

Vorkommen und Eigenschaften kondensierter Tannine in Vitaceen¹⁾

von

O. BACHMANN und R. BLAICH

Occurrence and properties of condensed tannins in Vitaceae

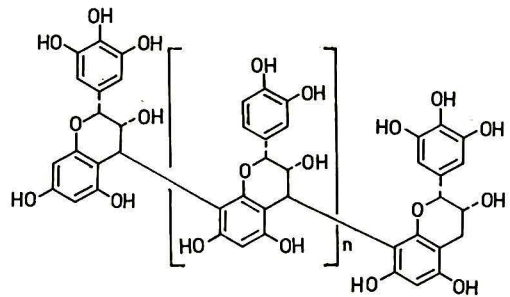
Summary. — Properties and amount of tannins in leaves of over 80 species and varieties of Vitaceae were investigated. Only condensed tannins were found, consisting mainly of cyanidine and delphinidine subunits. The prevailing molecular weight was around 4000, smaller oligomers are, however, present.

The tannins inactivate pectine methylesterases and other hydrolases of fungi by a reversible reaction with these enzymes. It could be shown that *Vitis* species known as fungus resistant contain more tannins (> 200 µg/g) than susceptible ones with generally < 50 µg/g fresh weight.

Einleitung

Die Untersuchung von Flavonolen und Phenolcarbonsäuren bei unterschiedlichen Rebsorten hatte keine Beziehung zwischen der Pilzresistenz von Rebenblättern und Art und Menge der darin vorhandenen Verbindungen erbracht (BACHMANN 1978). Deshalb wurden die Untersuchungen auf weitere Stoffgruppen ausgedehnt. Hier soll über die kondensierten Tannine berichtet werden.

Abb. 1: Kondensiertes Tannin, Strukturbeispiel.
Example for the structure of a condensed tannin.



Im Gegensatz zu den Gallus-Tanninen, welche Glukose-Ester von Gallussäuren darstellen, sind diese aus Leucocyanidin-Untereinheiten aufgebaut (Abb. 1). Kleinermolekulare Vorstufen werden auch Procyanidine genannt. Die kondensier-

¹⁾ Teil einer Dissertation von O. BACHMANN, Universität Karlsruhe 1978.

ten Tannine gehen durch Erhitzen mit Säure in Anthocyane über, allerdings nicht quantitativ. Da die Umsatzrate jedoch konstant bleibt, können kondensierte Tannine fotometrisch bestimmt werden. Bei der Rebe bestehen sie überwiegend aus Cyanidin- und Delphinidin-Untereinheiten (Catechol-Tannine).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß diese Verbindungen in den in der Pflanze vorliegenden Konzentrationen fungistatische Wirkungen aufweisen können, indem sie hydrolytische Enzyme immobilisieren, die beim Aufschluß der Pflanzenzellen durch den Pilzparasiten notwendig sind. Pilzresistente *Vitis*-Arten weisen gegenüber anfälligen in ihren Blättern meist einen um ein Vielfaches höheren Tanningehalt auf.

Material und Methoden

Herkunft, Kultur- und Aufarbeitungsbedingungen des verwendeten Pflanzenmaterials sind bereits bei BACHMANN (1978) beschrieben.

Zur Bestimmung der kondensierten Tannine aus den Flavonoid-Rohextrakten wurden aliquote Teile davon mit der 50fachen Menge n-Butanol mit 5 % HCl in verschlossenen Reagenzgläsern bei 100 °C 60 min lang erhitzt. Bei 540 nm war danach keine Extinktionszunahme mehr zu beobachten. Mit Cyanidin · HCl, das aus Quercetin synthetisiert worden war, ermittelte man eine Eichkurve. Die gemessenen Extinktionen der Proben wurden damit verglichen und der Gehalt der Probe als Cyanidin · HCl angegeben. Da Delphinidin in seiner Absorption bei 540 nm von Cyanidin kaum abweicht (Abb. 3 c), ist diese Bestimmung hinreichend genau.

