbildung in oder dicht unter den Epidermen stattfindet, im Palisadenparenchym ist nur wenig zu sehen, im Schwamm-

---

Abb. 3: a—c) Mikroaufnahmen der unteren Epidermis von *Tetrastigma*-Blättern im langwelligen UV-Licht: a) Resveratrolbildung nach Induktion durch einen Nadelstich und einen Tropfen Desoxyglucose-Lösung. — b) Aufnahme des Resveratrols in die Schließzellen nach seiner Umlagerung in die *cis*-Konfiguration infolge Bestrahlung. — c) Nichtinduziertes (resveratrolfreies) Blatt nach 12 h Inkubation in einer *trans*-Resveratrol-Lösung (gesättigt, man beachte die Kristalle in der rechten oberen Ecke); die Zellwände fluoreszieren bläulich, die Spaltöffnungen grünlich. — d) *trans*-Resveratrol-Kristalle.

a—c) Photomicrographs of leaves of *Tetrastigma* (lower epidermis) in longwave UV-light: a) Formation of resveratrol in the cells after induction by a needleprick and a droplet of desoxyglucose solution. — b) Uptake of resveratrol by the stomata after its transformation to the *cis*-configuration by UV irradiation. — c) Control leaf (free from resveratrol) after a 12-h incubation in a solution of *trans*-resveratrol (saturated, see the crystals in the upper corner); cell walls are fluorescing light blue, stomata light green. — d) Crystals of *trans*-resveratrol.

parenchym nichts. Die Blattadern haben eine besondere Affinität zu diesem Stoff, vor allem das Phloem leitet es in 24 h etwa 0,5—1 mm weit in beiden Richtungen vom Induktionsort weg (Abb. 1 c). Wie sich das Xylem verhält, kann wegen seiner starken gelben Eigenfluoreszenz nicht beurteilt werden. Spätestens 3 d nach der Induktion verschwindet das Resveratrol auch im Dunkeln wieder vollständig aus dem Blatt. Es wird wahrscheinlich aktiv abgebaut, denn ausgetretenes, an Zellulose adsorbiertes bleibt in der Dunkelheit wochenlang erhalten.

3. Verhalten des Resveratrols

Bei dem von Reben synthetisierten Resveratrol handelt es sich um die *trans*-Form (Langcake und Pryce 1977). Diese steht mit dem *cis*-Rerveratrol im Gleichgewicht, das unter dem Einfluß von Licht, besonders im UV-Bereich, zunehmend auf die Seite der *cis-Form* verschoben wird, was sich leicht im Dünnschichtchromatogramm demonstrieren läßt (Abb. 2). Das chromatographisch rein aufgetragene *trans*-Resveratrol bildet einen hellblau fluoreszierenden Fleck (R_f-Wert unter unseren Bedingungen etwa 0,2). Nach etwa 1 min Bestrahlung mit der Lichtquelle des Auflichtfluoreszenz-Mikroskops wird der Fleck grünlichblau. Eine erneute Chromatographie in die zweite Dimension zeigt, daß sich nun ein grünlich fluoreszierender Fleck mit geringfügig höherem R_f-Wert abtrennen läßt — das *cis*-Resveratrol. Nachdem das Chromatogramm einige Stunden im Dunkeln gelegen hat, beobachtet man, daß die Substanz z. T. wieder in die *trans*-Form umgelagert wird. Längerdauernde Bestrahlung bewirkt allerdings u. a. eine irreversible Cyclo-Dehydrogenierung des *cis*-Resveratrols zum Phenanthren, das als bräunlich fluoreszierender Fleck am Start sitzen bleibt (Blackburn und Timmons 1969).

Diese Vorgänge können auch im Blatt ablaufen. Nach 1 h Sonnenbestrahlung — unter intensivem UV-Licht sogar binnen weniger min — verschwindet die blaue Fluoreszenz aus dem Gewebe. Auf der unteren Epidermis zeigt sich dabei eine Besonderheit: Hier beginnen die Schließzellen der Spaltöffnungen grünlich zu fluoreszieren (Abb. 3 b). Zu erklären wäre dieser Effekt als Zerstörung des Resveratrols durch die Bestrahlung, bei gleichzeitiger Neusynthese einer unbekannten, grünlich fluoreszierenden Substanz in den Schließzellen, doch sprechen mehrere Gründe dagegen:

1. In Blättern oder Blattzonen, die nicht induziert wurden, d. h. kein *trans*-Resveratrol enthalten, war es nie möglich, durch Bestrahlung eine Fluoreszenz in den Schließzellen hervorzurufen.
2. Wird ein Flachschnitt aus der unteren Epidermis eines unbehandelten Blattes zusammen mit einem Kristall Resveratrol in Wasser unter ein Deckglas gelegt, so läßt sich nach einem Tag eine bläuliche Fluoreszenz der Zellwände und eine grünliche der Schließzellen beobachten; diese können also von außen „gefüttert" werden. Die lange Inkubationszeit erklärt sich aus der Schwerlöslichkeit des Stilbens (Abb. 3 c).
3. Durch Behandlung (z. B. Einreibung der Blattunterseite) mit einer 0,01%igen Desoxyglucose-Lösung wird das Auftreten der Fluoreszenz in den Schließzellen blockiert — ähnlich wie die Resveratrolausscheidung aus Schnittkanten (S. 233) verhindert wird. Worauf dies zurückzuführen ist, bleibt unklar. Desoxyglucose blockiert spezifisch den Glucosetransport durch die Zellmembran. Konzentriertere Lösungen dieses Hemmstoffes rufen bei Reben starke Schädigungen in den Blättern hervor. Man könnte an eine unspezifische Störung des Membrantransports denken.