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Celluloseplatten (Merck 5718). Fließmittel: Essigsäure/Salzsäure/Wasser

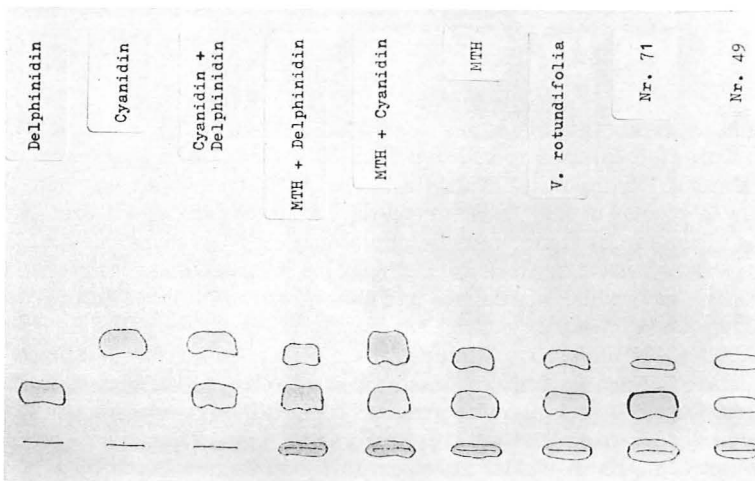


Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm von Tanninhydrolysaten aus Reben und Referenzsubstanzen.

Thin layer chromatogram of tannin hydrolysates of vines and reference substances.

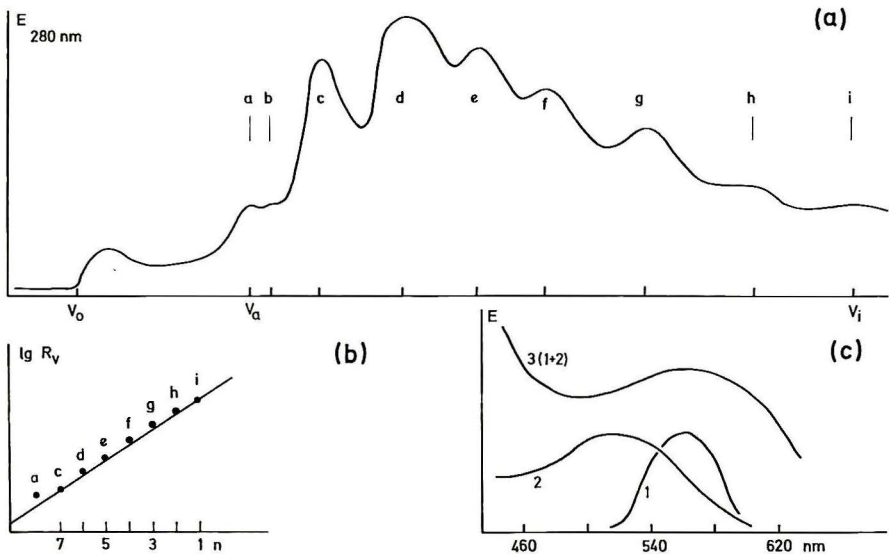


Abb. 3: a) Molekularsiebung eines Tanninrohextraktes auf Sephadex G 25. — b) Logarithmen der Elutionsvolumina der Gipfel c—i in gleichem Abstand aufgetragen; es resultiert annähernd eine Gerade. — c) Absorptionskurven einer Cyanidinlösung (1) einer Delphinidinlösung (2) und eines Hydrolysates von Reb-tannin (3).

a) Molecular sieving of a tannin extract on Sephadex G 25. — b) The logarithms of the elution volumina of peaks c—i are situated on a straight line, if having the same distance. — c) Absorption spectra of cyanidine (1), delphinidine (2) and hydrolysate of *Vitis* tannin (3).

(10/3/30). In dem HCl-sauren Fließmittel sind die Anthocyane stabil und lassen sie sich mit hoher Empfindlichkeit nachweisen.

Die präparative Isolierung von Reb-tanninen erfolgte nach einer modifizierten Methode von PORTER und SCHWARZ (1962). Das frische oder gefriergetrocknete Blattmaterial wurde mit der 30fachen Menge warmen 40 %igen Methanols (bezogen auf das Trockengewicht) im Mixer zerkleinert und 30 min gerührt. Die festen Bestandteile wurden dann abfiltriert oder -zentrifugiert, der Überstand im Rotationsverdampfer vom Methanol befreit, der dabei entstehende, wasserunlösliche Niederschlag abgetrennt und zum Überstand solange tropfenweise heiße, gesättigte Coffeinelösung (wässrig) zugegeben, bis das Tannin quantitativ ausgefallen war. Die Löslichkeit des Tannin-Coffein-Komplexes verringerte sich bei Abkühlung auf 0 °C. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 40 %igem Methanol aufgenommen. Diese Lösung engte man im Rotationsverdampfer auf etwa ein Drittel ein. Nun wurde das Coffein durch öfteres Ausschütteln mit Chloroform wieder abgetrennt, was zu Beginn durch die noch enthaltenen Verunreinigungen manchmal einige Schwierigkeiten bereiten konnte. Die wässrige Phase enthielt das Tannin und wurde lyophilisiert. Kleinmolekulare Anteile ließen sich durch Dialyse gegen 50 %iges Methanol abtrennen. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Molekularsiebung auf Sephadex G 25.

Die Kultur von *Botrytis cinerea* erfolgte in 1-l-Weithals-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nährlösung (30 g Saccharose/0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /2,0 g $NaNO_3$ /10 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ /0,5 g KCl/1,0 g Citrus-Pektin/1,0 g KH_2PO_4 auf 1000 ml dest. Wasser; pH-Wert mit Na_2CO_3 auf 5,5 eingestellt). Die Kulturgefäße wurden mit einer Sporensuspension beimpft, 10 d bei 22 °C gehalten und danach das Myzel abfiltriert. 10 Flaschen ergaben 550 ml Kulturfiltrat.

Zur Gewinnung des Rohenzym s wurde das klare Kulturfiltrat in der Kälte mit 20 % Aceton versetzt und das entstehende Sediment zentrifugiert. Das in Acetat-Puffer (pH 4,0) gelöste Sediment zeigte nur Spuren enzymatischer Aktivi-

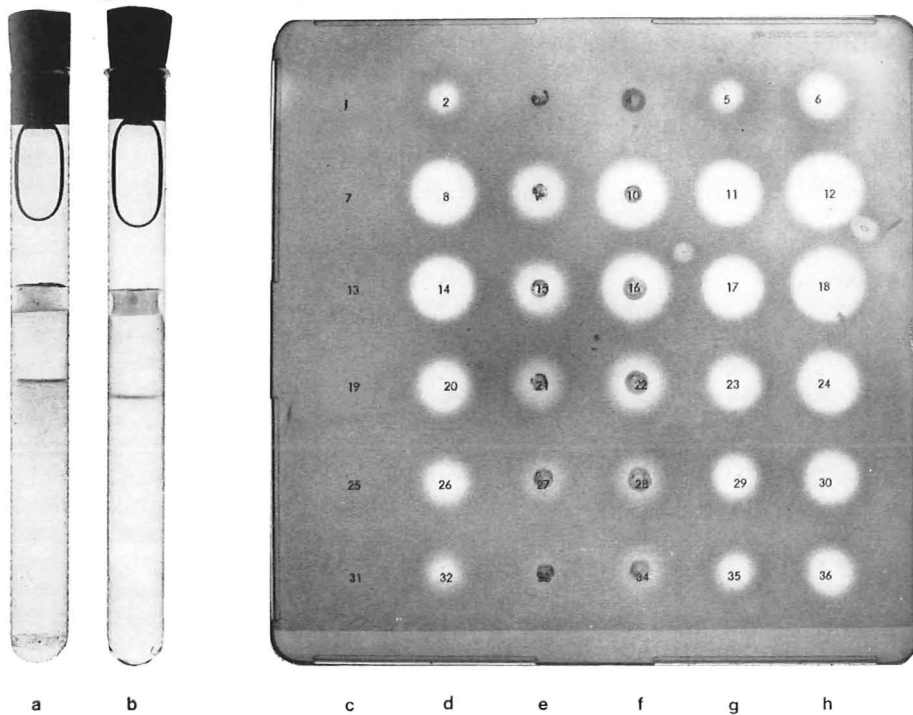


Abb. 4: a) Diskelektropherogramm eines Pektinase-Präparates aus *Botrytis cinerea*. Proteinfärbung mit Coomassie-Blau. — b) Esterasefärbung mit 1-Naphthylamid. — c—h) Pektinasentestplatte. Oberste Zeile *Botrytis*-Kulturmedium. — c) Kontrolle: Aqua dest. — d) Kontrolle: Pektinase-Verdünnungsreihe (Nr. 8 = 1, Nr. 14 = 0,5 usw.). — e) Wie d), aber mit Zusatz von gereinigtem Tannin aus *Vitis rotundifolia*; die Menge pro Testplättchen etwa der Konzentration im Blatt entsprechend. — f) Wie e), aber mit Zusatz von Blattextrakt. — g) Wie e), aber mit Blattextrakt einer *Vitis-vinifera*-Sorte. — h) Kontrolle: doppelte Enzymmenge wie bei d) in doppeltem Flüssigkeitsvolumen.

a) Disc electropherogram of a pectinase preparation of *Botrytis cinerea*. Protein staining with Coomassie blue. — b) Esterase-staining with 1-naphthylamide. — c—h) Plate test for pectinase activity. — First row: culture medium of *Botrytis cinerea*; other rows: enzyme dilutions. — c) Water control. — d) Control: pectinase dilutions (No. 8 = 1, No. 14 = 0,5, etc.). — e) Like d), but with purified tannin of *Vitis rotundifolia* added (amount according to its concentration in the leaf). — f) Like e), but with the corresponding amount of leaf extract. — g) Like e), but with leaf extract of a *Vitis vinifera* variety. — h) Control: like d) but with the twofold volume of enzyme.