Alle Beobachtungen belegen, daß die Fluoreszenz der Schließzellen tatsächlich von *cis*-Resveratrol herrührt, das offensichtlich aktiv und spezifisch aufgenommen wird. Die Aufnahme selbst wird nicht durch die Bestrahlung induziert, denn man beobachtet sie auch bei älteren induzierten Blättern, die schon einige Tage in der feuchten Kammer gelegen haben. Auch im Dunkeln wird aus dem *trans*- immer etwas *cis*-Resveratrol gebildet. Dieses scheint von den Schließzellen gierig aus dem Gleichgewicht entfernt zu werden, so daß sich neues nachbildet.

Ob dieser Vorgang einen biologischen Sinn hat, ist derzeit ungewiß, aber selbst als Artefakt erlaubt er doch Rückschlüsse über Transportmechanismen des Resveratrols und bietet Ansatzpunkte zu deren Untersuchung.

Zusammenfassung

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-Trihydroxystilben) wird durch verletzte Blätter aller bisher untersuchten Vitaceen ausgeschieden, wenn die Wundränder in Kontakt mit einem Zellulosesubstrat (Filterpapier) stehen, das mit einer wäßrigen Lösung induzierender Substanzen getränkt ist. Als gute Induktoren wirken u. a. viele Mono- und Disaccharide, Polysaccharide und Cu^{++}-Ionen; sie sind aktiv bis herunter zu Konzentrationen von 0,001%. Die Induktionswirkung ist nicht auf pH-Effekt zurückzuführen. Am wirkungsvollsten waren Alginsäure und Galactarsäure, die als Metabolit von *Botrytis cinerea* auf *Vitis* bekannt ist.

Einige toxische Substanzen, u. a. Phenoxyalkylcarbonsäuren und einige Inhibitoren wie Desoxyglucose, verhindern die Ausscheidung von Resveratrol, führen aber zu dessen Ablagerung im Blattgewebe selbst.

Zytologische Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop zeigten, daß induziertes *trans*-Resveratrol im Blatt zunächst entweder im Zytoplasma und/oder im Periplasma — anscheinend in der Nähe von Plasmodesmen — in Form lokaler Anhäufungen auftritt. Danach verteilt es sich gleichmäßig in die Zellwände. Unter dem Einfluß von Sonnenlicht oder durch die UV-Bestrahlung mit der Mikroskopleuchte lagert es sich in seine *cis*-Form um, die dann innerhalb kurzer Zeit von den Schließzellen aufgenommen wird. Dieser Effekt kann durch Desoxyglucose unterdrückt werden.

Für die technische Durchführung der Versuche bedanken wir uns bei den Mitarbeitern der Anstalt, insbesondere der Abteilung für Genetik und Cytologie.

Literatur

Bachman, O., 1978: Verbreitung von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden bei Vitaceen. Vitis 17, 234—257.

— — und Blaich, R., 1979: Vorkommen und Eigenschaften kondensierter Tannine in Vitaceen. Vitis 18, 106—116.

Blackburn, E. V. and Timmons, C. J., 1969: The photocyclisation of stilbene analogues. Quart. Rev. Chem. Soc. 23, 482—503.

Drysdale, R. B., 1978: The elicitation of phytoalexin production. Ann. Appl. Biol. 89, 340—358.

Krefft, M., 1977: Einfluß von *Botrytis cinerea* auf Traubeninhaltsstoffe und Untersuchungen der extrazellulären Proteine. Diss. TU München, Fachber. Brauwesen, Lebensmitteltechnol. und Milchwiss.

Langcake, P., Cornford, C. A. and Pryce, R. J., 1979: Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. Phytochemistry 18, 1025—1027.

— — and McCarthy, W. V., 1979: The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. 18, 244—253.
— — and Pryce, R. J., 1976: The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. Physiol. Plant Pathol. 9, 77—86.
— — and — — , 1977: The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. Phytochemistry 16, 1193—1196.
Rupprich, N., Hildebrand, H. and Kindl, H. 1980: Substrate specificity in vivo and in vitro in the formation of stilbenes. Biosynthesis of rhaponticin. Arch. Biochem. Biophys. 199 (im Druck).
— — and Kindl, H. 1978: Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases. I. Enzymatic synthesis of 3,5,4'-trihydroxystilbene from p-coumaroyl coenzyme A malonyl coenzyme A. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 165—172.

Eingegangen am 15. 4. 1980

Priv.-Doz. Dr. R. Blaich
Dr. O. Bachmann
BFA für Rebenzüchtung Geilweilerhof
6741 Siebeldingen