tät. Der Pilz gab an sein Nährmedium Schleimstoffe ab, die zum Teil durch diese erste Acetonfällung abgetrennt werden konnten. Mit weiterem Aceton wurde der Überstand auf das doppelte Volumen gebracht, die dadurch ausgefallenen Substanzen wurden nach dem Abzentrifugieren in 50 ml Puffer aufgenommen und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die so gewonnene Rohenzymlösung diente ohne weitere Reinigung für die enzymatischen Tests. Zu Vergleichszwecken wurden auch technische pektinspaltende Enzyme (Pectinol aus *Aspergillus niger*, Röhm und Haas) für die Hemmversuche verwendet. Die technischen Enzyme sind aus einer Vielfalt von Proteinen zusammengesetzt, wie die Diskelektrophorese deutlich zeigt.

Das Enzympräparat aus *Botrytis cinerea* enthielt 3,8 mg Protein/ml (Protein-gehalt nach LOWRY *et al.* 1951) und ergab in der Diskelektrophorese nach Amidoschwarzfärbung eine scharfe Bande und geringfügig diffuse Farbvertiefung unter dem Sammelgel. Ob dieser Proteinbande eine enzymatische Aktivität zugeordnet werden kann, ist noch nicht klar (Abb. 4 a, b).

Die Diskelektrophorese der Proteine wurde nach den bei BLAICH (1978) in Anlehnung an STEWARD und BARBER (1964) dargestellten Verfahren ausgeführt.

Zur Proteinfärbung diente Amidoschwarz 10 B; bei höheren Anforderungen an die Empfindlichkeit der Färbung wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, der Nachweis von Esteraseaktivität in den Gelen erfolgte mit 1-Naphthylacetat als Substrat.

Zur Ermittlung der Pektinmethylesteraseaktivität in Extrakten wurde auf die modifizierte cup-plate-Methode von McCOMB und McCREADY (1958) zurückgegriffen:

In 1 n Natriumacetat-Puffer von pH 6,3 wurden 1 g Citrus-Pektin und 2 g Agar-Agar angeteigt, auf einem Wasserbad zum Schmelzen gebracht, und nach und nach insgesamt 100 ml Puffer zugegeben. Auftretende Klumpen gingen beim Autoklavieren in Lösung. Der Testboden wurde zu 5 mm dicken Platten ausgegossen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert. Nun tränkte man Filterpapierscheibchen von 5 mm ϕ mit Enzymlösung, legte diese auf den Testböden aus und inkubierte im Brutschrank bei 36 °C 10–20 h.

Nach Ablauf der Enzymreaktion wurde das Papierplättchen mit einer Pinzette entfernt, Hydroxylamin-HCl-Lösung (3,75 g auf 100 ml Wasser) aufgegeben und mit 2 n NaOH alkalisch gemacht. Nach 10 min goß man die Lauge ab und säuerte mit halb konzentrierter HCl an. Nun wurde der Agar mit Eisen-(III)-chlorid in 1 % wäßriger Lösung gefärbt. Stellen, an denen noch Estergruppierungen vorhanden waren, erschienen danach durch die Bildung von Hydroxamsäuren rot; Esteraseaktivität verhinderte die Färbung.

Der Durchmesser des farblosen Reaktionshofes ist dem Logarithmus der Enzymkonzentration proportional. Als „screening“ auf Pektinmethylesteraseaktivität ist dieses einfache und schnelle Schätzverfahren sehr gut geeignet.

Zur Bestimmung der Hemmwirkung von Rebenextrakten auf die *Botrytis*-Esterasen wurde das Filterplättchen zunächst mit Phenollösung getränkt; nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurden 10 μ l Rohenzym zugegeben. Eine Hemmung äußerte sich in einer Verkleinerung des farblosen Hofes um das Testplättchen. Dadurch waren halbquantitative Bestimmungen der verbleibenden Enzymaktivität möglich. Bei der Anordnung der Proben reihenweise auf rechteckigen Platten muß sich in jeder Reihe eine Blindprobe ohne Hemmstoffzusatz befinden, denn die konstante Dicke der Agar-Pektinschicht ist bei großen Platten nicht über die ganze Fläche gewährleistet. Die Größe der Hemmhöfe wurde mittels eines

Scanners fotometrisch bestimmt, die Restaktivität an Hand einer Eichkurve ermittelt und die Hemmwirkung in 4 Klassen eingeteilt (s. Tabelle 2).

Bei diesem Test wurde die Rotfärbung der Hydroxamsäuren immer von einer Reaktion der Phenole mit dem Eisen-(III)-Ion überlagert, diese blaugrüne Färbung war jedoch wenig störend und ließ sich gut differenzieren.

Ergebnisse und Diskussion

1. Struktur der Rebttannine

Die dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen der Rebextrakte zeigen, daß die Tannine der untersuchten Arten neben Spuren anderer Anthocyanidine hauptsächlich Cyanidin- und Delphinidin-Untereinheiten enthalten (Abb. 2). Die Flecken im Chromatogramm sind in Farbe und R_f -Wert mit denen von Vergleichssubstanzen identisch, außerdem kann das Absorptionsspektrum der Mischung durch Addition aus den Spektren der Einzelsubstanzen erhalten werden (Abb. 3 c). Das Verhältnis der beiden Anthocyane zeigt dabei artspezifische Unterschiede.

Im Laufe der präparativen Reinigung von Tanninfraktionen traten Stadien auf, die darauf hindeuten, daß in den Blättern nicht nur hochpolymere, nicht dialysierbare Tannine, sondern auch Oligomere vorliegen. In einem Fall konnte von der resistenten Sorte Sbl. 5-24-20 durch Gelfiltration auf Sephadex G 25 eine Fraktionierung erhalten werden, bei der eine gleichmäßige Abfolge von Peaks auftrat (Abb. 3 a). Wurde der Logarithmus des entsprechenden Elutionsvolumens in gleichmäßigem Abstand in ein Koordinatensystem eingetragen, so resultierte eine Gerade (Abb. 3 b), was die Annahme unterstützt, daß es sich hier um Oligomere handelt, die sich im Molekulargewicht jeweils um eine Einheit unterscheiden. Durch Dialyse ließen sie sich zum größten Teil entfernen, und man erhielt ein nach den chromatographischen Daten einheitliches Produkt mit einem Molekulargewicht um 4000. Dieser Wert stimmt mit den Angaben von RIBÉREAU-GAYON und GLORIES (1971) für Tannine aus

Tabelle 1

Beispiel für eine Reinigung von kondensiertem Tannin aus *Vitis rotundifolia*

Example for the purification of *Vitis rotundifolia* tannins

Vorhergegangener Reinigungsschritt	Trocken- gewicht	Absoluter Tanningehalt ¹⁾	Relativer Tanningehalt ²⁾
Trocknung der Blätter	11,3 g	861 mg ³⁾	2,5 % ³⁾
Extraktion mit 40 %igem Methanol	2,3 g	220 mg	10,4 %
Coffeinfällung des Rohextraktes, Ausschütteln mit Chloroform	74 mg	20,5 mg	27,7 %
Dialyse in 50 % igem Methanol	50 mg	17 mg	34,5 %
Molekularsiebung auf Sephadex G 25	34 mg	14 mg	43,5 %

¹⁾ Fotometrisch bestimmt, bezogen auf Cyanidin.

²⁾ Bezogen auf 100 %ige Umwandlung des Tannins in Anthocyanidine.

³⁾ Fotometrischer Wert durch Verunreinigungen zu hoch; nur zu Vergleichszwecken ermittelt.

Tabelle 2

Tanningehalt und Fähigkeit zur Pektinase-Inaktivierung eines Rohextraktes von Vitaceen-Blättern · Der Gehalt ist nach einer anderen Aufarbeitungsmethode (BACHMANN 1978) als in Tabelle 1 ermittelt · Die Stämme sind in der Reihenfolge ihres Tanningehaltes angeordnet und in 5 Klassen eingeteilt

Tannin content in leaves of some Vitacea and inactivation of pectinases by leaf extracts · Another preparation method (BACHMANN 1978) than in Table 1 has been used · The strains are arranged according to their content of tannin and divided into 5 classes

Klasse I																							
Stammnummer	35	78	83	61	62	65	60	59	70	55	45	23	86	82	39	73	63						
Tanningehalt	6	6	13	13	14	16	20	20	21	22	22	22	22	23	23	25	25						
Inaktivierung	0	0	0	0	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Klasse II																							
Stammnummer	38	16	75	79	40	74	66	67	1	15	77	89	87	76	18	13	84						
Tanningehalt	26	27	27	31	32	34	35	37	41	42	42	44	47	47	48	48	48						
Inaktivierung	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Klasse III																							
Stammnummer	14	11	32	30	6	21	41	36	43	22	37	51	34	27	20	69	25	10	64	3	4	33	85
Tanningehalt	53	53	55	60	60	62	63	67	69	78	78	81	82	83	84	87	87	90	90	93	96	97	99
Inaktivierung	0	0	++	+++	0	0	0	0	0	0	+++	++	++	0	+++	++	0	0	++	0	++	0	0
Klasse IV																							
Stammnummer	17	90	10	50	2	8	88	48															
Tanningehalt	108	118	128	141	144	145	167	195															
Inaktivierung	0	+	0	+	0	0	+	++															
Klasse V																							
Stammnummer	19	4	29	80	7	81	44	49	71	72													
Tanningehalt	213	223	225	249	249	264	270	324	331	393													
Inaktivierung	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++													

Klassen des Tanningehaltes:

- I = $\sqrt{\wedge}$ 25 µg Tannin/g Frischgewicht
 II = $\sqrt{\wedge}$ 50 µg Tannin/g Frischgewicht
 III = $\sqrt{\wedge}$ 100 µg Tannin/g Frischgewicht
 IV = $\sqrt{\wedge}$ 200 µg Tannin/g Frischgewicht
 V = $\sqrt{\wedge}$ 200 µg Tannin/g Frischgewicht

Grad der Inaktivierung:

- +++ = vollständig
 ++ = 60 %
 + = 30 %
 0 = keine.

Erläuterungen der Stammnummern

s. BACHMANN (1978; Tabelle 5).

Rotweinen überein. Mit steigender Lagerdauer erhöhen sich deren Molekulargewichte. Dies paßt zu unserer Beobachtung, daß im Verlaufe aller Aufarbeitungen die ausgefällten Tannine immer schwieriger wieder in Lösung zu bringen waren. Am Schluß mußte dazu 30 %iger Harnstoff benutzt werden. Aus diesem Grunde war auch die Ausbeute an weitgehend gereinigtem Tannin immer nur sehr gering (Tabelle 1).

2. Wirkung von Rebtanninen auf Enzyme

Im Kulturfiltrat von *Botrytis cinerea* sind eine ganze Reihe von Enzymen enthalten, welche der Pilz zum Aufschluß des Wirtsgewebes benötigt (Literatur bei JARVIS 1977). Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei die Gruppe der Pektinasen, die durch die Auflösung der Mittellamelle das Eindringen der Pilzhyphen ermöglichen. Sowohl an einem Pektinmethylesterase-Präparat aus *Botrytis cinerea* (Abb. 4 a) wie an käuflicher Pektinase (Roth) konnte gezeigt werden, daß Extrakte aus Blättern pilzresistenter Rebsorten diese Enzyme inaktivieren. Die Ursache dafür ist klar, da die Wirkung eines Rohextraktes deutlich mit seinem Gehalt an Tanninen zusammenhängt (Tab. 2) und dieselbe Wirkung auch von gereinigten Tanninen ausgeht (Abb. 4 b). Dabei handelt es sich nicht ausschließlich um unspezifische Gerbungseffekte, da nicht alle untersuchten Enzyme davon betroffen werden; z. B. werden Amylasen nicht beeinflusst, wohl aber andere Enzyme (BACHMANN und STORCK, in Vorbereitung). Von einer Abwehrfunktion der Tannine her wäre dies kein Nachteil für die Pflanze, da Stärke als Zellwandbaustein keine Rolle spielt.

Die Pektinmethylesterase von *Botrytis cinerea* wurde durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat angereichert. In der Diskelektrophorese stellte sie sich als einfache Bande dar (Abb. 4 a). Ob eine unspezifische Aktivität gegen 1-Naphthylamid, die sich im Gel an der gleichen Stelle befand, ebenfalls der Pektinmethylesterase zuzuschreiben war, blieb unklar. Nach BRUCHMANN (1976) hat dieses Enzym eine hohe Spezifität, es könnte sich in unserem Fall auch um eine Überlagerung handeln. Jedenfalls wurde auch die Naphthylesteraseaktivität durch Zusatz von Tannin zum Reaktionsgemisch gehemmt.

Nach GOLDSTEIN und SWAIN (1963) und HASLAM (1974) werden Enzyme durch Komplexbildung mit Tanninen zumindest teilweise unter Erhalt ihrer Aktivität ausgefällt und dadurch für den Pilz trotz vorhandener Aktivität praktisch nutzlos. Dabei bilden nach HASLAM (1974) die o-Dihydroxyphenylgruppen die reaktiven Zentren der Tanninmoleküle, während die Proteine über ihre Keto-Imidgruppen daran beteiligt sein dürften. Da diese bei verschiedenen Proteinen in unterschiedlichem Umfang zugänglich sind, wäre damit die unterschiedliche Empfindlichkeit der Enzyme gegen Tannine zu erklären. In diesem Zusammenhang ist es biologisch sinnvoll, daß Anthocyanase gegen Tannin völlig resistent ist (GOLDSTEIN und SWAIN 1963).

3. Tanningehalt verschiedener Rebsorten und -arten

Es wurden die meisten der bei BACHMANN (1978) angegebenen Arten und Sorten auf das Vorkommen kondensierter Tannine in ihren Blättern untersucht. Die festgestellten Mengen sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Man darf diese Daten nur als Relativwerte auffassen, da es bislang noch keine Methode gibt, um das gesamte Tannin in Lösung zu bringen (siehe auch HILL 1977).

Die Diskussion der Ergebnisse muß sich auf einige Beispiele beschränken. Extrakte der Klasse V ($>200 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht) wirkten stets stark bis völlig hemmend auf die Testenzyme, während bei Werten $<50 \mu\text{g/g}$ nur selten eine Inakti-

vierung auftrat. Bei mittleren Tanningehalten war die Hemmwirkung der Extrakte sehr unterschiedlich. Dies ließe sich durch die naheliegende Annahme erklären, daß die Pflanze noch andere Substanzen produziert, welche zusammen mit den Tanninen gegen Pilzenzyme wirksam sind. Ist sehr viel Tannin vorhanden, so wirkt der Extrakt auf alle Fälle hemmend. Bei mittleren und niedrigen Werten kommt die Hemmung nur zustande, wenn andere Wirkstoffe die Tannine unterstützen. Dabei handelt es sich allerdings nicht um Flavonolglycoside (BACHMANN 1978). Andererseits ist auch eine unterschiedliche Löslichkeit der Tannine verschiedener Arten in Betracht zu ziehen.

Von vielen *Vitis*-Arten, deren Extrakte sich als wirksam gegen Pektinasen erwiesen, ist aus der Literatur eine hohe Pilz- und oft ganz allgemein Parasitenresistenz bekannt. Hier seien z. B. die untersuchten *V.-rotundifolia*-Abkömmlinge, *V. labrusca* oder *V. smalliana (simpsonii)* erwähnt.

Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß Tannine in den Organen pilzresistenter Reben einen wesentlichen Beitrag zu dieser Resistenz leisten, so daß ihre Bestimmung sich als Teil eines Systems zur Frühdiagnose von Resistenzeigenschaften ausbauen lassen sollte. Aber auch weitere Aspekte dürfen nicht außer acht gelassen werden:

Botrytis cinerea übt seine Wirkung auf das Pflanzengewebe außer durch Enzyme auch über ein Toxin aus. Diese toxische Wirkung kann durch Zugabe von Rebtanninen gehemmt werden (STORCK, BACHMANN und BLAICH, in Vorbereitung). Die präzipitierende Wirkung macht sich aber auch bei der Analyse von Proteinen aus den Reben selbst bemerkbar. Ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen fallen Rebpoteine bei der Herstellung des Rohextraktes aus, so daß im Überstand nur noch wenig davon vorhanden ist (SCHAEFER 1969). Während man sich normalerweise bemüht, die verantwortlichen Tannine bei der Herstellung von Blattextrakten durch Zugabe von Nikotin (BRÜCKBAUER und RÜDEL 1971), Cinchoninsulfat (PERI und POMPEI 1971) oder Polyvinylpyrrolidon (bei der Weinherstellung) zu entfernen und so die Proteine in Lösung zu halten, kann man sie auch zunächst belassen, absichtlich zum Ausfällen der Rebpoteine benützen und diese aus dem unlöslichen Niederschlag durch Behandlung mit Coffein herauslösen (GEBBING 1968, WOLFE 1976). Die Bedeutung der untersuchten Substanzen geht allerdings noch weiter; denn die diskutierten Eigenschaften der Rebtannine machen sich auch beim Versuch bemerkbar, infektiöse Partikel aus viruskranken Reben zu isolieren bzw. Reben ohne die natürlichen Vektoren mit Virus zu infizieren (Literatur bei VETTEN 1977).

In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung interessant, daß sich in Rotweinen ein Virus-inaktivierendes Prinzip befindet (KONOWALCHUCK und SPEIRS 1976). Hier handelt es sich zweifellos um Gerbstoffe aus diesem Getränk (RIBÉREAU-GAYON 1971); in Weißwein, der keine derartige Aktivität aufweist, sind auch vergleichsweise wenig Tannine vorhanden. Im übrigen ist die Anwendung von Tanninen zur Bekämpfung von Virus- und Pilzkrankheiten im Weinbau auch bereits patentiert (KOKUREWICZ 1962). Sie sollen durch Wundheilung vorbeugend und außerdem kurativ wirken. Die hier vorgeschlagene Art der äußerlichen Anwendung hat sich offensichtlich nicht bewährt, was nicht zuletzt auf die relativ schmale Wissensbasis zu-

rückzuführen sein mag. Dem zugrundeliegenden Gedanken sollte man aber — übertragen auf pflanzeigene Abwehrkräfte — in Zukunft mehr Beachtung schenken, gerade im Hinblick auf die steigende Bedeutung der Virosen im Weinbau.

Zusammenfassung

Blattextrakte aus über 80 Sorten und Arten von Vitaceen wurden auf Art und Menge der darin vorhandenen Gerbstoffe untersucht. Es handelt sich dabei um kondensierte Tannine, die hauptsächlich aus Cyanidin- und Delphinidin-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Ihr Molekulargewicht liegt um 4000, es sind jedoch auch kleinere Oligomere (Procyanidine) vorhanden.

Die Tannine wirken auf Pektinmethylesterasen und andere Hydrolasen aus Pilzen inaktivierend. Dies beruht auf einer reversiblen Reaktion mit diesen Enzymen. Es zeigte sich, daß *Vitis*-Arten, die als pilzresistent gelten, eine relativ hohe Tanninkonzentration ($>200 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht) in ihren Blättern enthalten, während anfällige meist nur geringere Mengen ($<50 \mu\text{g/g}$) aufweisen.

Den Mitarbeitern der BFA für Rebenzüchtung, insbesondere Frau D. SCHNEIDER, Frau R. WELKER und Herrn R. WIND danken wir für ihre Mitarbeit an den vorliegenden Untersuchungen.

Literatur

- BACHMANN, O., 1978: Verbreitung von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden bei Vitaceen. *Vitis* 17, 234—257.
- BLAICH, R., 1978: Analytische Elektrophoreseverfahren. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
- BRUCHMANN, E.-E., 1976: Angewandte Biochemie. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- BRÜCKBAUER, H. und RÜDEL, M., 1971: Die Viruskrankheiten der Rebe. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- GEBBING, H., 1968: Über pflanzliche Polyphenoloxidasen. Diss. TH Karlsruhe.
- GOLDSTEIN, J. and SWAIN, T., 1963: Changes in tannins in ripening fruits, *Phytochemistry* 4, 185—192.
- HASLAM, E., 1974: Polyphenol-protein interactions. *Biochem. J.* 139, 285—288.
- HILL, G., 1977: Frühphase der Pathogenese von *Botrytis cinerea* auf unterschiedlichen Entwicklungsstadien vegetativer und generativer Organe von *Vitis vinifera* L. Diss. Univ. Gießen.
- JARVIS, W. R., 1977: Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture. Monograph No. 15.
- KOKUREWICZ, J., 1962: Tannic materials as fungicides. U.S. Patent 3060082.
- KONOWALCHUK, J. and SPEIRS, J. I., 1976: Virus inactivation by grapes and wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 757—763.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. and RANDALL, R. J., 1951: Protein measurement with the folin phenolreagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275.
- MCCOMB, E. A. and MCCREARY, R. M., 1958: Use of the hydroxamic acid reaction for determining pectinesterase activity. *Stain Techn.* 33, 129—131.
- PERI, C. and POMPEI, C., 1971: Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts. *Phytochemistry* 10, 2187—2189.
- PORTER, W. L. and SCHWARTZ, J. H., 1962: Isolation and description of the pectinase-inhibiting tannins of grape leaves. *J. Food Sci.* 27, 416—418.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et GLORIES, Y., 1971: Détermination de l'état de condensation des tannins du vin rouge. *C. R. Acad. Sci. Paris* 273 2369—2371.
- SCHAEFER, H., 1969: Untersuchungen zur Methodik der Extraktion und Disk-Elektrophorese der Blatteiweiße der Gattung *Vitis*. *Wein-Wiss.* 24, 205—232.
- STEWART, F. C. and BARBER, J. T., 1964: The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 225—231.

- VETTEN, H. J., 1977: Virushemmende Prinzipien in der Rebe (*Vitis vinifera* L.) und Versuche zu deren Ausschaltung bei der mechanischen Übertragung von Reboviren. Diss. Univ. Bonn.
- WOLFE, W. H., 1976: Identification of grape varieties by isoenzyme banding patterns. Amer. J. Enol. Viticult. 27, 68—73.

Eingegangen am 26. 1. 1979

Dr. O. BACHMANN
Priv.-Doz. Dr. R. BLAICH
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen