

Biologie der Schwarzfäule an Reben
und
potentielle Abwehrmechanismen bei der Europäischen
Wildrebe und verschiedenen resistenten Sorten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Christine Tisch

aus

Grünstadt

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Peter Nick

Korreferent: apl. Prof. Dr. Eva Zyprian

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Phytomedizin Weinbau des Dienstleistungszentrums Ländlicher Raum Rheinpfalz in Neustadt an der Weinstraße unter der Betreuung von Dr. A. Kortkamp in Zusammenarbeit mit dem Institut für Botanik I des Karlsruher Institut für Technologie unter der Leitung von Prof. Dr. P. Nick angefertigt.

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte im Rahmen des Projektes “Nutzung genetischer Ressourcen der Europäischen Wildrebe für die Züchtung von Mehltau- und Schwarzfäule-resistenten Reben“, das vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert wurde (Förderkennzeichen 2810OE113). An dem Projekt waren ebenfalls das Botanische Institut und der Botanische Garten des KIT Karlsruhe sowie das Julius-Kühn-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof als Kooperationspartner beteiligt.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Summary	2
2	Einleitung.....	4
2.1	Der Weinbau.....	4
2.2	Die Weinrebe.....	4
2.2.1	Rebsorten.....	5
2.2.2	Die Europäische Wildrebe.....	6
2.3	Krankheiten im Weinbau.....	7
2.3.1	Die Schwarzfäule.....	7
2.3.2	Der Falsche Mehltau.....	11
2.3.3	Der Echte Mehltau.....	12
2.4	Pflanzliche Abwehr	13
2.4.1	Präformierte Resistenzmechanismen.....	13
2.4.2	Postinfektionelle Resistenzmechanismen.....	14
2.4.3	Ontogenetische Resistenz.....	18
2.5	Ziele der Arbeit	19
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material	21
3.1.1	Pflanzenmaterial	21
3.1.2	Pathogene	22
3.2	Methoden.....	23
3.2.1	Anzucht und Kultur der Weinreben im Gewächshaus	23
3.2.2	Vermehrung und Erhalt der Pilze	23
3.2.3	Infektionen mit dem Erreger der Schwarzfäule.....	24
3.2.4	Resistenzscreening der Wildreben.....	26
3.2.5	Nährmedientests	28
3.2.6	Histologische Untersuchungen	30
3.2.7	Bestimmung der Phenolgehalte	33
3.2.8	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.9	Analyse der Zellwandzusammensetzung.....	39
3.2.10	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Resistenzscreening und Evaluierung der Europäischen Wildrebenakzessionen	41
4.1.1	Screening auf Resistenz gegen den Falschen Mehltau	41
4.1.2	Screening auf Resistenz gegen den Echten Mehltau	45
4.1.3	Screening auf Resistenz gegen die Schwarzfäule.....	47
4.2	Biologie von <i>P. ampellicida</i>	51
4.2.1	Frühe Entwicklungsstadien	51
4.2.2	Fortgeschrittene Entwicklungsstadien.....	54
4.2.3	Entstehung und Entwicklung von Pyknidien.....	56
4.2.4	Nachweis des translaminaren Wachstums.....	58
4.2.5	Untersuchungen zur Ernährungsweise	59

4.3	Entwicklung von <i>P. ampellicida</i> auf verschieden resistenten Genotypen.....	63
4.3.1	Vergleich der Anheftung von Pyknidiosporen	63
4.3.2	Vergleich der Appressorienbildung.....	64
4.3.3	Vergleich der Bildung und Entwicklung von Hyphen	65
4.3.4	Vergleich der fortgeschrittenen pilzlichen Entwicklung	68
4.4	Untersuchungen zur Abwehr der Rebe.....	70
4.4.1	Histologische Untersuchungen	70
4.4.2	Phenolische Inhaltsstoffe.....	79
4.4.3	Expressionsanalysen.....	94
4.4.4	Untersuchungen zur Rolle der Zellwandzusammensetzung in der Resistenz	99
4.4.5	Untersuchungen zu den Hintergründen der altersbedingten Resistenz - Pflanzenwachstum und Blattlängenzunahme verschiedener Rebgenotypen	108
5	Diskussion	111
5.1	Biologie und Ernährungsweise von <i>P. ampellicida</i>	111
5.2	Pektingehalt/-komplexität als Resistenzfaktor?.....	114
5.3	Mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der Schwarzfäule	117
5.3.1	Frühe Abwehrreaktionen	118
5.3.2	Zellwandverstärkungen	120
5.3.3	Abwehrassoziierte Proteine	123
5.4	Europäische Wildreben als Resistenzquellen?	125
5.5	Schlussfolgerung	129
5.6	Ausblick.....	131
6	Literatur.....	133
7	Anhang.....	145

Abkürzungsverzeichnis

dpi	englisch: “days post inoculation“, Anzahl Tage nach Inokulation
FC	Folin Ciocalteu
HPLC	englisch: „high performance liquid chromatography“
hpi	englisch: “hours post inoculation“, Anzahl Stunden nach Inokulation
‘M-Th’	Müller-Thurgau
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PGIP	englisch: “Polygalacturonase inhibiting protein“, Polygalacturonase inhibierendes Protein
STS	Stilbensynthase

1 Zusammenfassung

Die Schwarzfäule ist eine pilzliche Erkrankung der Weinrebe und wird durch den Erreger *Phyllosticta ampellicida* (Enkman) Van der Aa (*P. ampellicida*, telomorph: *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala und Ravaz) hervorgerufen. Die ursprünglich in Nordamerika beheimatete Krankheit, wurde im 19. Jahrhundert nach Europa eingeschleppt. Im Jahr 2002 erreichte die Schwarzfäule erstmalig auch in Deutschland wirtschaftliche Relevanz und hat sich in einigen für sie klimatisch begünstigten Regionen als Krankheit etabliert, die vor allem den Öko-Weinbau vor neue Herausforderungen stellt.

Nahezu alle der in Deutschland zugelassenen Kulturrebsorten der Art *Vitis vinifera* sind anfällig gegenüber *P. ampellicida*. Ableger der letzten Europäischen Wildrebenpopulation Deutschlands, die bis heute in den Rheinauenwäldern ohne Pflanzschutzapplikation überdauert haben, wurden in einem ersten Schritt hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber der Schwarzfäule getestet, um deren Eignung für die Züchtung pilzwiderstandsfähiger, besonders schwarzfäule-resistenter neuer Rebsorten zu prüfen. Die Wildreben zeigten eine große Variabilität hinsichtlich ihrer Anfälligkeit. Einige Akzessionen wiesen eine gewisse Teilresistenz auf, die vermutlich in einer früher eintretenden Altersresistenz begründet ist, denn nur wenige, sehr junge Blätter wiesen Symptome auf.

Zum besseren Verständnis des Pathogens wurde die Biologie von *P. ampellicida* näher analysiert. Mit Hilfe der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie wurde der asexuelle Infektionszyklus von der Anheftung der Sporen bis hin zur Bildung der Pyknidien auf Blättern der anfälligen Rebsorte ‘Müller-Thurgau’ (‘M-Th’) untersucht. Besonders charakteristisch für die Schwarzfäule ist das zweidimensionale Hyphenwachstum auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermis unterhalb der Kutikula, das die lange biotrophe Phase des Pathogens prägt. Erst im Übergang zur Nekrotrophie kolonisiert das Myzel weitere Zellschichten und bildet Pyknidien. Untersuchungen basierend auf einem Nährmedientest zeigten, dass *P. ampellicida* fähig ist, wesentliche Bestandteile der Zellwand zu degradieren und besonders Pektin für sein Wachstum zu nutzen.

Die grundlegenden Infektionsschritte von *P. ampellicida* wurden auf jungen (Blatt 4) und alten (Blatt 7) Blättern verschieden resistenter Genotypen (‘M-Th’ [anfällig], ‘Solaris’ [teilresistent], ‘Börner’ [resistent], drei Wildrebenakzessionen [teilresistent]) verglichen. Alte Blätter wiesen eine entwicklungsbedingte Resistenz, die sogenannte Altersresistenz auf. Es zeigte sich, dass zwar die oberflächlichen Entwicklungsstadien, wie die Sporenanheftung und Appressorienbildung nahezu unbeeinflusst von Genotyp und Blattalter waren, während jedoch die Hyphenentwicklung auf resistenten und teilresistenten Genotypen sowie alten Blättern eingeschränkt schien. Auf diesen Blättern wurden weniger Appressorien beobachtet, die in der Lage waren erfolgreich Hyphen zu etablieren, zudem waren die Hyphen kürzer und weniger stark verzweigt.

In mikroskopischen Untersuchungen zu verschiedenen Abwehrmechanismen konnten mehr Kalloseakkumulationen und Phenolanreicherungen in resistenten und teilresistenten Genotypen am Ort der Penetration nachgewiesen werden. Die erhöhten Transkriptmengen der Phenylalaninammoniumlyase und Stilbensynthase der Rebsorten 'Solaris' und 'Börner' nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule weisen darauf hin, dass phenolische Verbindungen, u.a. antifungal wirkende Stilbene, mögliche Aspekte der Schwarzfäuleresistenz darstellen. Teilweise wurden auch Superoxidanionen, die zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören und Reaktionen im Bereich der Penetrationsstelle, die vermutlich einer Alkalisierung des Apoplasten zugesprochen werden können, beobachtet. Hypersensitive Reaktionen wurden nicht detektiert. Die Ergebnisse verweisen allgemein hin auf eine basal verankerte Resistenz.

Erste Ergebnisse zur Monosaccharidkomposition der Zellwände lassen darauf schließen, dass möglicherweise auch geringere Pektinhalte sowie deren stärkere Verzweigung und eine damit möglicherweise verbundene schlechtere biologische Abbaubarkeit die Hyphenentwicklung von *P. ampellicida* nachteilig beeinflussen.

1.1 Summary

Black rot is a fungal disease on grapevine caused by the pathogen *Phyllosticta ampellicida* (Enkman) Van der Aa (*P. ampellicida*, telomorph: *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala and Ravaz). It is native to North America and was introduced to Europe in the 19th century. In 2002 black rot achieved economical relevance in Germany for the first time and became established in some regions where weather conditions are favourable. Predominantly, ecological viticulture is challenged by the disease.

Almost all the commercially used vine varieties cultured in Germany belong to the species *Vitis vinifera* and are therefore susceptible to *P. ampellicida*. Some of the European wild grapes still have survived until today in the floodplains of the river Rhein without any fungicide applications. Offshoots of these wild grapes have been screened for their resistance towards black rot to proof their suitability for breeding of new fungus-resistant, especially black rot resistant grape varieties. The European wild grapes showed a high degree of variability regarding resistance. Some exhibited a partial resistance that could be explained by a very pronounced age-related resistance. In comparison, only few and very young leaves showed typical symptoms.

To get a better understanding of this pathogen, the biology of black rot has been analysed. The asexual infection process beginning from the attachment of pycnidiospores up to the formation of pycnidia on leaves of the susceptible grape variety Müller-Thurgau has been observed with the aid of fluorescence and scanning electron microscopy. The two-dimensional hyphal network growing on anticlinal cell walls of the epidermis underneath the cuticle is characteristic for the pathogen and dominates the long lasting biotrophic phase of the fungus. The mycelium also colonises further cell layers when switching to necrotrophy and is able to form pycnidia. Based on a plate assay with distinct nutrient media, it was

shown that *P. ampellicida* can degrade all substantial cell wall ingredients. However, growth was best on media enriched with pectin.

The fundamental infection steps of *P. ampellicida* have been compared on young and old leaves of different resistant genotypes ('M-Th' [susceptible], 'Solaris' [partly resistant], 'Börner' [resistant], three wild grape accessions [partly resistant]). Old leaves already acquired ontogenetic resistance. Infection steps on the leaf surface, such as quantity of spore attachment and formation of appressoria, are not related to genotype and leaf age. Nevertheless, hyphal development was restricted on resistant and partly resistant genotypes and old leaves. Few appressoria were able to establish hyphae, moreover hyphae have been shorter and less branched.

An investigation of different resistance mechanisms exhibited an increased accumulation of callose and phenolic compounds in resistant and partly resistant genotypes at the site of penetration. Transcripts of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase accumulated to a higher amount in resistant and partly resistant grapevine cultivars after an inoculation with *P. ampellicida*. Results revealed that accumulations of phenolic substances and stilbens may play a role in black rot resistance. Partially also superoxidanions, belonging to the reactive oxygen species and reactions around the site of penetration, presumably indicating an alkalization of the apoplast have been observed. Hypersensitive reactions have been detected. The results refer to a basal resistance.

Preliminary results of monosaccharide analysis of cell walls indicate that also low pectin contents and highly-branched pectins impaired hyphal development of *P. ampellicida*.

2 Einleitung

2.1 Der Weinbau

Die Weinrebe gehört zu den ökonomisch wichtigsten Kulturpflanzen weltweit und dient hauptsächlich zur Produktion von Tafeltrauben, Rosinen aber vor allem Wein. Ihr Anbau ist aus klimatischen Gründen auf die gemäßigten Klimazonen zwischen dem 30. und 50. Breitengrad auf Nord- und Südhalbkugel limitiert, aber dennoch auf jedem Kontinent vertreten. Weltweit werden etwa 695000 t Trauben auf 7,5 Mio. ha Rebfläche geerntet, davon entfallen 26,5 Mio. hl auf die Weinproduktion (Schultz & Stoll, 2015). Deutschland ist mit 102000 ha Rebfläche und einer Weinproduktion von ca. 9 Mio. hl das zehntgrößte Weinerzeugerland (Schultz & Stoll, 2015). Seine Rebfläche erstreckt sich auf 13 Weinanbaugebiete, die zum größten Teil im Süden oder Südwesten Deutschlands liegen. Zu den größten Weinbaugebieten zählen Rheinhessen, die Pfalz und Baden.

Innerhalb der durch das Pflanzrecht begrenzten Rebenanbaufläche hat der Anteil an ökologisch bewirtschafteten Weinbergen in den letzten Jahren beständig Zuwachs erfahren und beträgt mit 7800 ha mittlerweile ca. 7,6 %; Tendenz steigend (Ministerium für Umwelt, 2014). 2014 wurden 65 % dieser Rebflächen allein in Rheinland-Pfalz bewirtschaftet, wodurch Rheinland-Pfalz als Nummer 1 der Öko-Weinbauländer zählt (Ministerium für Umwelt, 2014).

Die Spezialkultur Wein hat neben ihrer wirtschaftlichen Relevanz, auch eine große und vor allem lange kulturelle und traditionelle Bedeutung. Sie ist Teil der Lebensart und spielt selbst in der Religion eine Rolle. Der Weinbau prägt das Landschaftsbild ganzer Regionen, wodurch auch der Tourismus maßgeblich beeinflusst und gefördert wurde.

2.2 Die Weinrebe

Die Weinrebe gehört zur Familie der Weinrebengewächse (*Vitaceae*) und darunter untergeordnet zur Gattung *Vitis*, die sich in ca. 60 Arten, verteilt über Nordamerika, Asien und Europa, gliedert. Die eurasische Art *Vitis vinifera* kann dabei in drei Unterarten unterteilt werden. Es handelt sich dabei um die Wildarten *Vitis vinifera* ssp. *caucasica* Vav. und *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi von denen sich die heute kommerziell genutzte *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* ableitet. Weitere Wildreben, in erster Linie amerikanischen Ursprungs, wie *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. cinerea* und *V. berlandieri* werden dank ihrer Resistenzen gegenüber der Reblaus und pilzlichen Schaderregern wie dem Echten und Falschen Mehltau zur Züchtung reblausresistenter Unterlagen und pilzwiderstandsfähiger Rebsorten eingesetzt.

Die kultivierte Weinrebe *Vitis vinifera* L. ist im Gegensatz zu den Wildarten einhäusig (hermaphrodit) und hat einen doppelten Chromosomensatz mit jeweils 19 Chromosomen. Ihr Genom ist mit 475-500 Megabasenpaaren (Mb) vergleichsweise klein. 2007 wurde die genomische Sequenz der Weinrebe, genauer des hoch homozygoten Genotyps Spätburgunder, veröffentlicht (Jaillon et al., 2007, Velasco et

al., 2007). Dieser Kenntnisgewinn bietet der Forschung neu Möglichkeiten und erlaubt eine effizientere Züchtung neuer Rebsorten. Resistenzgene und deren Loci können somit auf Basis von Homologien zu Resistenzgenen anderer Pflanzen besser identifiziert werden.

2.2.1 Rebsorten

Nahezu alle Rebsorten, die weltweit zur Weinbereitung angebaut werden, gehören der Unterart *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* an. Sie wird häufig auch als Edle Weinrebe oder Europäerrebe bezeichnet und geht auf Wildreben zurück, die bereits ca. 6000 v. Chr. mit der Entwicklung der Hochkultur in Mesopotamien domestiziert und im Weiteren auf Ertrag und Qualität selektioniert wurden (Töpfer et al., 2011). Alle europäischen Rebsorten sind jedoch anfällig gegenüber der Reblaus und Pilzkrankheiten wie dem Echten und Falschen Mehltau und der Schwarzfäule, welche ursprünglich aus Nordamerika stammen. Amerikanische Wildarten sind gegenüber diesen Pathogenen weitestgehend resistent oder tolerant, da sie sich in einem evolutionären Prozess aneinander angepasst haben. Auch asiatische Arten, wie *Vitis amurensis*, tragen Resistenzen gegenüber dem Echten und Falschen Mehltau und werden züchterisch genutzt.

Sowohl die amerikanischen, als auch die asiatischen Wildreben können nicht für die Weinbereitung eingesetzt werden, da ihr Weingeschmack ungenießbar ist. Die Züchtung neuer pilzwiderstandsfähiger Rebsorten strebt daher eine Einkreuzung der Resistenzgene unter Beibehaltung der guten geschmacklichen Eigenschaften der Kulturreben an. Dieser Vorgang ist allerdings sehr zeitintensiv. Von der Kreuzung bis zur Markteinführung vergehen ca. 30 Jahre, wie der Werdegang der erfolgreichen Rotweinsorte Regent zeigte (Eibach & Töpfer, 2003). Durch die Entwicklung molekularer Marker, konnte der Züchtungsvorgang jedoch verkürzt und die Pyramidisierung bzw. Anreicherung verschiedener Resistenzgene ermöglicht werden, die eine schnelle Überwindung oder Brechen der Resistenz durch die Adaption der Erreger vermeiden soll (Eibach et al., 2007). Langfristig gesehen, ist die Resistenzzüchtung die vermutlich aussichtsreichste Perspektive zur Reduktion von Pflanzenschutzmitteln.

2.2.1.1 ‘Müller-Thurgau‘

Die Sorte Müller-Thurgau (*Vitis vinifera* cv. ‘Müller-Thurgau‘, ‘M-Th’) ist eine Kreuzung aus den Rebsorten ‘Weißer Riesling‘ und ‘Madeleine Royale‘ (Dettweiler et al., 2000). Sie wurde 1882, in der damaligen königlichen Lehranstalt für Obst-, Wein und Gartenbau in Geisenheim gezüchtet und später nach ihrem Züchter Prof. Dr. Hermann Müller, einem Schweizer aus dem Kanton Thurgau, benannt. Dieser ging 1890 an die Forschungsanstalt nach Wädenswil in die Schweiz und nahm seine Zucht aus Geisenheim mit, wo der Sämling mit der Nummer 58 selektiert und weiter vermehrt wurde. 1913 kam die Rebe von der Schweiz wieder nach Deutschland zurück und wurde vor allem im Zuge des Wiederaufbaus nach 1945 zunehmend angebaut. Heute nimmt sie mit 12761 ha fast 12 % der Rebfläche Deutschlands ein und ist nach Riesling die am häufigsten angebaute Sorte (Bundessortenamt, 2015).

Müller-Thurgau wurde bevorzugt angebaut, da die Sorte geringe Ansprüche an das Klima und den Standort hat, hohe Erträge bringt und sich durch einen gefälligen und unproblematischen Weintyp auszeichnet (Müller et al., 1999). Allerdings zeigt Müller-Thurgau eine mittlere bis hohe Anfälligkeit gegenüber den meisten Pilzkrankheiten (Eibach, 1994, Bundessortenamt, 2015)

2.2.1.2 'Solaris'

'Solaris' ist eine neu gezüchtete pilzwiderstandsfähige Weißweinsorte. Sie wurde 1975 von Norbert Becker am staatlichen Weinbauinstitut Freiburg aus den Eltern 'Merzling' und Gm 6493 (Geisenheim 6493) gekreuzt (Lott et al., 2010). Bei der Sorte 'Merzling' (Seyve-Villard 5276 x ('Riesling' x 'Grauer Burgunder')) handelt es sich ebenfalls um eine pilzwiderstandsfähige Neuzüchtung, die Erbgut amerikanischer Wildreben trägt. Der Elternteil Gm 6493 ist wiederum eine Kreuzung aus 'Zarya Severa', einem Abkömmling der asiatischen Wildrebe *Vitis amurensis* und der Kulturrebsorte 'Muskat Ottonel' (Lott et al., 2010).

Seit 2001 genießt 'Solaris' Sortenschutz und wurde 2004 in die Sortenliste aufgenommen. Sie zeichnet sich vor allem durch eine frühe Reife und hohe Mostgewichte aus (Bundessortenamt, 2015). Mittlerweile ist die Anbaufläche von 'Solaris' auf 120 ha deutschlandweit angewachsen, wobei als Hauptanbaugebiete Baden und die Pfalz zu nennen sind (Bundessortenamt, 2015). Ihre Pilzwiderstandsfähigkeit bezieht sich in erster Linie auf den Falschen und Echten Mehltau (Bundessortenamt, 2015). Für den Elternteil 'Merzling' wurde 2004 keine Anfälligkeit gegenüber der Schwarzfäule im Freiland beobachtet und 'Solaris' selbst wurde anhand von Gewächshausversuchen als gering anfällig eingestuft (Loskill et al., 2009). Allerdings wurde aus der Schweiz bereits von einem Schwarzfäulebefall der Sorte berichtet (Jermini et al., 2009).

2.2.1.3 'Börner'

Die Sorte 'Börner' ist eine im Jahr 1935 von Dr. Carl 'Börner' gekreuzte Unterlagsrebsorte zur Bekämpfung der Reblaus und geht aus den amerikanischen Wildreben *Vitis riparia* 183 Geisenheim und *Vitis cinerea* Arnold hervor. Helmut Becker setzte nach dem Ende des zweiten Weltkriegs die Selektion und weitere Prüfung der von Carl 'Börner' gekreuzten Sämlinge fort. 1982 konnte die Sorte beim Bundessortenamt zum Sortenschutz angemeldet werden und erhielt ihrem Züchter zu Ehren den Namen 'Börner'. Seit 1989 ist sie zugelassen und geschützt. 'Börner' ist die erste reblausresistente Unterlagsrebsorte.

Laut Demaree et al. (1937) ist der Elternteil *Vitis riparia* resistent gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule. Rex (2012) stufte die Arthybride 'Börner' ebenfalls als schwarzfäule-resistent ein.

2.2.2 Die Europäische Wildrebe

Die Europäische Wildrebe *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* C. C. Gmel. ist die Wildform der Kulturrebe und in Deutschland stark vom Aussterben bedroht. Ursprünglich besiedelte sie viele verschiedene

Habitats, wurde aber hauptsächlich durch die Einschleppung der Reblaus, aber auch des Echten und Flaschen Mehltaus in den letzten 150 Jahren stark dezimiert und verdrängt (Arnold et al., 2005). Heute findet man sie in Deutschland ausschließlich in Auenwäldern am Oberrhein, aber auch hier wurde sie durch die Rheinbegradigung und den Kahlschlag der Wälder gefährdet (Werneck, 1955). Zurzeit sind in Deutschland fünf Gebiete mit Beständen spontaner Wildrebenpopulationen bekannt, wobei nur das Gebiet auf der Halbinsel Ketsch mit 82 Individuen (Stand 2013) eine größere und überlebensfähige Population beherbergt (Ledesma-Krist et al., 2015). Zur Rettung und Erhaltung der Wildreben in Deutschland begann im Jahr 2008 das Projekt „Überlebenssicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezielte *in situ*-Erhaltung“, in welchem gezielt Wildreben *ex situ* vermehrt und wieder ausgepflanzt wurden. Im Rahmen dieses Projektes wurde die Wildrebenpopulation sowohl morphologisch über ampelografische Untersuchungen zu Form und Größe von Blättern, Trauben, Samen etc. als auch genetisch charakterisiert. Die molekulargenetische Untersuchung diente zur Feststellung der Reinheit bzw. Einkreuzung von Kultur- oder Unterlagsreben, der genetischen Vielfalt und dem Nachweis von internen Verwandtschaftsverhältnissen und wurde mit Hilfe von 36 Mikrosatellitenmarkern (SSRs = simple sequence repeats) realisiert (Ledesma-Krist et al., 2013, Ledesma-Krist et al., 2015).

In weiterführenden Arbeiten wurden einzelne Akzessionen der Wildrebenpopulation der Halbinsel Ketsch, der Halbinsel Reiss bei Mannheim und einzelner Wildreben aus den Gebieten des Oberrheins bezüglich ihrer Resistenzeigenschaften gegenüber dem Echten und Falschen Mehltau und der Schwarzfäule getestet (Schröder et al., 2015, Schröder & Kortekamp, 2010, Rehn, 2011). Im Vergleich zu anfälligen Kulturreben, zeigten einige der Wildrebenakzessionen erhöhte Resistenzlevel gegenüber den Pathogenen und werden als potentielle Quellen neuer Resistenzen gesehen.

2.3 Krankheiten im Weinbau

2.3.1 Die Schwarzfäule

Die Schwarzfäule an Weinreben wird durch den Erreger *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala und Ravaz, Nebenfruchtform *Phyllosticta ampellicida* (Enkman) Van der Aa, hervorgerufen. Aktuell wird sie der Familie *Botryosphaeriaceae* zugeordnet (Schoch et al., 2006, Wikee et al., 2013) und gehört der Abteilung der Ascomycota an.

Die Krankheit stammt ursprünglich aus Nordamerika und wurde vermutlich durch den Transfer von Vermehrungsmaterial in andere Länder eingeschleppt (Ramsdell & Milholland, 1988). In Europa trat die Schwarzfäule erstmals 1885 in Frankreich auf (Pezet & Jermini, 1989) und ist heute hauptsächlich in Gebieten Frankreichs, Italiens und der Schweiz verbreitet, die sich durch hohe Niederschläge im Frühjahr und Sommer auszeichnen (Jermini et al., 2009, Jermini & Gessler, 1996). Im Jahr 2002 wurde erstmalig in Deutschland ein wirtschaftlich bedeutender Schwarzfäulebefall in den Anbaugebieten Nahe und Mosel festgestellt (Holz, 2003). Im Folgejahr 2003 war die Krankheit bereits in den meisten

Gemarkungen der Weinanbaugebiete Nahe, Mittelrhein und Mosel vertreten (Lipps & Harms, 2004), der bislang stärkste Schwarzfäulebefall wurde jedoch im Jahr 2004 beobachtet (Loskill & Molitor, 2008). Molitor et al. (2010) stellten 2010 in einem Rückblick fest, dass vor allem durch die Beseitigung von Drieschflächen, in denen der Pilz sich ungehindert vermehren konnte, in den folgenden Jahren extreme Befallsereignisse vermieden werden konnten. Jedoch hat sich die Schwarzfäule in einigen Regionen neben dem Echten und Falschen Mehltau und der Graufäule als viert wichtigste Pilzkrankheit der Rebe etabliert (Molitor et al., 2010).

Der Erreger der Schwarzfäule ist in der Lage alle jungen, neu zugewachsenen Pflanzenteile wie Blätter, Blattstiele, Triebe, Ranken und Blütenstängel zu befallen (Ramsdell & Milholland, 1988, Kuo & Hoch, 1996b). Erste Infektionen treten meist an Blättern auf. Zwei bis drei Wochen nach Infektion bilden sich runde teilweise auch polygonale braune Flecken, die sich durch einen dunkelbraunen Rand klar vom übrigen Gewebe abgrenzen (Abb. 1 A). Innerhalb dieser Blattflecken bilden sich, zumeist kreisförmig angeordnete, schwarze punktförmige Pyknidien (Abb. 1 B), welche als Sporenträger größere Mengen an Pyknidiosporen beinhalten. An Triebachsen, Blattstielen und Stielgerüsten entstehen längliche dunkle eingesunkene Läsionen, die ebenfalls Pyknidien hervorbringen (Abb. 1 C). Direkte Infektionen von Beeren sind mit dem Abwerfen der Blütenköpchen möglich. Zunächst erscheint ein kleiner heller Punkt, um den sich ein rötlich brauner Ring bildet, der sich konzentrisch über die Beere ausbreitet (Abb. 1 D). Innerhalb weniger Tage schrumpfen und schrumpeln die Beeren schließlich zu harten blauschwarzen sogenannten Frucht mumien zusammen, die neben Pyknidien auch Perithezien, die sexuell gebildeten Fruchtkörper, tragen (Loskill et al., 2009).

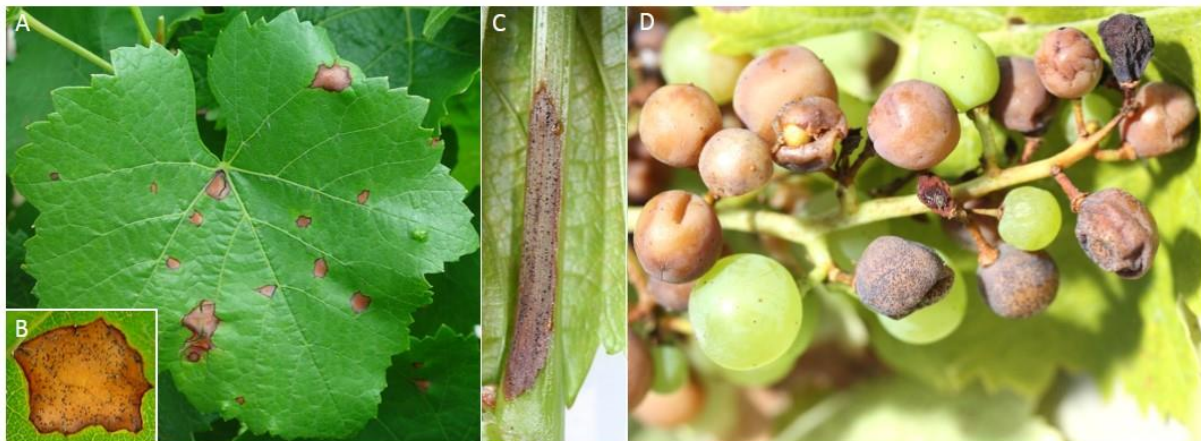


Abbildung 1. Typische Symptome der Schwarzfäule an Blättern (A) mit charakteristisch ringförmiger Anordnung der Pyknidien (B), an Blattstielen (C) und Beeren in unterschiedlich fortgeschrittenen Entwicklungsstadien (D), Fotos: R. Rueff.

In Abbildung 2 ist der asexuelle und sexuelle Infektionszyklus des Erregers der Schwarzfäule nach Ramsdell und Milholland (1988) beschrieben. Grundlegend werden dabei zwei verschiedene Sporenarten unterschieden. Sexuell gebildete Sporen werden als Ascosporen bezeichnet und entstehen in Perithezien, während die asexuell gebildeten Konidien, auch Pyknidiosporen genannt, sich in großer Zahl in Pyknidien entwickeln und für die epidemische Ausbreitung des Pilzes verantwortlich sind.

Der Erreger überwintert meist in Fruchtmumien, entweder am Boden liegend oder im Rebstock verbleibend (Ramsdell & Milholland, 1988). Im Frühjahr reifen die Ascosporen aus und werden schon bei geringen Niederschlägen (0,3 mm) ausgestoßen (Ferrin & Ramsdell, 1977). Loskill et al. (2009) konnten jedoch in umfangreichen Studien in Deutschland zeigen, dass im Frühjahr zunächst Pyknidien und die darin enthaltenen Konidien gebildet werden und die in Perithezien gebildeten Ascosporen erst später in der Saison eine größere Rolle spielen.

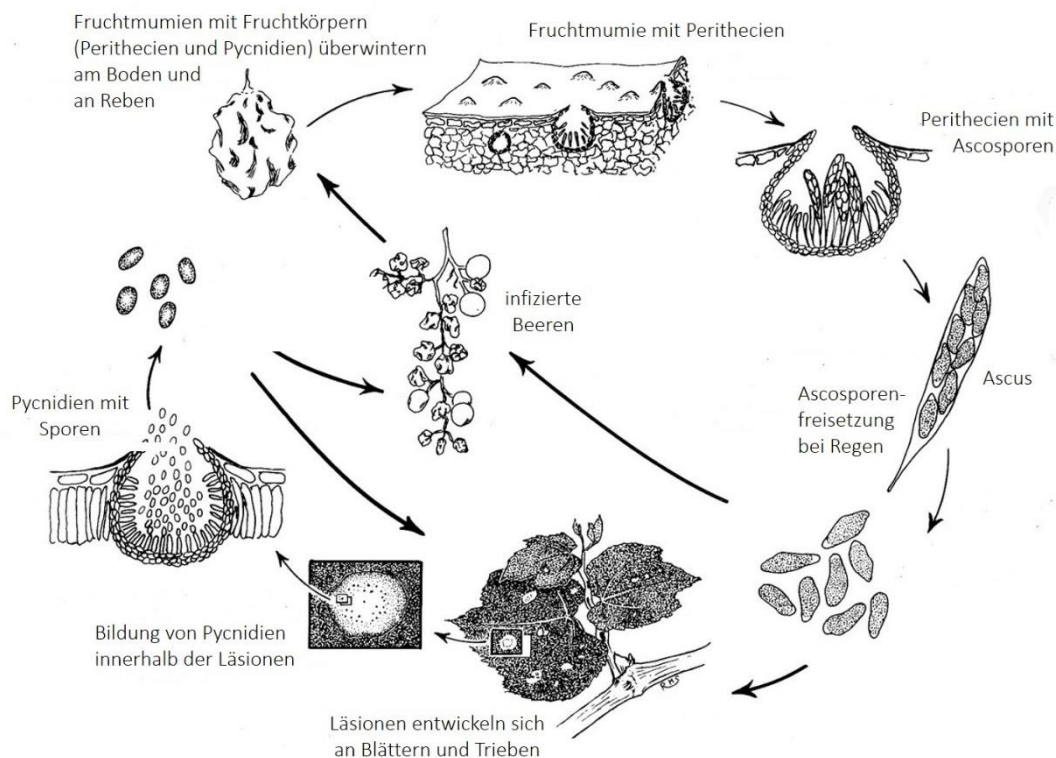


Abbildung 2. Sexueller und asexueller Lebenszyklus des Erregers der Schwarzfäule (nach Ramsdell und Milholland (1988), verändert).

Die Verbreitung der Ascosporen erfolgt mit dem Wind (Ferrin & Ramsdell, 1977), während die Pyknidiosporen weitestgehend über Wasser übertragen werden (Ferrin & Ramsdell, 1978). Erste Infektionen können bereits mit dem Knospenausbruch erfolgen (Molitor et al., 2010). Der Befall von Blättern, Blattstielen und Trieben ist dabei selten direkt ertragsrelevant, jedoch dient er als Inokulumquelle für weitere Epidemien und wirtschaftlich bedeutende Infektionen an Beeren. Die auf den nekrotischen Symptomflecken entstehenden Pyknidien enthalten große Mengen an Pyknidiosporen, die ebenfalls schon bei geringen Niederschlagsmengen ($< 0,25$ cm) freigesetzt werden (Ferrin & Ramsdell, 1978). Die Pyknidiosporen brauchen ähnlich wie die Ascosporen lange Nässephasen zum Anheften und Auskeimen, wobei die Nässedauer von der Temperatur abhängig ist. Im Allgemeinen gilt, je höher die Temperatur, desto kürzer ist die erforderliche Nässedauer, welche jedoch mindestens sechs Stunden beträgt (Molitor et al., 2010, Spotts, 1977).

Die Inkubationszeit der Schwarzfäule ist im Vergleich zu anderen Erregern, wie dem Falschen Mehltau, außergewöhnlich lang. Sie beträgt in der Regel mindestens zehn Tage, meist aber mehr, in Abhängigkeit

der Witterungsbedingungen (Molitor et al., 2010, Ferrin & Ramsdell, 1977, Spotts, 1977, Spotts, 1980) und dem phänologischen Entwicklungsstadium (Molitor & Berkelmann-Loehnertz, 2011, Hoffman & Wilcox, 2002).

Durch die Schwarzfäule hervorgerufener Blattbefall ist in der Regel keine direkte Bedrohung für die Rebe oder ertragsrelevant (Mohr & Herrmann, 2005). Befallene Beeren können hingegen die Weinqualität beeinträchtigen und zu Ertragseinbußen bis hin zum Totalausfall führen. Der Befallsdruck baut sich in der Regel über mehrere Jahre im Bestand auf. An Mosel und Nahe wird vor allem ein Zusammenhang mit den verwilderten, nicht mehr bewirtschafteten Weinbergen, den sogenannten Drieschen gesehen, die als Inokulumquelle dienen (Lipps & Harms, 2004).

Zu Beginn des Infektionsprozesses sinken die Sporen im Wasser ab und lagern sich an die Kutikula der Rebe an (Kuo & Hoch, 1995). Nach erfolgreicher Anheftung der Pyknidiosporen, welche Grundvoraussetzung für die weitere Entwicklung des Erregers ist, keimen die Sporen meist schon innerhalb einer Stunde aus (Kuo & Hoch, 1995, Kuo & Hoch, 1996a). Kuo und Hoch (1996a) haben die Umstände der Sporenanheftung genauer untersucht und fanden heraus, dass sich die Sporen von *P. ampellicida* am besten an schlecht benetzbare hydrophobe Oberflächen wie Rebblätter aber auch artifizielle Oberflächen wie Polystyrol oder Teflon anheften. Auch das Vorhandensein von freiem Ca^{2+} scheint sowohl für die Keimung als auch die Appressorienbildung essentiell zu sein (Shaw & Hoch, 2000). Sobald der Keimschlauch ausdifferenziert ist, wandert das Cytoplasma aus der Pyknidiospore in den Keimschlauch um eine mitotische Kernteilung zu durchlaufen (Shaw et al., 1998). Einer der vier Kerne verbleibt in der Pyknidiospore, während drei der Kerne in das sich am apikalen Ende des Keimschlauch entwickelnde Appressorium übergehen (Shaw et al., 1998). Anschließend bildet sich ein Septum, das die Pyknidiospore und den Keimschlauch vom Appressorium trennt (Shaw et al., 1998). In ihrem Reifeprozess lagern die Appressorien Melanin ein, das ihnen die schwarze Farbe, aber vor allem Festigkeit verleiht. Ca. zwei Tage nach Infektion sind die ersten Hyphen sichtbar, die zunehmend wachsen und sich verzweigen, um ein dichtes Hyphennetz zu bilden (Kuo & Hoch, 1996b, Ullrich et al., 2009). Die Hyphen entwickeln sich dabei ausschließlich subkutikulär zwischen Epidermis und Kutikula auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermiszellen, ein typisches Hyphenwachstum für die Schwarzfäule (Kuo & Hoch, 1996b, Ullrich et al., 2009). Zu späteren Zeitpunkten zeigten sich laterale Hyphenverzweigungen auf den periklinalen Zellwänden der Epidermis, die jedoch nicht oder sehr selten in der Lage waren diese zu überwachsen (Kuo & Hoch, 1996b, Ullrich et al., 2009).

Kurz vor Sichtbarwerden der Symptome kollabieren die Zellen in den kolonisierten Bereichen und der hemibiotrophe Erreger wechselt von der biotrophen in die nekrotrophe Phase (Kuo & Hoch, 1996b). Erste erkennbare Anzeichen für eine Schwarzfäuleinfektion sind kleine matte leicht erhobene Flecken, die sich kurze Zeit später zu den typischen nekrotisch braunen Läsionen weiterentwickeln (Kuo & Hoch, 1996b).

Zur Bekämpfung der Schwarzfäule können sowohl direkte als auch indirekte Maßnahmen Anwendung finden. Indirekte Kulturmaßnahmen bilden die Grundlage eines erfolgreichen Bekämpfungsmanagements und umfassen beispielsweise das Entfernen von Fruchtummien, eine luftige Erziehung und termingerechte Laubarbeiten für ein schnelleres Abtrocknen des Blattwerks (Mohr & Herrmann, 2005). Außerdem sollten ausschließlich sorgfältig kompostierte Trester bzw. Trester aus befallsfreien Anlagen in den Weinberg eingebracht werden (Mohr & Herrmann, 2005). Die direkte Schwarzfäulebekämpfung stellt in konventionell wirtschaftenden Betrieben meist eine untergeordnete Rolle dar, da sie in der Regel bei der Bekämpfung des Echten- und Falschen Mehltaus miteingefasst wird. Pflanzenschutzmittel mit Wirkstoffen der Fungizidgruppen Strobilurine, Triazole und Dithiocarbamate haben sich als wirksam gegenüber der Schwarzfäule herausgestellt (Molitor & Beyer, 2014), Vertreter der beiden erstgenannten Gruppen sollen sogar eine kurative Wirkung besitzen (Molitor, 2009). Problematisch ist die Schwarzfäule vor allem im ökologischen Anbau, da hier kaum alternative Bekämpfungsmaßnahmen zur Verfügung stehen. Einzig ein kombinierter Einsatz von Schwefel und Kupfer zeigte gute Wirkung gegen Blatt- und Traubeninfektionen, wobei Kupfer allein weniger wirksam war als Schwefel (Loskill & Molitor, 2008). Es wird jedoch empfohlen bei Neupflanzungen in schwarzfäulegefährdeten Regionen Sorten mit reduzierter Anfälligkeit anzupflanzen. Auch indirekte Kulturmaßnahmen sind elementarer Bestandteil im ökologischen Anbau (Molitor & Beyer, 2014).

Untersuchungen hinsichtlich des Resistenzverhaltens bzw. der Abwehrmechanismen gegenüber der Schwarzfäule gibt es kaum. Dhekney et al. (2011) konnten zeigen, dass anfällige Reben, die durch einen cis-genetischen Ansatz thaumatinähnliche Proteine (thaumatin-like proteins) konstitutiv exprimierten, eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber der Schwarzfäule aufwiesen. Thaumatinähnliche Proteine, aber auch Chitinasen schränkten den Erreger auch bei *in vitro* Tests in seinem Wachstum ein und es wird vermutet, dass die Akkumulation dieser Proteine und die zunehmende Anreicherung von Zuckern im Reifeprozess zur altersbedingten Resistenz von Weinbeeren gegenüber verschiedenen Pathogenen, wie der Schwarzfäule beitragen (Salzman et al., 1998).

2.3.2 Der Falsche Mehltau

Plasmopara viticola (Berk. & Curt) Berl. & de Toni (*P. viticola*) ist der Erreger des Falschen Mehltaus an Reben und gehört im Gegensatz zur Schwarzfäule und zum Echten Mehltau zur Abteilung der Oomycota. Er ist ein obligat biotropher Endoparasit, der über Stomata ins pflanzliche Gewebe eindringt. Bis zur erneuten Sporulation vergehen oft nur wenige Tage, die Inkubationszeit ist vergleichsweise kurz und kann sich je nach Witterung auf bis zu vier Tage verkürzen, wodurch er ein hohes epidemisches Potential birgt.

Im Jahr 1878 wurde der Falsche Mehltau aus Nordamerika eingeschleppt und ist grundsätzlich in der Lage alle Rebsorten der Art *Vitis vinifera* zu befallen (Lafon & Clerjeau, 1988). Da der Pilz für seine Vermehrung auf eine hohe Luftfeuchte oder andauernde Blattnässe angewiesen ist, hat er sich vor allem in den feucht warmen Weinanbaugebieten Mitteleuropas verbreitet, wo er als gefährlichste

Rebenkrankheit gilt (Mohr & Herrmann, 2005). Früher und starker Befall zur Reblüte kann sehr anfällige Sorten völlig entlauben und damit zu erheblichen Ernteausfällen führen. Bei Infektionen zu späteren Zeitpunkten werden die Trauben in der Regel nicht mehr befallen, jedoch vermindert sich die Weinqualität durch die unzureichende Assimilationsfläche und der damit verringerten Zuckereinlagerung in die Beeren.

Zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus können vorbeugende Kulturmaßnahmen wie Laubarbeiten ergriffen werden, die ein schnelles Abtrocknen der Laubwand gewährleisten (Mohr & Herrmann, 2005). Mittlerweile sind auch einige pilzwiderstandsfähige Neuzüchtungen wie 'Regent' oder 'Solaris' erhältlich, die durch ihre geringere Anfälligkeit die Bekämpfung minimieren. Sowohl im ökologischen, als auch im konventionellen Anbau werden erfolgreich Kupferpräparate mit Kontaktwirkung eingesetzt. Dem konventionellen Anbau stehen zusätzlich Fungizide zur Verfügung, die teilweise auch systemische Tiefenwirkung zeigen.

2.3.3 Der Echte Mehltau

Der Echte Mehltau der Weinrebe, verursacht durch den Erreger *Erysiphe necator* Schwein. (Nebenfruchtform *Oidium tuckeri* Berk.) wurde Anfang des 19. Jahrhunderts aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt (Pearson, 1988). Er gehört zu den weltweit bedeutendsten Krankheiten an Reben. Der Pilz ist in der Lage alle grünen Pflanzenteile zu befallen, wobei die Beeren mit zunehmender Reife an Anfälligkeit verlieren. Die kritischste Phase für Mehltauinfektionen ist während und nach der Reblüte. Betroffene Blätter und Triebe beeinträchtigen die Assimilation, das größte Schadpotential geht allerdings von befallenen Beeren aus, die aufplatzen und anschließend von Sekundärparasiten wie Essigbakterien oder Fäulniserreger besiedelt werden (Mohr & Herrmann, 2005). Dies führt sowohl zu quantitativen, als auch zu erheblichen qualitativen Einbußen, durch die Beeinträchtigung der Weinqualität.

Erysiphe necator (*E. necator*) gehört zur Abteilung der Ascomycota und ist ein obligat biotropher Ektoparasit, der Kutikula und Epidermiszellen penetriert. Er bevorzugt Temperaturen um die 20 bis 27 °C und hohe Luftfeuchten, aber keine direkte Nässe (Pearson, 1988). Daher beugen Kulturmaßnahmen, die eine bessere Durchlüftung und Abtrocknung der Laubwand ermöglichen und die Widerstandsfähigkeit der Beerenhaut fördern, Mehltauinfektionen vor. Im ökologischen Weinbau kommen vor allem Netzschwefel und Kupferpräparate zum Einsatz. Dem konventionellen Anbau stehen ebenfalls Fungizide organisch-chemischer Wirkstoffgruppen zur Verfügung, deren Spritzfolge und -abstände von Witterung und Befallsdruck bestimmt werden.

2.4 Pflanzliche Abwehr

Pflanzen können weder vor Pathogenen flüchten, noch besitzen sie ein adaptives Immunsystem mit mobilen Abwehrzellen wie Menschen und Tiere. Sie haben jedoch verschiedene Barrieren und Abwehrmechanismen entwickelt, die in der Lage sind sie zu schützen.

Einen passiven Schutz bieten sogenannte präformierte Resistenzmechanismen, wie beispielsweise Wachsauflagerungen oder antimikrobielle Verbindungen, die pathogen-unspezifisch sind (Dangl & Jones, 2001). Pflanzen reagieren jedoch auch aktiv auf Pathogenbefall. Jones und Dangl (2006) haben die Funktionsweise des pflanzlichen Immunsystems bzw. das coevolutionäre Zusammenspiel zwischen Pflanze und Pathogen in einem Modell vereinfacht zusammengefasst: Bei dem Versuch eines Pathogens eine Pflanze zu befallen, werden Elicitoren im Apoplasten freigesetzt und von der Pflanze durch Rezeptoren erkannt. Diese Elicitoren sind pathogenassoziierte Moleküle (PAMP = pathogen-associated molecular pattern) wie beispielsweise pilzliches Chitin oder Flaggelin aus Bakterien, aber auch Strukturmotive wie eine bestimmte Abfolge von Zuckern oder Zellwandkomponenten (Hückelhoven, 2007). Nachdem die Pflanze das Pathogen bemerkt hat, aktiviert sie ihre Abwehr und es kommt zur PTI (PAMP-triggered immunity), der durch Elicitoren ausgelösten Immunität der Pflanze. Diese Reaktion wird weitestgehend auch als Basalresistenz oder Nichtwirtresistenz bezeichnet und ist die häufigste Form der Abwehr. Sie ist unspezifisch und richtet sich nicht gegen spezielle Pathogene.

Erfolgreiche Pathogene jedoch müssen die Immunität mit Hilfe von Effektoren unterdrücken. Diese können beispielsweise strukturelle Rollen in der extrahaustoriellen Matrix erfüllen (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Werden diese Effektoren von spezifischen Resistenzgenen erkannt, wird die ETI (effector-triggered immunity) ausgelöst und das Pathogen bleibt erfolglos. Hier spricht man von einer Wirts- bzw. induzierten Resistenz. Nun sind Pathogenvarianten gefragt, die eine Erkennung ihrer Effektoren seitens der Pflanze umgehen können. Ob nun eine Pflanze anfällig oder resistent bzw. ein Pathogen erfolgreich oder erfolglos ist, hängt vom aktuellen coevolutionären Stand ab, der jedoch stets dynamisch ist.

2.4.1 Präformierte Resistenzmechanismen

Präformierte Resistenzmechanismen sind Abwehrmechanismen die bereits vor einer Infektion im pflanzlichen Gewebe vorliegen und sowohl von strukturellem, chemischem als auch enzymatischem Charakter sein können.

Zu den strukturellen Resistenzfaktoren gehören in erster Linie Haare und Trichome oder die Mikrostruktur der Pflanzenoberfläche, angefangen von der Grundform der Epidermiszellen, über die Form der Kutikula bis hin zu Wachsauflagerungen. Kortekamp und Zyprian (1999) beispielsweise beschrieben die Blattbehaarung auf der Blattunterseite als morphologischen Schutz und Resistenzfaktor gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus an Weinreben. Je nach Dichte und Oberflächenbeschaffenheit unterbinden sie die Anlagerung von Tropfen aufgrund der schwachen

Adhäsionskräfte (Kortekamp et al., 1999). Untersuchungen von Weinbeeren unterschiedlich resistenter Rebsorten und -arten gegenüber dem Graufäuleerreger *Botrytis cinerea* ergaben positive Korrelationen zwischen der Anzahl und Dicke der epidermalen und hypodermalen Zellschichten und der Kutikula (Gabler et al., 2003). Auch die Anzahl und Struktur von Stomata, die die Eintrittspforten verschiedener Pathogene darstellen, spielen eine Rolle. Bei Reben wurde ein Zusammenhang zwischen der Stomatazahl und der Anfälligkeit gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus festgestellt (Lu et al., 2010, Alonso-Villaverde et al., 2011). Jürges et al. (2009) haben zusätzliche Kutikularleisten an der Innenseite der Spaltöffnungen amerikanischer Wildreben entdeckt, ein präformierter Resistenzmechanismus, der vermutlich im Zuge der Coevolution zwischen den Wildreben und dem Falschen Mehltau entstanden ist.

Auch die chemische Zusammensetzung der Kutikula oder der ihr aufgelagerten Wachsen kann Einfluss auf eindringende Erreger nehmen. Auf einer Maismutante die bezüglich ihrer kutikulären Wachse frei von sehr langkettigen Aldehyden war, war die Keimung und die Differenzierung von Appressorien des Echten Mehltaus (*Blumeria graminis*) stark beeinträchtigt (Hansjakob et al., 2011). Kuo und Hoch (1996a) fanden heraus, dass sich die Pyknidiosporen von *P. ampellicida* nur an schlecht benetzbaren hydrophoben Oberflächen anlagern und in der Lage sind auszukeimen. Zum gleichen Ergebnis kamen Terhune und Hoch (1993) bezüglich der Anheftung von Uredosporen und Keimlingen, als auch der Induktion von Appressorien.

Präformierte antifungal wirkende Substanzen wie Polyphenole sind ubiquitär in Pflanzen vorhanden. Dai et al. (1994) konnten zeigen, dass die mehltairesistente Rebart *Vitis rotundifolia* schon in gesundem Gewebe höhere Gehalte an Polyphenolen, vor allem Gallussäurederivaten und Catechinen, aufweist. Die induzierte Phenolbildung war ebenfalls erhöht. Studien von Agati et al. (2008) weisen ebenfalls auf eine positive Korrelation zwischen präformierten Flavonoiden und der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau hin. Auch in Weinbeeren sollen konstitutiv vorliegende phenolische Verbindungen die Stilbenoxidase von *Botrytis cinerea*, ein Enzym, welches Stilbene entgiftet, hemmen (Goetz et al., 1999).

2.4.2 Postinfektionelle Resistenzmechanismen

Voraussetzung für die Aktivierung postinfektioneller Abwehrmechanismen ist der Angriff einer Pflanze durch ein Pathogen, das in Folge durch Elicitoren von der Pflanze bemerkt oder erkannt wird. Im Anschluss kommt es zu einer Signaltransduktion und verschiedene Abwehrmaßnahmen werden eingeleitet. Viele führen über eine spezifische Genaktivierung zur Neusynthese von Substanzen, die zuvor so oder in solcher Form und Menge in der Pflanze nicht vorhanden waren. Postinfektionelle Resistenzmechanismen können ebenfalls in struktureller als auch chemischer Form auftreten.

Auch die frühe und schnelle Signalweiterleitung ist gewissermaßen Teil der Abwehr und stark verknüpft mit ihrem Gelingen. Unmittelbar nach der Pathogenwahrnehmung folgt eine Aktivierung der Ionen

Kanäle und es kommt zur Anreicherung von H^+ - und Ca^{2+} -Ionen im Cytosol, zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinasen, der Proteinphosphorylierung und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und vielen weiteren Reaktionen (Hückelhoven, 2007). Eine Akkumulation von H^+ -Ionen im Cytosol geht dabei mit einer Alkalisierung des Apoplasten einher, die beispielsweise wichtig für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die zellwandgebundene Peroxidase zu sein scheint (Bolwell et al., 2002).

Reaktive Sauerstoffspezies können neben ihrer Signalfunktion auch direkten Einfluss auf das Pathogen oder die pflanzliche Zelle am Ort der Infektion nehmen (Blumwald et al., 1998). Wasserstoffperoxid wurde ebenfalls in Papillen, vor allem effektiven Papillen nachgewiesen und dient vermutlich der Vernetzung von Zellwandkomponenten wie Phenolen (Hückelhoven et al., 1999, Thordal-Christensen et al., 1997).

Zu den strukturellen postinfektionellen Resistenzfaktoren gehören in erster Linie Zellwandverstärkungen am Ort der Infektion. Hierzu zählt beispielsweise die Papillenbildung, eine Kalloseakkumulation zwischen Plasmalemma und Zellwand unterhalb von Appressorien, den Anheftungsorganen von Pilzen und Oomyceten. Papillen sind sehr komplex und können neben Kallose auch Proteine, Zellwandkomponenten und phenolische Substanzen enthalten (Collinge, 2009, Voigt, 2014, Chowdhury et al., 2014). Zellwandverstärkungen und Papillen können, müssen aber nicht zwangsläufig die Besiedlung der Pflanze durch ein Pathogen verhindern (Kortekamp et al., 1997, Heintz & Blaich, 1990, Ficke et al., 2002) und sind nicht nur in inkompatiblen Pflanze Pathogen Interaktionen nach Pathogenbefall zu beobachten (Hückelhoven, 2007). Pratt et al. (1984) haben Papillenformationen nach Befall mit dem Echten Mehltau an Reben in Rebblättern gefunden. Nähere Untersuchungen von Heintz und Blaich (1990) zeigten, dass große Papillen, reich an Polysacchariden, Proteinen und Polyphenolen, in der Lage waren Penetrationen des Echten Mehltaus zu stoppen, wohingegen geringe Zellwandverdickungen überwunden werden konnten und geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Komposition der Papillen maßgeblich deren Erfolg beeinflusst, wie von Chowdhury et al. (2014) bestätigt werden konnte. Aber auch der Zeitpunkt und die Geschwindigkeit der Papillenbildung scheinen für die Penetrationsresistenz bedeutend zu sein (von Röpenack et al., 1998, Aist & Israel, 1977, Hückelhoven, 2014).

Phenolische Verbindungen sind ubiquitär in allen Pflanzenarten vorhanden und gemeinhin als Teil der Abwehr pilzlicher Schaderreger anerkannt. Sie können in der Pflanze frei, glukosidisch gebunden an Zuckern oder organischen Säuren oder als Ester und unlöslich gebunden assoziiert mit der Zellwand vorliegen. Sie können sowohl präformiert bereits vorhanden sein, als auch induziert durch Pathogenbefall, neu synthetisiert werden. Die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) als Schlüsselenzym des Phenolstoffwechsels ist dabei Untersuchungsgegenstand vieler Studien und sowohl deren Enzymaktivität als auch das Expressionsprofil wurden in verschiedenen Pathosystemen analysiert.

Hydroxycimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren sind einfache phenolische Verbindungen, die relativ früh im Phenylpropanoidstoffwechsel entstehen. Sie dienen als Grundstrukturen für komplexere

Phenole wie die Flavonoide, haben aber auch andere Funktionen und weisen teilweise antifungale Wirkung auf (Taiz & Zeiger, 2002). Die Hydroxybenzoesäure Salicylsäure beispielsweise ist ein Phytohormon und agiert als endogenes Signal der systemisch erworbenen Resistenz. Auch Gallussäure zählt zu den Hydroxybenzoesäuren und ist ein Vorläufer der hydrolysierbaren Tannine. Dai et al. (1994) fanden beispielsweise mehr konstitutiv vorliegende Gallussäurederivate, als auch hydrolysierbare Tannine in der resistenten Rebart *V. rotundifolia* und vermuteten, dass sie an der Resistenzausprägung gegenüber dem Erreger *P. viticola* beteiligt sind. Gallussäure wurde ebenfalls in der Sorte Chasselas als dominierende Phenolsäure beschrieben (Amarowicz et al., 2008).

Kaffeesäure, *p*-Coumarsäure, Ferulasäure und Chlorogensäure sind Beispiele für in Rebblättern vorkommende Hydroxyzimtsäuren (Katalinić et al., 2009, Taware et al., 2010, Amarowicz et al., 2008), wobei *p*-Coumarsäure und vor allem Ferulasäure überwiegend als Ester an die Zellwand gebunden sind (Weber et al., 1995, Amarowicz et al., 2008). Stadnik und Buchenauer (2000) gehen davon aus, dass eine schnelle Akkumulation phenolischer Säuren, die über Ester mit der Zellwand verknüpft sind in BTH (Benzothiadiazol) behandeltem Weizen in die Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau involviert sind.

Auch komplexere phenolische Verbindungen wie Kaempferol und Quercetin, die zu den Flavonolen gehören, wurden in Rebblättern häufig detektiert (Pastrana-Bonilla et al., 2003, Katalinić et al., 2009, Taware et al., 2010). Sie dienen in erster Linie als UV-Schutz, einige wenige Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass sie auch einen potentiellen Einfluss auf die Resistenz von Reben gegenüber pilzlichen Schaderregern haben (Agati et al., 2008, Latouche et al., 2013)

Catechine sind wie die Flavonole den Flavonoiden zuzuordnen und scheinen einen direkten Einfluss auf das pilzliche Wachstum zu haben. Yamamoto et al. (2000) zeigten beispielsweise, dass +Catechin in der Lage ist das Hyphenwachstum von *Alternaria alternata* in Blättern von Erdbeeren zu hemmen. Catechine, aber auch andere phenolische Verbindungen schränken ebenfalls die Entwicklung und Sporulation einiger Pilze und Oomyceten in der Weinrebe ein (del Río et al., 2004, Dai et al., 1995).

Der vermutlich am besten untersuchte Abwehrmechanismus seitens der Rebe ist die Akkumulation von Stilbenen. Sie leiten sich ebenfalls vom Phenolstoffwechsel ab und zählen zu den Phytoalexinen; niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Verbindungen, deren Synthese durch abiotischen und biotischen Stress induziert wird (Jeandet et al., 2002). Die Stilbensynthase (STS) stellt das Schlüsselenzym im Syntheseweg dar und katalysiert den letzten Schritt zu trans-Resveratrol, das zugleich als Ausgangsprodukt für weitere Stilbene wie Piceid oder verschiedene Viniferine dient.

Nach Infektionen mit dem Erreger des Falschen Mehltaus, konnten in Blättern resistenter Rebsorten vielfach höhere Stilbenmengen gemessen werden als in anfälligen Sorten (Pezet et al., 2004a, Pezet et al., 2004b, Paolucci et al., 2014). Nicht nur quantitative, auch qualitative Unterschiede scheinen hier eine Rolle zu spielen. Vor allem Viniferine wie ϵ -Viniferin und δ -Viniferin wurden häufiger in resistenten Rebsorten nach Pathogenbefall nachgewiesen (Pezet et al., 2004a, Paolucci et al., 2014,

Bavaresco, 1997) und Pezet et al. (2004a) konnten in *in vitro*-Tests zeigen, dass δ -Viniferin und Pterostilbene den größten Einfluss auf die Zoosporenmobilität hatten.

Ähnlich wie Phytoalexine, werden auch PR-Proteine in erster Linie als Antwort auf eindringende Pathogene oder abiotischen Stress synthetisiert, können aber auch konstitutiv oder beeinflusst durch Entwicklungsprozesse exprimiert werden (van Loon et al., 2006). Nach Pathogenbefall akkumulieren sie sowohl in infiziertem, an die Infektionsstelle angrenzenden, aber auch entferntem Gewebe. Trotz einiger Gemeinsamkeiten, wie einem geringen Molekulargewicht, einer hohen Säurestabilität und Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen, bilden sie eine strukturell sehr heterogene Gruppe pflanzlicher Proteine (Ebrahim et al., 2011). Zurzeit werden sie anhand ihrer Eigenschaften und Funktionen in 17 verschiedene Familien eingeordnet.

Chitinasen (PR Familien 3, 4 und 11) und β -1,3-Glukanasen (PR-2) sind hydrolytische Enzyme die häufig nach Pathogenbefall in verschiedenen Pflanzenarten (Ebrahim et al., 2011) wie der Rebe vermehrt akkumulieren (Busam et al., 1997, Aziz et al., 2007, Kortekamp, 2006) und einen vermeintlich direkten Effekt auf Pilze und Oomyceten durch die Hydrolyse ihrer Zellwände haben (Ebrahim et al., 2011).

Thaumatococcus-like proteins aus der PR Familie 5 akkumulieren zusammen mit Zuckern zunehmend in reifenden Weinbeeren und erklären möglicherweise deren ontogenetische Resistenz gegenüber der Schwarzfäule (Salzman et al., 1998). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam ein Versuch mit einem cis-genetischen Ansatz, bei dem ein thaumatococcus-like protein konstitutiv in einer anfälligen Rebsorte transformiert wurde und zu einer reduzierten Schwarzfäuleanfälligkeit führte.

Viele PR-Proteine sind extrazelluläre Proteine oder in der Vakuole lokalisiert, wohingegen PR10 Proteine frei im Cytoplasma vorliegen, da sie kein Signalpeptid haben (Xu et al., 2010). In der Weinrebe (*V. vinifera*) wurden bisher 17 verschiedene *VvPR10*-Gene beschrieben, die eine geringe Sequenzvariabilität aufweisen (Lebel et al., 2010). Die meisten PR10 Proteine haben eine hoch konservierte P-loop-Domäne, die als Nukleotid-Bindestelle funktioniert und die Ribonuklease-Aktivität der PR10-Proteine vermittelt und ein Bet v 1 Motiv (Hauptallergen des Birkepollens), das direkte RNase-Aktivität besitzt (Liu & Ekramoddoullah, 2006). He et al. (2013) konnten zeigen, dass eine Überexpression von *VpPR10.2* (Homolog zu *VvPR10.2*) der chinesischen Wildrebe *Vitis pseudoreticulata* in der anfälligen Rebsorte 'Carignane' zu einer Resistenzsteigerung gegenüber *P. viticola* führte. *VvPR10.1* wurde vor allem in resistenten Rebsorten nach Inokulation mit dem Erreger des Falschen Mehltau induziert (Merz et al., 2015, Müller, 2014, Kortekamp, 2006) und scheint daher eine wichtige Rolle in der Abwehr von Reben zu spielen.

Polygalacturonase inhibierende Proteine (PGIPs) gehören nicht zu den PR-Proteinen, spielen aber dennoch eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr gegenüber pilzlichen Pathogenen. Sie sind Glykoproteine die in der Zellwand lokalisiert sind und ein leucin rich repeat (LLR) Motiv tragen, wodurch sie in der Lage sind Moleküle eindringender Pathogene zu erkennen. Sie haben einen direkten Einfluss auf Pathogene, indem sie die hydrolytische Aktivität der Endo-Polygalacturonasen

herabsetzen, die von Pathogenen gleich zu Beginn der Infektion abgegeben werden, wodurch die Zellwand vor Abbau geschützt, die Freigabe von Nährstoffen gestoppt und schließlich der Infektionsprozess gehemmt wird (De Lorenzo et al., 2001). Zusätzlich aktivieren langkettige Oligogalakturonide, die durch die Interaktion von PGIPs mit Polygalakturonasen entstehen, die Induktion weiterer Abwehrmechanismen (Cervone et al., 1997).

Liu et al. (2014) zeigten das *VtPGIP* aus der chinesischen Rebe *Vitis thunbergii* durch verschiedene Pathogene wie beispielsweise *Botrytis cinerea* oder *Glomerella cingulata* induziert wurde. Reben der anfälligen Sorten ‘Chardonnay’ und ‘Thompson Seedless’, die mit einem PGIP- Gen aus der Birne transformiert wurden zeigten eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber *Botrytis cinerea* und dem Bakterium *Xylella fastidiosa*, dem Erreger der Pierce-Krankheit (Aguero et al., 2005). Kortekamp (2006) wies ein erhöhtes Transkriptlevel von *VvPGIP* nach Infektion mit dem Falschen Mehltau bei der resistenten Rebsorte ‘Gloire’ nach, während es in der anfälligen Vergleichssorte ‘Riesling’ zu keiner infektionsbedingten Induktion kam.

2.4.3 Ontogenetische Resistenz

Die ontogenetische Resistenz beschreibt die alters- und reifebedingte Resistenz ganzer Pflanzen oder Pflanzenteile wie Blätter, Früchte und Triebe gegenüber verschiedener Krankheiten. Bei einigen Pathosystemen wie beispielsweise der Erdbeere und dem Echten Mehltau *Podosphaera aphanis* (Asalf et al., 2014) oder Apfel und dem Apfelschorf *Venturia inaequalis* (Jha et al., 2009, Gusberty et al., 2013) ist die ontogenetische Resistenz bekannt und gut beschrieben.

Auch bei der Weinrebe weiß man, dass beispielsweise die Beeren der meisten Rebsorten der Art *V. vinifera* mit zunehmendem Alter resistenter gegenüber dem Echten Mehltau werden (Ficke et al., 2002, Gadoury et al., 2003). Ähnliche Erkenntnisse hat man auch für die Anfälligkeit von Beeren gegenüber dem Falschen Mehltau gewonnen, jedoch festgestellt, dass Beginn und Entwicklung der ontogenetischen Resistenz auch von den klimatischen Bedingungen der Region beeinflusst werden (Kennelly et al., 2005).

Hoffman et al. (2002) konnten zeigen, dass die Phase der maximalen Beerenanfälligkeit gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule bei Sorten der Art *V. vinifera* von der Blüte bis ca. drei bis fünf Wochen später reichte und mit zunehmendem Alter der Beeren nicht nur deren Anfälligkeit abnimmt sondern auch eine längere Inkubationszeit erforderlich war. Kuo und Hoch (1996b) haben die ontogenetische Resistenz gegenüber der Schwarzfäule anhand von Blättern charakterisiert und herausgefunden, dass Blätter, die zum Zeitpunkt der Inokulation das Wachstum bereits eingestellt haben, keine Symptome mehr entwickeln. Pyknidiosporen waren zwar in der Lage auszukeimen, Appressorien zu bilden und teilweise Hyphen im Wirtsgewebe zu etablieren, jedoch waren diese in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung stark eingeschränkt. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen die australischen Autoren Ficke et al. (2003) bezüglich der ontogenetischen Resistenz von Weinbeeren gegenüber *Erysiphe necator* und zeigten in ihren Untersuchungen, dass sowohl strukturelle Barrieren wie die Dicke der Kutikula und

Epidermiszellwände, die Papillenbildung, die Akkumulation antimikrobieller Phenole, als auch die Expression verschiedener PR-Proteinen (VvPR1 und VvGLP3) nicht die Hauptursache der ontogenetischen Resistenz gegenüber dem Erreger darstellen (Ficke et al., 2004).

Die der ontogenetischen Resistenz zugrundeliegenden Abwehrmechanismen sind bis heute nur unzureichend untersucht. Auch wird diese Form der Resistenz im integrierten Pflanzenschutzmanagement nur in geringem Ausmaß berücksichtigt (Ficke et al., 2002).

2.5 Ziele der Arbeit

Die Schwarzfäule hat seit dem Jahr 2002 auch in Deutschland wirtschaftliche Relevanz erlangt und konnte sich lokal in einigen Weinanbaugebieten wie Mosel, Nahe und Ahr mit günstigen Witterungsbedingungen etablieren (Molitor et al., 2010). Während sie in konventionellen Betrieben meist durch den Pflanzenschutzmitteleinsatz gegen andere Schadpilze, wie den Echten und Falschen Mehltau, erfasste wird, stellt sie vor allem ökologisch wirtschaftende Weinbaubetriebe vor eine große Herausforderung. Zurzeit stehen ihnen keine effektiven Bekämpfungsstrategien zur Verfügung. Auch bezüglich der Sortenwahl sind die Winzer stark eingeschränkt, denn nahezu alle der in Deutschland angebauten Kulturrebsorten sind hoch anfällig gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule.

Da bei der Kreuzung und Züchtung pilzwiderstandsfähiger Neuzüchtungen, den sogenannten Piwis, bisher ausschließlich Resistenzen gegenüber dem Echten und Falschen Mehltau berücksichtigt wurden, sind auch viele Neuzüchtungen, wie beispielsweise die Rotweinsorte 'Regent', hoch anfällig gegenüber der Schwarzfäule. Nur wenige Neuzüchtungen wie 'Solaris' oder 'Merzling' zeigten bisher moderate bis sehr gute Resistenzen und bilden im Zuge einer Neuanpflanzung die einzige Option für ökologisch genutzte Flächen in schwarzfäulegefährdeten Lagen. Vor allem für Ökobetriebe, deren Zahl in Deutschland in den letzten Jahren kontinuierlich anstieg, aber auch im Sinne eines umweltverträglicheren Weinbaus soll in Zukunft auch die Schwarzfäuleresistenz gezielt in Züchtungsprogramme einbezogen werden. Rex et al. (2014) haben bereits anhand zweier QTLs Marker entwickelt, die eine markergestützte und somit schnellere Selektion der Sämlinge hinsichtlich ihrer Schwarzfäuleresistenz ermöglichen würden.

Amerikanische Wildreben sind mit dem Erreger der Schwarzfäule coevolviert und weisen einen hohen Resistenzgrad gegenüber der Schwarzfäule, aber auch dem Echten und Falschen Mehltau, auf. Bei ihrer Verwendung in der Züchtung werden jedoch viele Rückkreuzungsschritte mit Sorten der Art *Vitis vinifera* benötigt, um andere wichtige Selektionsmerkmale, wie die Weinqualität, zu erhalten.

Eine weitere potentielle Resistenzquelle stellen die Europäischen Wildreben (*Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* C. C. Gmel.) dar, die Vorfahren unserer heutigen Kulturrebsorten. Da sie nicht mit dem Erreger coevolviert sind, gelten sie als naive Wirte, die jedoch bis heute in den Auenwäldern entlang des Oberrheins ohne Pflanzenschutzmaßnahmen überdauert haben. Erste Tests wiesen bereits auf eine erhöhte Widerstandsfähigkeit einiger Wildreben gegen die Schwarzfäule, aber auch den Echten und Falschen Mehltau hin. Darüber hinaus weisen sie nicht den für amerikanische Wildreben typischen

Foxton auf, der sich nachteilig auf die Weinqualität auswirkt, wodurch sich der Züchtungsvorgang möglicherweise vereinfachen und verkürzen ließe. Da in der Resistenzzüchtung zusätzlich angestrebt wird, möglichst viele verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber einem Erreger in einer Neuzüchtung zu vereinen (Pyramidisierung), ist die Erschließung neuer Resistenzquellen essentiell.

(1) In einem ersten Schritt sollte die Europäische Wildrebenpopulation der Halbinsel Ketsch und einige einzelne Wildreben benachbarter Standorte auf ihre Resistenz gegen die Schwarzfäule, aber auch gegen den Echten und Falschen Mehltau getestet werden, um ihre Eignung für die Züchtung zu evaluieren.

(2) Ein grundlegendes Verständnis der Biologie der Schwarzfäule, speziell der Infektionsschritte und deren zeitliche Einordnung ist elementar für aufbauende Untersuchungen hinsichtlich der Interaktion zwischen der Schwarzfäule und der Rebe. Während die Erreger des Echten und Falschen Mehltaus aufgrund ihrer weltweiten wirtschaftlichen Bedeutung gut erforscht wurden, sind viele Aspekte der Biologie der Schwarzfäule nach wie vor unklar. Anhand von Blättern der anfälligen Kulturrebsorte 'M-Th', sollte der vollständige asexuelle Infektionszyklus mit Hilfe mikroskopischer Methoden näher untersucht und dargestellt werden.

(3) Aufbauend auf den Erkenntnissen der Untersuchungen zum Infektionsprozess der Schwarzfäule, sollten wichtige Infektionsstadien auf verschiedenen resistenten Genotypen und verschiedenen alten Blattetagen verglichen werden. Hierzu wurde die anfällige Kulturrebsorte 'M-Th', die pilzwiderstandsfähige Neuzüchtung 'Solaris', die eine Teilresistenz aufweist, die resistente Unterlagsrebe 'Börner' und drei verschiedene teilresistente Wildrebenakzessionen herangezogen. Ausgewachsene Rebblätter unterliegen im Unterschied zu jungen sich im Wachstum befindenden Rebblättern einer Altersresistenz gegenüber der Schwarzfäule und sollten ebenfalls in die Versuche integriert werden. Ziel war es zu eruieren zu welchem Zeitpunkt die Entwicklung des Pathogens auf teilresistenten oder resistenten Genotypen bzw. von der Altersresistenz betroffenen Blättern gestoppt bzw. gehemmt wird.

(4) Zusätzlich wurde angestrebt die Abwehr der verschiedenen Genotypen näher zu charakterisieren, da ebenfalls Kandidatengene zur Entwicklung funktioneller Marker genutzt werden können, um in der Züchtung Anwendung zu finden. Dabei sollten zunächst histologische Methoden genutzt werden um Abwehrreaktionen am Ort der Penetration aufzuzeigen. Darüber hinaus sollte vertiefend die Dynamik der Expression verschiedener abwehrrelevanter Gene mit Hilfe der quantitativen real-time PCR als auch präformierte und pathogeninduzierte Sekundärmetabolite mittels analytischer Methoden untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Aldrich (St. Louis, USA) und Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen. Bei Chemikalien, deren Herkunft essentiell für das Gelingen eines Versuches war sowie HPLC-Standards und Farbstoffe, wird der Hersteller zusätzlich genannt.

Verbrauchsmaterialien und Reaktionsgefäße aus Kunststoff stammten von der Firma Sarstedt (Nümbrecht), gläserne Gebrauchsgegenstände wie Flaschen, Messkolben und Petrischalen von der Firma Schott AG (Mainz).

3.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Versuche an Reben wurden neben den Europäischen Wildreben vergleichend verschiedene Rebsorten verwendet, die sich in ihrer Anfälligkeit gegenüber der Schwarzfäule, aber auch des Echten und Falschen Mehltaus unterscheiden. Die Kulturrebsorte *Vitis vinifera* L. cv. 'Müller-Thurgau' ('M-Th') ist anfällig gegenüber allen drei Schaderregern und diente daher in allen Resistenzscreenings als Positivkontrolle. Die pilzwiderstandsfähigen Neuzüchtungen *Vitis vinifera* L. cvs. 'Regent' und 'Solaris' sollen die maximale Toleranz bzw. Resistenz gegenüber der Pathogene repräsentieren, die durch aktuell zugelassene Neuzüchtungen in der Praxis realisiert werden können. Die arthybride Unterlagsrebsorte 'Börner' (*Vitis riparia* 183 Geisenheim x *Vitis cinerea* Arnold) ist resistent gegenüber den genannten Pathogenen. Das einjährige Steckholz dieser Sorten stammte aus institutsnahen Vermehrungs- oder Versuchsflächen und wurde im Winter, im Zuge des Rebschnitts, gewonnen.

Die zu testende Wildrebenpopulation stammt von der Halbinsel Ketsch, aus dem Naturschutzgebiet „Ketscher Rheininsel“ bei Heidelberg am Rhein. Im Herbst 2008 und im Winter 2009 wurden im Rahmen des Projektes „Überlebenssicherung der Wildrebe *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* (C.C. Gmel.) Hegi in den Rheinauen durch gezieltes in situ-Management“ Kerne und Vermehrungsholz der Wildreben gesammelt und im Botanischen Garten Karlsruhe vermehrt und dauerhaft kultiviert (Ledesma-Krist et al., 2013). Die Wildrebenakzessionen wurden mit einem „K“ für den Fundort Ketsch und einer Nummer versehen. Zwei der zu testenden Wildreben kamen aus den Rheinauen bei Hördt und tragen die Bezeichnung „Hö“ kombiniert mit einer Nummer. Die Abkürzung „CO“ verweist auf einen Standort nahe Colmar und „Rö“ steht für Römerberg. Insgesamt wurden 79 Wildreben in Resistenzscreenings getestet, die im Anhang aufgelistet sind.

3.1.2 Pathogene

3.1.2.1 Die Schwarzfäule

Für die Versuche mit dem Erreger der Schwarzfäule wurde die Einzelsporenlinie 8088-2 verwendet, die dem Isolat 8088 entstammt, welches 2005 in Kesten an der Mosel aus einer Driesche isoliert wurde. Zusätzlich kamen weitere Isolate für die Nährmedientests und Pathogenitätsversuche zum Einsatz, deren Bezeichnung, Fundort und -jahr in Tabelle 1 angegeben sind.

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Schwarzfäuleisolate, deren Fundort und -jahr.

Isolat-Nummer	Fundort (Weinanbaugebiet)	Fundjahr
8088	Kesten (Mosel)	2005
9390	Geilweilerhof (Pfalz)	2010
9449	Diedesfeld (Pfalz)	2010
9450	Deidesheim (Pfalz)	2010
9494	Mühlheim-Andel (Mosel)	2010
9495	Kallstadt (Pfalz)	2010
9680	Kallstadt (Pfalz)	2011

3.1.2.2 Der Falsche Mehltau

Im Zuge des Wildrebenscreenings wurden vier verschiedene *Plasmopara viticola*-Isolate verwendet; "Zucht", GWH, 8836 und 8837. Das Hausisolat "Zucht" wurde bereits Mitte der 90er-Jahre isoliert und fortwährend artifiziell kultiviert und vermehrt. Die Abkürzung GWH steht für den Isolationsort des Isolates, das 2009 am Geilweilerhof in Siebeldingen in einer unbehandelten Anlage pilzwiderstandsfähiger Neuzüchtungen gewonnen wurde. Das Isolat 8836 kommt aus einer Junganlage der Sorte 'Silvaner' in Geinsheim bei Neustadt an der Weinstraße, die eine einseitige Behandlung mit dem Kontaktfungizid Polyram erfahren hat. Einen ähnlichen Hintergrund hat auch das Isolat 8837, das aus einer Rieslinganlage bei Neustadt an der Weinstraße stammt, die in Blockspritzungen behandelt wurde.

3.1.2.3 Der Echte Mehltau

Im Fall des Echten Mehltaus kann man nicht von einem Isolat sprechen, da seine Erhaltung in einer Gewächshauskammer stattfindet, die nicht hermetisch nach außen abgeschlossen ist. Da die Sporen des Echten Mehltaus sich über weite Strecken über die Luft verbreiten, ist ein Austausch und Vermischen mit natürlich vorkommendem Mehltau in den umliegenden Weinbergen sehr wahrscheinlich.

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht und Kultur der Weinreben im Gewächshaus

Lösungen und Erdgemisch	Zusammensetzung
Chinoplantlösung	3 % (v/v) Chinoplant (Cheminova, Stade)
Erdgemisch	70 l Floradur® Anzuchtsubstrat (Floragard, Oldenburg) 7 l Perlite 700 g Kohlensaurer Kalk (Kalkwerk Hufgard, Hösbach-Rottenberg) 350 g Langzeitdünger MANNA COTE 6M mit Spurennährstoff, NPK 15 - 7 - 15 (Manna, Düsseldorf)

Als Grundlage zur Anzucht neuer Kulturreben wurden Einaugenstecklinge verwendet, die im Winter zuvor aus einjährigem Holz umliegender Rebanlagen geschnitten wurden. Zur besseren Konservierung und Lagerung wurden die Stecklinge für 24 Stunden gewässert und anschließend in einer Chinoplantlösung für weitere 8 Stunden inkubiert, um den Befall durch Pilze zu minimieren. Die Aufbewahrung des Steckholzes erfolgte bei 6 °C.

Für die Rebenanzucht wurden die Stecklinge erneut angeschnitten und zum Schutz vor Austrocknung und Pilzbefall mit rotem Rebwachs WF (Stähler Agrochemie, Stade) überzogen, das das Fungizid 8-Hydroxychinolin und einen Wuchsstoff enthält. Zur leichteren Wurzelbildung wurden die Stecklinge zunächst in Perlite in einer Anzuchtkammer bei ca. 23 °C im Gewächshaus kultiviert. Nach etwa vier Wochen, als die Stecklinge ausreichend Austrieb und Bewurzelung zeigten, wurden sie in das Erdgemisch getopft und im Gewächshaus bei mindestens 14 Stunden Licht (gegebenenfalls mit Zusatzbeleuchtung) weiter aufgezogen. Die relative Luftfeuchte lag bei ca. 40 % und die Temperatur betrug während der Lichtperiode 21 °C sowie 18 °C während der Nacht. Die Pflanzen wurden mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 50 cm für die Versuche eingesetzt.

Zur Vermehrung und Aufzucht der Wildreben wurden Einaugenstecklinge aus dem Wildreben Sortiment in Karlsruhe gewonnen und wie die Kulturrebenstecklinge für die weitere Anzucht eingesetzt (siehe oben). Da jedoch die Menge der Steckhölzer nicht ausreichend war, wurden die Wildreben zusätzlich durch Grünstecklinge vermehrt. Hierzu wurden grüne Einaugenstecklinge in Perlite angezogen und ebenfalls nach Austrieb und Bewurzelung in das Erdgemisch überführt und im Gewächshaus kultiviert.

3.2.2 Vermehrung und Erhalt der Pilze

3.2.2.1 Die Schwarzfäule

Medium	Zusammensetzung
Hafermehl-Agar	4 % (v/v) Hafermehl (Holo®, Reformkontor, Zarrentin) 2 % (w/v) Agar (Merck)

Die Schwarzfäule wurde in Petrischalen auf Hafermehl-Agar bei 25 °C und Dauerlicht, bestehend aus gleichen Teilen Ultraviolett- (Osram L18-73, 300-400 nm) und Weißlicht (Osram L18W/840 Lumilux

cool white), kultiviert. Zur Vermehrung wurden ca. 0,25 cm² große Agarblöcke aus der Wachstumszone des Pilzes entnommen und auf frische Hafermehlplatten überführt.

3.2.2.2 Der Falsche Mehltau

Auf Grund der Tatsache, dass der Falsche Mehltau obligat biotroph ist, ist er für seine Erhaltung und Vermehrung auf lebendes Pflanzengewebe angewiesen. Hierzu wurden Reben der anfälligen Sorte 'M-Th' mit einer Sporangiensuspension (25000 Sporen/ml) inokuliert, die mit Hilfe eines Feinzerstäubers und Druckluft auf die Blattunterseiten der Pflanzen aufgesprüht wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Reben über Nacht in einer feuchten Kammer bei 20 °C. Je nach Jahreszeit sind ca. 6 bis 14 Tage später die ersten Symptome, die sogenannten Ölflecken, sichtbar. Zur Gewinnung von Sporangien für erneute Infektionen wurden die entsprechenden Blätter kurz vor der Symptomausprägung entnommen, mit der Blattoberseite nach unten auf feuchtes Filterpapier in Petrischalen gelegt und bei 25 °C über Nacht inkubiert. Die Sporangien konnten anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen und mit Hilfe einer Zählkammer (nach Fuchs-Rosenthal) auf die gewünschte Sporangienkonzentration eingestellt werden.

3.2.2.3 Der Echte Mehltau

Auch der Echte Mehltau muss aufgrund seiner obligat biotrophen Lebensweise auf intakten Pflanzen erhalten und vermehrt werden. Hierzu wurden gesunde Pflanzen der Sorte 'M-Th' zwischen bereits befallene Reben im Gewächshaus gestellt, die sich in Folge infizierten.

3.2.3 Infektionen mit dem Erreger der Schwarzfäule

3.2.3.1 Herstellung einer Pyknidiosporensuspension

Sowohl für das Resistenzscreening als auch für die Versuche bezüglich des Abwehrverhaltens der verschiedenen Genotypen gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule wurden je nach Versuch ganze Pflanzen, Blätter oder Blattscheiben mit einer Pyknidiosporensuspension inokuliert. Hierfür wurden ca. 10 bis 20 Tage alte Schwarzfäulekulturen verwendet, die zuvor auf Hafermehlagar und unter Dauerlicht (50 % Ultraviolettlicht, 50 % Weißlicht) kultiviert wurden, da diese Faktoren die Pyknidien- und Sporenbildung der Schwarzfäule begünstigen. Zur Induktion der Sporenfreigabe aus den Pyknidien wurden die Platten mit 10 ml destilliertem autoklaviertem Wasser geflutet und für 10 min inkubiert. Die gewonnene Konidien suspension wurde abgegossen und mit Hilfe einer Zählkammer (nach Fuchs Rosenthal) deren Konzentration bestimmt. Je nach Versuch und Fragestellung wurde die Suspension auf die entsprechende Konidienkonzentration eingestellt, wie in Tabelle xy angegeben ist.

3.2.3.2 Inokulation von Pflanzenmaterial

Für das Resistenzscreening, die Untersuchungen der Phenolgehalte nach Schwarzfäuleinfektion und die Virulenzversuche verschiedener Schwarzfäuleisolate wurden ganze Pflanzen mittels Feinzerstäuber und Druckluft, sowohl auf Blattober- als auch auf Blattunterseite sprühinokuliert. Für das Resistenzscreening und die Phenolversuche wurde eine Konidienkonzentration von 25000 Konidien/ ml eingesetzt. Bei den Virulenzversuchen wurde mit einer geringeren Konzentration von 15000 Konidien/ ml gearbeitet, da das Isolat 9450 nur sehr wenige Sporen bildet. Im Anschluss wurden die Pflanzen stets für 24 h in einer feuchten Kammer bei 21 °C inkubiert und anschließend im Gewächshaus bis zur Bonitur oder Probenahme kultiviert.

Die Versuche zur Biologie und Entwicklung, zu den histologischen Untersuchungen und Expressionsanalysen basierten auf Blattscheiben, die mit Tropfen der Konidiensuspension inokuliert wurden. Frisch mit einem Korkbohrer ausgestochene Blattscheiben wurden hierfür in Glaspetrischalen überführt, die mit 6 ml autoklaviertem Leitungswasser getränktem Filterpapier ausgelegt waren. Zur Generierung einer möglichst hohen Luftfeuchte, wurden die Petrischalen in Plastikwannen gestellt, mit einer durchsichtigen Plastiktüte abgedeckt und bei 21 °C und 12 h Belichtung in der Klimakammer inkubiert. Die Inokulationstropfen wurden nach 24 h mit einer Pipette und Papiertüchern abgenommen. Bis zur vollständigen Abtrocknung der Blattscheiben wurden die Platten zusätzlich unter der Sterilbank bei permanenter Luftzirkulation positioniert. Je nach Probenahmezeitpunkt wurden die entsprechenden Blattscheiben vorsichtig mit einer Federstahlpinzette entnommen und je nach Verwendungszweck in Ethanol (90 %) oder flüssigem Stickstoff konserviert oder weiterverarbeitet. Aus den Blattscheiben für die Expressionsanalyse wurden kurz vor der Probenahme und Analyse nochmals kleinere Blattscheiben ($\varnothing = 11$ mm) ausgestochen, um den Rand und damit die störende Verwundungsreaktion zu entfernen. Die verwendeten Blattscheibengrößen, die Anzahl der Tropfen pro Blattscheibe, deren Volumen und Sporenkonzentration der verschiedenen Versuche sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Überblick über das Versuchsdesign der auf Tropfeninokulation basierenden Versuche.

Versuch	Blattscheiben- größe	Tropfen pro Blattscheibe	Tropfen- volumen	Sporenkonzentration
Konidienanheftung	16 mm	3	5 μ l	20000 Sporen/ml
Appressorienbildung	16 mm	3	10 μ l	25000 Sporen/ml
Hyphenbildung	16 mm	3	10 μ l	25000 Sporen/ml
Histologische Untersuchungen	16 mm	1	20 μ l	25000 Sporen/ml
Expressionsanalyse (Vergleich Inokulationsmethoden)	14 mm	1	70 μ l	40000 Sporen/ml
Expressionsanalyse (Untersuchung abwehrrelevanter Gene)	14 mm	1	70 μ l	70000 Sporen/ml

3.2.4 Resistenzscreening der Wildreben

3.2.4.1 Versuche zur Evaluierung der Resistenz gegenüber der Schwarzfäule

Die Bestimmung der Resistenz gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule, *P. ampellicida*, wurde an ganzen Pflanzen durchgeführt. Nach der Inokulation und Inkubation der Reben (Kapitel 3.2.3.2) wurde die Spitze der Reben mit einem feinen Draht markiert und die Pflanzen für weitere 20 Tage im Gewächshaus kultiviert. Zur Evaluation der Resistenzprägung wurde die Befallsstärke der fünf Blätter unterhalb der Markierung getrennt prozentual in Kategorien erfasst, welche sich großteils an der EPPO Richtlinie PP 1/4(4) *Uncinula necator* orientierten (Tabelle 3). Aus den geschätzten Befallsstärken der fünf Blätter wurde für jede Rebe der Mittelwert erstellt.

Tabelle 3. Boniturschema zur Evaluierung der Befallsstärke von schwarzfäule- und mehltaubefallenen Blättern nach der EPPO Richtlinie PP 1/4(4) *Uncinula necator*, modifiziert.

Kategorie [%]	0	2,5	7,5	17,5	37,5	62,5	82,5	95
Beschreibung [%]	0	0-5	5-10	10-25	25-50	50-75	75-90	90-100

Von jeder Wildrebenakzession wurden mindestens drei Pflanzen getestet. Da pro Versuchsansatz nur maximal 30 Pflanzen eingesetzt werden konnten und die Wildreben sehr unterschiedlich in ihrem Wachstum waren, wurden insgesamt 30 Versuche zeitlich versetzt durchgeführt. Pro Versuch wurden drei Reben der Sorte ‘M-Th’ als Positivkontrolle und zur Überprüfung und Gleichhaltung der Versuchsbedingungen eingesetzt. Die Unterlagsrebsorte ‘Börner’ diente als resistente Negativkontrolle.

3.2.4.2 Versuche zur Evaluierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau

Für das Resistenzscreening bezüglich des Falschen Mehltaus wurde eine minimalinvasive Methode basierend auf Blattscheiben in modifizierter Weise nach Genet et al. (1997) verwendet. Vier verschiedene Isolate von *P. viticola* (“Zucht“, GWH, 8836 und 8837) kamen für die Resistenzerhebung zum Einsatz. Pro Akzession bzw. Sorte und Isolat wurden drei bis vier Blätter verschiedener Pflanzen, aber stets der gleichen Blattetage (erstes bis drittes voll entwickeltes Blatt) geerntet. Aus ihnen wurden mit Hilfe eines Korkbohrers insgesamt sieben Blattscheiben mit einem Durchmesser von 16 mm ausgestanzt und mit der Oberseite nach unten randomisiert in Petrischalen ($\varnothing = 5$ cm) überführt, die mit 5 ml autoklaviertem Leitungswasser gefüllt waren. Jede Blattscheibe wurde mit einem Tropfen von 30 μ l Sporangiensuspension (33000 Sporangien/ ml) inokuliert und für sieben Tage bei 21 °C, 70 % relative Luftfeuchte und 12 h Taglicht in einer Klimakammer inkubiert. Die Tropfen wurden nach 24 h (hpi) wieder entfernt, um Sekundärinfektionen zu vermeiden. Für die Auswertung wurde einmal der Sporulationsfleck visuell bonitiert und zum anderen die Anzahl der gebildeten Sporangien bestimmt. Die visuelle Schätzung der Größe der Sporulationsfläche erfolgte mit Hilfe einer Skala von 0 bis 4 (Tabelle 4) nach Genet et al. (1997).

Tabelle 4. Boniturskala zur Beschreibung des Sporulationsflecks von *P. viticola*.

Kategorie	Beschreibung
0	keine Sporulation
1	leichte Sporulation
2	Sporulationsfleck < Inokulationstropfen
3	Sporulationsfleck = Inokulationstropfen
4	Sporulationsfleck > Inokulationstropfen

Zur Quantifizierung der gebildeten Sporangien wurden die Blattscheiben jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml 0,1 %-igem Tween (Tween® 80) versetzt. Die Proben wurden gevortext, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gevortext und mit Hilfe einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthal) und einem Lichtmikroskop die Sporangienkonzentration bestimmt.

Die Ergebnisse der sieben Blattscheiben pro Akzession bzw. Sorte und Isolat wurden gemittelt. Bei jedem Versuch wurde die anfällige Sorte ‘M-Th’ als Positivkontrolle mitgetestet, die pilzwiderstandsfähigen Rebsorten ‘Regent’ und ‘Solaris’ und die Arthybride ‘Börner’ dienten als Negativkontrolle.

3.2.4.3 Versuche zur Evaluierung der Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau

Von jeder Wildrebenakzession wurden mindestens drei Pflanzen bezüglich ihrer Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau untersucht. Die zu testenden Pflanzen wurden zwischen bereits befallene Reben gestellt und dort unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Nach drei Wochen wurde die Befallsstärke und –häufigkeit erfasst. Die Ermittlung der Befallsstärke orientierte sich in leicht modifizierter Weise an dem Boniturschema, wie es in der EPPO Richtlinie PP 1/4(4) *Uncinula necator* beschrieben ist und bereits beim Schwarzfäulescreening angewandt wurde (Tabelle 3). Die Befallsstärke der zehn jüngsten voll entwickelten Blätter einer Rebe wurden gemittelt. Auch die Berechnung der Befallshäufigkeit bezog sich auf diese zehn Blätter und wurde in Prozent ausgedrückt. Bei jedem Versuchsansatz dienten drei Reben der anfälligen Sorte ‘M-Th’ als Positivkontrolle und Überprüfung der Versuchsbedingungen. Die pilzwiderstandsfähigen Sorten ‘Solaris’ und ‘Regent’ und die resistente Unterlagsrebsorte ‘Börner’ wurden als Negativkontrollen und Vergleich mitgeführt.

3.2.5 Nährmedientests

3.2.5.1 Nährmedientests zum Nachweis zellwanddegradierender Enzyme

Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Minimal-Medium (Czapek-Dox-Medium, modifiziert)	0,6 % (w/v) NaNO ₃ 0,15 % (w/v) K ₂ HPO ₄ 0,05 % (w/v) KCl 0,05 % (w/v) MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,001 % (w/v) FeSO ₄ x 7H ₂ O 1,5 % (w/v) Agar (Merck) 0,1 % (v/v) Spurenmetalllösung
Medienzusätze	1 % (w/v) Stärke/ 1 % (w/v) Cellulose/ 1 % (w/v) Carboxymethylcellulose Natriumsalz (CMC)/ 1 % (w/v) Xylan aus Buchenholz/ 1 % (w/v) Pektin aus Zitruschale
Spurenmetalllösung	1 % (w/v) ZnSO ₄ x 7H ₂ O 0,5 % (w/v) CuSO ₄ x 5H ₂ O
NaOH-Lösung	1 M NaOH
Potatodextroseagar (PDA):	39 % (w/v) Kartoffelextrakt-Glucose-Agar (Merck)
Lugolsche Lösung	100 %
CTAB-Lösung	3% (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Semi-quantitative Tests wurden auf unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt, um die Fähigkeit von *P. ampellicida* zu ermitteln, verschiedene Substrate wie Cellulose, CMC, Xylan, Pektin und Stärke mittels degradierender Enzyme abzubauen und für sein Wachstum zu nutzen. Die Methode orientierte sich an Romao et al. (2011) und Hankin und Anagnostakis (1975).

Von den hier verwendeten Kohlenstoffquellen wurden stets 10 g (w/v) auf einen Liter Agar eingesetzt, ohne zunächst die spezifische Energie zu berücksichtigen. Direkte Energie- oder Brennwerte werden von den Herstellern nicht angegeben und mussten recherchiert werden. Der Brennwert von Cellulose variiert je nach Quelle und Reinheit zwischen 17,0 und 17,5 kJ/g organische Substanz, vergleichbar mit Stärke, deren Brennwert zwischen 17,2 und 17,3 kJ/g organischer Substanz liegt (Kienzle et al., 2001). Die Variation der Brennwerte für Pektin ist größer und liegt in Abhängigkeit des Veresterungsgrades zwischen 14,2 und 16,3 kJ/g organische Substanz (Kienzle et al., 2001). Für Hemicellulose waren keine vergleichbaren Brennwertangaben aufzufinden. Die Energiedichten der einzelnen hier eingesetzten Kohlenstoffquellen waren folglich sehr ähnlich und lassen daher keinen exakten, aber ungefähren Vergleich des pilzlichen Wachstums und Substratabbaus zwischen den einzelnen Substraten zu.

Mit Hilfe eines Korkbohrers wurden runde Myzelstücke (Ø 5mm) aus drei bis vier Wochen alten Schwarzfäulekulturen geschnitten, die zuvor bei 25 °C und Dauerlicht auf PDA kultiviert wurden. Die Myzelstücke wurden auf Minimalmedium übertragen, welches jeweils mit Cellulose, CMC, Xylan, Pektin oder löslicher Stärke versetzt war. Reines Minimal-Medium ohne Zusatz wurde ebenfalls inokuliert und diente als Kontrolle. Die Platten wurden zur Vermeidung von Austrocknung und Kontamination mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C und Dauerlicht (50 % Weißlicht, 50 % UV-A Licht) kultiviert. Das Minimalmedium und die Nährmedien, die mit Cellulose, CMC, Xylan oder Stärke

angereichert waren, wurden auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Das pektinhaltige Medium wurde einmal auf pH 7 zum Nachweis der Pektatlyaseproduktion und zum anderen auf pH 5 zur Überprüfung der Polygalacturonaseaktivität justiert.

Für die Auswertung wurden das Pilzwachstum und der Substratabbau bestimmt. Zur Ermittlung des Substratabbaus kamen verschiedene Färbemethoden zum Einsatz. Mit Hilfe der Lugolschen Lösung wurde der Cellulose-, CMC-, Xylan- und Stärkeabbau sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Platten für 5 min mit der Lösung geflutet. Cellulose- und xylanhaltige Bereiche färbten sich daraufhin orangebraun, wohingegen die Abbauzone gelblich erschien; eine gelbliche Zone um die Schwarzfäulekolonien verwies auch auf stärkehaltigen Medien auf enzymatische Aktivität, stärkereiches Medium war deutlich dunkelblau gefärbt. Zur Überprüfung des Pektinabbaus wurden die entsprechenden Platten mit 10 ml CTAB-Lösung geflutet und 40 min bei 30 °C im Wärmeschrank inkubiert. CTAB präzipitiert intaktes Pektin, wodurch pektinfreie Bereiche klar in einem sonst undurchsichtig milchigen Medium erscheinen. Sowohl der Kolonie- als auch der Halodurchmesser abzüglich des Inokulumstücks (0,5 mm) wurde für jede Platte zweimal um 90 °C versetzt bestimmt und gemittelt.

Die Auswertung für das Isolat 8088-2 erfolgte 5, 10, 15 und 20 Tage nach Inokulation. Für jedes Nährmedium und jeden Zeitpunkt wurden fünf Wiederholungen angesetzt und der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Zum Vergleich der verschiedenen Schwarzfäuleisolate bezüglich ihres Vermögens die unterschiedlichen Substrate abzubauen und für ihr Wachstum zu nutzen, wurden die Platten 15 dpi evaluiert. Pro Isolat und Nährmedium wurden sechs Wiederholungen generiert und der Versuch wurde viermal wiederholt.

3.2.5.2 Nachweis des Ligninabbaus mittels Bavendamm-Test

Medium	Zusammensetzung
Tannin-Agar	1,5 % (v/v) Malzextrakt 0,5 % (w/v) Tanninsäure (Sigma Aldrich) 2 % (w/v) Agar (Merck) mit 1M NaOH auf pH 7 eingestellt

Die Bavendamm-Reaktion zur Unterscheidung von Weißfäule- und Braunfäuleerregern wurde 1928 von dem gleichnamigen Mykologen Werner Bavendamm entwickelt und zeigt, ob Pilze in der Lage sind die Polyphenoloxidase Laccase zu bilden (Schmidt, 1994).

Für den Nachweis des Ligninabbaus durch verschiedene Isolate der Schwarzfäule, wurden runde Myzelstücke (Ø 5mm) aus der Wachstumszone der Isolate entnommen, die zuvor drei bis vier Wochen bei 25 °C auf PDA kultiviert wurden und auf Tannin-Agar übertragen. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 7 Tage bei 25 °C und Dauerlicht (50 % Weißlicht, 50 % UV-A Licht) inkubiert. Eine dunkelbraune Verfärbung des Mediums um die Inokulationsstelle wies auf eine Oxidation der im Agar enthaltenen Tanninsäure und damit der Produktion der Polyphenoloxidase Laccase hin. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

3.2.6 Histologische Untersuchungen

Die mikroskopischen Untersuchungen im Fluoreszenzbereich, als auch im Durchlicht wurden mit dem Mikroskop Axiovision 4 der Firma Zeiss (Oberkochen) durchgeführt. Für die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen wurde überdies der Filtersatz 05 (Anregung: 395-440 nm, Emission: 470 nm) angewendet. Die Bilder wurden mit der Kamera DC 300 der Firma Leica (Wetzlar) erstellt, mit Hilfe des Tribers Leica DC Twain Version 5.1.1 eingelesen und der AxioVison Rel. 4.8.1 Software aufgenommen und ausgewertet.

3.2.6.1 Färbung der oberflächlichen Pilzstrukturen mittels Direct Yellow 96

Färbelösung	Zusammensetzung
Färbelösung „Direct Yellow“	0,05 % Direct Yellow 96 (Sigma Aldrich)

Die auf der Pflanzenoberfläche sich ereignenden Entwicklungsschritte von *P. ampellicida* wie Konidienanheftung, -keimung und Appressorienbildung wurden mit dem Farbstoff Direct Yellow 96 (Diphenyl brilliant flavine 7 GGF) sichtbar gemacht.

Hierzu wurden die Blattscheiben mit der infizierten Blattseite nach unten in die Färbelösung gelegt und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal in destilliertem Wasser gewaschen, um überflüssige Farbstoffreste zu entfernen und auf einen Objektträger überführt. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.6.2 Nachweis pilzlicher Strukturen in der Pflanze und Kallose mittels Anilinblau

Färbelösung und Reagenzien	Zusammensetzung
Entfärbelösung	1 M KOH
Anilinblau-Lösung	0,05 % (w/v) Anilinblau (Keller, Mannheim) 1 M Tris-HCl, pH 10

Zur Sichtbarmachung pilzlicher Strukturen im Pflanzengewebe und Kalloseeinlagerungen in den Zellwänden der Epidermis, wurden die entsprechenden Blattscheiben mit einer alkalischen Anilinblaulösung gefärbt.

Hierzu wurden die Blattscheiben zunächst in 90 %-igem Ethanol entfärbt und bis zu den mikroskopischen Betrachtungen fixiert und gelagert. Vor der Färbung wurden die farblosen Blattscheiben schrittweise in Wasser überführt und anschließend bei 80 °C in Entfärbelösung inkubiert, bis diese völlig durchsichtig waren. Im Anschluss wurden sie vorsichtig in destilliertem Wasser gewaschen und auf einen Objektträger übertragen. Die Färbung erfolgte mit 2 bis 3 Tropfen Anilinblaulösung und die Präparate wurden umgehend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.2.6.3 Untersuchung der Autofluoreszenz

Zur besseren Untersuchung der Autofluoreszenz wurde das störende Chlorophyll durch eine Inkubation der Blattscheiben in 90 %-igem Ethanol für etwa zwei Tage entfernt. Eine Lagerung war ebenfalls in Ethanol möglich. Anschließend wurden die Blattscheiben schrittweise in Wasser überführt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

3.2.6.4 Mischfärbung mit Ethacridinlactat und Acridinorange

Färbelösungen	Zusammensetzung
Stammlösung Acridinorange	0,05 % (w/v) Acridinorange (Sigma Aldrich)
Stammlösung Ethacridinlactat	0,1 % (w/v) Ethacridinlactat (Sigma Aldrich)
Färbelösung	0,5 ml Stammlösung Acridinorange 0,5 ml Stammlösung Ethacridinlactat 4 ml H ₂ O 5 µl Break-Thru® (Evonik Degussa, Essen)

Die Mischfärbung aus den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Ethacridinlactat (6,9-Diamino-2-ethoxyacridin-DL-lactat-Monohydrat) und Acridinorange (*N,N,N',N'*-Tetramethylacridin-3,6-diamin) ist vergleichsweise neu und erfolgte nach Müller et al. (2014), welche die Färbung anhand des Pathosystems Weinrebe – Falscher Mehltau etablierte und untersuchte. Acridinorange ist ein bekannter Fluoreszenzfarbstoff, der in der Molekularbiologie zum Färben von DNA und RNA eingesetzt wird. Ethacridinlactat stellte sich als hervorragender Fluoreszenzfarbstoff für frühe Infektionsstadien des Falschen Mehltaus heraus (Müller, 2014). In Kombination führen die Farbstoffe je nach Rebsorte oder -art zusätzlich zur Sichtbarmachung von frühen Reaktionen infizierter Stomata und angrenzender Bereiche.

Zur Färbung wurden Blattscheiben für 10 min in die Färbelösung gelegt und anschließend dreimal in destilliertem Wasser gewaschen, um Farbrückstände zu vermeiden. Für jeden Versuch wurde die Färbelösung frisch angesetzt. Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, wobei die Reaktionen um die Appressorien von *P. ampellicida* in keine, leichte und starke Reaktionen unterschieden wurden (Kapitel 4.4.1.2, Abbildung 23).

3.2.6.5 Detektion von Superoxidanionen mittels Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

Färbelösungen	Zusammensetzung
Kaliumphosphatpuffer	0,01 M Kaliumphosphat, pH 7,8
NBT- Stammlösung	0,5 % (w/v) Natriumblau-Tetrazoliumchlorid (Merck) 0,01 M Kaliumphosphatpuffer
Färbelösung	9 ml Kaliumphosphatpuffer 1 ml NBT-Stammlösung 10 µl Break-Thru® (Evonik Degussa, Essen)
Entfärbelösung	Ethanol:Aceton (4:1)

Die Detektion von Superoxidanionen als Teil der reaktiven Sauerstoffspezies wurde in modifizierter Weise nach Doke (1983) und Walz (2005) durchgeführt. Nitroblautetrazolium-Chlorid, das zunächst gelblich erscheint wird durch die Anwesenheit von Superoxidanionen zu dem blauen Farbstoff Formazan umgewandelt, der sich unlöslich am Ort seiner Entstehung niederschlägt.

Die zu untersuchenden Blattscheiben wurden mit der Blattoberseite nach unten in die Färbelösung getaucht, wobei darauf zu achten war, dass die Blattscheiben vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Für jeden Versuch wurde die Färbelösung frisch angesetzt. Die Proben wurden zweimal für ca. 5 min mit Hilfe einer Vakuumpumpe (SC810, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) vakuumfiltriert, bis der Druck auf 60 hPa abgesunken war, woraufhin das System schlagartig belüftet wurde und es zur Infiltration der Färbelösung kam. Zur Verstärkung der Reaktion wurden die Proben für weitere 60 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert und anschließend zum Entfernen des Chlorophylls und zur Konservierung in Entfärbelösung überführt, wobei die Lösung mehrere Male bis zur völligen Entfärbung ausgetauscht wurde. Die Analyse der Blattscheiben erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops im Hellfeld.

3.2.6.6 Färbung von Phenolen mittels Methylrot

Färbelösung und Lösungsmittel	Zusammensetzung
Methylrot-Färbelösung	gesättigte Lösung von Methylrot (Sigma Aldrich) in Xylol
Isopropanol	Isopropanol
Isopropanol/Xylol	Isopropanol:Xylol (4:1)
Xylol	Xylol

Der Nachweis oxidierter Phenole mittels Methylrot erfolgte in modifizierter Form nach Kortekamp et al. (1998) und Dayanandan et al. (1983). Zunächst wurden die Blattscheiben in Ethanol vollständig entfärbt und anschließend jeweils für 10 min in Isopropanol, einem Isopropanol/Xylol-Gemisch und schließlich in Xylol inkubiert. Zur Färbung wurden sie für 10 bis 30 s in eine gesättigte Lösung von Methylrot in Xylol getaucht. Im Anschluss wurde der überschüssige Farbstoff in reinem Xylol entfernt und die Proben umgehend mikroskopisch im Hellfeld untersucht. Oxidierte Phenole nehmen durch die Färbung eine leuchtend dunkelrote Farbe an.

3.2.6.7 Untersuchungen der Blattoberfläche mittels Rasterelektronenmikroskop

Zur Untersuchung der Struktur der Blattoberfläche und der sich darauf entwickelnden Stadien des Erregers der Schwarzfäule, wurde ein Rasterelektronenmikroskop (Stereoscan S260, Leica, Wetzlar) mit einer vorgeschalteten Kryo-Einheit (CT 1500, Oxford Instruments, Abingdon, Großbritannien) eingesetzt.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Bereiche aus Blättern und Blattscheiben mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem kolloidalen Graphitkleber auf dem Objektträger fixiert. Dieser wurde mit Hilfe einer Kryo-Transfereinheit in die Kryostation überführt und bei ca. -180 °C und unter Vakuum

schockgefroren. Ebenfalls mit der Transfereinheit wurden die Proben anschließend unter Vakuum in die Präparationskammer des REM und weiter in dessen elektronenmikroskopische Säule eingeschleust. Hier wurde nun der Objektträgertisch auf -80 °C aufgeheizt, um Wasserkristalle, die sich im Präparationsprozess an der Probenoberfläche angelagert haben, zu sublimieren. Es folgte erneut eine Temperaturreduzierung und die Proben wurden in der mit Argon gefluteten Präparationskammer mit Gold besputtert. Der Objektträger wurde nun erneut in die elektronenmikroskopische Säule überführt und die Probenoberfläche konnte nach Anlegen einer Hochspannung (15 kV) untersucht werden. Zur Erstellung von Bildern wurde die Software „diss“ (point electronics, Halle) und zur Bildbearbeitung die Software „dips“ (point electronics, Halle) verwendet.

3.2.7 Bestimmung der Phenolgehalte

Die Quantifizierung der freien und estergebundenen Gesamtphenole erfolgte nach Kofalvi und Nassuth (1995) und de Farias Viegas Aquije et al. (2010) photometrisch mittels Folin-Ciocalteu-Test (FC-Test) als Gallussäureäquivalente. Einzelne phenolische Komponenten wie die Gallussäure, *p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, das Kaempferol, Catechin und Epicatechin wurden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) identifiziert und quantifiziert.

3.2.7.1 Extraktion der freien Phenole

Die zu untersuchenden Blattproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Zum Aufschluss der Proben wurde das Blattmaterial in einem 10 ml-Mahlbecher in der Schwingmühle bei einer Frequenz von 30000 Schlägen pro s eine Minute lang zu feinem Pulver zerkleinert. Sowohl die Mahlbecher, als auch das Blattmaterial wurden stets mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Von jeder Probe wurden zweimal 100 mg Blattmaterial in 15 ml-Falcontubes abgewogen und damit eine A- und B-Probe erstellt. Jede der Proben wurde mit 5 ml 60 %-igem Methanol (Th Geyer, Renningen) versetzt, gevortext und für 30 min bei 25 °C und 90 rpm in Dunkelheit geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 15 min und 5000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Falcontube überführt und der Rückstand für weitere Analysen zu den gebundenen Phenolen eingefroren.

3.2.7.2 Saure und alkalische Hydrolyse

Im Zuge der methodischen Weiterentwicklung wurde mit dem Überstand der Phenolextraktion sowohl eine saure als auch eine alkalische Hydrolyse angestrebt. Hierzu wurden jeweils 1,7 ml des Überstandes abgenommen und für die saure Hydrolyse mit 300 μl 10,5 M HCl und für die alkalische Hydrolyse mit 300 μl 3,3 M NaOH ergänzt. Die Proben wurden gevortext und für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in der Speed-vac bei 40 °C verdampft und der Rückstand in 1,7 ml 60 %-igem Methanol aufgenommen.

3.2.7.3 Bestimmung der freien Phenole mittels FC-Test

Reagenzien	Zusammensetzung
Alkalireagenz	0,1 M NaOH 2 % Na ₂ CO ₃

Für die Bestimmung der freien Phenole mittels FC-Test, wurden 33 µl des Überstandes mit 300 µl bidestilliertem Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl FC-Reagenz (Merck) wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit geschüttelt. Der Blindwert wurde anstelle des Überstandes mit 60 %-igem Methanol generiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 1650 µl Alkalireagenz zugegeben und die Proben für weitere 30 min ebenfalls bei Raumtemperatur und in Dunkelheit geschüttelt. Die Vermessung der Proben erfolgte in Einweg-Kunststoffküvetten in einem Photometer bei 720 nm. Die Bestimmung der freien Phenole mittels FC-Test wurde für jede Probe zweimal durchgeführt.

Über die Kalibrierung mit Gallussäure wurden die Phenolgehalte in Gallussäureäquivalente (GAE), genauer in mg GAE/g FW, angegeben (siehe Anhang).

3.2.7.4 Bestimmung der freien Phenole mittels HPLC

Puffer und Laufmittel	Zusammensetzung
Essigsäure-Acetat-Puffer	4 mM Natriumacetat 5 % Essigsäure
Laufmittel A	Essigsäure-Acetat-Puffer/Methanol 90:10
Laufmittel B	Essigsäure-Acetat-Puffer/Methanol 75:25
Laufmittel C	Essigsäure-Acetat-Puffer/Methanol 5:95

Zur Bestimmung der freien Phenole mittels HPLC wurde 1 ml des Überstandes mit Hilfe von Einmalfiltern Chromafil® PET-45/15 (Macherey-Nagel, Düren) von Partikeln befreit, in dunkle Probengefäße überführt und in der HPLC vermessen. Jede Probe wurde in der HPLC doppelt analysiert.

Die phenolischen Inhaltsstoffe wurden mit einem computergesteuerten HPLC-System, welches mit einem Autosampler (Smartline Autosampler 3800, Knauer, Berlin) einem Degaser (Smartline Manager 5000, Knauer, Berlin), einer Pumpe (Smartline Pumpe 1000, Knauer, Berlin) und einem Photodiodenarraydetektor (RF-10a, Shimadzu, Kyōto, Japan) ausgestattet war, bestimmt und quantifiziert. Die Probenauftrennung erfolgte mit Hilfe einer Kinetex 2,6 µ PFP 100 Å Säule (Phenomenex, Aschaffenburg). Die verwendeten Laufmittel wurden vor ihrem Einsatz entgast und entsprechend der Gradiententabelle (Tabelle 5) verwendet. Jede Messung wurde mit einem Probenvolumen von 20 µl durchgeführt.

Tabelle 5. Gradiententabelle für die Laufmittel A, B und C.

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Fluss [ml/min]
initial	100	0	0	0,6
4	100	0	0	0,6
8	0	100	0	0,6
14	0	100	0	0,6
18	0	0	100	0,6
30	0	0	100	0,6
35	100	0	0	0,6
40	100	0	0	0,6

Zur Identifizierung und Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe wurden verschiedene Standards genutzt, die in Tabelle 6 mit den entsprechend gemessenen Retentionszeiten und Absorptionsmaxima angegeben sind.

Tabelle 6. HPLC-Standards mit zugehörigen Retentionszeiten und Absorptionsmaxima.

Standard	Retentionszeit [min]	Absorptionsmaximum [nm]
Gallussäure (Merck)	2,5	274
Catechin (Sigma Aldrich)	5,8	279
Kaffeesäure (Sigma Aldrich)	8,9	326
Epicatechin (Sigma Aldrich)	9,15	279
<i>p</i> -Coumarsäure (Sigma Aldrich)	11,8	310
Ferulasäure (Sigma Aldrich)	13,9	324
Kaempferol (Sigma Aldrich)	21,3	367

Anhand dieser Daten wurden Messfenster bestimmter Wellenlängen (Tabelle 7) erstellt, um eine optimale Messung und Quantifizierung der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe zu erzielen.

Tabelle 7. Anordnung der Messfenster

Zeit [min]	Wellenlänge [nm]
0,00	274
4,00	279
6,00	326
9,60	310
12,75	324
20,00	367
25,00	280
39,00	274

Zur Auswertung der Chromatogramme und Quantifizierung der einzelnen phenolischen Komponenten wurde die Software ClarityChrom (Knauer, Berlin) genutzt.

3.2.7.5 Extraktion der gebundenen Phenole

Zur Untersuchung der über Ester-Verbindungen an die Zellwand gebundenen Phenole wurde der Rückstand, der in der Extraktion der freien Phenole bereits entstanden war und bis zur weiteren

Verarbeitung eingefroren wurde, erneut für 5 min mit 4700 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung des restlichen Methanols wurden die Proben zunächst für 10 min kopfüber auf Filterpapier gestellt und anschließend nochmal für 30 min mit der Öffnung nach oben im dunklen Abzug belassen. Zur Extraktion der zellwandgebundenen Phenole wurden die Probenrückstände in 1,5 ml 0,5 M NaOH resuspendiert und für 16 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Danach schloss sich erneut ein Zentrifugationsschritt für 15 min und mit 5000 rpm an. Der gewonnene Überstand wurde abgenommen.

3.2.7.6 Bestimmung der gebundenen Phenole mittels FC-Test

Reagenzien	Zusammensetzung
Alkalireagenz	0,1 M NaOH 2 % Na ₂ CO ₃

Für die Bestimmung der estergebundenen Gesamtphenole mittels Folin-Ciocalteu-Test wurden jeweils 250 µl des Überstandes (Blindwert 250 µl 0,5 M NaOH) mit 40 µl 10 %-iger HCl angesäuert. 40 µl dieses Gemisches wurden mit 300 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und die Reaktion mit der Zugabe von 50 µl FC-Reagenz gestartet. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und in Dunkelheit wurde die Reaktion mit 1650 µl der Alkalireagenzlösung abgestoppt und für weitere 30 min geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben bei 720 nm im Photometer in Plastikkuvetten vermessen. Für jede Probe wurde ab dem Schritt der Neutralisation des Überstandes eine technische Wiederholung generiert.

Über die Kalibrierung mit Gallussäure (siehe Anhang) wurden die Phenolgehalte in Gallussäureäquivalente (GAE), in mg GAE/g FW, angegeben.

3.2.7.7 Bestimmung der gebundenen Phenole mittels HPLC

Zur Quantifizierung der gebundenen Phenole mittels HPLC wurde 1 ml des Überstandes mit 60 µl konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von ca. 2,5 abgesenkt. Durch die Zugabe von 100 µl NaCl 25 % (w/v) wurde die Menge der im Wasser gelösten Moleküle erhöht, das ein Übertreten der phenolischen Verbindungen von der wässrigen Phase in das Lösungsmittel erleichtert. Im Anschluss wurden 800 µl Ethylacetat dazu pipettiert, die Probe gründlich gevortext und in der Tischzentrifuge für 5 min bei 16000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden 500 µl entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die untere Phase wurde erneut mit 600 µl Ethylacetat extrahiert und die obere Phase (800 µl) nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren abgenommen und mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereint. Das Lösungsmittel Ethylacetat wurde im Anschluss unter permanentem Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand erneut in 200 µl Methanol aufgenommen und gelöst. Die Proben wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und in der HPLC vermessen.

3.2.8 Molekularbiologische Methoden

3.2.8.1 Isolation von RNA aus dem pflanzlichen Gewebe

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Rebblättern erfolgte mit dem “GeneMatrix Universal RNA Purification Kit” von EURx nach Herstellerangaben. Die Proben wurden zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Proben mit Mörser und Stößel in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver vermahlen und 50 bis 80 mg für die weitere Extraktion in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (Kapitel “PLANT TISSUE RNA Purification Protocol“) unter Berücksichtigung des “Appendix 2” für einen möglichen DNase-Verdau direkt auf der Säule (EURx LTD. 2011).

3.2.8.2 RNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde 1 µl der RNA mit dem Spektralphotometer (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) vermessen. Die RNA-Konzentration wurde dabei anhand des Lambert-Beersche Gesetz bestimmt; die Reinheit ergibt sich aus dem Quotient der OD260 und OD280, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Als Blindwert diente autoklaviertes bidestilliertes Wasser.

3.2.8.3 Reverse Transkriptase

Die zuvor extrahierte RNA wurde mit Hilfe des “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR” (Thermo Scientific) in cDNA umgewandelt. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben, wobei stets 250 ng RNA in einem 20 µl-Ansatz zu cDNA synthetisiert wurden, die im Anschluss mit DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt und bei -80 °C eingefroren und gelagert wurde. Die RT-Reaktion wurde in einem Thermocycler „Labcycler Basic” (SensoQuest) nach dem in Tabelle 8 angegebenen zeitlichen Ablauf durchgeführt.

Tabelle 8. Zeitlicher Ablauf der reversen Transkription.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initialisierung	25 °C	10 min
Reverse Transkriptase	50 °C	15 min
finaler Heizschritt	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

3.2.8.4 Quantitative real-time PCR

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge ausgesuchter Gene wurde eine quantitative Echtzeit-PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green angewendet. SYBR Green interkaliert bzw. lagert sich an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA an, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes zunimmt, die am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Transkriptmenge zu und ermöglicht somit die Quantifizierung der Zielsequenz (Holzapfel & Wickert, 2007).

Die Durchführung der quantitative Echtzeit-PCR erfolgte mit dem PCR-Kit "Maxima SYBR Green qPCR" von Thermo Scientific in einem Rotor-Gene Q Cycler (QIAGEN). Zunächst wurden 20 µl des Mastermixes, bestehend aus Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), entsprechendem Forward Primer und Reverse Primer (Tabelle 10) und nukleasefreiem Wasser in die Reaktionsgefäße vorgelegt und anschließend mit 5 µl 1:10 verdünnter cDNA ergänzt. Die Messung der Proben fand nach dem in Tabelle 9 angegebenen Protokoll stets in Triplikaten statt. Zur Beurteilung der Spezifität und Reinheit der Amplifikate, wurde eine Schmelzkurve von 56 bis 96 °C durch kontinuierliche Temperaturerhöhung durchgeführt. Die Primereffizienz aller Primerpaare wurde zuvor mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt und lag zwischen 1,9 und 2,0. Als Referenzgen diente stets Ubiquitin, dessen Verlässlichkeit regelmäßig mit den Haushaltsgenen Actin und GAPDH überprüft wurde. Zur Erstellung der Schmelzkurve und Berechnung der Ct-Werte wurde die zugehörige Rotor-Gene Q Series Software Q 2.0.2 (QIAGEN) verwendet. Die relative Quantifizierung erfolgte nach Pfaffl et al. (2002).

Tabelle 9. Zeitlicher Ablauf der quantitativen real-time-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	

Tabelle 10. Liste der in der quantitativen real-time-PCR verwendeten Primer, deren Sequenzen und Referenzen.

Primername	Sequenz 5'→3'	Referenz
QPCR-HK-Ubiquitin-F	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	Reid et al. (2006)
QPCR-HK-Ubiquitin-R	AACCTCCAATCCAGTCATCTAC	
QPCR-HK-EF1- α -F	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	Reid et al. (2006)
QPCR-HK-EF1- α -R	GAACTGGGTGCTTGATAGGC	
QPCR-HK-GAPDH-F	ACAGCTCCCGTGTGATCGA	Reid et al. (2006)
QPCR-HK-GAPDH-R	TAAAAGCTCTGCCCTTGAAAT	
QPCR-PR10-F	GCACATCCCGATGCCTATTAAG	Merz et al. (2014)
QPCR-PR10-R	ACTTACTGAGACTGATAGATGCAATGAATA	
QPCR-VvSTSmulti-F	GGTTTTGGACCAGGCTTGACT	Höll (2014)
QPCR-VvSTSmulti-R	GAGATAAATACCTTACTCCTATTCAAC	
QPCR-PAL-F	CTAAAAGTGGTGGATAGGGAACATG	Janine Höll, Universität Heidelberg
QPCR-PAL-R	TCTTCTCATTTTCGCCATTGCT	
QPCR-VvPGIP-F	TGTTCCAGTTTGATCTTTCGAG	Liu et al. (2014)
QPCR-VvPGIP-R	CAAGCACCGATTGTGAAAGTAG	

3.2.9 Analyse der Zellwandzusammensetzung

Die Analyse der Zellwände, genauer der Monosaccharide und der glykosidischen Bindungen in die sie involviert sind, wurde in Kooperation mit der AG Lebensmittelchemie und Phytochemie des KIT Karlsruhe (Herr Prof. Mirko Bunzel und Dr. Daniel Wefers) durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurden die fünf Hauptblattadern jedes Blattes mit dem Skalpell entfernt und die Blätter im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 C gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Blätter in einer Schwingmühle bei einer Frequenz von 30000 Schlägen pro s für eine Minute unter Stickstoffeinfluss zerkleinert und jeweils 400 mg abgewogen. Zur weiteren Extraktion der Zellwände wurden die Proben mit 5 ml 90%-igem Ethanol versetzt, gevortext und anschließend mit 3000 rpm 4 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Extraktion vier weitere male wiederholt bis der Überstand farblos und der Rückstand weiß erschien. Ein weiterer Extraktionsschritt mit reinem Aceton wurde angeschlossen und die Proben bei 40 C im Trockenschrank für 5 Stunden getrocknet.

Sowohl die Monosaccharid- als auch die Methylierungsanalyse wurden von Dr. Daniel Wefers am KIT Karlsruhe vorgenommen. Die genaue Vorgehensweise wurde von Wefers und Bunzel (2015) beschrieben.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel® 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und der statistischen Software XLSTAT Version 2016 (Addinsoft, Paris, Frankreich), die sich nahtlos in Excel integriert.

Die Daten wurden zunächst mit Hilfe deskriptiver Methoden in Form von Diagrammen und Tabellen aufgearbeitet, wobei stets, wenn nicht anders angegeben, die Mittelwerte der entsprechenden Versuchswiederholungen und deren Standardabweichung angegeben wurden.

Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten wurden bei normalverteilten Daten mit Hilfe der ANOVA inklusive eines paarweisen Mittelwertvergleiches überprüft, dem stets der Tukey-Test zugrunde lag. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α lag dabei bei 5 %. Nicht normalverteilte Daten wurden zunächst mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis auf mögliche Signifikanzen untersucht. Der mehrfache Paarvergleich nach Steel-Dwass-Critchlow-Fligner wurde darauf aufbauend zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Varianten eingesetzt.

Zur Analyse der linearen Beziehung zwischen der Abbau- und Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen und der Pathogenität (Kapitel 4.4.4.1.3) wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson angewendet.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Anlehnung an die Ziele dieser Arbeit in vier Hauptteile gegliedert. Zunächst wurde ein Screening der Europäischen Wildreben hinsichtlich ihrer Resistenz gegen verschiedene Pathogene vorgenommen, aufgrund dessen eine Auswahl einzelner Wildrebenakzessionen für weitere Untersuchungen stattfand. Im zweiten Teil wurde der asexuelle Infektionsprozess des Schwarzfäuleerregers anhand mikroskopischer Untersuchungen beschrieben und dessen Ernährungswiese näher charakterisiert. Darauf aufbauend folgte ein Vergleich der wesentlichen Infektionsschritte auf verschiedenen resistenten Genotypen und Blattetagen. Er sollte Aufschluss geben, welche Entwicklungsschritte auf teilresistenten und resistenten Genotypen, aber auch ausgewachsenen, von der Altersresistenz betroffene, Blätter gehemmt oder gar unterbunden werden. Der vierte Abschnitt befasst sich mit der Untersuchung der potentiellen Resistenzmechanismen der verschiedenen Genotypen gegenüber der Schwarzfäule mittels verschiedener Methoden.

4.1 Resistenzscreening und Evaluierung der Europäischen Wildrebenakzessionen

Die Europäischen Wildreben sollten im Rahmen eines Resistenzscreenings bezüglich ihrer Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber dem Falschen und dem Echten Mehltau sowie der Schwarzfäule getestet werden, mit dem Ziel, die resistentesten Wildrebenakzessionen zu selektionieren. In Abhängigkeit des Pathogens wurden verschiedene Testsysteme bzw. Boniturschemata angewendet. Als Positivkontrolle diente stets die Rebsorte 'M-Th', die gegenüber allen drei Erregern als anfällig beschrieben ist. Die pilzwiderstandsfähigen Neuzüchtungen 'Regent' und 'Solaris' gelten vor allem als tolerant gegenüber dem Falschen und Echten Mehltau. 'Börner' ist eine arthybride Unterlagsrebsorte und weist eine ausgeprägte Resistenz gegenüber der Schwarzfäule, aber auch den Mehltaukrankheiten auf und wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

4.1.1 Screening auf Resistenz gegen den Falschen Mehltau

Zur Prüfung der Wildrebenpopulation auf Resistenz gegen den Falschen Mehltau wurden vier verschiedene *P. viticola* Isolate verwendet, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Herkunft und den angewendeten Bekämpfungsstrategien einem unterschiedlichen Selektionsdruck unterlagen, der möglicherweise zu einer Ungleichheit hinsichtlich ihrer Fitness bzw. Virulenz geführt hat.

Die Screeningversuche zur Resistenz gegen den Falschen Mehltau basierten auf Blattscheiben, die mit einem Tropfen einer Sporangiensuspension inokuliert wurden. Die Evaluation des Befalls erfolgte mit Hilfe zweier Methoden, wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben. Zunächst wurde visuell die Größe der Sporulationsflecken in fünf Kategorien (0 – 4) unterschieden. Anschließend wurde die Konzentration der neu gebildeten Sporangien bestimmt.

In Abbildung 3 A und Abbildung 4 sind die Boniturergebnisse dargestellt, wobei die Ergebnisse der einzelnen Isolate aufsummiert und somit zunächst als gleichwertige Wiederholungen gewichtet wurden. 'M-Th', der als Positivkontrolle gilt, zeigte sowohl bei den ermittelten Sporangienkonzentrationen als auch den Boniturwerten vergleichsweise hohe Befallswerte. Auf den Blattscheiben der Sorte 'Börner' konnte kein Isolat neue Sporangien bilden und sich somit vermehren. Auf der pilzwiderstandsfähigen Rebsorte 'Regent' wurden sieben Tage nach Inokulation bei allen Isolaten nur wenige Sporulationsflecken beobachtet. Die Zahl der gebildeten Sporangien war jedoch vergleichsweise gering und entsprach nur ca. 4,8 % der ermittelten Sporangienzahl bei 'M-Th'. Auf der Rebsorte 'Solaris' war rein visuell kaum eine Sporulation nachzuweisen und es wurden nur wenige neu gebildete Sporangien ermittelt. Die Europäischen Wildreben zeigten innerhalb der Population vor allem hinsichtlich der Sporangienneubildung, aber auch den Boniturwerten, eine hohe Variabilität. Nur wenige Wildreben wiesen vergleichbar geringe Befallswerte wie 'Regent' und 'Solaris' auf. Die meisten der Wildreben lagen hinsichtlich Anfälligkeit bzw. Resistenz zwischen den Sorten 'Regent' und 'Solaris' und der anfälligen Sorte 'M-Th'; wenige der Wildreben waren anfälliger als 'M-Th'.

Im Vergleich der *P. viticola*-Isolate zeigte sich, dass die visuelle und ungenauere Bewertung der Sporulationsfleckengröße der verschiedenen Isolate innerhalb der einzelnen Genotypen sehr ähnlich war. Deutliche isolatspezifische Unterschiede, wie beispielsweise bei K17, K84 oder Hö29 (Abbildung 7, rot umrandet), bildeten die Ausnahme. Eine weitaus größere Variabilität war bei der Anzahl neu gebildeter Sporangien zu verzeichnen, die das epidemische Potential neue Infektionen hervorzurufen widerspiegelt. Zur besseren Verdeutlichung sind einzelne Wildrebenakzessionen, die große isolatspezifische Unterschiede zeigten in Abbildung 3 B vergleichend dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die *P. viticola* – Isolate je nach Wildrebenakzession unterschiedlich virulent waren. Bei der Quantifizierung der Sporangien war ebenfalls auffällig, dass deren Größe je nach Isolat und Wirt stark variieren konnte (keine Daten erhoben).

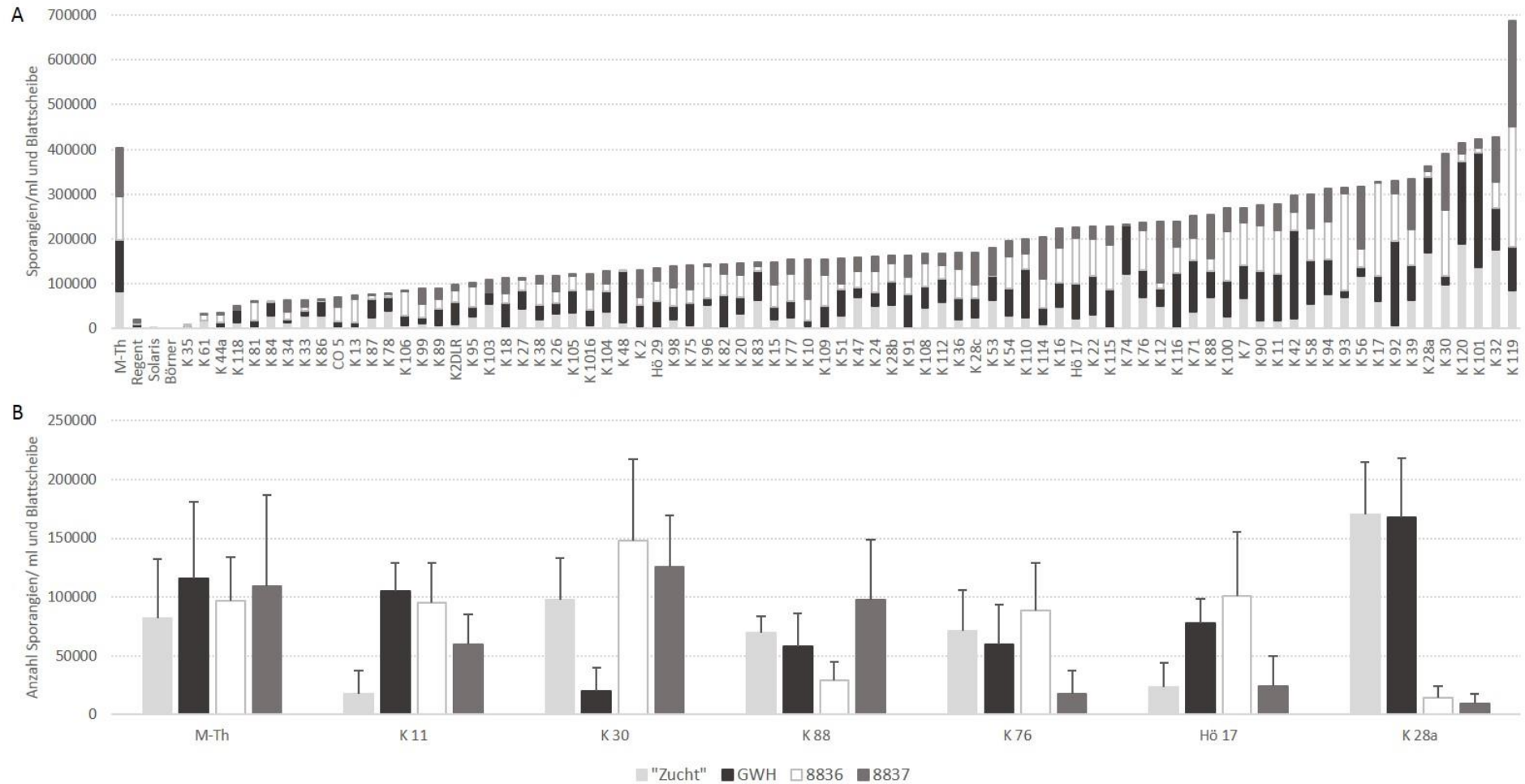


Abbildung 3. Befall durch den Falschen Mehltau angegeben als Sporangienkonzentration [Sporangienanzahl/ ml und Blattscheibe] 7dpi. Die Versuche wurden anhand vier verschiedener Isolate des Falschen Mehltaus ("Zucht", GWH, 8836 und 8837) durchgeführt. Für die Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichsorten 'M-Th', 'Regent', 'Solaris' und 'Börner' wurden die Ergebnisse zunächst aufsummiert in einem gestapelten Säulendiagramm dargestellt (A). Einzelne Akzessionen wurden ausgewählt um isolatspezifische Unterschiede aufzuzeigen (B). n = sieben Blattscheiben verschiedener Reben.

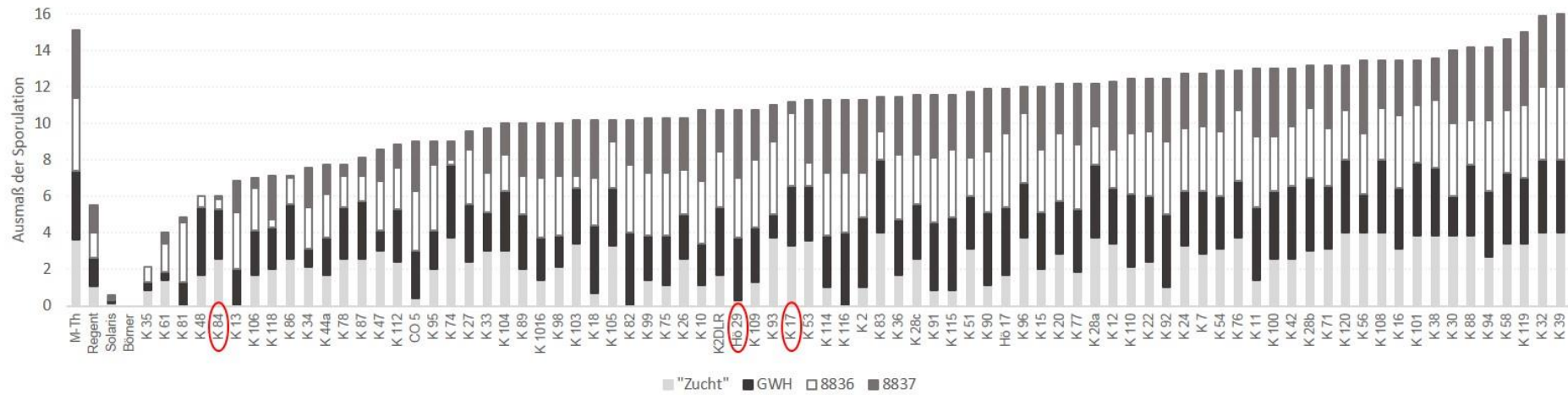


Abbildung 4. Ausmaß der Sporulation, in Form einer visuellen Evaluierung der Sporulationsflecken in fünf Kategorien (0 - 4) der Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichssorten ‘M-Th’, ‘Regent’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 7 dpi. Die Versuche wurden anhand vier verschiedener Isolate des Falschen Mehltaus (“Zucht“, GWH, 8836 und 8837) durchgeführt, deren Ergebnisse als Summe dargestellt sind. n = sieben Blattscheiben verschiedener Reben.

4.1.2 Screening auf Resistenz gegen den Echten Mehltau

Zur Ermittlung der Resistenz bzw. Anfälligkeit der Europäischen Wildreben gegenüber dem Erreger des Echten Mehltaus wurden mindestens drei Pflanzen pro Genotyp in Gewächshausversuchen infiziert und im Anschluss evaluiert. Die Bonitur erfolgte 21 Tage nach Inokulation wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben und sowohl die Befallsstärke als auch die Befallshäufigkeit bezogen sich auf die zehn jüngsten voll entwickelten Blätter jeder Rebe zum Zeitpunkt der Bonitur.

Die anfällige Kulturrebsorte 'M-Th' diente mit einer durchschnittlichen Befallsstärke von 50,1 % ($\pm 22,8$) und einer Befallshäufigkeit von 88,4 % ($\pm 16,1$) als Positivkontrolle. Die pilzwiderstandsfähigen Neuzüchtungen 'Regent' und 'Solaris' wiesen mit durchschnittlichen Befallsstärken von 10,3 und 9,0 % und Befallshäufigkeiten von 35,4 und 42,5 % ähnliche Werte auf und zeigten eine erhöhte Widerstandsfähigkeit im Vergleich zur Rebsorte 'M-Th'. Die Unterlagsrebsorte 'Börner' führte zu einem nur minimalen Befall (Befallsstärke 1,38 %, Befallshäufigkeit 18,57 %). Die Ergebnisse der 80 getesteten Europäischen Wildrebenakzessionen zeigten sowohl bezüglich der Befallsstärke, als auch der Befallshäufigkeit eine große Variabilität und bewegten sich zum Großteil zwischen den Ergebnissen der pilzwiderstandsfähigen Sorten 'Regent' und 'Solaris' und der anfälligen Rebsorte 'M-Th'. Mittels statistischer Analysen (Kruskal-Wallis-Test (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$) konnten keine statistisch belegbaren Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden.

4.1.3 Screening auf Resistenz gegen die Schwarzfäule

Die Resistenzerhebung gegenüber dem Erreger der Schwarzfäule wurde an ganzen Pflanzen durchgeführt und pro Sorte bzw. Akzession wurden mindestens drei Pflanzen getestet. Sowohl die Befallsstärke als auch die Befallshäufigkeit beziehen sich wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben, auf die zum Zeitpunkt der Inokulation fünf jüngsten Blätter.

Die anfällige Rebsorte 'M-Th' diente mit einer Befallsstärke von 30,91 % ($\pm 21,61$) und einer Befallshäufigkeit von 79,55 % ($\pm 23,21$) erneut als Positivkontrolle, die resistente Arthybride 'Börner' als Negativkontrolle (Befallsstärke 0 %, Befallshäufigkeit 0 %). Die pilzwiderstandsfähige Neuzüchtung 'Regent' wies einen vergleichsweise hohen Befall auf, der sich sowohl bezogen auf die Befallsstärke, als auch auf die Befallshäufigkeit nicht signifikant von der Sorte 'M-Th' unterschied. Die Sorte 'Solaris' war hingegen deutlich weniger stark und häufig befallen, wenn auch mittels Statistik keine signifikanten Unterschiede zu 'M-Th' nachweisbar waren. Die Ergebnisse der Europäischen Wildreben zeigten wiederholt eine hohe Variabilität, sowohl hinsichtlich der Stärke als auch der Zahl der befallenen Blätter. Mit Hilfe statistischer Analysen nach Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) konnten die Ergebnisse zur Befallsstärke und Befallshäufigkeit gruppiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Sorte 'Börner' (Gruppe A) sich signifikant von den Sorten 'M-Th' und 'Regent' und 27 der Wildreben unterschied, die der Gruppe B zugeordnet werden konnten. Die Sorte 'Solaris' und die anderen Wildreben bildeten die Gruppe AB, die sich weder signifikant von der resistenten Sorte 'Börner', noch von den anfälligen Sorten 'M-Th' und 'Regent' und den Wildreben der Signifikanzgruppe B unterschied und damit eine intermediäre Stellung einnahm. Die Gruppenzuordnungen der Wildreben waren bei Befallsstärke und Befallshäufigkeit weitestgehend, jedoch nicht vollständig, identisch.

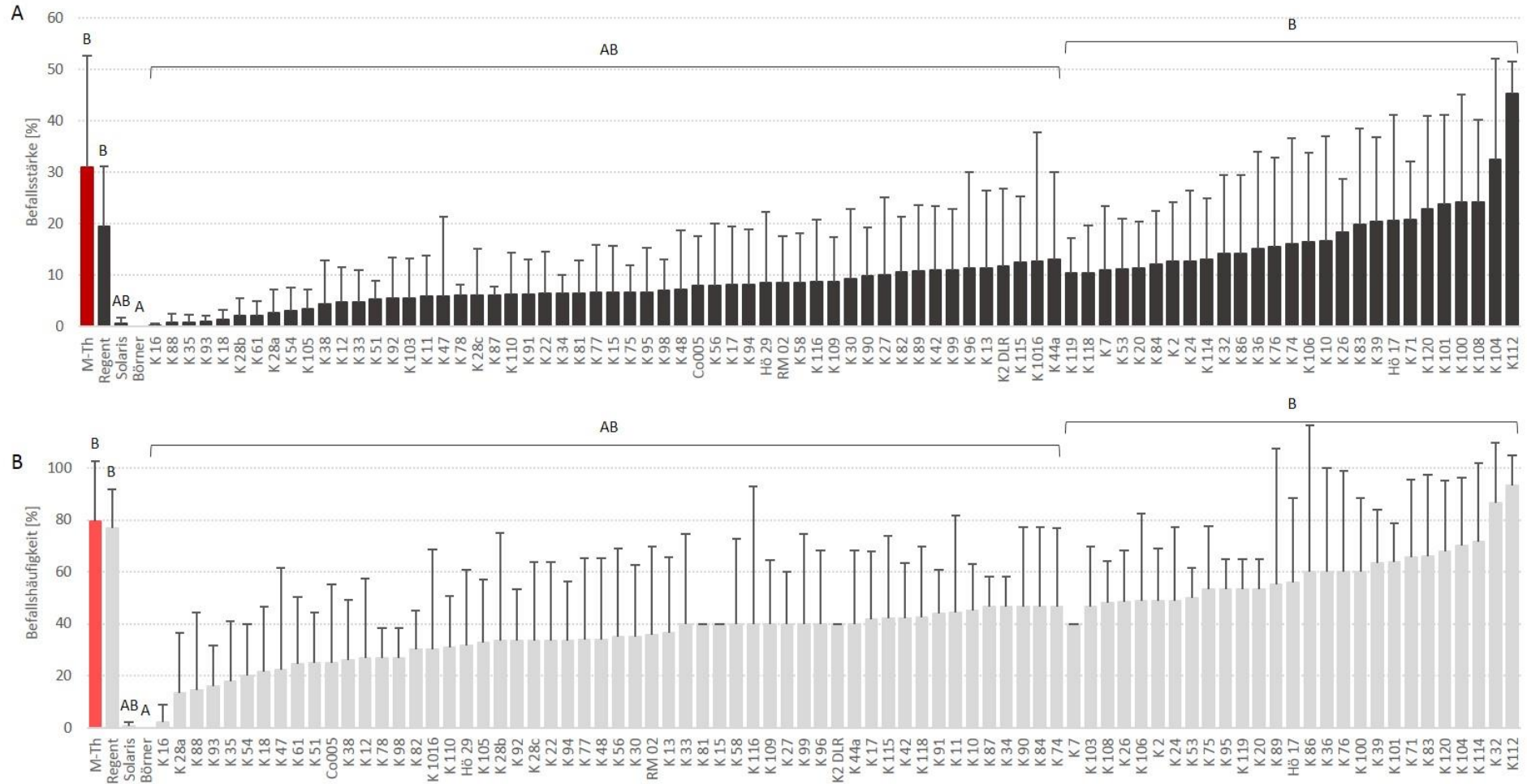


Abbildung 6. Schwarzfäulebefall angegeben als Befallsstärke (A) und Befallshäufigkeit (B) der Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichssorten ‘M-Th’, ‘Regent’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 21 dpi. A, AB, B - Signifikanzgruppen nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. $n \geq$ drei Reben.

Während der Durchführung des Screenings zur Schwarzfäuleresistenz wurde beobachtet, dass generell ältere Blätter weniger stark oder gar nicht befallen wurden. Bei den Wildreben waren zudem häufig weniger Blätter befallen als bei der Sorte 'M-Th'. Zur Überprüfung dieser Beobachtung anhand von Boniturdaten, ist in Abbildung 7 C die Befallsstärke der einzelnen Sorten und der Wildreben zusammengefasst in den Signifikanzgruppen AB und B getrennt nach den einzelnen Blattetagen dargestellt. Die Nummerierung der Blätter erfolgte zum Zeitpunkt der Inokulation durch eine Markierung der Rebenspitze (Abbildung 7 A). Die bis zur Bonitur nach 21 Tagen neu gebildeten Blätter (Abbildung 7 B), die in der Rebenspitze bereits angelegt waren, wurden mit einem '+' versehen (Abbildung 7 C).

Obwohl diese Blätter aufgrund ihrer geringen Größe zum Zeitpunkt der Inokulation nur minimalen Kontakt mit der Sporensuspension hatten, konnten bei einigen Reben Infektionen dieser Blätter beobachtet werden. Über alle Blattetagen hinweg, zeigte vor allem die Sorte 'Börner', aber auch die Sorte 'Solaris' nur wenige oder gar keine Symptome. Sie unterschieden sich innerhalb fast aller Blattetagen signifikant von den anderen Genotypen, die stets einen höheren Befall aufwiesen. Zwischen den Blattetagen konnten innerhalb der beiden Sorten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 7 D). Bei der Rebsorte 'M-Th' waren in der Regel bereits die beiden neu gebildeten Blätter '+2' und '+1' infiziert und zeigten Symptome. Die Ausprägung der Symptome nahm bis zum dritten Blatt zu, welches durchschnittlich den höchsten Befall hervorbrachte und nahm zu Blatt fünf hin wieder ab, was sich deutlich in der Verteilung der Signifikanzen zwischen den Blattetagen widerspiegelt (Abbildung 7 D). Bei vielen 'M-Th'-Reben waren auch ältere Blätter, wie Blatt Nummer sechs oder sieben befallen, die in diesem Boniturschema jedoch nicht erfasst wurden. Die Wildreben der Gruppe B, die sich in der gleichen Signifikanzgruppe wie 'M-Th' befinden, zeigten ebenfalls ein sehr ähnliches Befallsmuster wie die Sorte 'M-Th'. Jedoch war bei diesen Wildreben bereits das zweite Blatt am stärksten befallen und die Symptomausprägung nahm danach wieder ab. Auch der durchschnittliche Befall war ab Blatt zwei stets geringer als der Befall der Sorte 'M-Th'. Die Wildreben der Signifikanzgruppe AB waren über alle Blattetagen hinweg signifikant schwächer befallen als die Sorte 'M-Th' und die Wildreben der Signifikanzgruppe B. Der maximale Befall wurde bereits bei Blattetage eins beobachtet. Danach setzte eine zunehmende Resistenz der Blätter mit zunehmendem Blattalter ein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die anfällige Sorte M-Th stets am stärksten befallen war. Die bereits beobachtete und auch bekannte Altersresistenz der Blätter gegenüber der Schwarzfäule setzte bei den Wildreben vergleichsweise früher ein. Die Blätter der Sorten 'Börner' und 'Solaris' wiesen durchweg keinen oder nur minimalen Befall auf und unterschieden sich meist signifikant von 'M-Th' und den Wildreben, unabhängig ihrer Signifikanzgruppe.

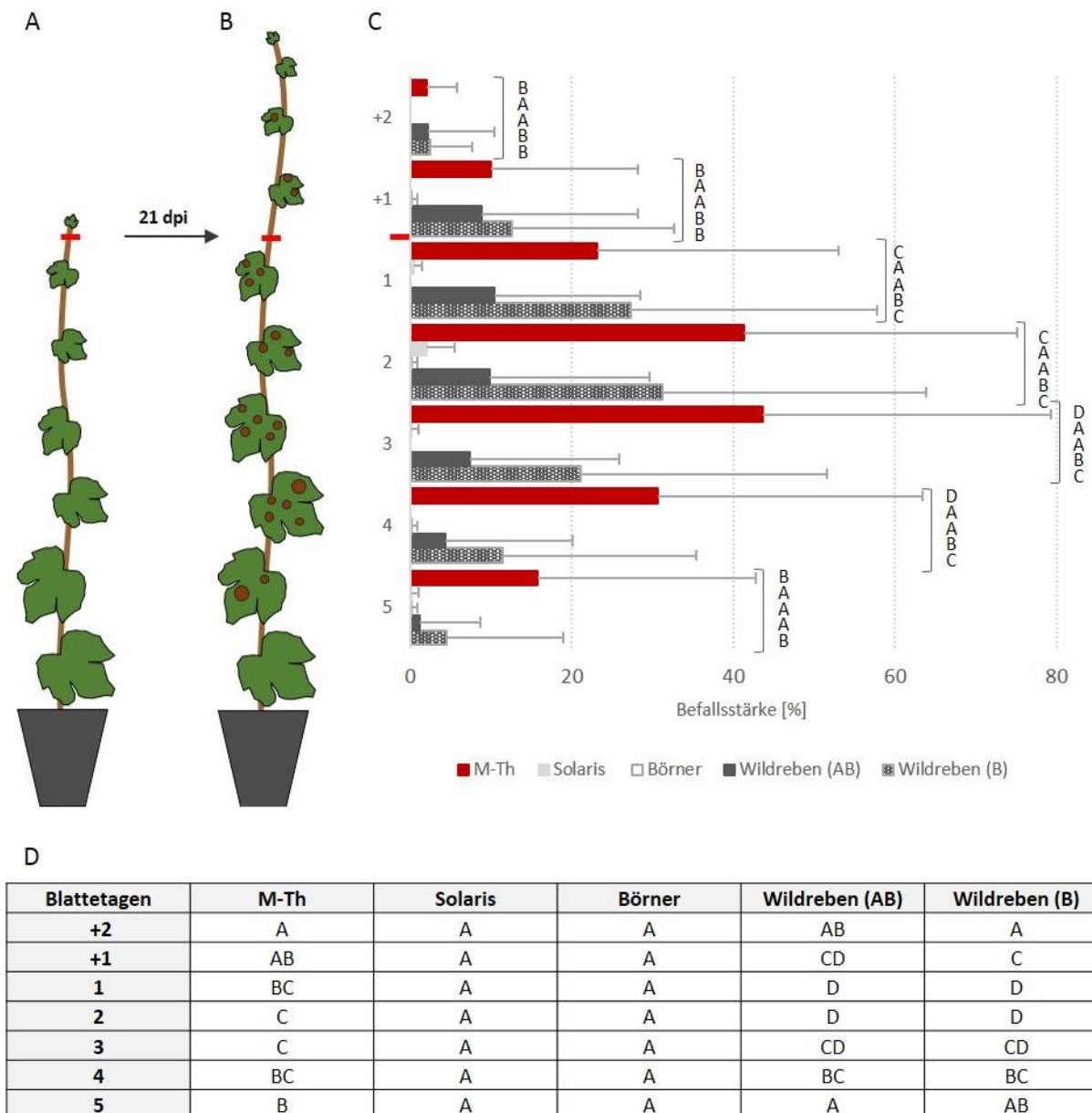


Abbildung 7. Befallsstärke der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ und den Europäischen Wildreben zusammengefasst in den Signifikanzgruppen AB und B getrennt nach Blattetagen (C). Signifikanzgruppen, die sich auf Sortenunterschiede innerhalb der einzelnen Blattetagen beziehen, wurden nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur), $\alpha = 0,05$, ermittelt. Die Nummerierung der Blätter erfolgte zum Zeitpunkt der Inokulation durch die Markierung der Spitze (A). Neu zugewachsene Blätter (B) wurden mit ‘+1’ und ‘+2’ bezeichnet. Die Tabelle (D) verweist auf signifikante Unterschiede hinsichtlich der Befallsstärke zwischen den Blattetagen innerhalb eines Genotyps wurden nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur), $\alpha = 0,05$, berechnet.

Im pathogenübergreifenden Vergleich der Wildreben zeigte sich jedoch, dass Wildrebenakzessionen, die eine gute Widerstandsfähigkeit gegenüber einem Pathogen zeigten nicht zwangsläufig auch eine ähnlich gute Widerstandsfähigkeit gegenüber den anderen Pathogenen besitzen müssen. Insgesamt gab es nur wenige Parallelen zwischen den Resistenztests. Die Resistenzen gegenüber der verschiedenen Pathogene der Wildrebenakzessionen scheinen demnach größtenteils entkoppelt zu sein.

4.2 Biologie von *P. ampellicida*

Ein detailliertes Wissen über die Biologie des Erregers der Schwarzfäule, speziell des asexuellen Infektionszyklus, trägt grundlegend zum besseren Verständnis der Krankheit bei. Darüber hinaus ist sie Voraussetzung für die zeitliche bzw. entwicklungsbedingte Einordnung der Abwehrmechanismen. Erkenntnisse zur Ernährungsweise der Schwarzfäule lassen darüber hinaus Rückschlüsse auf die Infektionsstrategie des Erregers zu.

4.2.1 Frühe Entwicklungsstadien

Mit Hilfe von Licht-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie wurden die frühen Entwicklungsstadien des asexuellen Infektionsprozesses des Erregers der Schwarzfäule, *P. ampellicida*, untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten Blattscheiben junger Blätter der anfälligen Rebsorte 'M-Th', die mit Tropfen einer Konidiensuspension des Schwarzfäuleisolates 8088-2 inokuliert wurden.

Die durch Flutung von Schwarzfäulekulturen mit Wasser gewonnenen Pyknidiosporen sind in Abbildung 8 A lichtmikroskopisch dargestellt und dienten als Ausgangspunkt neuer Infektionen. In einem ersten Infektionsschritt hefteten sich die Sporen an die Blattoberfläche der Rebe an (Abbildung 8 B). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Pyknidiosporen bereits zwei Stunden nach Inokulation erste Keimschläuche (Abbildung 8 C) bildeten, die sich im Folgenden am apikalen Ende verdickten (Abbildung 8 D) und schließlich Appressorien (Abbildung 8 E, F, G) formten. Die Appressorien entstanden meist an sehr kurzen (Abbildung 8 E), seltener an langen Keimschläuchen (Abbildung 8 F) und schienen durch ein bis zwei transversale Septen unterteilt zu sein (Abbildung 8 E, F). Diese waren jedoch ausschließlich zu frühen Entwicklungsstadien der Appressorien und nur nach Färbungen mit dem Farbstoff Anilinblau und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung zu erkennen. Während ihrer Reife lagerten die Appressorien Melanin ein, das ihnen eine dunkle bzw. schwarze Farbe verlieh (Abbildung 8 E, F), wodurch sie auch bei mikroskopischen Untersuchungen im Durchlicht deutlich sichtbar waren (Abbildung 8 J, K). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 24 hpi zeigten, dass die Pyknidiosporen durch den Transfer des Cytoplasmas aus der Pyknidiospore in das Appressorium, kollabierten. Ebenfalls etwa 24 Stunden nach Inokulation konnten sowohl mit Hilfe des Fluoreszenz- als auch des Rasterelektronenmikroskops Anzeichen für eine Penetration der Kutikula durch eine Penetrationshyphe unterhalb des Appressoriums beobachtet werden (Abbildung 8 H, I). Auf den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen (Abbildung 8 I) weisen dunkle punktförmige Flecken unterhalb der Appressorien auf eine solche Eindringstelle hin. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die oberflächlichen pilzlichen Strukturen mit Hilfe eines Klebestreifens entfernt und anschließend auf Anheftungsrückstände von Pyknidien und Appressorien in Kombination mit Eintrittsstellen untersucht, wie sie beispielhaft in Abbildung 8 H zu sehen sind.

Die Penetrationshyphe schien sich anhand von Beobachtungen im Durchlicht, nach der Penetration in zwei Haupthyphen zu teilen (Abbildung 8 J, K), die sich meist in entgegengesetzte Richtungen

orientierten (Abbildung 8 K, L). Erste Hyphen waren 30 hpi sichtbar, die in ihrer weiteren Entwicklung expandierten und sich verzweigten (Abbildung 8 L). Die Hyphen wuchsen dabei auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermis unterhalb der Kutikula, welche sie dabei anhob und nach oben wölbte (Abbildung 8 M, N), deutlich zu erkennen an den Kutikularfalten, die sich über den Hyphen abzeichnen (Abbildung 8 N).

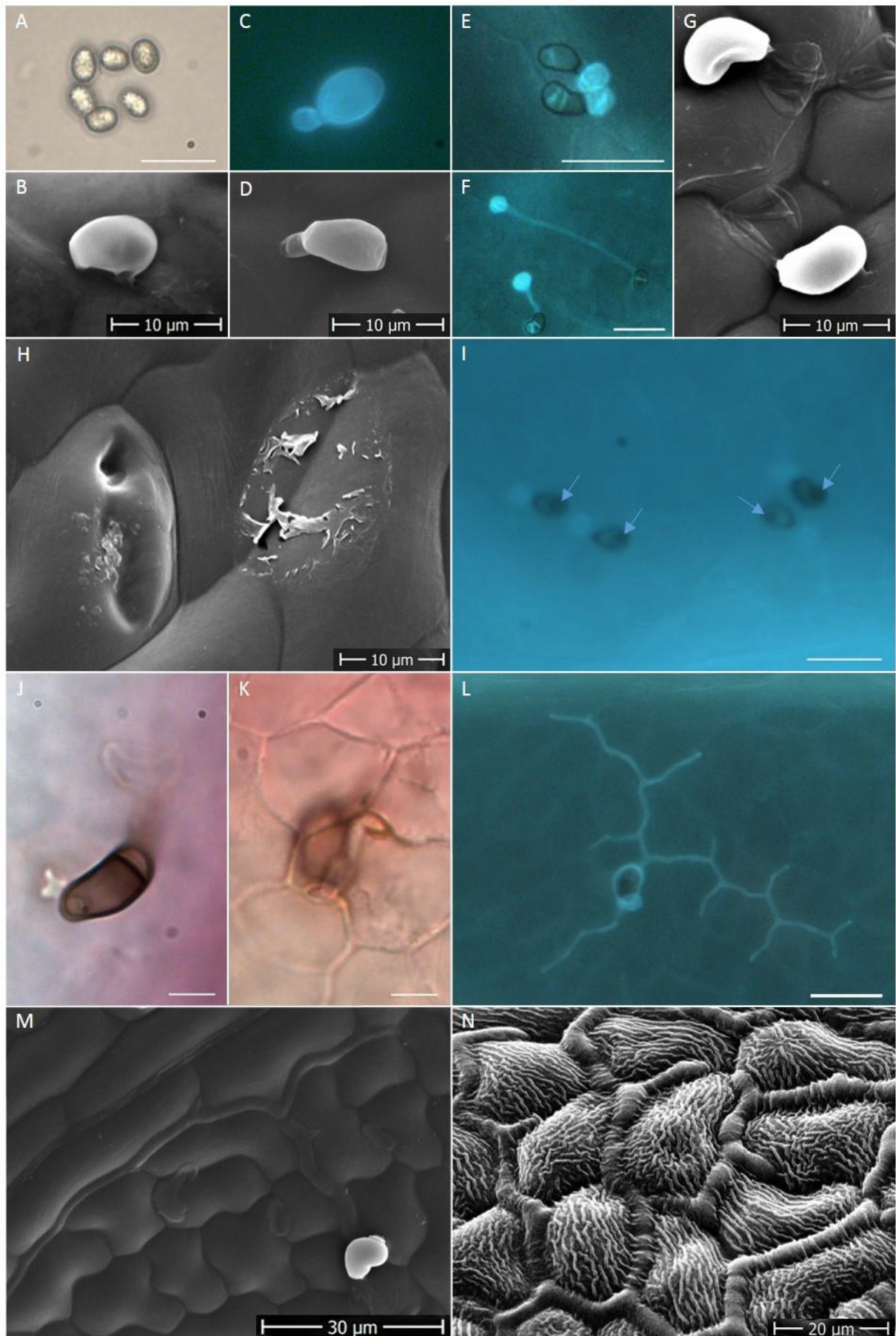


Abbildung 8. Frühe Entwicklungsstadien von *P. ampellicida* auf Blattscheiben junger Blätter der anfälligen Rebsorte 'M-Th' dargestellt im Durchlicht (A), mittels Rasterelektronenmikroskopie (B, D, G, H, M, N), Fluoreszenzmikroskopie nach Anilinblaufärbung (C, E, F, I, L) und Durchlicht nach Methylrotfärbung (J, K). Pyknidiosporen in Wasser 0 hpi (A) und angeheftet an der Blattoberfläche (B) mit anschließender Keimschlauchbildung 24 hpi (C, D). Entwicklung melanisierter Appressorien 24 hpi an kurzen (E, G) und langen Keimschläuchen (F), gefolgt vom Kollaps der Pyknidiosporen (G). Hinweise einer Penetration der Kutikula 24 hpi (H, I), gekennzeichnet durch Pfeile und erste Hyphenbildung 48 hpi (J, K). Wachstum und Verzweigung der Hyphen 5 dpi, die sich subküticulär auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermis entwickelten (L, M, N). Maßstäbe = 20 µm (C, E, F, I, L); 5 µm (J, K). n = zehn Reben.

4.2.2 Fortgeschrittene Entwicklungsstadien

Zur Untersuchung der fortgeschrittenen Entwicklungsstadien wurden junge Blätter der Sorte 'M-Th' inokuliert, zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommen und für weitere mikroskopische Analysen aufgearbeitet oder konserviert.

Während des Myzelwachstums verzweigten sich die Hyphen mehrfach und formten ein dichtes zweidimensionales Hyphennetz zwischen Epidermis und Kutikula (Abbildung 9 A). Aufeinander zuwachsende Hyphen schienen dabei nicht zu verschmelzen, sondern stellten ihr Wachstum kurz vor dem Zusammentreffen ein (Abbildung 9 A, B). Etwa acht bis zehn Tage nach Infektion konnten viele Hyphen im Zentrum des Myzels mit gewellter oder gelappter Form und mit lateralen Verzweigungen beobachtet werden (Abbildung 9 B). Diese lateralen Hyphenverzweigungen, auch Hyphenfinger genannt, entwickelten sich auf den periklinalen Zellwänden der Epidermiszellen ohne diese vollständig zu überwachsen. Ca. zehn bis zwölf Tage nach Inokulation erreichte das zweidimensionale Hyphennetzwerk seine maximale Größe (Abbildung 9 C). Zu diesem Zeitpunkt waren auch die ersten Symptome in Form von runden Erhebungen (Abbildung 9 D Δ) sichtbar, die sich etwa 24 Stunden später in braune Flecken (Abbildung 9 D ▲) wandelten. Zeitgleich wurde ein verändertes Hyphenwachstum am Rand der Hyphennetze beobachtet. Die Hyphenspitzen verdickten sich und erschienen teilweise mehrfach gelappt (Abbildung 9 E, G). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass aus ihnen dreidimensional wachsende Hyphen hervorgingen, welche auch andere Zellschichten der Blätter kolonisierten (Abbildung 9 E, F). Das Wachstum dieser Hyphen erschien bezüglich Richtung und System weniger geordnet und erstreckte sich zunächst in einem Band ringförmig um das anfänglich zweidimensionale Myzel (Abbildung 9 F). Vereinzelt begannen auch Hyphen im Innern des Myzels weitere Zellschichten zu kolonisieren. Mit dem dreidimensionalen Wachstum der Hyphen ging ein Kollabieren der angrenzenden pflanzlichen Zellen einher, wie in Abbildung 9 G und H zu erkennen ist, wodurch die klassischen braunen und nekrotischen Blattsymptome verursacht wurden (Abbildung 10 F).

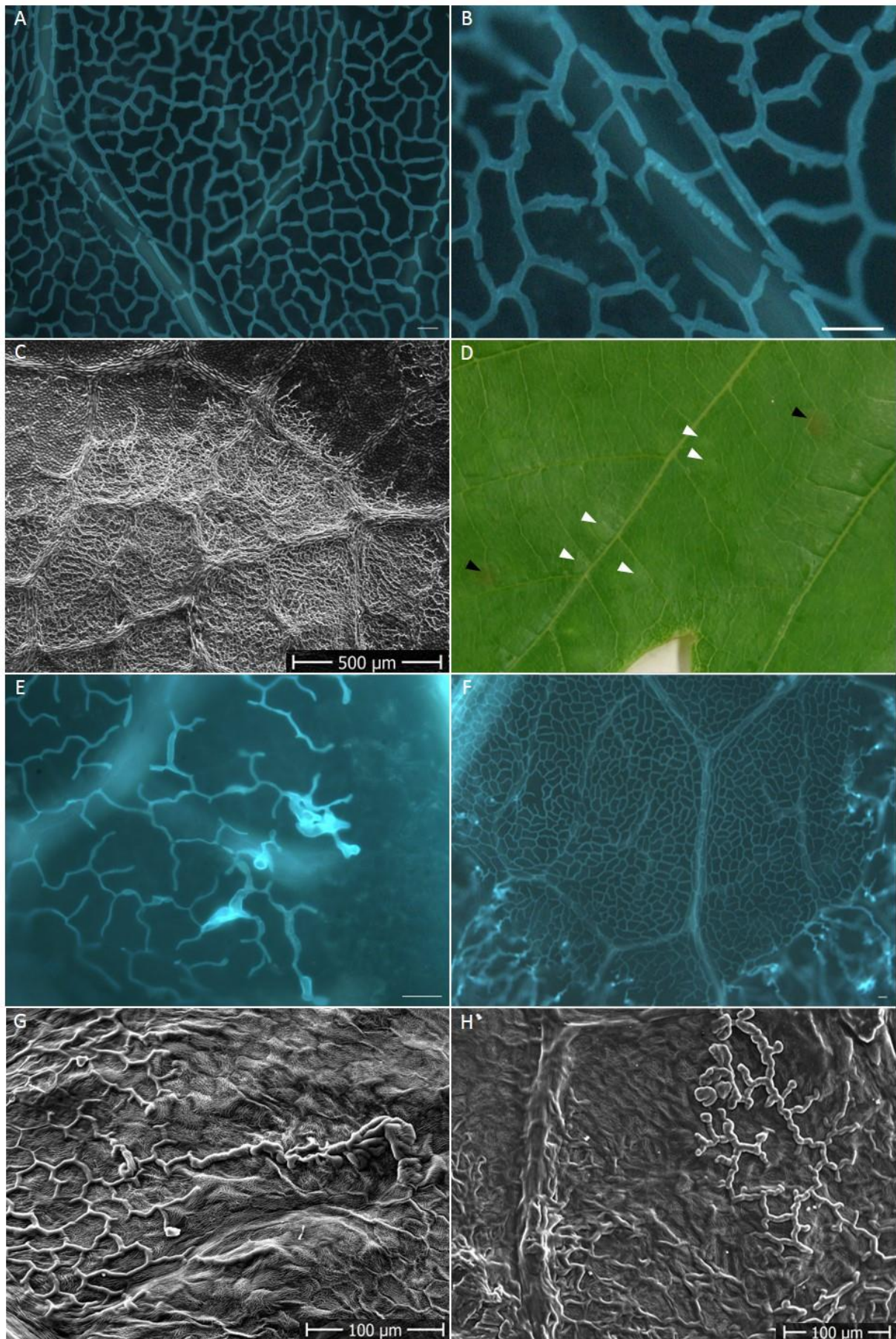


Abbildung 9. Fortgeschrittenes Wachstum von *P. ampellicida* auf zum Zeitpunkt der Inokulation jungen Blättern der Rebsorte 'M-Th' fluoreszenzmikroskopisch nach Anilinblaufärbung (**A**, **B**, **E**, **F**), raster-elektronenmikroskopisch (**C**, **G**, **H**) und photographisch (**D**) dargestellt. Dichtes Hyphennetz (**A**) mit kurzen lateralen Hyphenverzweigungen und veränderter Hyphenform (**B**) 10 dpi. Großes zweidimensionales Hyphennetz (**C**) 11 dpi und gleichzeitig auftretende erste sichtbare Symptome in Form runder Erhebungen (**D**, Δ), die sich 24 h später bräunlich verfärbten (**D**, \blacktriangle). Zunächst verdickte und häufig gelappte Hyphenspitzen im Randbereich des Myzels (**E**, **G**, **H**) mit anschließendem dreidimensionalem Hyphenwachstum in weitere Zellschichten (**F**) und einhergehendem Kollaps der angrenzenden Zellen der Rebe (**G**, **H**). Maßstäbe = 20 μm (**A**, **B**, **E**, **F**). n = zehn Reben.

4.2.3 Entstehung und Entwicklung von Pyknidien

Die mikroskopischen Aufnahmen gaben ebenfalls Aufschluss über die Entstehung und Entwicklung von Pyknidien, den Fruchtkörpern, in denen sich Pyknidiosporen für die epidemische Ausbreitung der Schwarzfäule bilden.

Die Pyknidien sind bei der Schwarzfäule charakteristischerweise ringförmig im Randbereich der symptomatischen Blattflecken (Abbildung 10 F) angeordnet. Anhand mikroskopischer Beobachtungen gingen sie ausschließlich aus sich zusammenlagernden Hyphen im dreidimensionalen Wachstumsbereich des Myzels hervor (Abbildung 10 A und C). Diese Myzelzusammenlagerungen wurden während ihrer Entwicklung größer und dichter und färbten sich schließlich dunkelbraun bis schwarz (Abbildung 10 B). Die dunklen Pyknidien waren spätestens 21 Tage nach Infektion mit dem bloßen Auge sichtbar (Abbildung 10 F). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Pyknidien sich zunächst kugelförmig unterhalb der Kutikula bildeten und diese nach oben anhoben und wölbten (Abbildung 10 D und E). Erst für den Ausstoß der in ihnen entstandenen Pyknidiosporen brach die Kutikula auf (Abbildung 10 H, I), wodurch die Pyknidien einsackten und in sich zusammenfielen (Abbildung 10 G, H). Der Ausbruch der Pyknidiosporen erfolgte in einer Sporenranke (Abbildung 10 I).

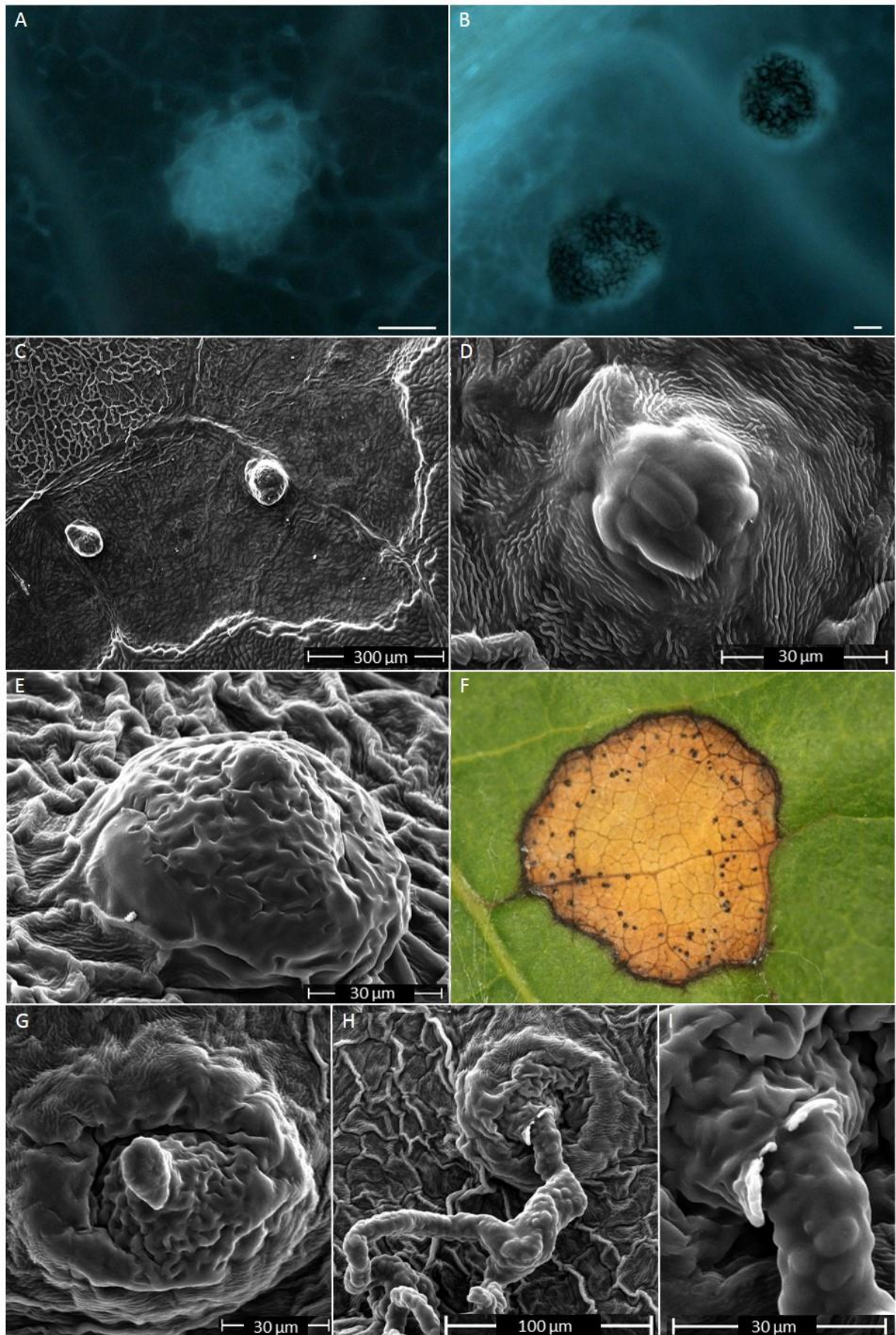


Abbildung 10. Entwicklung der Pyknidien von *P. ampellicida* auf zum Zeitpunkt der Inokulation jungen Blättern der Sorte 'M-Th' fotografisch (**F**), rasterelektronenmikroskopisch (**C, D, E, G, H, I**) und fluoreszenzmikroskopisch nach Anilinblaufärbung (**A, B**, Maßstäbe = 20 µm) dargestellt. Entstehung der Pyknidien 14 dpi durch sich zusammenlagernde Hyphen (**A**) die sich während ihrer weiteren Entwicklung dunkel färbten (**B**). Die Pyknidien erschienen vorwiegend im Randbereich (**C**) und erklären somit die kreisförmige Anordnung der Pyknidien innerhalb einer Läsion 21 dpi (**F**). Die Pyknidien bildeten sich unterhalb der Kutikula (**D, E**), die erst zum Ausstoß der Pyknidiosporen aufbrach (**G, H, I**). n = zehn Reben.

4.2.4 Nachweis des translaminaren Wachstums

Zur Bestätigung des dreidimensionalen Hyphenwachstums von *P. ampellicida*, das zuvor bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Entwicklung des Pilzes beobachtet werden konnte, wurde ein modifizierter Infektionsversuch durchgeführt. Hierzu wurden Reben der anfälligen Sorte 'M-Th' auf der Blattunterseite des dritten und vierten Blattes mit Hilfe von zehn Tropfen einer Sporensuspension inokuliert (Abbildung 11 A) und anschließend bedeckt mit einer Plastiktüte inkubiert (Abbildung 11 B). Sowohl für die Inokulation, als auch für die Inkubation wurden die Reben mit dem Spross nach unten arretiert, um ein Abfließen der Tropfen zu verhindern. Zwei Wochen nach Inokulation bildeten sich für die Schwarzfäule typische Symptomflecken, die sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite sichtbar waren (Abbildung 11 C). Etwa eine weitere Woche später waren deutlich Pyknidien innerhalb der Symptomflecken auf der Blattoberseite zu erkennen (Abbildung 11 D), welche das Vermögen von *P. ampellicida*, die verschiedenen Zellschichten eines Blattes zu durchdringen und damit dreidimensional bzw. translaminar zu wachsen, bestätigten. Der Versuch wurde dreimal mit jeweils vier Reben wiederholt.



Abbildung 11. Nachweis des translaminaren Hyphenwachstums von *P. ampellicida* durch einen modifizierten Inokulationsversuch. Tropfeninokulation der Blattunterseite des dritten und vierten Blattes einer kopfüber arretierten Rebe der anfälligen Sorte ‘M-Th’ (A), mit anschließender Inkubation für 24 h (B). Typische Symptome waren 14 dpi (C) sichtbar, die kurze Zeit später Pyknidien auf der Blattoberseite hervorbrachten (D). n = drei Versuche mit jeweils vier Reben.

4.2.5 Untersuchungen zur Ernährungsweise

Die Ernährungsweise von *P. ampellicida* ist bislang unerforscht und unbekannt. Da sich das Myzel des Pilzes anfänglich, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, auf den Zellwänden der Epidermisschicht entwickelt, wurde mit Hilfe von Nährmedientests untersucht, ob der Pilz in der Lage ist, die verschiedenen Zellwandkomponenten abzubauen und für sein Wachstum zu nutzen. Als Grundlage diente ein Minimalmedium (MM), das sich ausschließlich aus Nährsalzen und Agar zusammensetzte und für den jeweiligen Substratabbautest entsprechend mit Cellulose, carboxymethylierter Cellulose (CMC), der Hemicellulose Xylan, Pektin oder Stärke versetzt wurde. Sowohl die Wachstumsrate, als auch der Substratabbau, sichtbar in Form eines Halos, wurden ermittelt. Das Potential des enzymatischen Abbaus des Makromoleküls Lignin mittels Phenoloxidasen wurde mit dem Bavendammtest basierend auf Tanninsäureagar validiert.

In einem Vorversuch wurde die Wachstumsrate und die Abbauzone der Kohlenstoffquellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (3, 5, 10, 15 und 20 dpi) bestimmt (siehe Anhang). Das verwendete Schwarzfäuleisolat 8088-2 war in der Lage auf allen Medien zu wachsen und die jeweiligen Substrate zu reduzieren, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Sowohl das Myzelwachstum als auch die Abbauzone der Substrate nahm in der Regel mit zunehmender Zeit zu, nur zwischen 15 und 20 dpi stagnierte der Substratabbau auf pektinhaltigem Medium (pH 5) und leicht auf xylanhaltigem Medium

(siehe Anhang). Da zum Zeitpunkt 15 Tage nach Inokulation eine gute Auftrennung der Werte erfolgte, wurde dieser Zeitpunkt ausgewählt und um vier weitere Versuche ergänzt.

Die Mittelwerte zu Wachstum und Substratabbau sind vergleichend in einem Säulendiagramm in Abbildung 12 dargestellt, das auch das Verhältnis von Koloniewachstum zu Substratabbau verdeutlichen soll. Die Bildertafel (Abbildung 13) dient zusätzlich zur Veranschaulichung der Ergebnisse und soll einen Eindruck über die Art des Myzels hinsichtlich Farbe und Struktur geben.

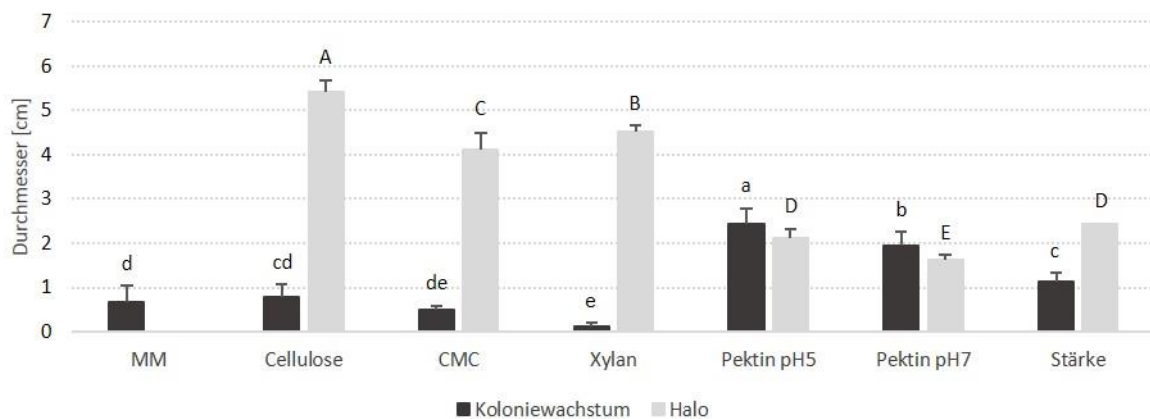


Abbildung 12. Vergleich des Koloniewachstums mit dem Substratabbau (Halo) bei dem Schwarzfäuleisolat 8088-2 auf Minimalmedium und Minimalmedium ergänzt mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Cellulose, CMC, Xylan, Pektin pH 5, Pektin pH 7 und Stärke) zum Zeitpunkt 15 dpi. Signifikanzgruppen wurden bestimmt nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. n = sieben Versuche mit jeweils fünf unabhängigen Wiederholungen.

Abbildung 12 zeigt, dass das Schwarzfäuleisolat selbst auf dem kohlenstofffreien Minimalmedium in der Lage war zu wachsen, wenn auch nur geringfügig und fast ausschließlich in Form von uncharakteristischen und vereinzelt hyalinen Hyphen (Abbildung 13 B). Auf cellulosehaltigen Medien wies die Schwarzfäule ein vergleichsweise geringes Wachstum auf, das sich nicht signifikant von dem des Minimalmediums unterschied, aber zu einem weitreichenden Substratabbau führte, welcher durch einen großen Halo gekennzeichnet war. Das Myzel setzte sich ebenfalls aus vorwiegend hyalinen, mehrheitlich diffus wachsenden Hyphen zusammen (Abbildung 13 E, F, G, H). Nahezu identisch verhielt sich der Pilz auf dem xylanhaltigen Medium, das für die Überprüfung der Abbaubarkeit und Verwertung von Hemicellulose eingesetzt wurde. Hier wurde das geringste Koloniewachstum beobachtet (Abbildung 13 I, J). Auf den Medien, die mit Pektin angereichert wurden, zeigte das Pathogen ein vergleichsweise gutes Wachstum, das auch bezüglich Myzelfärbung und -dichte (Abbildung 13 K, L) mit dem typischen Schwarzfäulewachstum auf dem Vollmedium OMA (Abbildung 13 A), vergleichbar war. Nach der Präzipitierung der Pektinrückstände wurde deutlich, dass die Abbauzone etwa der Koloniegröße entsprach und daran gemessen im Vergleich zu den anderen Substraten sehr gering war. Laut Hankin und Anagnostakis (1975) wird mit Hilfe des pektinhaltigen Mediums, justiert auf pH 5, die Aktivität der Polygalacturonase detektiert. Das gleiche Medium mit einem pH-Wert von 7 dient zur Überprüfung der Pektatlyaseproduktion. Die Produktion von Polygalacturonase schien bei dem Schwarzfäuleisolate 8088-2 höher bzw. effektiver zu sein, da auf

diesem Medium ein durchschnittlich größerer Kolonie- und Halodurchmesser beobachtet wurde. Das mit Stärke versetzte Medium brachte ein im Vergleich mittleres Myzelwachstum hervor, dass in Bezug auf Myzelfärbung und -struktur ebenfalls charakteristisch für die Schwarzfäule war (Abbildung 13 D). Auch der Halodurchmesser bewegte sich sowohl absolut, als auch relativ auf den Koloniedurchmesser bezogen, zwischen denen der anderen Substrate.

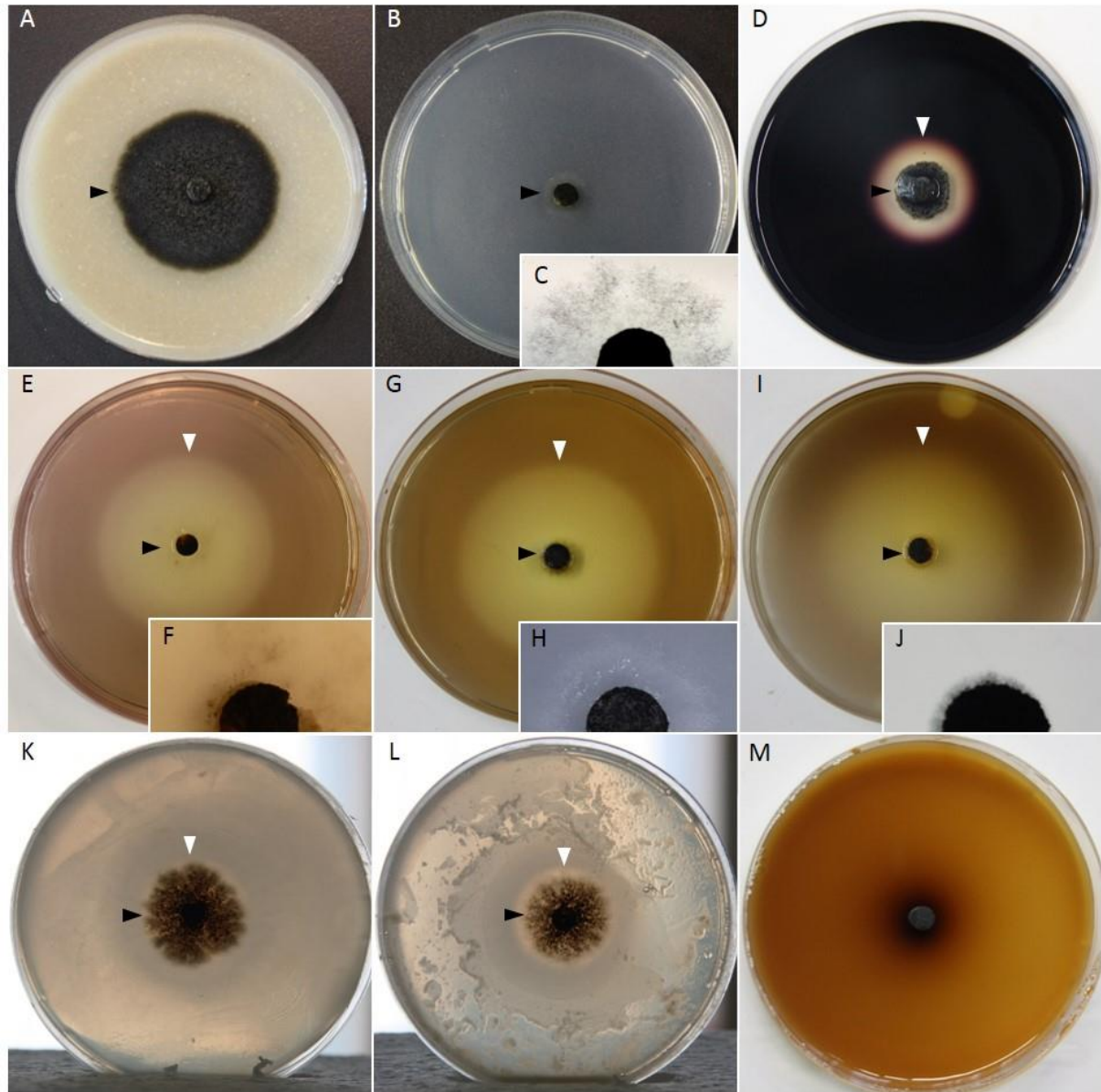


Abbildung 13. Myzelwachstum und Substratabbauzone des Schwarzfäuleisolats 8088-2 auf verschiedenen Nährmedien 15 dpi. Hafermehlagar (A), MM (B, C), MM mit Stärke (D), MM mit Cellulose (E, F), MM mit CMC (G, H), MM mit Xylan (I, J), MM mit Pektin pH 5 (K), MM mit Pektin pH 7 (L), Tanninsäureagar (M). Auf den Nährmedien D, E, G, I, K und L wurden die entsprechenden Kohlenstoffquellen angefärbt oder präzipitiert. Dreiecke kennzeichnen die Wachstums- (▲) bzw. Substratabbauzonen (Δ).

Mit Hilfe des Bavendammtests konnte die Produktion von Phenoxidasen und damit die Fähigkeit des Schwarzfäuleisolates Polyphenole abzubauen nachgewiesen werden. Bereits 24 Stunden nach Inokulation wurde die für den Test erforderliche dunkle Braunfärbung um die Inokulationsstelle wahrgenommen (Abbildung 13 M).

Auf keinem der hier getesteten Nährmedien basierend auf Minimalmedium konnten 15 dpi Pyknidien beobachtet werden, welche auf Vollmedium OMA bereits ab etwa 6 dpi erschienen.

4.3 Entwicklung von *P. ampellicida* auf verschieden resistenten Genotypen

Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde der Infektionsprozess auf unterschiedlich anfälligen Genotypen und Blattetagen studiert, um herauszufinden in welchem Stadium die pilzliche Entwicklung auf resistenten Genotypen bzw. alten, der Altersresistenz unterliegenden, Blättern gehemmt oder gar gestoppt wird. Darüber hinaus sollten Erkenntnisse über mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der Schwarzfäule gewonnen werden. Untersucht wurden grundlegende Entwicklungsschritte wie die Pyknidiosporenanheftung an die Blattoberfläche, die Appressorien- und Hyphenbildung sowie deren Länge und Verzweigung. Untersuchungsgegenstand waren verschieden resistente Genotypen wie die anfällige Rebsorte 'M-Th', die teilresistente Sorte 'Solaris' und die resistente Unterlagsrebe 'Börner'. Anhand des Wildreben screenings wurden ebenfalls drei teilresistente Wildreben K16, K18 und K38 der Signifikanzgruppe AB für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Da der Erreger der Schwarzfäule offensichtlich nur junge, sich noch im Wachstum befindende Pflanzenorgane befällt, wurde das vierte Blatt (Blatt 4), stellvertretend für die jungen anfälligen Blattetagen in den Versuchen eingesetzt. Blatt 7 repräsentiert ältere, bereits ausgewachsene Blätter die laut Kuo und Hoch (1996b) besiedelt werden können, jedoch keine Symptome zeigen und daher als resistent gegenüber der Schwarzfäule gelten.

Für jeden Untersuchungsschwerpunkt wurden vier Versuche mit je zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen basierend auf Blattscheiben durchgeführt. Pro Blattscheibe wurden drei Inokulationstropfen aufgebracht und ausgewertet. Das Volumen und die Sporenkonzentration der Inokulationstropfen variierten je nach Fragestellung und sind in Tabelle 2 angegeben.

4.3.1 Vergleich der Anheftung von Pyknidiosporen

Die Anheftung der Pyknidiosporen an die Pflanzenoberfläche ist der erste Infektionsschritt und eine Voraussetzung für deren Keimung und weitere Entwicklung. Die Anheftungsrate wurde 24 Stunden nach Inokulation bestimmt.

Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt und zeigen, dass sich über alle Genotypen hinweg an Blatt 7 tendenziell weniger Pyknidiosporen angeheftet haben als an dem jungen Blatt 4, was jedoch nach Genotypen getrennt nur für die Sorte 'Solaris' statistisch belegbar war. Innerhalb der vierten Blattetage konnten lediglich signifikante Unterschiede zwischen 'M-Th' und K38 gegenüber K18 festgestellt werden. Die Anheftungsraten auf Blatt 7 zeigten zwar eine größere Variabilität, jedoch konnten keine signifikanten Genotypenunterschiede statistisch nachgewiesen werden. Die meisten angeheftete Pyknidiosporen wurden hier auf der anfälligen Sorte 'M-Th' beobachtet, die tendenziell wenigsten Pyknidiosporen auf der Sorte 'Solaris' und den Wildreben K16 und K18.

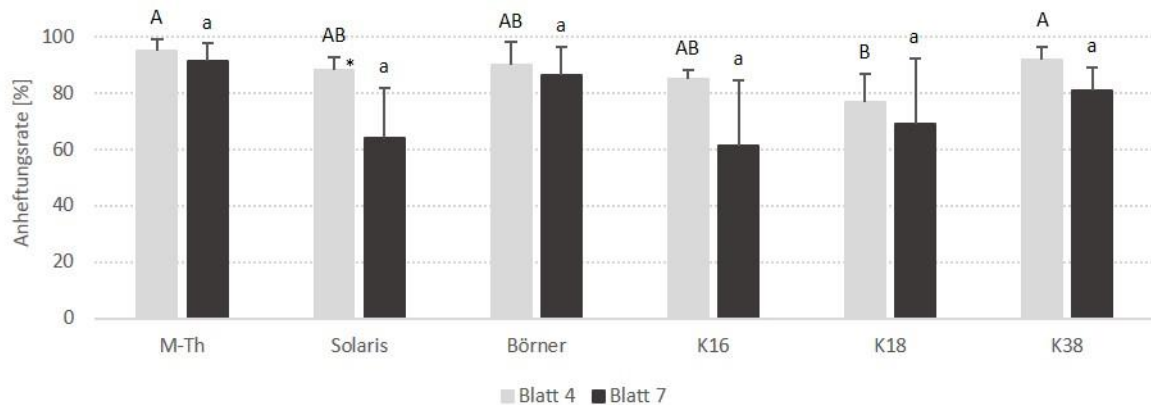


Abbildung 14. Anheftungsrate der Pyknidiosporen von *P. ampellicida* in Abhängigkeit vom Blattalter (Blatt 4 und Blatt 7) und verschiedenen Genotypen ('M-Th', 'Solaris', 'Börner', K16, K18 und K38) 24 hpi. Groß- und Kleinbuchstaben geben Signifikanzen für Sortenunterschiede innerhalb der Blattetagen nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$, an. Die * - Signifikanzgruppe steht für Unterschiede zwischen den Blattetagen einer Sorte, nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. n = vier Versuche mit jeweils zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen.

4.3.2 Vergleich der Appressorienbildung

Appressorien, die sogenannten Haftorgane der Pilze, sind die Voraussetzung für eine erfolgreiche Penetration und damit auch für das Wachstum von *P. ampellicida* in der Pflanze. Zum Vergleich der Appressorienbildung zwischen den verschiedenen Genotypen und Blattetagen, wurde 24 Stunden nach Inokulation die relative Anzahl appressorienbildender Pyknidiosporen pro Inokulationstropfen erfasst (Abbildung 15 A) und zusätzlich nach Appressorien an kurzen oder an langen Keimschläuchen unterschieden (Abbildung 15 B und C).

Es konnte stets eine verminderte Appressorienbildung auf Blatt 7 im Vergleich zu Blatt 4 beobachtet werden, die jedoch getrennt nach Genotypen nur bei der Sorte 'Solaris' und der Wildrebe K38 statistisch abgesichert war. Innerhalb der einzelnen Blattetagen gab es nur geringe Genotypenunterschiede ohne signifikante Relevanz. Jedoch wurden bei beiden Blattetagen die meisten Pyknidiosporen mit Appressorien auf der Sorte 'M-Th' gefunden, die mit 96,9 % ($\pm 0,9$) für Blatt 4 und 91,1 % ($\pm 4,7$) für Blatt 7 sehr hoch waren.

Abbildung 15 B zeigt die prozentuale Verteilung der Appressorien, die sich an kurzen oder langen Keimschläuchen entwickelt haben. Unter kurzen Keimschläuchen wird eine fast nahtlose Appressorienbildung verstanden, während lange Keimschläuche mehr als etwa 8 μm betragen. Der Großteil der Appressorien bildete sich unabhängig vom Genotyp oder der Blattetage an kurzen Keimschläuchen. Appressorien an langen Keimschläuchen wurden über alle Genotypen hinweg tendenziell häufiger, jedoch statistisch nicht belegbar, auf dem jungen Blatt 4 beobachtet. Innerhalb der einzelnen Blattetagen wurden keine signifikanten Genotypenunterschiede festgestellt.

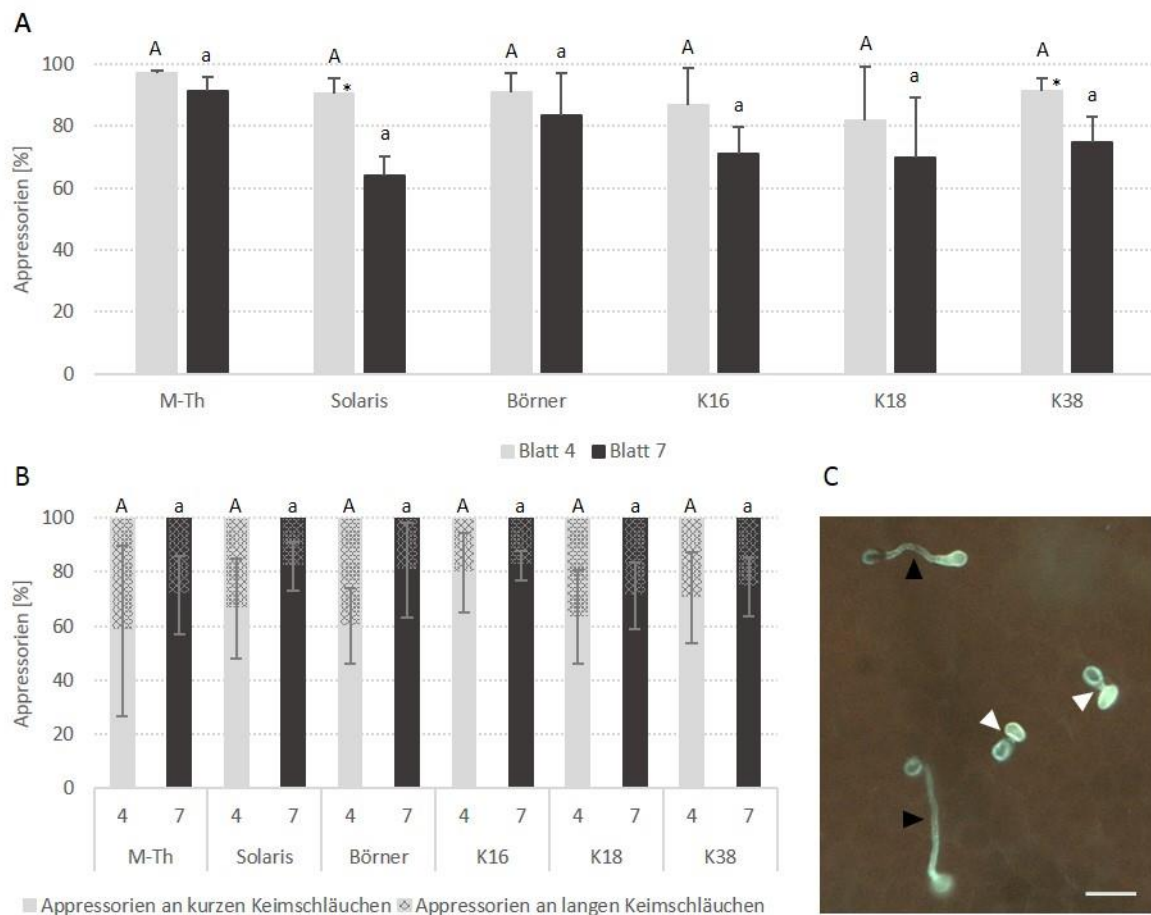


Abbildung 15. Appressorienbildung von *P. ampellicida* in Abhängigkeit vom Blattalter (Blatt 4 und Blatt 7) und verschiedenen Genotypen ('M-Th', 'Solaris', 'Börner', K16, K18 und K38) 24 hpi. Ergänzend zur Ermittlung der relativen Anzahl gebildeter Appressorien (A) wurde unterschieden, ob die Appressorien sich am Ende von kurzen (Δ) oder langen Keimschläuchen (\blacktriangle) entwickelt hatten (B und C, Maßstab = 20 μ m). Groß- und Kleinbuchstaben geben Signifikanzen für Sortenunterschiede innerhalb der Blattetagen nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$, an. Die * - Signifikanzgruppe steht für Unterschiede zwischen den Blattetagen einer Sorte nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. n = vier Versuche mit jeweils zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen.

4.3.3 Vergleich der Bildung und Entwicklung von Hyphen

Die anfänglichen Hyphen des Erregers *P. ampellicida* wachsen ausschließlich subkutikulär und sind der Nachweis für eine erfolgreiche Penetration der Kutikula und Etablierung des Pilzes in der Pflanze. Zur Detektion der Hyphenbildung wurde fünf Tage nach Inokulation die relative Anzahl von Appressorien mit Hyphen im Vergleich zu hyphenlosen Appressorien ermittelt (Abbildung 16). Zusätzlich wurde pro Inokulationstropfen von zehn Appressorien mit Hyphen die Hyphenentwicklung mit Hilfe des durchschnittlichen Hyphenradius (Abbildung 17), gemessen vom Mittelpunkt des Appressoriums bis zur Hyphenspitze, und des durchschnittlichen Verzweigungsgrades (Abbildung 18), untersucht.

In Abbildung 16 ist die relative Anzahl gebildeter Hyphen in Anhängigkeit vom Blattalter und dem Genotyp dargestellt. Die Anzahl hyphenbildender Appressorien war auf älteren Blättern im Vergleich

zu jungen Blättern tendenziell reduziert. Bei der Sorte ‘M-Th’ und der Wildrebe K38 war dieser Unterschied auch statistisch belegbar. Die meisten Appressorien, die in der Lage waren die Kutikula zu penetrieren und Hyphen zu bilden, wurden auf dem vierten Blatt der Sorte ‘M-Th’ nachgewiesen. Vergleichbar hohe Zahlen wurden auch auf den jüngeren Blättern (Blatt 4) der Wildreben K16 und K38 beobachtet. Auf den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ und der Wildrebe K18 haben sich im Vergleich zu ‘M-Th’ signifikant weniger Hyphen gebildet. Ähnlich verhielt sich die Hyphenbildung auf dem siebten Blatt; die meisten Appressorien mit Hyphen wurden ebenfalls auf der Sorte ‘M-Th’ festgestellt, die sich damit tendenziell von den Wildreben K16 und K18 und den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ absetzte. Deutlichere Unterschiede, sowohl zwischen dem Blattalter aber auch den Genotypen, waren hinsichtlich der Hyphenentwicklung zu beobachten.

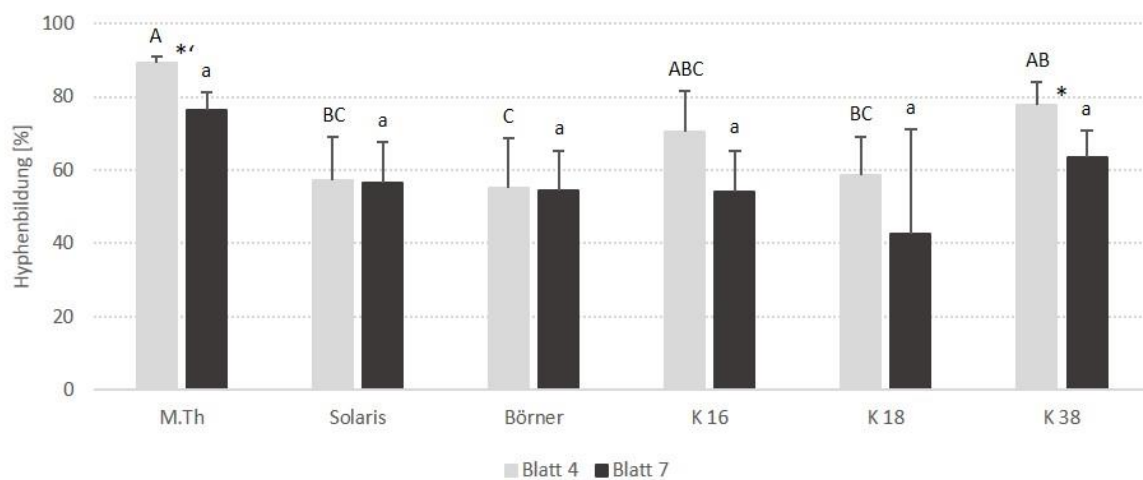


Abbildung 16. Hyphenbildung von *P. ampellicida* in Abhängigkeit vom Blattalter (Blatt 4 und Blatt 7) und verschiedenen Genotypen (‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’, K16, K18 und K38) 5 dpi. Bestimmt wurde die relative Anzahl hyphenbildender Appressorien. Großbuchstaben stehen für Sortenunterschiede innerhalb der Blatttage 4 nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. Kleinbuchstaben stehen für Sortenunterschiede innerhalb der Blatttage 7 nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. Die * - Signifikanzgruppe steht für Unterschiede zwischen den Blatttagen einer Sorte nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$, während die *' – Signifikanzgruppe nach Kruskal-Wallis-Test (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$, berechnet wurde. n = vier Versuche mit jeweils zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen.

Auf allen Genotypen war der Hyphenradius auf dem jungen Blatt 4 größer als auf dem entsprechenden älteren Blatt 7, was außer für die Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ für alle Genotypen statistisch bestätigt werden konnte. Innerhalb beider Blatttage konnte die Schwarzfäule die größten Hyphenradien auf der Sorte ‘M-Th’ entwickeln, wohingegen die kürzesten Hyphen auf der Sorte ‘Börner’ zu sehen waren. Die Varianz des Hyphenradius zwischen den Genotypen innerhalb der vierten Blatttage war stärker ausgeprägt als innerhalb der siebten Blatttage. Neben der Sorte ‘Börner’ wurden auch bei ‘Solaris’ und K16 signifikant kleinere Hyphenradien als bei der Sorte ‘M-Th’ gefunden. Innerhalb der siebten Blatttage wiederum unterschieden sich ‘Börner’ und K18 signifikant von ‘M-Th’.

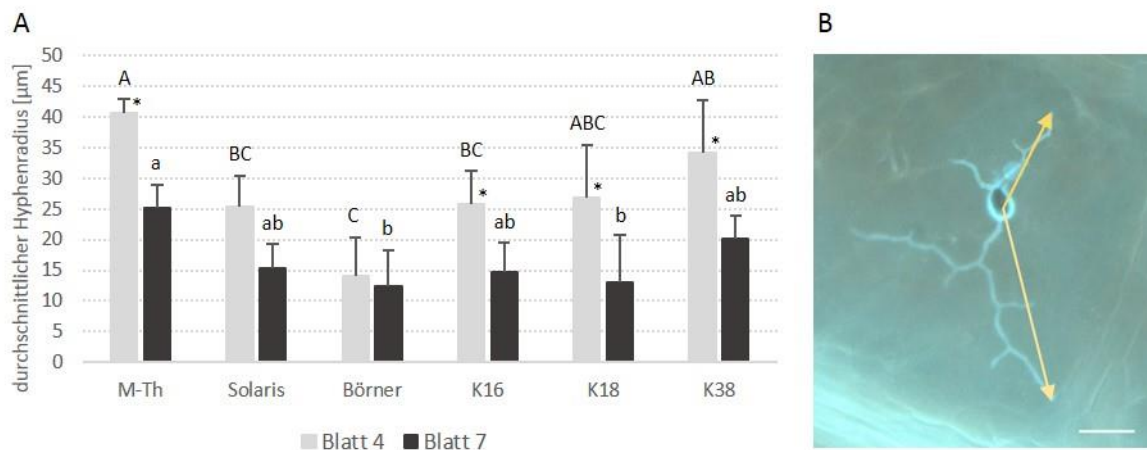


Abbildung 17. Durchschnittlicher Hyphenradius (A) von *P. ampeliciida* in Abhängigkeit vom Blattalter (Blatt 4 und Blatt 7) und verschiedenen Genotypen ('M-Th', 'Solaris', 'Börner', K16, K18 und K38) 5 dpi. Bestimmt wurden die Hyphenradien der beiden Haupthyphen ausgehend vom Appressorium, die in **B** (Maßstab = 20 µm) durch gelbe Pfeile dargestellt sind. Die Werte wurden im Anschluss gemittelt, um den durchschnittlichen Hyphenradius zu erhalten. Großbuchstaben stehen für Sortenunterschiede innerhalb der Blatttage 4 nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. Kleinbuchstaben stehen für Sortenunterschiede innerhalb der Blatttage 7 nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. Die * - Signifikanzgruppe für Blatttagenunterschiede innerhalb einer Sorte wurde nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$, ermittelt. n = vier Versuche mit jeweils zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen.

Auch der Verzweigungsgrad der Hyphen war bei allen Genotypen auf Blatt 4 höher als auf Blatt 7 und konnte nur für die Wildrebe K18 nicht statistisch belegt werden. Bezogen auf Blatt 4 wurden am häufigsten verzweigte Hyphennetze bei der Sorte 'M-Th' detektiert. Signifikant weniger verzweigt waren die Hyphen auf den Genotypen 'Solaris', 'Börner', K16 und K18 und tendenziell weniger verzweigt auf der Wildrebe K38. Innerhalb der siebten Blatttage gab es keine signifikanten genotypbedingten Unterschiede, der Verzweigungsgrad war bei allen Genotypen sehr gering.

zeigten nur eine geringe Anzahl an Verzweigungen (Abbildung 19 F); viele Hyphen stellten bereits kurz nach der Penetration der Kutikula ihr Wachstum ein (Abbildung 19 G). Auf den Blättern der drei untersuchten Wildreben K16, K18 und K38 wurden im Vergleich zu ‘M-Th’ meist kleinere, weniger stark verzweigte Myzele wahrgenommen (Abbildung 19 H, J, K, M). Teilweise wurden auch keine (Abbildung 19 I, L) oder nur sehr kurze, kaum verzweigte Hyphen detektiert (Abbildung 19 K, N), die häufig mit dem Auftreten einer hellen Fluoreszenz entlang der angrenzenden Zellen assoziiert waren.

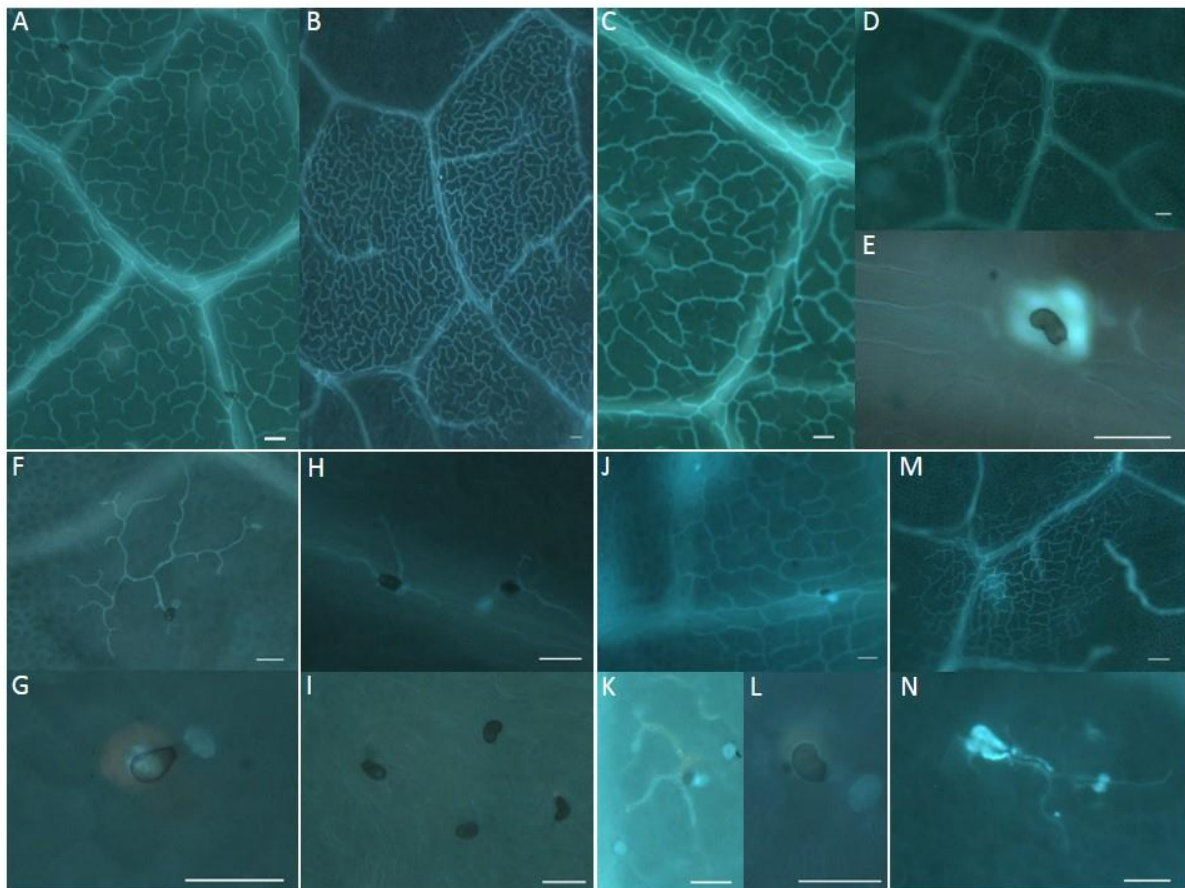


Abbildung 19. Vergleich der fortgeschrittenen Entwicklung von *P. ampellicida* 8 dpi auf den jeweils zum Zeitpunkt der Inokulation vierten Blättern der Genotypen ‘M-Th’ (A, B), ‘Solaris’ (C, D, E), ‘Börner’ (F, G), K16 (H, I), K18 (J, K, L) und K38 (M, N) mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit dem Farbstoff Anilinblau. Zu erkennen ist die unterschiedlich starke Ausbreitung des Myzels im subkutikulären Bereich. Maßstäbe = 20 µm. n = zehn Reben.

4.4 Untersuchungen zur Abwehr der Rebe

Aufbauend auf den Studien zur Biologie von *P. ampellicida* und der Tatsache, dass die Penetration der Kutikula und vor allem die Hyphenentwicklung in Form von Längenwachstum und Verzweigung bei teilresistenten und resistenten Genotypen eingeschränkt sind, wurden vor allem die Zellwand und den Apoplasten betreffende Abwehrmechanismen untersucht. Unterschiedliche Methoden wie mikroskopische Untersuchungen, Analysen zu Phenolgehalten und Expressionsstudien verschiedener abwehrrassoziierter Gene kamen hierbei zum Einsatz. Aber auch die Zellwandkomposition und deren Rolle in der Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber der Schwarzfäule wurden berücksichtigt.

4.4.1 Histologische Untersuchungen

Mit Hilfe verschiedener Farbstoffe wurden abwehrrelevante Verbindungen wie Kallose oder reaktive Sauerstoffspezies sichtbar gemacht. Die melanisierten Appressorien der Schwarzfäule, die sowohl im Durchlicht, als auch unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich erkennbar sind, erlauben darüber hinaus die entsprechenden Verfärbungen im Gewebe dem Ort der Infektion zuzuordnen.

4.4.1.1 Untersuchungen zum Auftreten von Autofluoreszenz

Die mikroskopische Untersuchung von Autofluoreszenz ist eine einfache und schnelle Methode und ihre Beobachtung dient als Hinweis auf das Vorkommen phenolischer Verbindungen (Carver et al., 1998, Dai et al., 1995, Bennett et al., 1996). Phenolische Verbindungen gehören zu den Sekundärmetaboliten und es wurde mehrfach gezeigt, dass sie eine hemmende Wirkung gegenüber pilzlichen Erregern entfalten können (Goetz et al., 1999, Stadnik & Buchenauer, 2000, Paolocci et al., 2014). Ziel dieser Untersuchung war es die Rolle phenolischer Verbindungen in der Abwehr der Schwarzfäule bei verschiedenen resistenten Genotypen einzuschätzen.

Fünf Tage nach Inokulation wurden schwarzfäuleinfizierte Blattscheiben mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops auf das Auftreten von Autofluoreszenz am Ort der Infektion untersucht. Das im Fluoreszenzbereich stark rot fluoreszierende Chlorophyll wurde zuvor durch Ethanol entfernt und die Reaktion und Entwicklung des Pilzes gleichzeitig fixiert.

Beobachtet wurde eine vorwiegend gelbe Autofluoreszenz am Ort der Infektion, bei der in erster Linie die Zellwände der Epidermiszellen unterhalb der Appressorien und der daran angrenzenden Epidermiszellen betroffen waren (Abbildung 20 D, F, K, M und O). Auf den Rebsorten 'Solaris' und 'Börner' wurde zusätzlich eine flächige Autofluoreszenz ganzer Epidermiszellen detektiert, wobei es sich häufig nur um eine Epidermiszelle handelte, die sich unterhalb des Appressoriums befand bzw. an das Appressorium direkt angrenzte (Abbildung 20 B und H). Die gelbe Autofluoreszenz hat sich im Durchlicht stets als Verbräunung gezeigt (Abbildung 20 C, E, G, I, J, L, N und P).

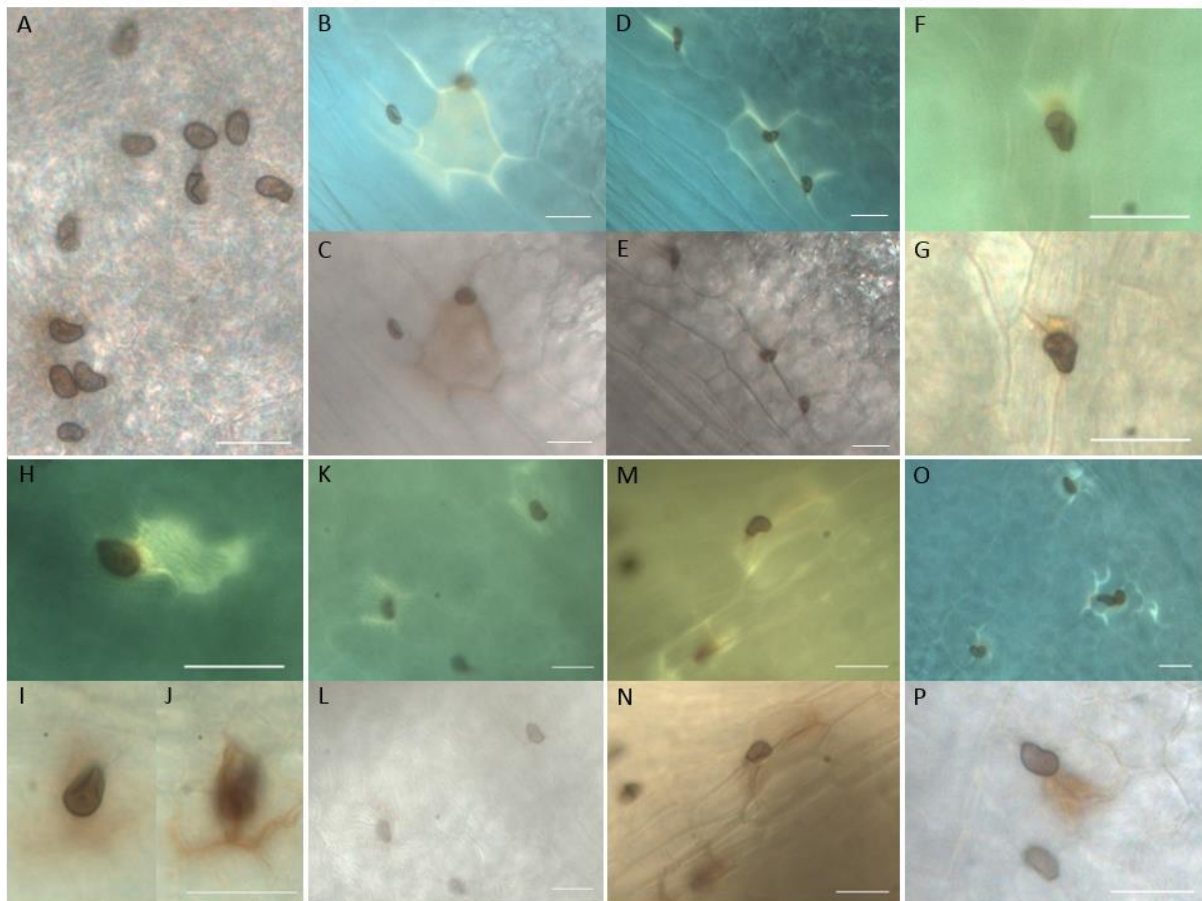


Abbildung 20. Mikroskopische Analyse der Autofluoreszenz (**B, D, F, H, K, M** und **O**) und Verbräunung (**A, C, E, G, I, J, L, N** und **P**) von Zellwänden und Zellen am Ort der Infektion anhand schwarzfäuleinfizierter Blattscheiben der Genotypen ‘M-Th’ (**A**), ‘Solaris’ (**B, C, D, E**), ‘Börner’ (**F, G, H, I, J**), K16 (**K, L**), K18 (**M, N**) und K38 (**O, P**) fünf dpi nach Entfärbung und Fixierung in Ethanol (96 %). Die gelbliche Autofluoreszenz wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert; die Untersuchung der Verbräunung erfolgte im Durchlicht. Maßstäbe = 20 µm. n = acht Reben.

In Abbildung 21 ist die relative Anzahl der von Autofluoreszenz umgebenen Appressorien der verschiedenen Genotypen dargestellt. Auf der Sorte ‘M-Th’ wurden die wenigsten autofluoreszenzverursachenden Appressorien gefunden, zudem war die Fluoreszenz beziehungsweise Verbräunung nur geringfügig ausgeprägt (Abbildung 20 A). Ein vergleichbares Bild ergab sich bei den Wildreben K16 und K18, die sich nicht signifikant von der Sorte ‘M-Th’ unterschieden. Auch hier konnte die Autofluoreszenz ausschließlich entlang der Zellwände und tendenziell schwach wahrgenommen werden (Abbildung 20 K, L, M, N). Deutlich mehr Appressorien umgeben von gelber Fluoreszenz wurden auf der Wildrebe K38 beobachtet, die Fluoreszenz und entsprechenden Verbräunungen beschränkte sich aber auch hier nur auf die angrenzenden Zellwände (Abbildung 20 O, P). Die Sorte ‘Solaris’ und die Wildrebe K38 unterschieden sich in der Häufigkeit des Auftretens der Autofluoreszenz signifikant von der Sorte ‘M-Th’, nicht jedoch die Sorte ‘Börner’. Doch wie bereits beschrieben, wurde bei ‘Solaris’ und ‘Börner’ eine intensivere und flächigere gelbe Fluoreszenz respektive Verbräunung beobachtet, die teilweise ganze Epidermiszellen betraf (Abbildung 20 B, C, H).

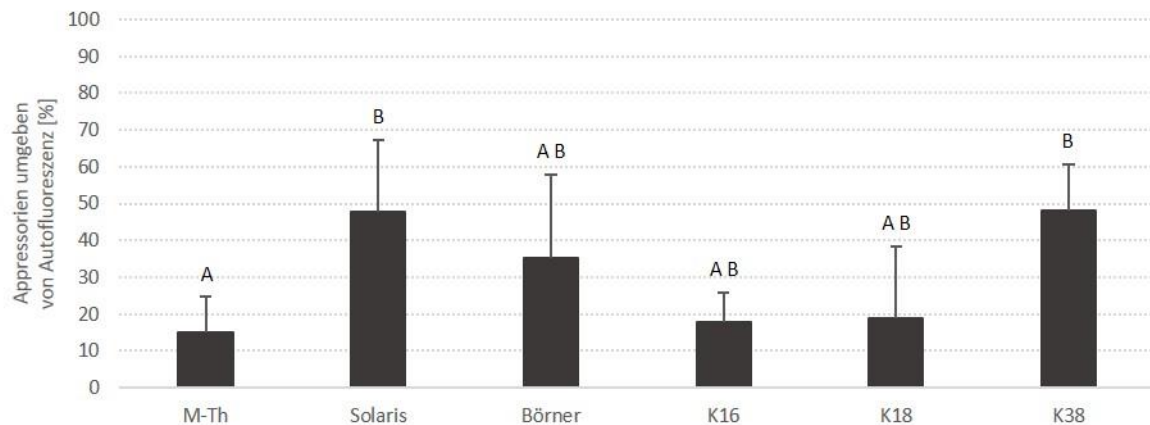


Abbildung 21. Relative Anzahl der von gelber Autofluoreszenz umgebenen Appressorien von *P. ampellicida* 5 dpi auf den Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 nach Entfärbung der Blattscheiben in Ethanol. Signifikanzgruppen wurden ermittelt nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. n = acht Reben.

4.4.1.2 Untersuchungen mit dem Farbstoffgemisch Ethacridinlactat-Acridinorange

Die Mischfärbung bestehend aus Ethacridinlactat und Acridinorange wurde von Müller et al. (2014) am Pathosystem *Vitis* – *P. viticola* entwickelt, um sowohl den Erreger als auch die frühen Reaktionen in der Pflanze am Ort der Infektion gleichermaßen sichtbar zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Mischfärbung sich ebenfalls zur Färbung der pilzlichen Strukturen der Schwarzfäule eignet und vergleichbare Reaktionen nach Schwarzfäulebefall auftreten. Diese Reaktionen weisen auf eine Alkalisierung des Apoplasten hin und lassen sowohl die Wahrnehmung des Pathogens als auch die Einleitung von Abwehrmechanismen seitens der Pflanze erkennen.

Erste mikroskopische Untersuchungen zum Nachweis der Pathogenstrukturen bei den Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 48 Stunden nach Inokulation zeigten, dass vor allem die oberflächlichen Pilzstrukturen wie Pyknidiosporen und Keimschläuche durch die Farbstoffkombination erfasst und sichtbar gemacht werden konnten (Abbildung 22 A). Stellenweise, jedoch nicht zuverlässig, war auch die Penetrationshyphe angefärbt (Abbildung 22 B), in einzelnen Fällen waren Hyphennetze zu erahnen. Zusätzlich konnten als pflanzliche Reaktionen gelbgrüne Verfärbungen im Gewebe, hauptsächlich in den Epidermiszellen, unterhalb der Appressorien und damit am Ort der Penetration und Infektion beobachtet werden. Ihr Auftreten unterschied sich jedoch bezüglich Häufigkeit und Intensität auf den drei untersuchten Sorten ‘M-Th’ (Abbildung 22 C), ‘Solaris’ (Abbildung 22 D) und ‘Börner’ (Abbildung 22 E).

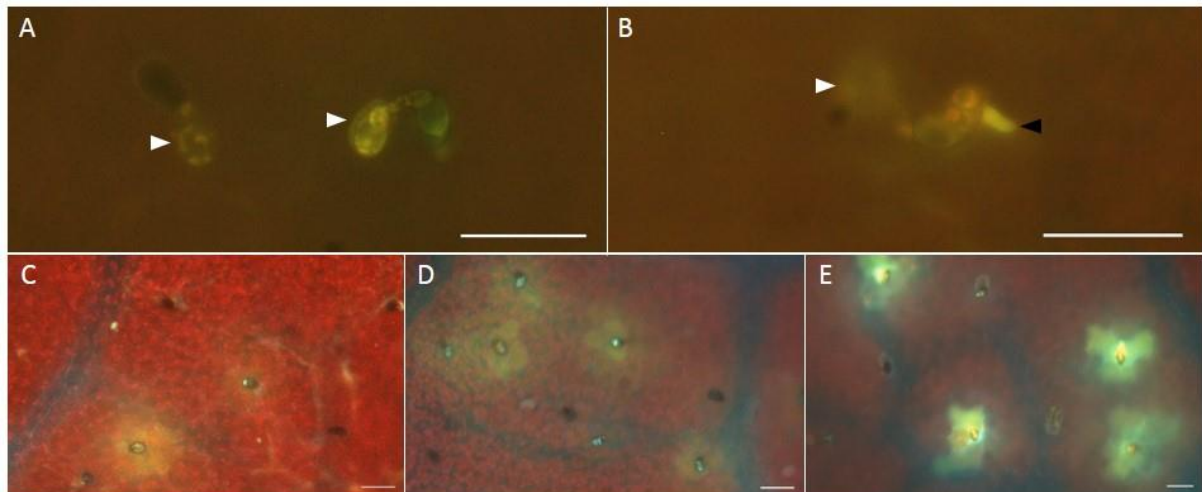


Abbildung 22. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen schwarzfäuleinfizierter Blattscheiben der Sorten ‘M-Th’ (A, B, C), ‘Solaris’ (D) und ‘Börner’ (E) 48 hpi nach Färbung mit dem Farbstoffgemisch aus Ethacridinlactat und Acridinorange. Zu sehen sind die fluoreszierenden Pyknidiosporen Δ (A) und die Penetrationshyphen \blacktriangle (B), sowie die Färbung von Reaktionen um die Appressorien im pflanzlichen Gewebe der Sorten ‘M-Th’ (C), ‘Solaris’ (D) und ‘Börner’ (E) in unterschiedlichem Ausmaß. Maßstäbe = 20 μm .

Zur Erstellung eines Genotypenvergleichs hinsichtlich Ausmaß und Stärke der Reaktionen nach Schwarzfäulebefall, wurde zunächst ein Vorversuch zur Ermittlung des optimalen Untersuchungszeitpunktes durchgeführt. Hierfür wurden in drei Versuchen mit jeweils vier biologisch unabhängigen Wiederholungen 100 Pyknidiosporen pro Blattscheibe gezählt und den entsprechenden Kategorien “keine Reaktion“, “diffuse Reaktion“ und “starke Reaktion“ zugeordnet. Untersucht wurden zunächst die Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 hpi. Unter dem Ausdruck “diffuse Reaktion“ wurde eine nur schwache gelbe Fluoreszenz um das Appressorium verstanden (Abbildung 23 D). “Starke Reaktionen“ waren leuchtend gelb grün und erfassten flächig die Epidermiszellen unterhalb der Appressorien (Abbildung 23 E).

Bei allen drei Rebsorten konnten erste, wenn auch sehr wenige und tendenziell eher schwache Reaktionen bereits 24 hpi wahrgenommen werden, die im Verlauf der Zeit an Ausmaß und Intensität zunahmten (Abbildung 23 A, B und C). Vom Zeitpunkt 72 hpi zum Zeitpunkt 96 hpi hin, konnte jedoch auf den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ eine Stagnation (Abbildung 23 A, B) und bei der Sorte ‘M-Th’ gar ein Rückgang der Anzahl der Reaktionen und ihrer Intensität beobachtet werden. Daher wurde für einen erweiterten Genotypenvergleich der Zeitpunkt 72 hpi gewählt.

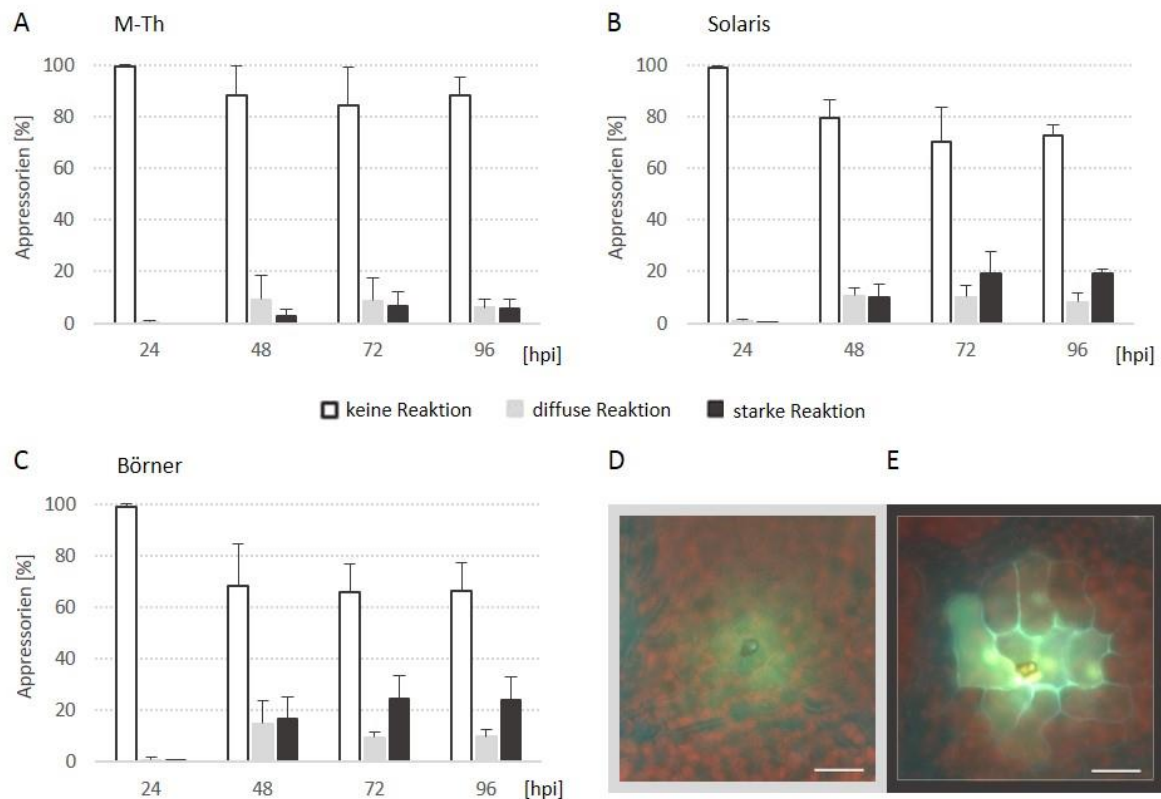


Abbildung 23. Zeitlicher Verlauf der Ausbildung von Reaktionen unterhalb der Appressorien der Schwarzfäule nach Ethacridinlactat-Acridinorange-Färbung auf den Rebsorten ‘M-Th’ (A), ‘Solaris’ (B) und ‘Börner’ (C). Die Reaktionen wurden hierbei in “keine“, “diffuse“ (D) und “starke“ (E) Reaktionen unterschieden. Maßstäbe = 20 µm. n = drei Versuche mit jeweils vier biologisch unabhängigen Wiederholungen.

In vier Versuchen mit jeweils drei biologisch unabhängigen Wiederholungen wurden die Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 72 Stunden nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule hinsichtlich ihrer Reaktion unterhalb der Appressorien durch Färbung mit dem Farbstoffgemisch aus Ethacridinlactat und Acridinorange verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Die wenigsten Reaktionen wurden auf den Genotypen ‘M-Th’ und K16 beobachtet, auf denen nur etwa 10 % der untersuchten Appressorien von einer Reaktion umgeben waren. Tendenziell mehr Reaktionen wurden auf den Genotypen ‘Solaris’, K18 und K38 detektiert. Am stärksten reagierte die resistente Unterlagsrebsorte ‘Börner’ auf den Schwarzfäulebefall; ca. 30 % der Appressorien führten zu einer meist starken Fluoreszenz der umliegenden Epidermiszellen.

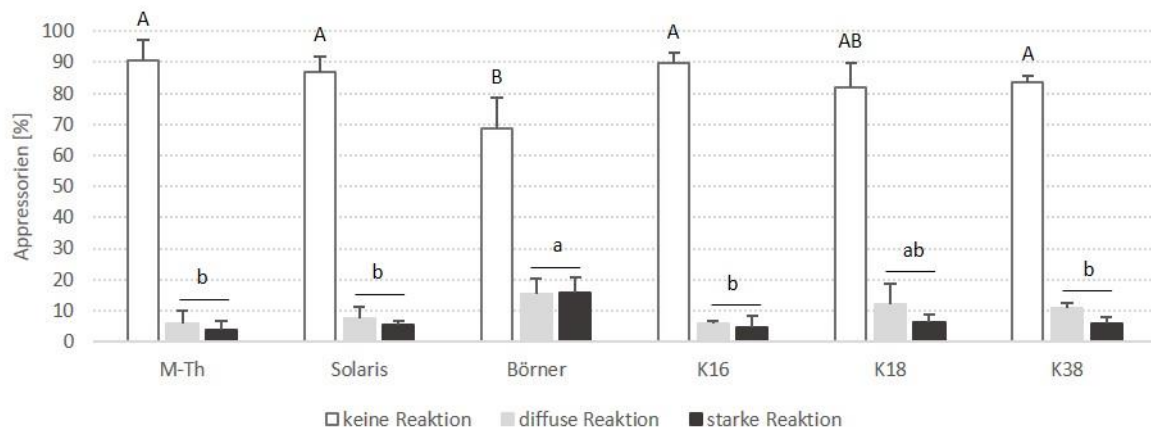


Abbildung 24. Auftreten von Reaktionen unterhalb der Appressorien der Schwarzfäule nach Ethacridinlactat-Acridinorange-Färbung bei den Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 72 hpi. Die Reaktionen wurden hierbei in “keine”, “diffuse” und “starke” Reaktionen unterschieden. Die statistische Auswertung wurde auf die Summe “diffuser” und “starker” Reaktionen bezogen. Großbuchstaben beziehen sich auf Signifikanzen zwischen den Genotypen innerhalb der Kategorie “keine Reaktionen” nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. Kleinbuchstaben stehen für Signifikanzen zwischen den Genotypen innerhalb der Summe aus “diffuser” und “starker” Reaktionen nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. $n = 4$ Versuche mit jeweils 3 biologisch unabhängigen Wiederholungen.

4.4.1.3 Detektion von Kalloseablagerungen

Kallose wurde in der Weinrebe vor allem bei dem Echten (Qiu et al., 2015) aber auch dem Falschen Mehltau (Toffolatti et al., 2012, Hamiduzzaman et al., 2005) als Beitrag zur Penetrationsresistenz beschrieben. Sie ist der Hauptbestandteil der Papillen, die sich häufig als Zellwandverdickungen am Ort der Infektion zeigen. Da Kallose mit Hilfe des Farbstoffs Anilinblau angefärbt und nachgewiesen werden kann, wurden im Zuge der Untersuchungen zur Entwicklung von *P. ampellicida*, die auf Färbungen mit Anilinblau basierten, auch die Bildung und Einlagerung von Kallose und deren Potential zur Hemmung der pilzlichen Ausbreitung analysiert.

Grundsätzlich wurden Kalloseeinlagerungen ausschließlich auf Proben detektiert, die von intakten lebenden Pflanzen stammten, nicht jedoch von artifizielleren Versuchen basierend auf Blattscheiben. Untersucht wurden daher Proben intakter Pflanzen, zu den Probenahmezeitpunkten 8 und 21 dpi. Die anfällige Rebsorte ‘M-Th’ zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Inokulation Kalloseeinlagerungen (Abbildung 25 A). Auf der Sorte ‘Solaris’ akkumulierte Kallose meist punktuell direkt unterhalb der Appressorien (Abbildung 25 C, D und E) oder an den Hyphenspitzen (Abbildung 25 B und C). Seltener wurden flächige Kalloseeinlagerungen beobachtet, die die periklinale Zellwand der Epidermiszelle unterhalb des Appressoriums betrafen (Abbildung 25 D und E). Kalloseeinlagerungen an den Hyphenspitzen bereits etablierter Myzelien 21 dpi konnten nur partiell das Hyphenwachstum einzelner Hyphen stoppen, manche Hyphen setzten ihr Wachstum trotz Kalloseeinlagerungen fort (Abbildung 25 B). Akkumulationen von Kallose direkt unterhalb der Appressorien, am Ort der Penetration, zu frühen Zeitpunkten im Infektionsprozess schienen häufig die

Penetration und Hyphenbildung erfolgreich zu unterbinden (Abbildung 25 D und E). Wie bereits in Kapitel 4.3.4 beschrieben, wurden auf der Unterlagsrebsorte ‘Börner’ sehr wenige Hyphenetze gefunden, die auch nur selten mit Kalloseeinlagerungen assoziiert waren (Abbildung 25 F und G). Stellenweise wurden Kalloseakkumulationen ohne zugehörige pilzliche Strukturen gefunden, die jedoch hinsichtlich ihrer Form bzw. Anordnungsmusters auf frühe Abwehrmechanismen, die die Penetration unterbinden, hinweisen (Abbildung 25 H und I). Häufig bestanden dieses Muster aus einem stark fluoreszierenden und damit kallosehaltigen Punkt im Bereich der periklinalen, der Kutikula zugewandten, Zellwand der Epidermis und fluoreszierenden antiklinalen Zellwänden der umgebenden Epidermiszelle oder angrenzenden Zellen. Auf den Wildreben K16, K18 und K38 wurden ebenfalls Kalloseeinlagerungen gefunden, die stellenweise in der Lage waren das pilzliche Wachstum zu hemmen (Abbildung 25 L, N) oder zu stoppen (Abbildung 25 J, K, M, O). Am häufigsten wurde die Kallose bei den Wildreben direkt unterhalb der Appressorien beobachtet (Abbildung 25 K, L, M, O).

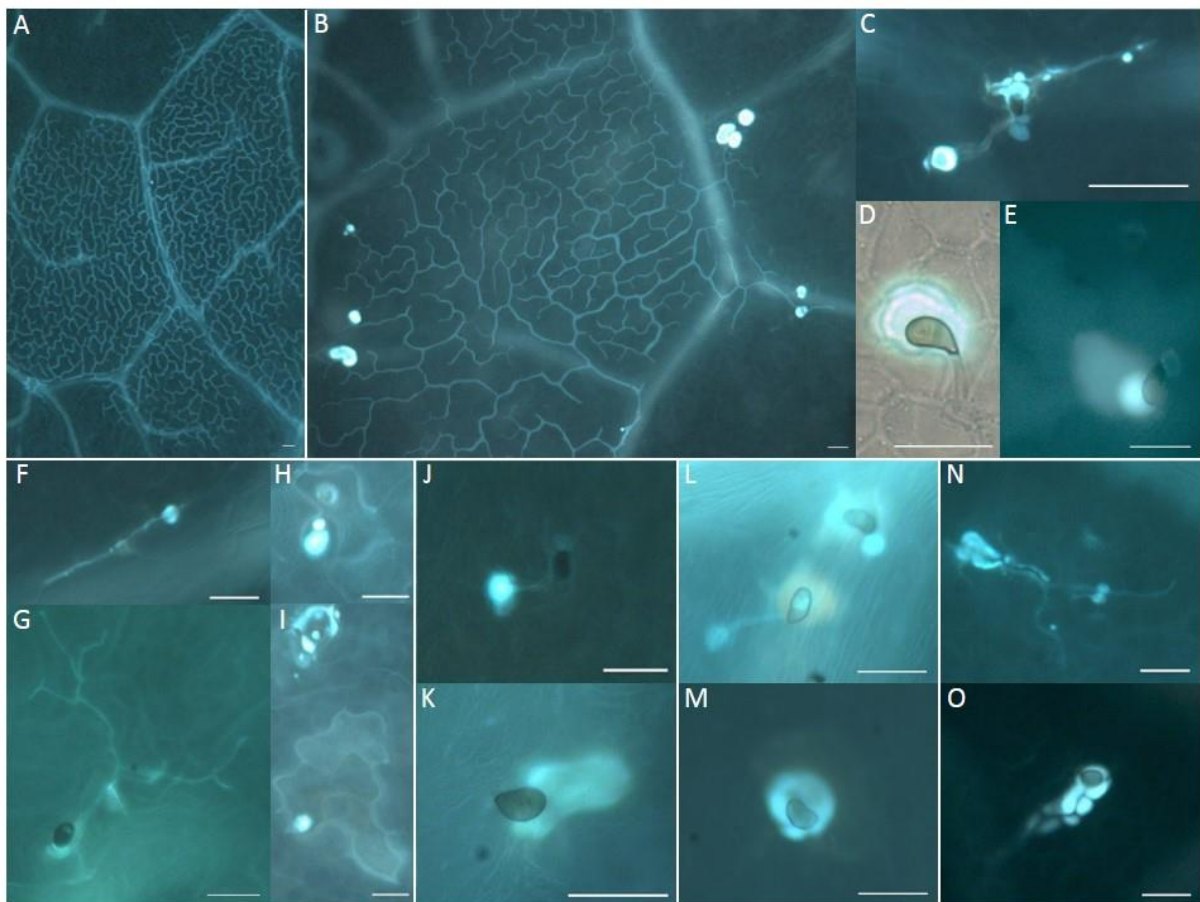


Abbildung 25. Simultane Färbung von Pyknidiosporen, Hyphen und der Akkumulation von Kallose 8 (**A, D, E, F, G, J, K, L, M, N, O**) und 21 dpi (**B, C, H, I**) mit dem Erreger der Schwarzfäule auf den Genotypen ‘M-Th’ (**A**), ‘Solaris’ (**B, C, D, E**), ‘Börner’ (**F, G, H, I**), K16 (**J, K**), K18 (**L, M**) und K38 (**N, O**) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Anilinblau. Kalloseakkumulationen waren meist punktuell als starke Fluoreszenz direkt unterhalb der Appressorien oder an den Hyphenspitzen sichtbar. Maßstäbe = 20 μm . n > acht Reben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auf der Sorte ‘Solaris’ und den untersuchten Wildreben, also den Genotypen, die in der Lage waren Kallose als Antwort auf den Schwarzfäulebefall zu bilden,

pilzliche Strukturen gehemmt oder gar gestoppt werden konnten, jedoch nur in geringem Umfang. Zudem schien ein wirkliches Unterbinden der Entwicklung von *P. ampellicida* und der erfolgreichen Etablierung von Hyphen im pflanzlichen Gewebe nur zu frühen Zeitpunkten möglich zu sein. Aus den Beobachtungen ging hervor, dass Kalloseakkumulationen direkt unterhalb des Appressoriums, die Ausbreitung des Pathogens am effizientesten zu verhindern schienen.

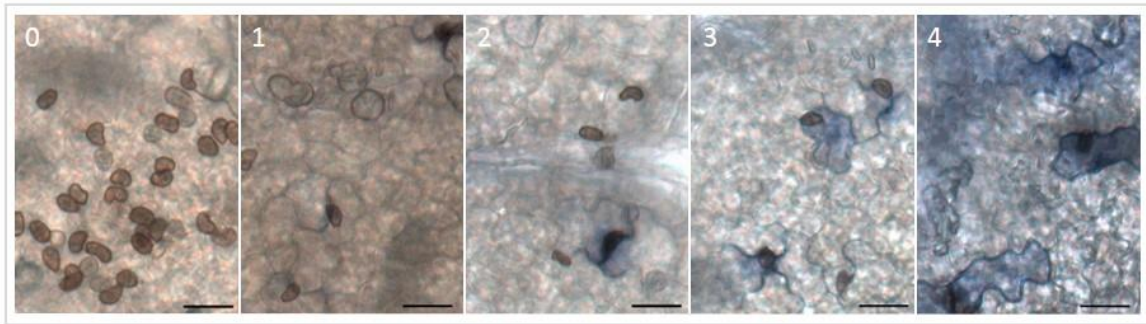
4.4.1.4 Nachweis der Bildung von Superoxidanionen

Die Superoxidanionenbildung im Gewebe von Rebblättern wurde mit Hilfe des Farbstoffs Nitroblautetrazoliumchlorid nachgewiesen, der sich im Zuge der Reduktion in das blaue Präzipitat Formazan wandelte. Superoxidanionen gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies, die als frühe Reaktion auf den Pathogenbefall gelten und sowohl an der Signaltransduktion als auch direkten Pathogenabwehr beteiligt sind (Hückelhoven, 2007).

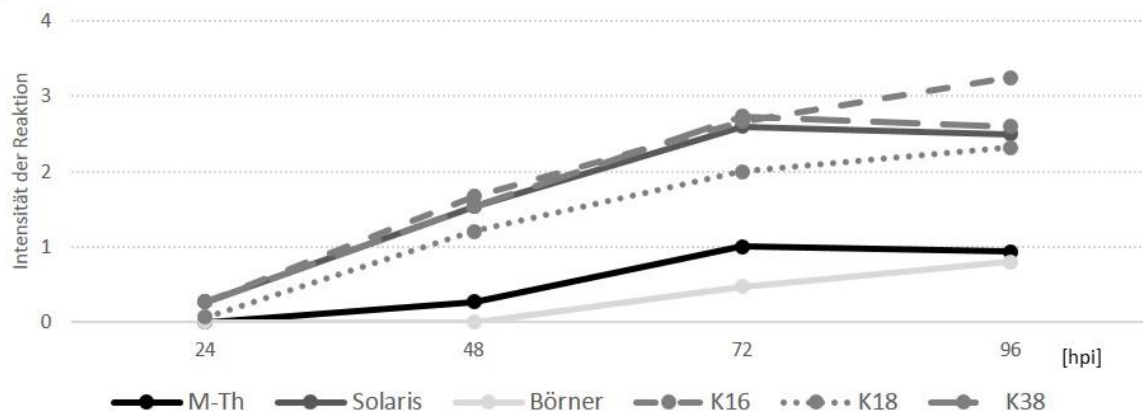
In drei Versuchen mit jeweils fünf biologisch unabhängigen Wiederholungen wurde die Superoxidanionenbildung 24, 48, 72 und 96 hpi bei den Genotypen 'M-Th', 'Solaris', 'Börner' und den Wildreben K16, K18 und K38 untersucht. Die blaue Färbung des reduzierten Farbstoffs wurde dabei stets entlang der Zellwände der Epidermiszellen wahrgenommen, die sich unterhalb der Appressorien und damit der Penetrationsstelle befanden. Bei sehr starken Reaktionen waren teilweise auch flächige Färbungen ganzer Epidermiszellen zu beobachten. Die Intensität und das Ausmaß der Färbung wurden in fünf Kategorien (Abbildung 26 A), von '0' bis '4' eingeteilt, anhand derer die Proben im Anschluss bewertet wurden.

In Abbildung 26 B ist der zeitliche Verlauf der durch Superoxidanionenbildung verursachten Blaufärbung nach Schwarzfäuleinfektion dargestellt. Generell wurde auf allen Genotypen mit zunehmender Infektionsdauer ein Anstieg der Reaktionen in Menge bzw. Ausmaß beobachtet. Zwischen den Zeitpunkten 72 und 96 hpi kam es jedoch bei den Sorten 'M-Th' und 'Solaris' und der Wildrebe K38 zu einer Abnahme bzw. Stagnation der Reaktionsausprägung; auf der Sorte 'Börner' und den Wildreben K16 und K38 war die Zunahme reduziert.

A



B



C

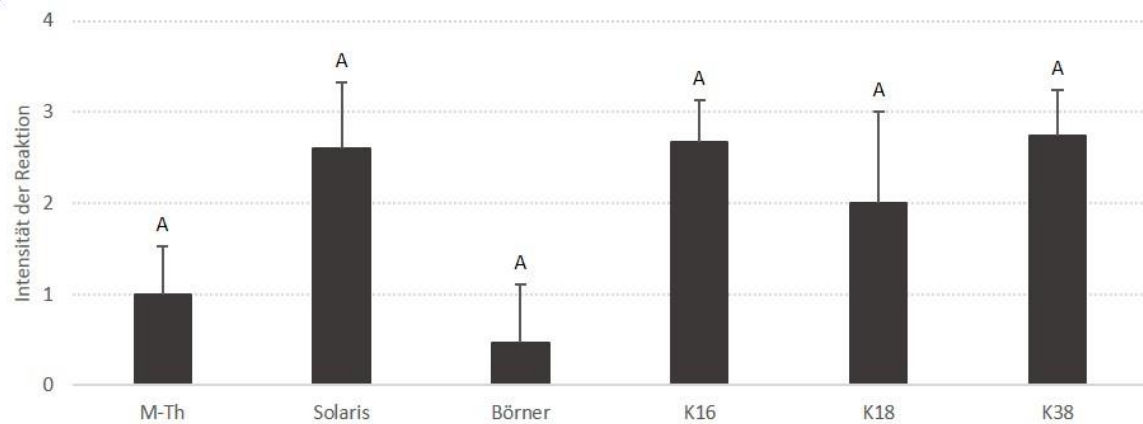


Abbildung 26. Nachweis der Superoxidationenbildung mit Hilfe des Farbstoffs Nitroblautetrazoliumchlorid in den Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule (B). Die Evaluierung der Daten erfolgte in fünf Kategorien von ‘0’ bis ‘4’ mit zunehmender Ausprägung (A). Vergleichende Darstellung der Daten 72 hpi im Säulendiagramm und statistischer Analyse (C). Signifikanzgruppe wurden ermittelt nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. n = drei Versuche mit jeweils fünf biologisch unabhängigen Wiederholungen.

Im Genotypenvergleich zum Zeitpunkt 72 hpi zeigten sich deutliche Unterschiede, die jedoch nicht statistisch belegt werden konnten (Abbildung 26 C). Sehr wenige und wenn nur schwache Reaktionen wurden auf der Rebsorte ‘Börner’ beobachtet. Mehr und stärkere Reaktionen wurden auf der Rebsorte ‘M-Th’ gefolgt von der Wildrebe K18 detektiert. Die meisten und intensivsten Blaufärbungen im

pflanzlichen Gewebe am Ort der Penetration wurden auf der Sorte ‘Solaris’ und den Wildreben K16 und K38 gefunden.

4.4.2 Phenolische Inhaltsstoffe

Wie bereits in Kapitel 4.4.1.1 erwähnt, wird phenolischen Verbindungen allgemein eine hemmende Wirkung auf pilzliche Erreger zugesprochen. Zellwandassoziierte Phenole sind über Ester-Verbindungen an die Polysaccharide der Zellwand gebunden und reduzieren ihren Abbau durch hydrolytische Enzyme (Hückelhoven, 2007). Darüber hinaus sind sie häufig Bestandteil von Papillen (Voigt, 2014, Hückelhoven, 2014) und können mögliche Ligninvorläufer darstellen. Freie Phenole können in gebundene Phenole umgewandelt werden, haben teilweise aber auch eine direkte Wirkung auf Pathogene wie beispielsweise Catechine (Goetz et al., 1999) oder Stilbene (Pezet et al., 2004a, Pezet et al., 2004b, Paolocci et al., 2014).

Da die Untersuchungen zur Biologie der Schwarzfäule zeigten, dass der Pilz in der biotrophen Phase ausschließlich auf den Zellwänden der Epidermis wächst und diese für seine Ernährung abbaut, wurden die freien und zellwandgebundenen Phenole getrennt voneinander aufgearbeitet und bestimmt. Die Gesamtphenolgehalte wurden kolorimetrisch mit Hilfe des Folin-Ciocalteu-Tests (FC-Test) ermittelt, eine weit verbreitete und anerkannte Methode (Singleton et al., 1999). Die Gesamtphenolgehalte wurden dabei anhand einer mit Gallussäure erstellten Kalibrierkurve (siehe Anhang) in Gallussäureäquivalenten angegeben. Darüber hinaus konnten unter Zuhilfenahme verschiedener Standards (Tabelle 6) mittels HPLC-Technik einzelne phenolische Komponenten identifiziert und quantifiziert werden.

4.4.2.1 Untersuchung phenolischer Inhaltsstoffe verschiedener Genotypen und Blattetagen

Zur Bestimmung der konstitutiv vorliegenden phenolischen Verbindungen in verschieden resistenten Genotypen wurde exemplarisch von den Sorten ‘M-Th’ und ‘Börner’ und der Wildrebe K18 sowohl die freien als auch die zellwandgebundenen Gesamtphenole über mehrere Blattetagen bestimmt. Pro Genotyp wurden vier Pflanzen untersucht und bei ausreichender Blattmasse zwei technische Wiederholungen für jede Probe generiert. Die Blattetagen 1 bis 3 wurden vereint, da die einzelnen Blätter für getrennte Aufarbeitungen und Analysen zu klein waren und damit zu wenig Blattmasse aufwiesen.

Der Vergleich der freien und zellwandgebundenen Gesamtphenole (Abbildung 27) zeigte, dass die vereinten Blattetagen 1 bis 3 über alle Genotypen hinweg signifikant mehr freie als gebundene Phenole enthielten. Gleiches konnte für die Blattetage vier beobachtet, jedoch nur für die Sorte M-T und die Wildrebe K18 statistisch belegt werden. In den Blattetagen fünf bis elf wies nur die Wildrebe K18 stets höhere Gehalte an freien als an gebundenen Phenolen auf.

Die Ergebnisse zu den freien Gesamtphenolen (Abbildung 27 A) zeigten, dass in den vereinten Blattetagen ‘1-3’, also in den sehr jungen Blättern, bei ‘M-Th’ und der Wildrebe K18 signifikant mehr

freie Gesamtphenole gemessen wurden als in den älteren Blattetagen. Bei der Sorte ‘Börner’ war eine sehr ähnliche Tendenz erkennbar, die jedoch nicht statistisch bestätigt werden konnte. Die Blattetagen vier bis elf der einzelnen Genotypen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Auch im Vergleich der Genotypen untereinander waren kaum Unterschiede feststellbar. Nur von Blattetage sechs an abwärts, wurden in der Wildrebe K18 mehr freie Phenole gemessen als in den Sorten ‘M-Th’ und ‘Börner’, was jedoch nur für die Blattetage 10 statistisch belegt werden konnte.

Auch bei den zellwandgebundenen Phenolen (Abbildung 27 B) konnte eine Abnahme der Phenolgehalte von den jungen zu den älteren Blättern hin beobachtet werden, die jedoch nur bei der Sorte ‘Börner’ statistisch belegt werden konnte. Innerhalb der einzelnen Blattetagen wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen.

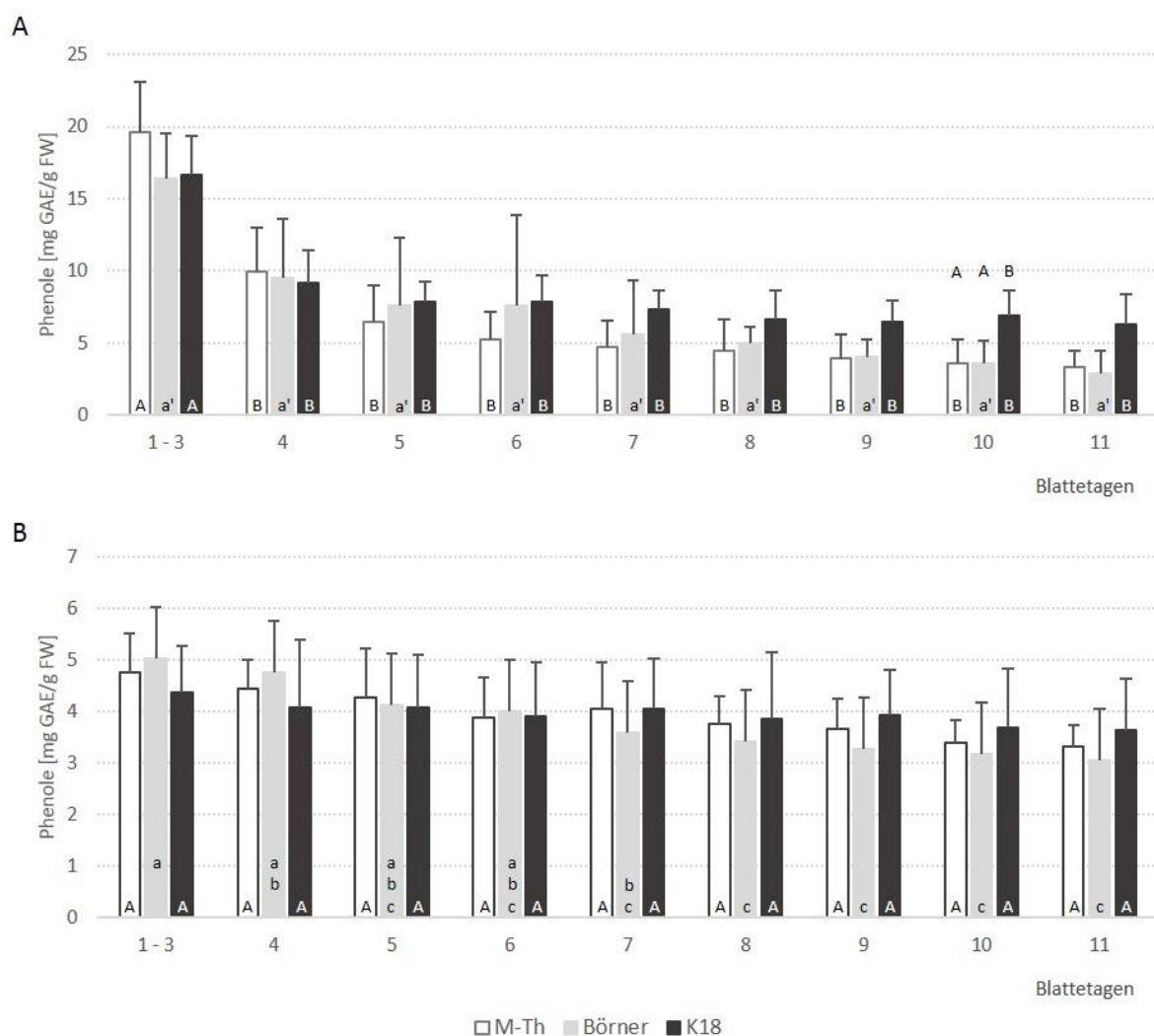


Abbildung 27. Gehalt der freien (A) und zellwandgebundenen (B) Gesamtphenole verschiedener Blattetagen (‘1-3’ bis 11) der Genotypen ‘M-Th’, ‘Börner’ und K18 bestimmt mittels FC-Test. Die Buchstaben innerhalb der Säulen weisen auf Unterschiede zwischen den Blattetagen innerhalb einer Sorte hin, ermittelt nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. Die mit ‘ gekennzeichneten Signifikanzgruppen wurden nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$, berechnet. Signifikanzgruppen für Sortenunterschiede innerhalb einer Blattetage nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. n = vier Blätter.

Erste nähere Analysen der gebundenen Phenole mittels HPLC (Abbildung 28) unter Zuhilfenahme der Standards für Gallussäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaempferol zeigten eine deutliche Dominanz der *p*-Cumarsäure und eine tendenziell untergeordnete Rolle der anderen phenolischen Verbindungen die Menge betreffend. In der Summe wurden die höchsten Phenolkonzentrationen in den Blättern der Sorte 'M-Th' gemessen, gefolgt von der Sorte 'Börner'. Die Wildrebe K18 enthielt unabhängig vom Blattalter die geringsten Phenolkonzentrationen. Mit zunehmendem Blattalter wurde eine leichte Abnahme der *p*-Cumarsäurekonzentration beobachtet, die Konzentration der Ferulasäure nahm indes zu. Bei der Sorte 'Börner' kam es auch zu einer erhöhten Messung an Gallussäure. Kaempferol konnte bei der Wildrebe K18, im Gegensatz zu den Sorten 'M-Th' und 'Börner', in keiner Blatttage detektiert werden.

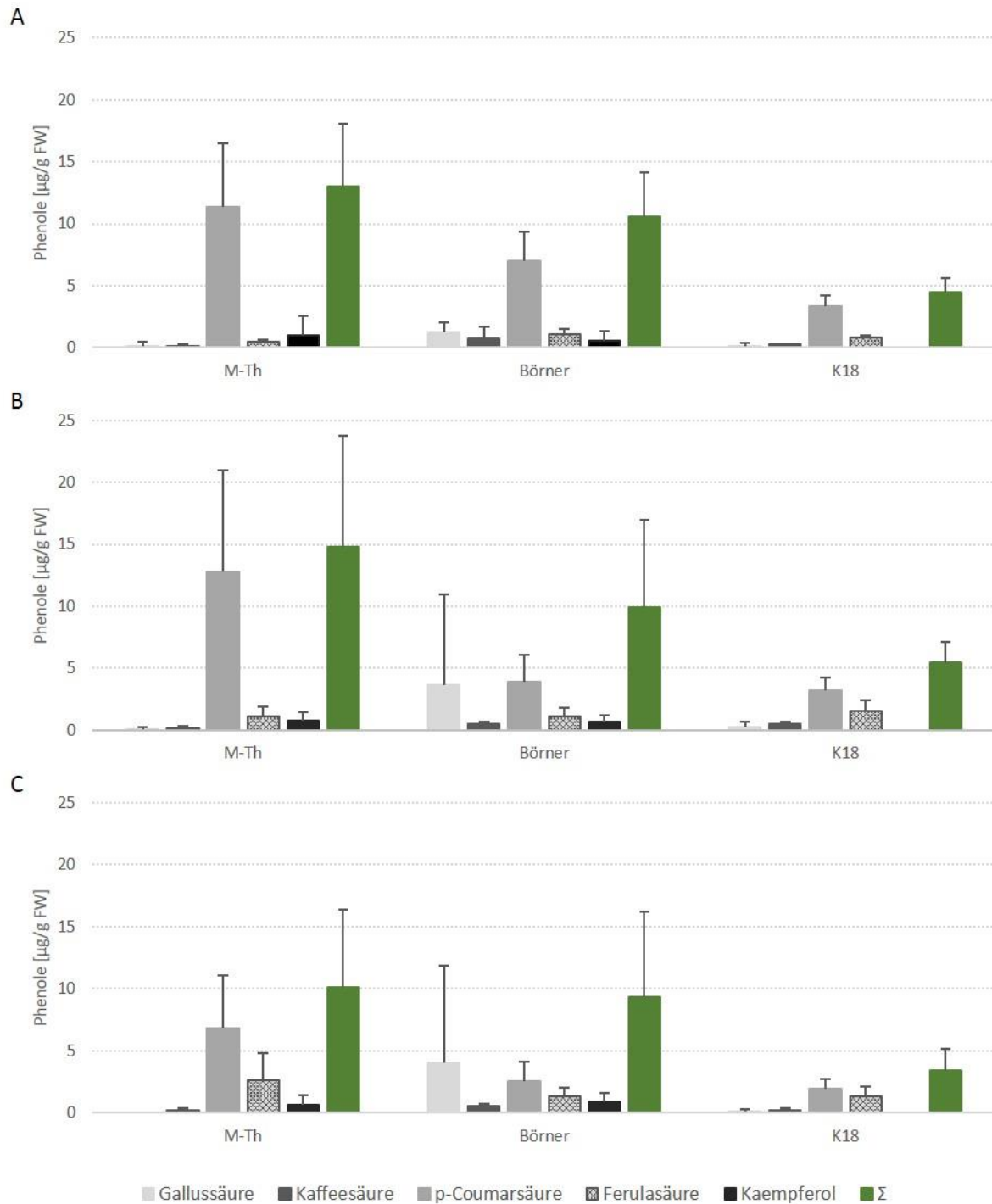


Abbildung 28. Analyse der gebundenen Phenole mittels HPLC. Identifizierung und Quantifizierung von Gallussäure, Kaffeesäure, *p*-Coumarsäure, Ferulasäure und Kaempferol aus der Fraktion der zellwandgebundenen Phenole der Blättagen 4 (A), 7 (B) und 10 (C) der Genotypen ‘M-Th’, ‘Börner’ und K18. Die grünen Säulen stellen die Summen der einzelnen phenolischen Verbindungen dar. n = vier Blätter.

Generell kann festgestellt werden, dass der FC-Test zur Bestimmung der Gesamtphenole bei allen Varianten höhere Werte als die Summe der mittels HPLC-Technik quantifizierten Phenole ergab.

Die Unterschiede hinsichtlich der konstitutiv vorliegenden Phenole zwischen den Genotypen und Blättagen waren allgemein gering.

4.4.2.2 Einfluss einer Schwarzfäuleinfektion auf die phenolischen Verbindungen

Da gezeigt werden konnte, dass die Bildung phenolischer Verbindungen häufig erst durch Pathogenbefall induziert wird (Bennett et al., 1996), sollten die Phenole auch nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule analysiert werden. Dazu sollte im Rahmen eines Vorversuches ein geeigneter Zeitpunkt nach Inokulation für die Ermittlung der Phenolkonzentrationen gewählt werden. Untersuchungsgegenstand waren die Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' 2, 4 und 6 dpi. Als Kontrolle wurde für jede Sorte und jeden Zeitpunkt eine scheininfizierte Probe generiert. Es wurden sowohl die freien als auch die zellwandgebundenen Phenole mittels FC-Test und HPLC bestimmt. Die Standards für die Messungen an der HPLC wurden dabei durch Catechin ergänzt. Der Versuch umfasste drei biologisch unabhängige Wiederholungen, die in jeweils zwei technischen Replikaten aufgearbeitet wurden. Die HPLC-Werte der freien Phenole zum Zeitpunkt 2 dpi stehen aufgrund eines technischen Defektes nicht zur Verfügung.

Die Ergebnisse zu den frei vorliegenden Phenolen sind in Abbildung 29 dargestellt. Der FC-Test zur Bestimmung der Gesamtphenolgehalte, ergab bei den Messungen der freien Phenole höhere Werte als die Summe der mittels HPLC-Technik quantifizierten Phenole. Beide Analysemethoden kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass 'M-Th' die höchsten Phenolkonzentrationen enthielt, gefolgt von der Sorte 'Solaris'. 'Börner' wies stets die geringsten Phenolkonzentrationen auf; bei den Analysen mittels HPLC wurden jedoch teilweise sogar gar keine bzw. nur sehr geringe Mengen detektiert.

Unabhängig von der Sorte und der Zeit nach Inokulation mit dem Schwarzfäuleerreger konnte ausschließlich bei der Sorte 'Solaris' 2 dpi ein signifikanter Unterschied zwischen der infizierten und der zugehörigen scheininfizierten Varianten festgestellt werden (Abbildung 29). Mit zunehmender Zeit nach Inokulation wurde mehrheitlich eine Abnahme der Phenolgehalte, ermittelt nach Folin-Ciocalteu, wahrgenommen. Bei den Phenolkonzentrationen gemessen mit Hilfe der HPLC-Technik handelte es sich tendenziell eher um eine Zunahme.

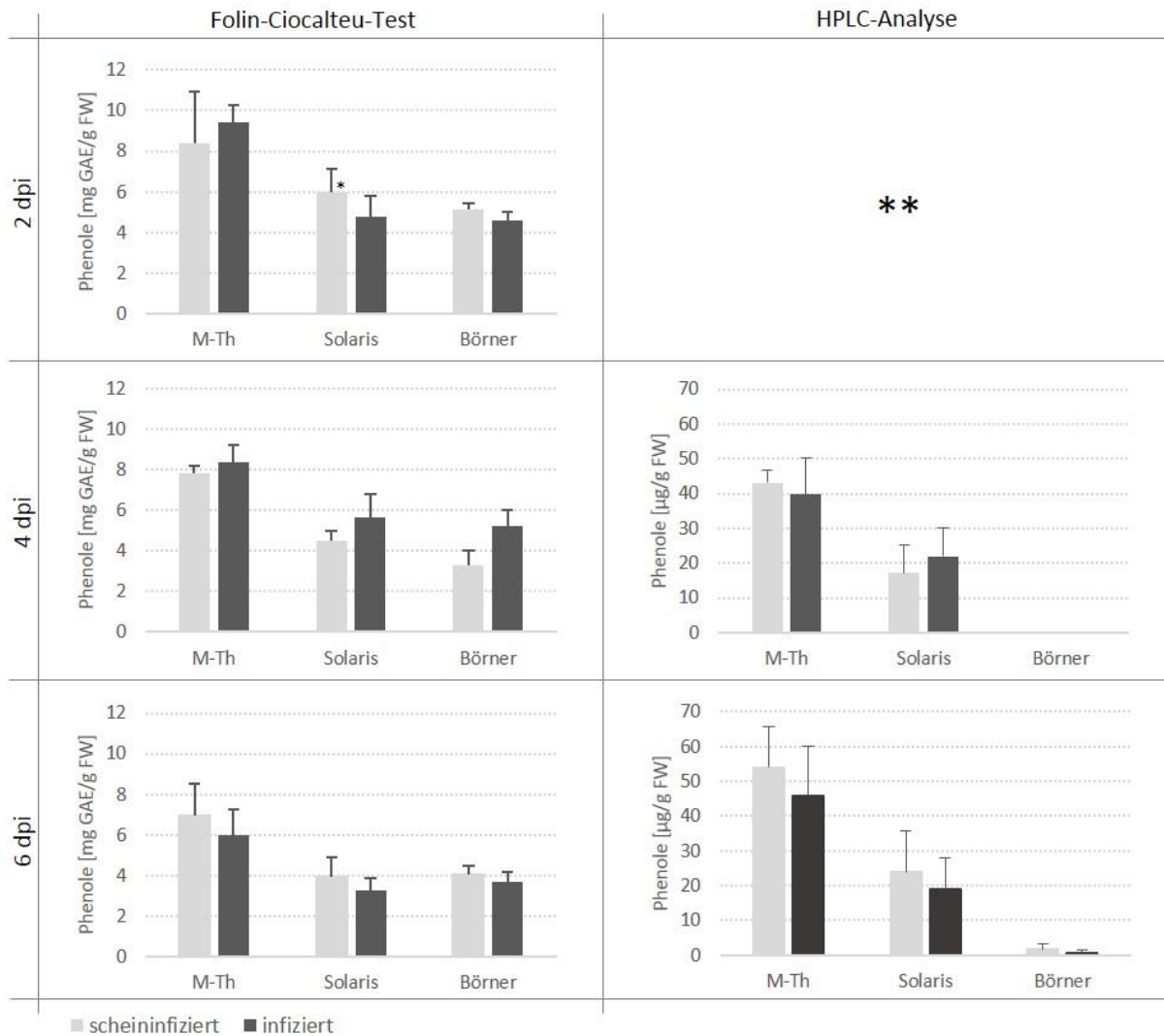


Abbildung 29. Konzentrationen an freien Phenolen der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 2, 4 und 6 Tage nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule ermittelt mit Hilfe des FC-Tests und der HPLC. Die Graphiken zu den Daten der HPLC-Messungen zeigen die Summen der einzelnen gemessenen Phenole. Die HPLC-Werte der freien Phenole zum Zeitpunkt 2 dpi stehen aufgrund eines technischen Defektes nicht zur Verfügung (**). Die mit * gekennzeichneten Signifikanzgruppen verweisen auf signifikante Unterschiede zwischen infizierter und zugehöriger scheininfizierter Variante nach Tukey (HSD) $\alpha = 0,05$ %. $n =$ drei Reben.

In Abbildung 30 sind die einzelnen phenolischen Verbindungen, die in Abbildung 29 als Summe angegeben sind, exemplarisch für den Zeitpunkt 6 dpi dargestellt. Bei den Sorten ‘M-Th’ und ‘Solaris’ hatte, unabhängig von der Variante, den größten Anteil die Gallussäure, aber auch die Ferulasäure war stets vertreten. Catechin und Kaffeesäure wurden in keiner der Varianten gemessen und die *p*-Cumarsäure spielte eine nur untergeordnete Rolle. Kaempferol trat in geringen Konzentrationen auf, jedoch ausschließlich bei den infizierten Varianten.

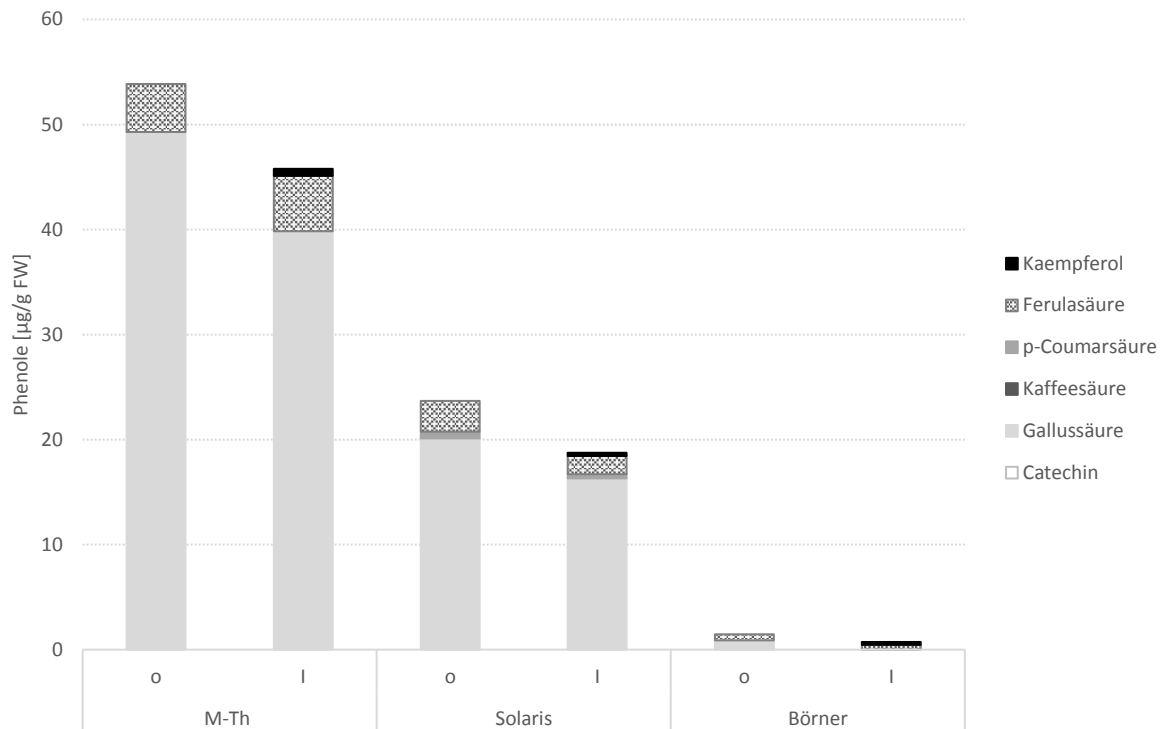


Abbildung 30. Konzentrationen der freien Phenole Kaempferol, Ferulasäure, *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Catechin gemessen mittels HPLC, der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 6 dpi mit dem Erreger der Schwarzfäule. n = drei Reben.

Auch bei den Untersuchungen der zellwandgebundenen Phenole ergaben die Messungen mittels FC-Test höhere Konzentrationen als die aufsummierten Messwerte der einzelnen phenolischen Verbindungen der HPLC-Analyse. Das Muster der Ergebnisse war indes bei beiden Methoden vergleichbar (Abbildung 31). Unabhängig von der Zeit nach Inokulation und Sorte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und den jeweils zugehörigen scheininfizierten Varianten festgestellt werden. Auch signifikante Sortenunterschiede und Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Probenahme innerhalb der Sorten waren nicht nachweisbar.

Das Verhältnis von zellwandgebundenen Phenolen zu freien Phenolen ist demnach in der Sorte ‘Börner’ am höchsten, gefolgt von der Sorte ‘Solaris’.

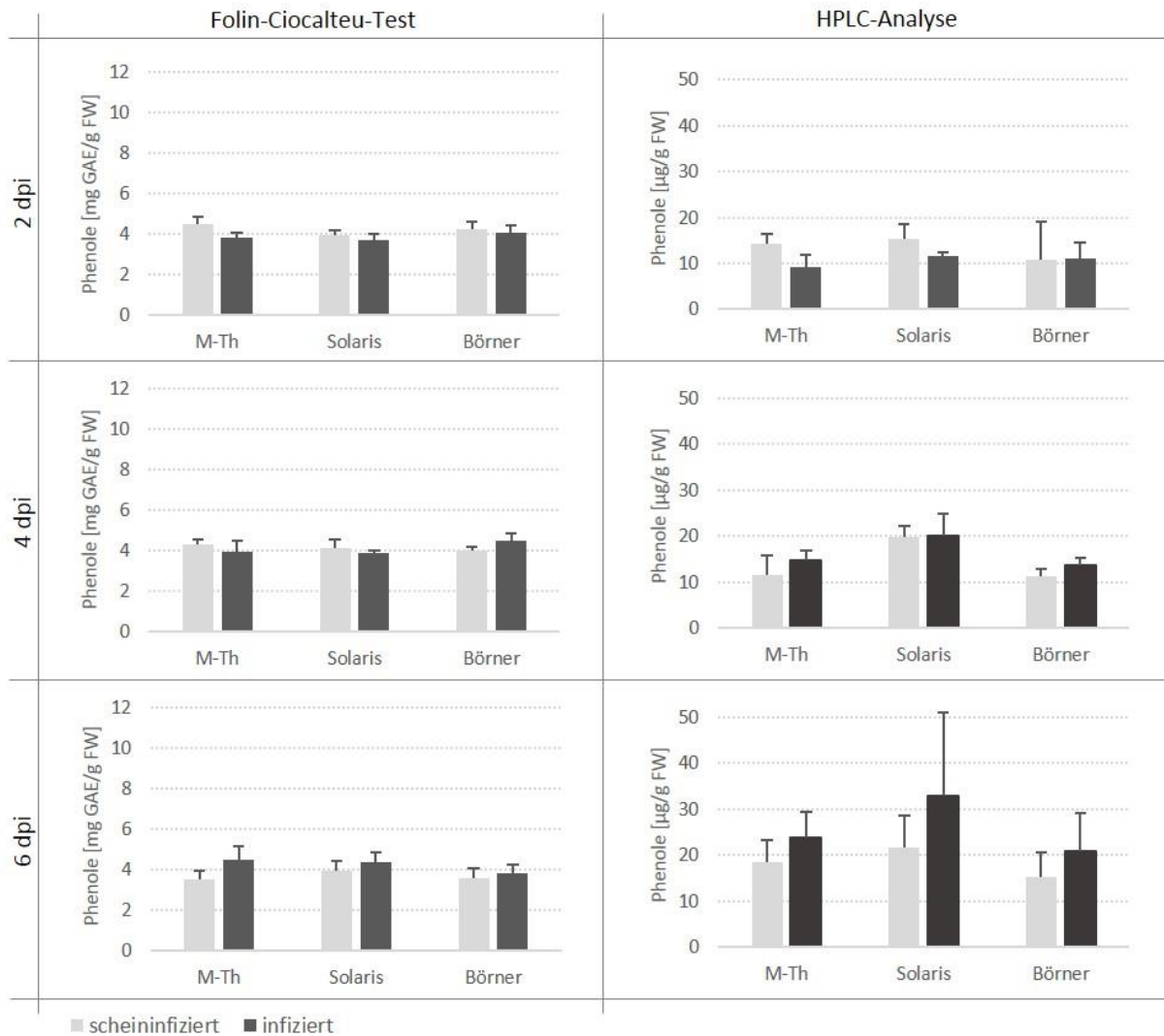


Abbildung 31. Konzentrationen an zellwandgebundenen Phenolen der Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' 2, 4 und 6 Tage nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule ermittelt mit Hilfe des FC-Tests und der HPLC. Die Graphiken zu den Daten der HPLC-Messungen zeigen die Summen der einzelnen gemessenen phenolischen Verbindungen. n = drei Reben.

Die in Abbildung 31 als Summe angegebenen Phenole, zeigten aufgetrennt in ihre einzelnen phenolischen Verbindungen zum Zeitpunkt 6 dpi (Abbildung 32), dass *p*-Cumarsäure bei allen Varianten den größten Anteil dieser Verbindungen hatte. Ferulasäure, Catechin, Gallussäure und Kaempferol wurden in geringeren Konzentrationen ebenfalls in allen Proben detektiert. Die Kaffeesäure konnte ausschließlich in den Proben der Sorte 'Solaris' und nach Infektion in der Sorte 'Börner' nachgewiesen werden. Sowohl die *p*-Cumarsäure als auch die Ferulasäure schienen in den infizierten Reblättern im Vergleich zu den scheininfizierten Blättern verstärkt gebildet worden sein.

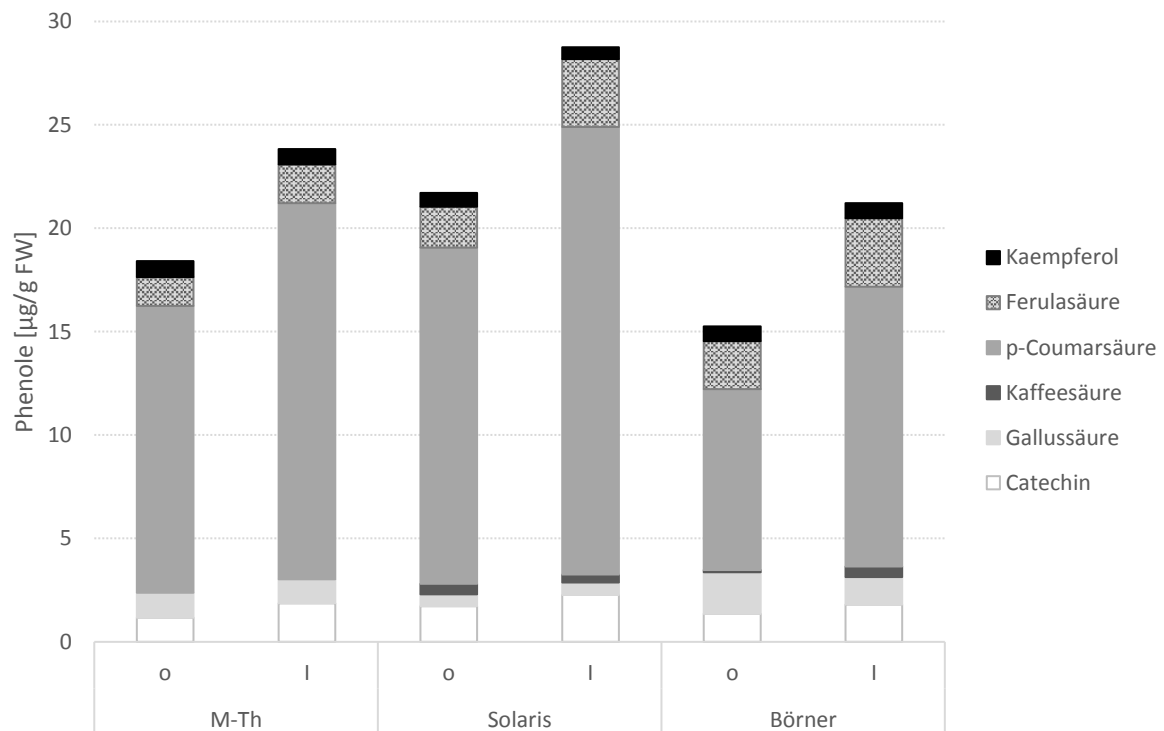


Abbildung 32. Konzentrationen der zellwandgebundenen Phenole Kaempferol, Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Catechin gemessen mittels HPLC, der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ 6 dpi mit dem Erreger der Schwarzfäule. n = drei Reben.

Die Ergebnisse des Vorversuchs ließen keine Aussage über die Wahl des optimalen Untersuchungszeitpunktes zu. Da Phenolen nach Pathogenbefall im Allgemeinen akkumulatorische Eigenschaften zugesprochen werden, wurde für nähere Beobachtungen zu den HPLC-Analysen der späteste Zeitpunkt, 6 dpi, herangezogen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur bei den freien Phenolen deutliche genotypbedingte Unterschiede festzustellen waren, wobei die anfällige Sorte ‘M-Th’ die höchsten Phenolgehalte aufwies. Infektionsbedingte Unterschiede der Phenolkonzentrationen wurden kaum beobachtet. Während die Gallussäure bei den freien Phenolen dominierte, hatte die *p*-Cumarsäure bei den gebundenen Phenolen den größten Anteil.

4.4.2.3 Optimierung des Extraktions- und Analyseverfahrens zur Bestimmung der freien Phenole

Da in dem Vorversuch zur Klärung des Einflusses einer Schwarzfäuleinfektion auf die Phenolkonzentration (Kapitel 3.4.2.2) große Diskrepanzen bei der Sorte ‘Börner’ zwischen den Konzentrationen freier Phenole ermittelt nach FC und HPLC-Analytik entstanden, wurde nach möglichen Erklärungsansätzen bzw. Hypothesen gesucht. Zwei potentielle Hypothesen wurden aufgestellt.

Hypothese 1: Die freien phenolischen Verbindungen in den Reblättern der Sorte ‘Börner’ liegen großteils gebunden an Zuckern vor und werden dadurch bei der HPLC-Analyse nicht erkannt, da sie ein

anderes UV-Spektrum als die Reinsubstanz haben. In der Folge werden sie nicht quantifiziert, kommen beim FC-Test jedoch zum Tragen.

Hypothese 2: In den Blättern der Rebsorte ‘Börner’ werden vorrangig andere phenolische Verbindungen gebildet, die mit den bisher verwendeten Standards nicht erfasst wurden.

4.4.2.3.1 Methodenvergleich und –optimierung zur Extraktion der freien Phenole

Zur Prüfung der ersten Hypothese wurden die freien Phenole der Genotypen ‘M-Th’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 sechs Tage nach Infektion durch den Erreger der Schwarzfäule mittels FC-Test und HPLC untersucht. Die Extraktion der freien Phenole erfolgte zunächst wie in Kapitel 3.2.7.1 beschrieben und der gewonnene Überstand wurde wie zuvor ‘klassisch’ direkt mittels FC-Test und HPLC vermessen. Ein Teil des gleichen Überstandes wurde zusätzlich zum Vergleich einer sauren und einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, um die Abspaltung der Zuckerreste zu bewirken und anschließend ebenfalls analysiert.

Die Ergebnisse des FC-Tests sind in Abbildung 33 gezeigt, dass die saure Hydrolyse bei allen Varianten vergleichbare Werte zur klassischen Methode ergab. Die Gesamtphenolgehalte nach alkalischer Hydrolyse waren hingegen deutlich geringer.

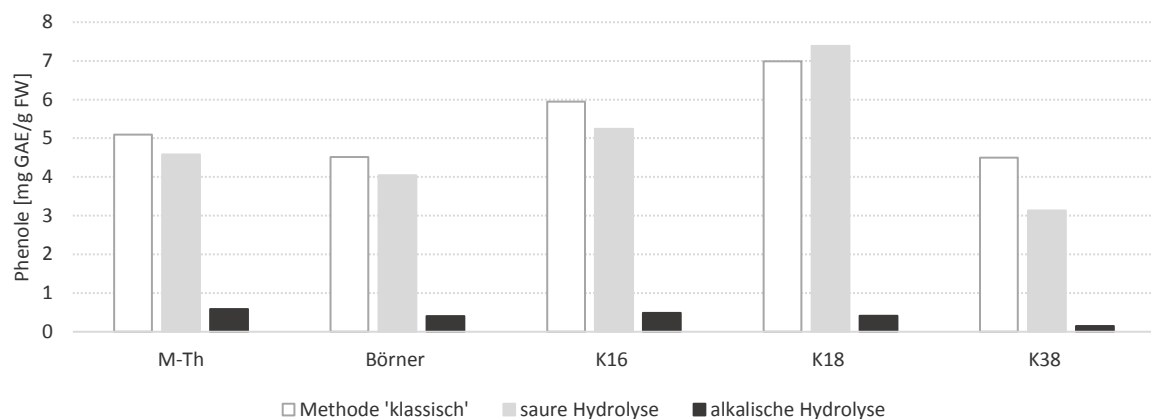


Abbildung 33. Konzentrationen der freien Gesamtphenole der Genotypen ‘M-Th’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 6 dpi bestimmt mittels FC-Test nach Aufarbeitung durch die ‘klassische Methode’ und zusätzlicher saurer und alkalischer Hydrolyse. n = 1.

Die Ergebnisse der HPLC-Analysen vermittelten ein anderes Bild (Abbildung 34). Die Summe der einzeln gemessenen phenolischen Verbindungen nach saurer Hydrolyse waren um ein vielfaches höher als die der “klassischen“ Methode oder nach alkalischer Hydrolyse. Die durch die “klassische“ Methode extrahierten und gemessenen Phenolkonzentrationen waren stets am geringsten, bei den Wildreben K18 und K38 wurden sogar gar keine Verbindungen nachgewiesen. Bei der Sorte ‘Börner’ und der Wildrebe K16 wurde bei dieser Methode ausschließlich Gallussäure detektiert, bei der Sorte ‘M-Th’ zusätzlich auch Ferulasäure und Kaempferol. Durch die ergänzend durchgeführte saure Hydrolyse konnten bei allen Genotypen ein größeres Spektrum phenolischer Verbindungen nachgewiesen werden. Bei allen Proben dominierte deutlich die Kaffeesäure, die durch die klassische Methode in keiner Probe erfasst

werden konnte. Auch die *p*-Coumarsäure und Ferulasäure wurden bei allen Genotypen gemessen, wenn auch in geringeren Konzentrationen als die Kaffeesäure. Kaempferol wurde ausschließlich bei den Sorten ‘M-Th’ und ‘Börner’ und der Wildrebe K16 aufgefunden. Durch die alkalische Hydrolyse wurden bei allen Genotypen aus dem hier verwendeten Standardset nur die *p*-Coumar- und Ferulasäure extrahiert und gemessen, wobei die Gehalte an *p*-Coumarsäure deutlich höher waren als die der Ferulasäure. Catechin wurde durch keine Extraktionsvariante bei keinem Genotyp erfasst.

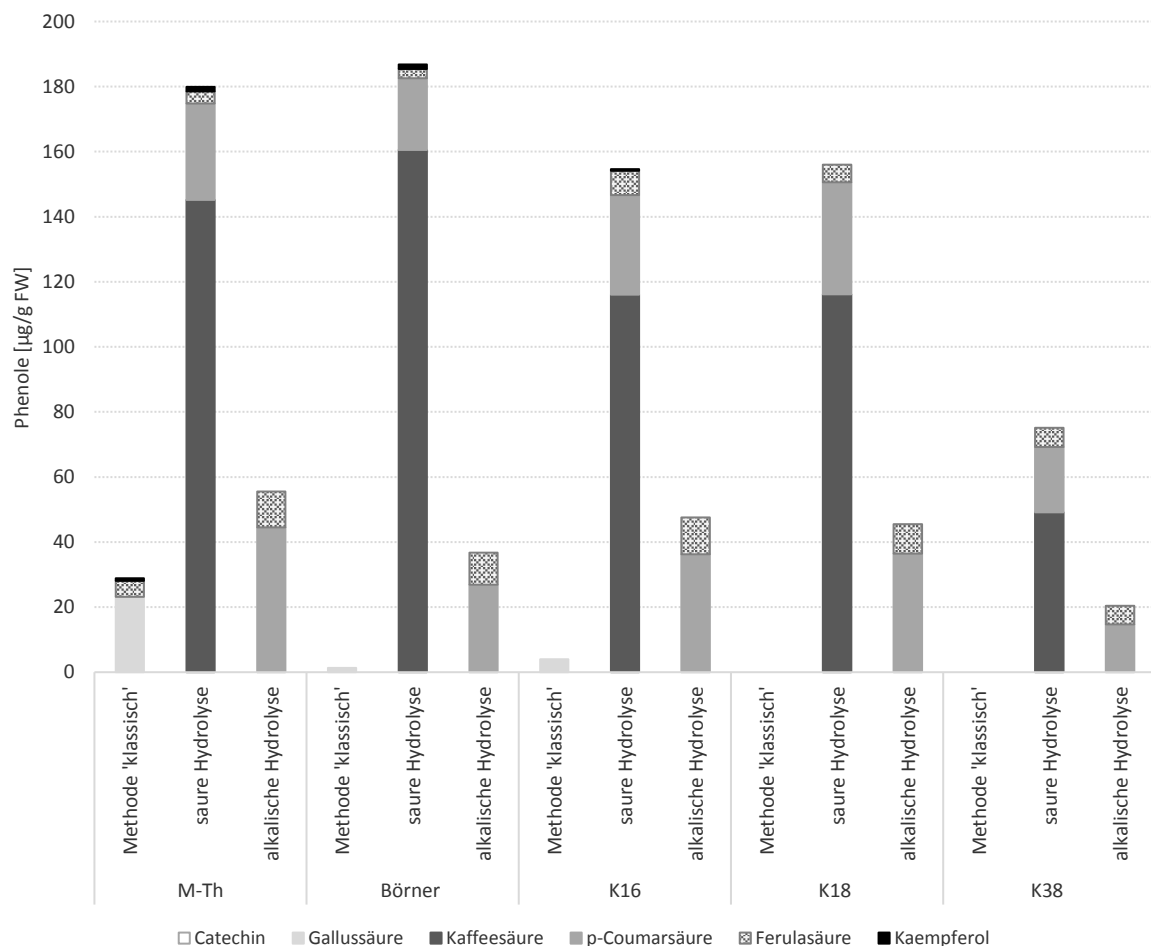


Abbildung 34. Konzentrationen der freien Phenole Kaempferol, Ferulasäure, *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Catechin bestimmt mittels HPLC-Analyse der Genotypen ‘M-Th’, ‘Börner’, K16, K18 und K38 6 dpi nach Aufarbeitung durch die ‘klassische Methode’ und zusätzlicher saurer und alkalischer Hydrolyse.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die erste Hypothese bestätigt werden konnte. Viele der hier mittels HPLC untersuchten phenolischen Verbindungen liegen gebunden an Zuckern vor. Nach saurer Hydrolyse mittels HCl wurden mehr unterschiedliche phenolische Verbindungen gemessen als bei der alkalischen Hydrolyse und die phenolischen Verbindungen in Summe gesehen, führten zu einer höheren Ausbeute. Im Sinne einer Erweiterung der phenolischen Analysen um die Fraktion der glykosidisch gebundenen Phenole würde die Wahl auf die saure Hydrolyse fallen.

4.4.2.3.2 Analyse des Phenolprofils

Zur Untersuchung der Genotypen auf mögliche Unterschiede in ihrem Phenolprofil und damit zur Überprüfung der zweiten Hypothese, wurden die Chromatogramme der verschiedenen Genotypen 6 Tage nach Inokulation bzw. Scheininokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule näher analysiert. Mit Hilfe des Diodenarray-Detektors, der bei allen Messungen das UV/VIS Spektrum von 200 bis 600 nm erfasste, wurden die Chromatogramme auf weitere signifikanten Peaks untersucht, deren Absorptionsmaximum/a und Retentionszeiten bestimmt und gegebenenfalls komplexere Peaks näher beschrieben. Die Genotypen wurden anschließend hinsichtlich An- bzw. Abwesenheit der Peaks verglichen (Tabelle 11 und Tabelle 12). Es wurden sowohl infizierte als auch scheininfizierte Proben analysiert, um zusätzlich herauszufinden, ob die Schwarzfäuleinfektion im Zuge des Abwehrverhaltens der Rebe die Synthese anderer phenolischer Verbindungen in der Pflanze provoziert. Von den Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' wurden jeweils drei biologisch unabhängige Proben analysiert, von den Wildreben K16, K18 und K38 wurde eine Probe untersucht.

In Abbildung 35 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus dem Chromatogramm der extrahierten freien Phenole der Wildrebe K16 infiziert mit dem Erreger der Schwarzfäule 6 dpi dargestellt. Der hier nicht abgebildete Chromatogrammabschnitt von 20 bis 40 min befindet sich zur vollständigen Angabe der Ergebnisse im Anhang. Außer den bekannten, bereits durch Standards identifizierten Peaks, konnten acht weitere signifikante Peaks unter zu Hilfenahme der Isoplotfunktion ermittelt werden, die mit Nummern versehen im Chromatogramm markiert wurden. In Tabelle 11 sind zusätzlich die Retentionszeit als auch das Absorptionsmaximum bzw. die Absorptionsmaxima angegeben. Die Wellenlänge, bei der die Peaks die größte Intensität aufwiesen, ist fett formatiert. Die Retentionszeiten sind ungefähre Angaben und können je nach Umgebungstemperatur oder anderen äußeren Einflüssen leicht variieren.

Bis auf Peak Nummer 6 konnten alle Peaks bei allen hier untersuchten Genotypen und Varianten detektiert werden. Peak Nummer 6 konnte ausschließlich bei infizierten Varianten, jedoch bei allen Genotypen nachgewiesen werden. Die zweite Hypothese wurde folglich widerlegt.

Mit dem Ziel weitere potentiell an der Abwehr beteiligte phenolische Verbindungen zu identifizieren und zukünftig in die Messmethode mittels HPLC zu integrieren, wurden die Peaks näher beschrieben. Denn nicht nur das Vorhandensein bzw. Fehlen phenolischer Verbindungen kann zu Resistenz oder Anfälligkeit der Pflanzen beitragen, sondern auch die vorliegende Menge bzw. Konzentration (Latouche et al., 2013, Goetz et al., 1999, Mayr et al., 1997).

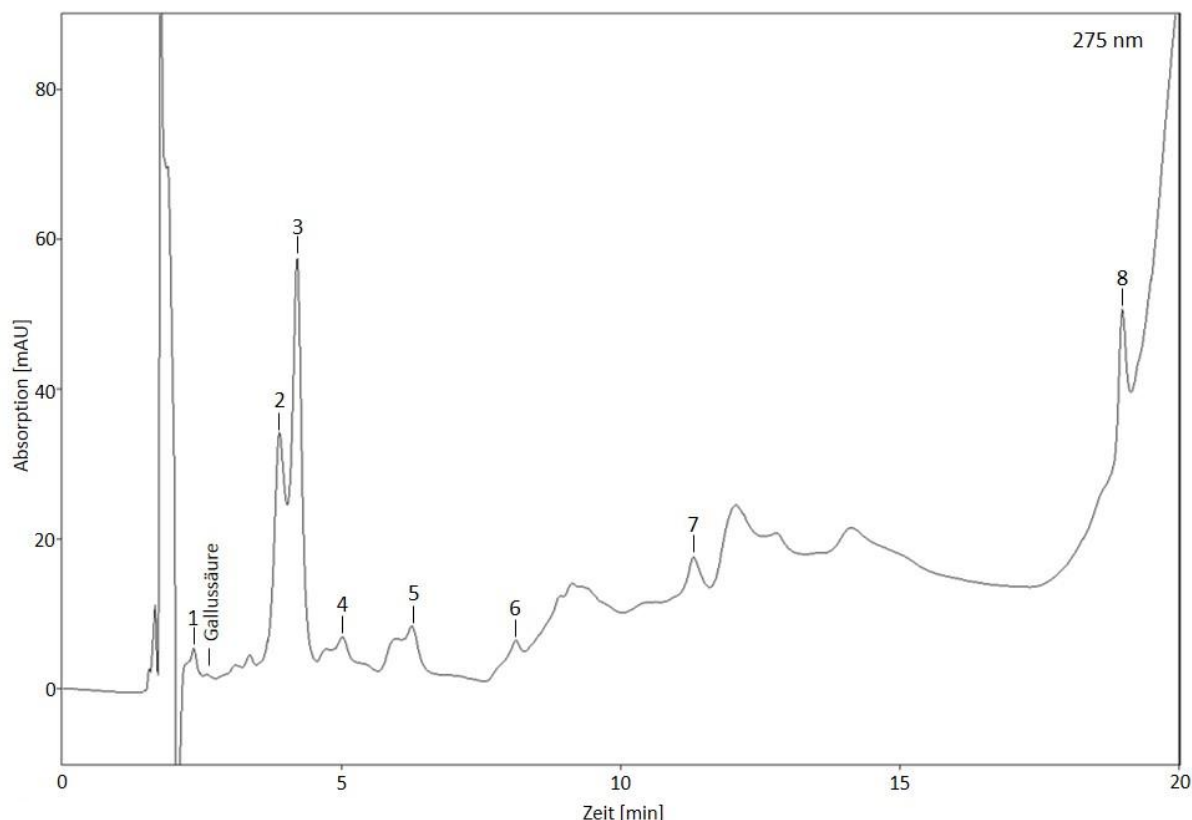


Abbildung 35. Chromatogrammausschnitt von 0 bis 20 min der Extrakte der freien Phenole der Wildrebe K16 infiziert mit dem Erreger der Schwarzfäule 6 dpi dargestellt mit einer Wellenlänge von 275 nm. Die Zahlen eins bis acht markieren signifikante Peaks die in Tabelle 11 mit zugehöriger Retentionszeit und Absorptionsmaximum/a aufgelistet sind. Zusätzlich ist das Signal der Gallussäure angezeigt.

Hervorzuheben sind die Peaks Nummer 2 und 3, die bei allen Proben auffällig hoch waren und einen Doppelpeak, mit identischen Absorptionsmaxima bei 330 nm bildeten. Die Peaks Nummer 4 und 5 waren sich hinsichtlich ihrer Form sehr ähnlich, beide wiesen ein vorgelagertes schwächeres Signal auf, dessen Absorptionsmaximum mit dem des Hauptpeaks übereinstimmte. Peak Nummer 4 hatte ein erstes Maximum bei ca. 4,5 min gefolgt von dem Hauptmaximum bei ca. 5 min und einer Wellenlänge von 306 nm. Das stärkste Signal zeigte Peak Nummer 5 im UV-Spektrum bei einer Wellenlänge von 315 nm und den Retentionszeiten 5,6 und 6,2 min.

Tabelle 11. Auflistung der signifikanten Peaks aus Chromatogrammen nach Extraktion der freien Phenole mit Nummerierung und zugehörigen Retentionszeiten und Absorptionsmaxima. Die Retentionszeit bzw. Wellenlänge, bei der der Peak die maximale Intensität zeigte ist fett formatiert. Zusätzlich ist das Auftreten (gekennzeichnet durch 'x') bzw. die Abwesenheit ('-') der Peaks in den Chromatogrammen der verschiedenen Genotypen 6 Tage nach Scheininfektion ('o') und Infektion mit dem Erreger der Schwarzfäule ('I') angegeben.

Peak-nummer	Retentionszeit [min]	Absorptionsmaxima [nm]	'M-Th'		'Solaris'		'Börner'		K16		K18		K38	
			o	I	o	I	o	I	o	I	o	I	o	I
1	2,3	260	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	3,9	330	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	4,0	330	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	4,5; 5,0	306	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	5,6; 6,2	315	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	8,1	288, 323	-	x	-	x	-	x	-	x	-	x	-	x
7	11,3	259, 279	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	19,0	258, 288, 352	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Bis auf Peak Nummer 6 konnten alle Peaks bei allen hier untersuchten Genotypen und Varianten detektiert werden. Peak Nummer 6 wurde jedoch ausschließlich bei infizierten Varianten nachgewiesen. Dies wird vor allem im Overlay der Chromatogramme von schwarzfäuleinfizierten und nicht infizierten Proben der Wildrebe K16 deutlich (Abbildung 36 A). Der signifikante Peak mit den Absorptionsmaxima bei 288 und 323 nm war nur bei der mit Schwarzfäule infizierten Variante zu sehen (Abbildung 36 B). Das Signal mit der Nummer 8, das sich bei etwa 19 min aufbaut, hat ein vergleichsweise komplexes UV-Spektrum (siehe Anhang) mit drei Absorptionsmaxima bei 258, 288 und 352 nm.

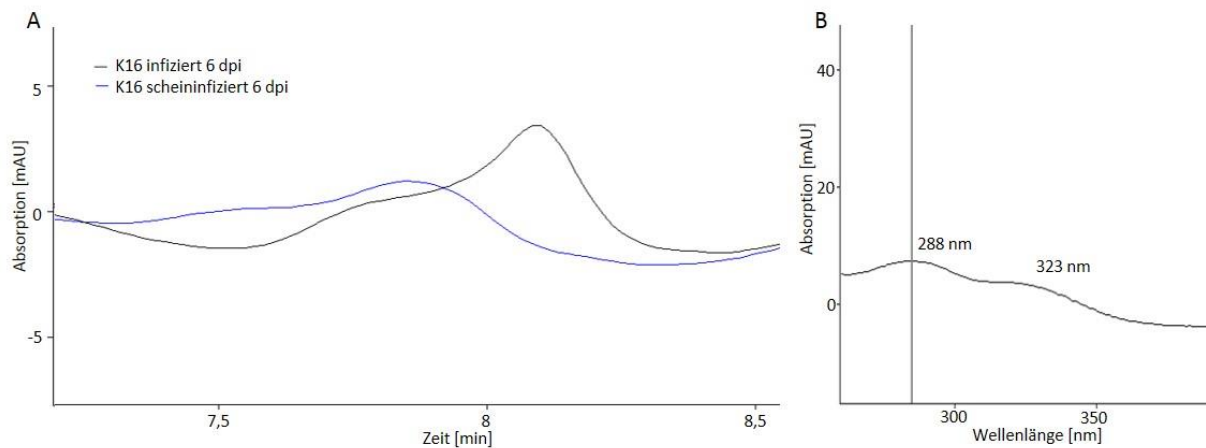


Abbildung 36. Nähere Beschreibung des Peaks Nummer 6 nach Chromatographie von Extrakten zu den freien Phenolen der Wildrebe K16 infiziert mit dem Erreger der Schwarzfäule 6 dpi. Peak Nummer 6 ist im Overlay nur bei der infizierten Variante zu sehen, nicht aber bei der scheininfizierten Kontrolle (A). Im UV-Spektrum sind die Absorptionsmaxima deutlich bei 288 und 323 nm zu erkennen (B).

Bei der näheren Analyse der Chromatogramme der Extrakten zu den zellwandgebundenen Phenolen wurden ebenfalls acht signifikante Peaks ermittelt, die bei allen Genotypen sowohl in der scheininfizierten als auch in der infizierten Variante detektiert werden konnten. Das in Abbildung 37 exemplarisch dargestellte Chromatogramm ist unter Berücksichtigung der Absorptionsmaxima der Peaks im ersten Abschnitt von 0 bis 20 min mit der Wellenlänge 270 nm (Abbildung 37 A) und im zweiten Teil von 20 bis 40 min mit der Wellenlänge 420 nm (Abbildung 37 B) dargestellt. Sowohl die unbekanntesten Peaks, als auch die gemessenen bekannten phenolischen Verbindungen sind im Chromatogramm markiert.

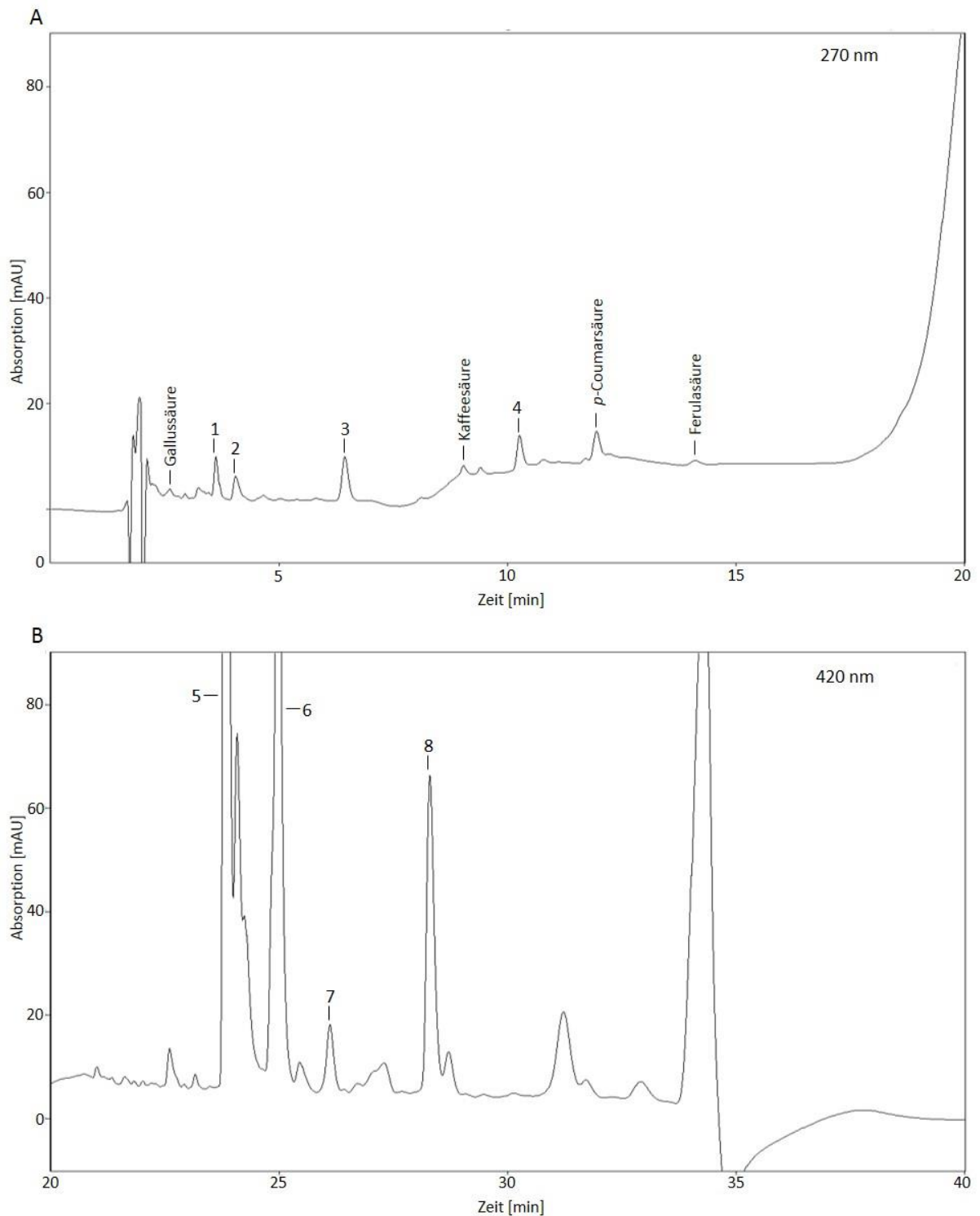


Abbildung 37. Chromatogramm von Extrakten der zellwandgebundenen Phenole der Wildrebe K16 infiziert mit dem Erreger der Schwarzfäule 6 dpi. Der Bereich 0 bis 20 min ist bei einer Wellenlänge von 270 und der Bereich von 20 bis 40 min bei einer Wellenlänge von 420 nm dargestellt. Die Zahlen eins bis acht markieren signifikante Peaks die in Tabelle 12 mit zugehöriger Retentionszeit und Absorptionsmaximum/a aufgelistet sind. Zusätzlich sind die Signale von Gallus-, Kaffee-, *p*-Coumar- und Ferulasäure angezeigt.

Die Signale zu den Peaks Nummer 1 und 2 erschienen bezogen auf die Retentionszeiten mit einem Abstand von etwa 0,4 min relativ kurz nacheinander und hatten beide ein Absorptionsmaximum bei 265 nm. Der Peak mit der Nummer 4 zeigte eine vorgelagerte Schulter, deren Absorptionsmaximum bei

263 nm lag, das Maximum des Hauptpeaks befand sich bei 285 nm. Der stark ausgeprägte Peak Nummer 5 war Teil eines Dreifachpeaks, jedoch handelte es sich hierbei um drei unterschiedliche Substanzen, was durch die drei voneinander getrennten Farbfelder in der Isoplot-Ansicht (siehe Anhang) deutlich wird. Der Peak hatte zwei Absorptionsmaxima (284 und 405 nm). Auch der darauffolgende Peak, Peak Nummer 6, wies in der Regel zwei Absorptionsmaxima auf. Meist hatte das Signal bei der Wellenlänge von 405 nm die stärkere Intensität, seltener jedoch auch das Signal bei 428 nm. In wenigen Fällen war ausschließlich ein Signal bei der Wellenlänge von 405 nm zu beobachten.

Tabelle 12. Auflistung der signifikanten Peaks aus Chromatogrammen nach Extraktion der zellwandgebundenen Phenole mit Nummerierung und zugehörigen Retentionszeiten und Absorptionsmaxima. Die Retentionszeit bzw. Wellenlänge, bei der der Peak die maximale Intensität zeigte ist fett formatiert. Zusätzlich ist das Auftreten ‘x’ bzw. die Abwesenheit (‘-‘) der Peaks in den Chromatogrammen der verschiedenen Genotypen 6 Tage nach Scheininfektion (‘o’) und Infektion mit dem Erreger der Schwarzfäule (‘I’) angegeben.

Peak-nummer	Retentionszeit [min]	Absorptionsmaxima [nm]	‘M-Th’		‘Solaris’		‘Börner’		K16		K18		K38	
			o	I	o	I	o	I	o	I	o	I	o	I
1	3,6	265	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	4,0	265	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	6,4	283	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	10,2	263, 285	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	23,9	284, 405	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	25,0	405 , 428	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	26,3	428	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	30,8	445, 475	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

4.4.3 Expressionsanalysen

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine etablierte und sensitive Methode zur Quantifizierung von Transkriptmengen unter Verwendung genspezifischer Primer. Mit ihrer Hilfe sollte die zeitliche Expressionsdynamik unterschiedlicher abwehrassoziierter Gene zunächst in verschiedenen resistenten Sorten wie ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule untersucht werden.

4.4.3.1 Vergleich verschiedener Infektionsmethoden für die Eignung zur Expressionsanalyse abwehrrelevanter Gene

Zur optimalen Untersuchung abwehrassoziierter Gene in Rebblättern nach Schwarzfäuleinokulation wurden zunächst zwei methodisch unterschiedliche Versuchsansätze verglichen, die sich in der Inokulation und Probenahme unterschieden. Um den Aspekt des Pflanzenwachstums, speziell der Expansion der Blätter zu berücksichtigen, wurden im Versuchsansatz „ganze Pflanzen“ die Pflanzen wie für die Screeningversuche vollständig sprühinokuliert, wobei die Blattober- und Blattunterseiten benetzt wurden. Zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt wurden pro Variante drei Blätter von unterschiedlichen Reben geerntet. Es handelte sich dabei stets um Blatt 4, zum Zeitpunkt der Inokulation, das zuvor markiert wurde. Als Alternative wurde in Anlehnung an die Versuche mit *P. viticola* (Merz, 2014, Müller, 2014) ein Versuch basierend auf Blattscheiben angesetzt, der weniger

material- und platzintensiv ist. Hierfür wurden Blattscheiben aus dem vierten Blatt verschiedener Reben ausgestanzt, gepoolt, in Petrischalen überführt und mit einem Tropfen inokuliert bzw. scheininokuliert. Somit ist das Ausgangsmaterial für die einzelnen Varianten pro Sorte nahezu gleich und vereint viele biologisch unabhängige Wiederholungen

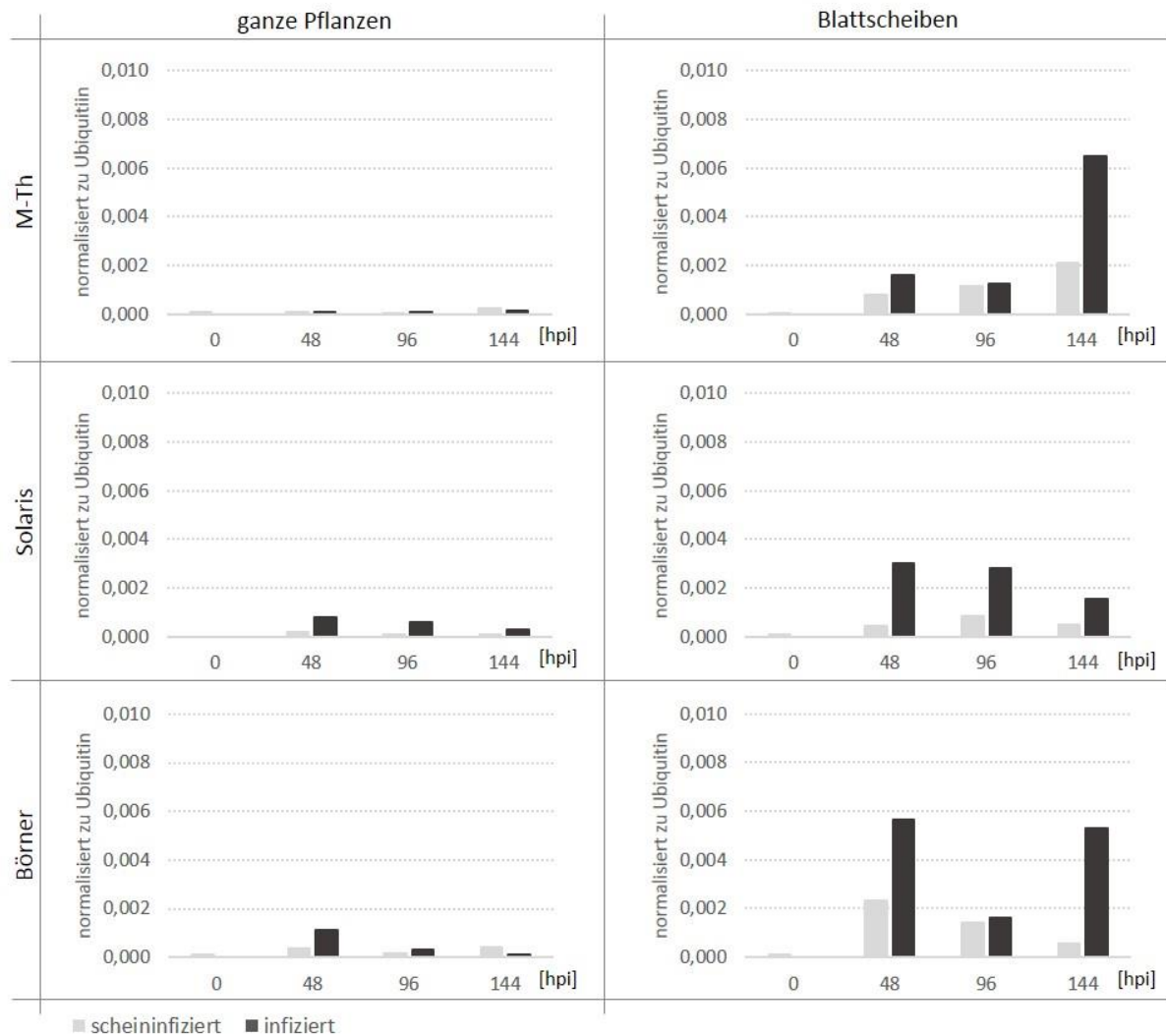


Abbildung 38. Vergleich verschiedener Inokulationsmethoden hinsichtlich ihrer Eignung zur Untersuchung der Expression abwehrrelevanter Gene. Dargestellt ist die Expression von *VvPR10.1* bei verschiedenen Sorten ('M-Th', 'Solaris' und 'Börner') scheininfiltrierter und infizierter Varianten zu den Zeitpunkten 0, 48, 96 und 144 hpi. Verglichen wurden sprühinokulierte Blätter an ganzen Pflanzen die zum Probenahmezeitpunkt geerntet und Blattscheiben, die mit einem Tropfen inokuliert wurden. n = ein Versuch mit gepoolten Blattscheiben von mindestens 15 verschiedenen Blättern.

Dargestellt sind die Ergebnisse zu *VvPR10.1* bei den Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner'. Die Expressionslevel bei Versuchen basierend auf Blattscheiben waren sortenunabhängig deutlich höher als bei Versuchen an ganzen Pflanzen. Auch die scheininokulierten Varianten zeigten bei Blattscheibenversuchen vergleichsweise erhöhte Transkriptmengen. Im Sortenvergleich deutet sich an, dass bei der Sorte 'M-Th' erst zum späten Zeitpunkt 144 hpi eine verstärkte Transkription von *VvPR10.1* stattfindet, wohingegen die Sorten 'Solaris' und 'Börner' bereits zum Zeitpunkt 48 hpi erhöhte

Expressionslevel aufzeigten, welche anschließend absanken. Bei 'Börner' kam es zum Zeitpunkt 144 hpi zu einem erneuten Transkriptanstieg.

4.4.3.2 Expressionsanalyse verschiedener potentiell an der Abwehr beteiligter Gene

Die relativen Expressionen beider Versuchsansätze sind vergleichbar. Da sich die höchsten Expressionen zum frühen Zeitpunkt 48 hpi beobachten ließen, wurden bei den Expressionsanalysen verschiedener potentiell an der Abwehr beteiligter Gene auch frühere Zeitpunkte wie 6, 12 und 24 hpi berücksichtigt. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, findet in dieser Zeit die Pyknidiosporenanheftung und -keimung, die Appressorienbildung und Penetration der Kutikula statt. Da diese Entwicklungsschritte vermutlich nicht vom Blattwachstum beeinflusst sind, und aus Vorteilen, wie dem geringen Material- und Platzaufwand wurden die folgenden Versuche basierend auf Blattscheiben durchgeführt.

Die Ergebnisse beruhen auf zwei biologisch unabhängigen Versuchen, wobei jede Variante sich aus Blattscheiben von mindestens 15 Blättern verschiedener Reben zusammensetzt. Bei der Versuchsdurchführung wurde die Sporenkonzentration, aber auch die Tropfengröße erhöht (Tabelle 2) um eine größere Infektionsdichte und einen stärkeren Effekt zwischen infizierten und nicht infizierten Varianten zu erzielen.

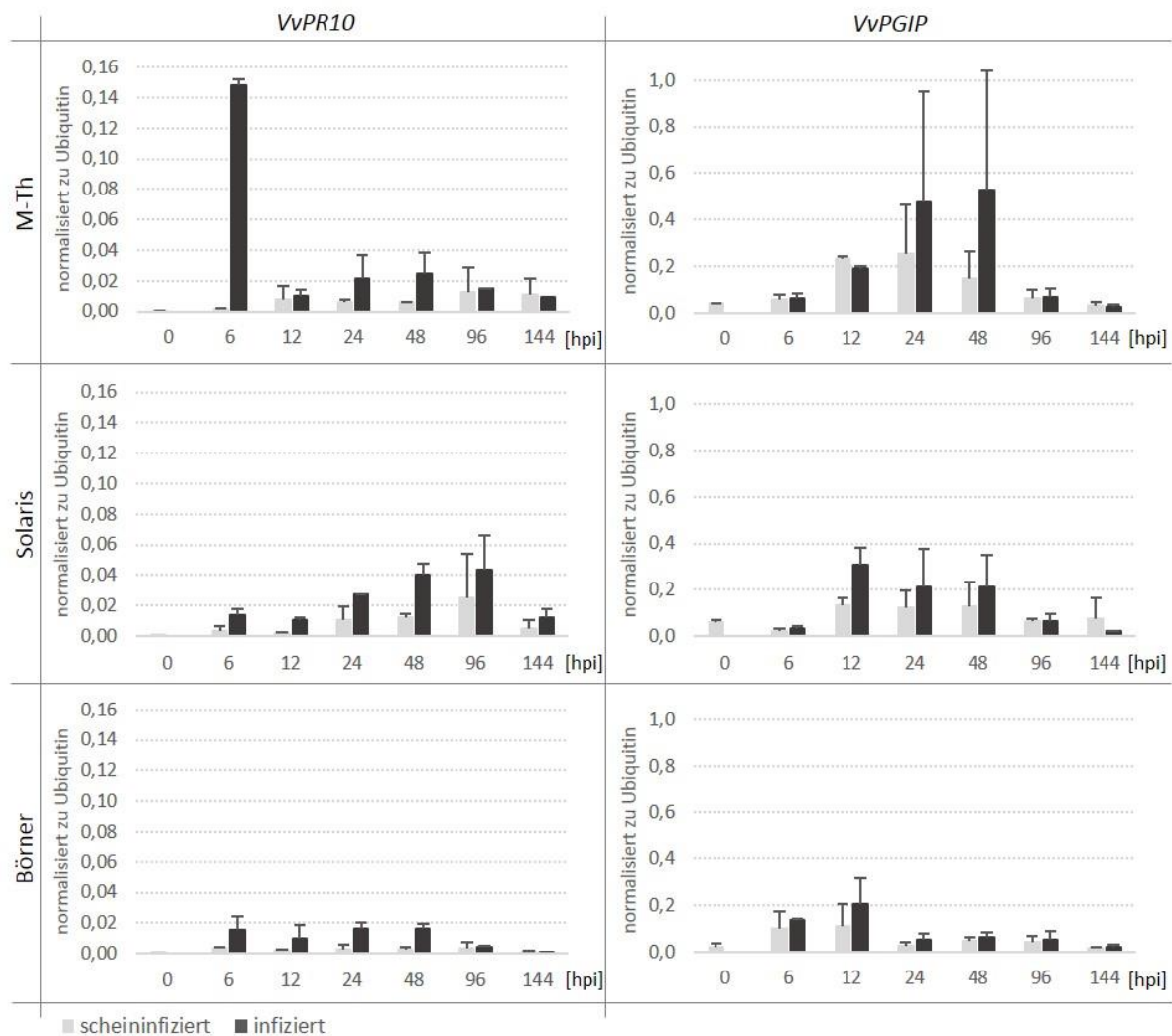


Abbildung 39. Expression von *VvPR10.1* und *VvPGIP* der Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48, 96 und 144 h) nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule bestimmt mittels qPCR. Dargestellt sind scheininfizierte (hellgrau) und infizierte (dunkelgrau) Varianten. Die Expressionswerte wurden korrigiert durch das Haushaltsgen Ubiquitin. n = 2.

Das Zeitprofil der Expressionslevel von *VvPR10.1* zeigte bei allen drei untersuchten Sorten einen leichten biphasischen Verlauf, mit einem ersten Peak bei 6 hpi, der anschließend abflachte und bei 24 hpi wieder anstieg (Abbildung 39). Besonders auffällig ist die sehr starke Expression zum Zeitpunkt 6 hpi bei der Sorte 'M-Th'. Die Expressionslevel waren durchschnittlich bei der Sorte 'Börner' am geringsten. Das zeitliche Expressionsprofil des abwehrrelevanten Genes *VvPGIP* variiert stark zwischen den einzelnen Sorten (Abbildung 39). Die höchsten Transkriptmengen wurden bei der Sorte 'M-Th' gemessen, diese stiegen bis zum Zeitpunkt 48 hpi stetig an. Jedoch zeigten auch die scheininfizierten Varianten erhöhte Expressionslevel. Nur zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi kam es zu einer infektionsbedingten Induktion. Bei der Sorte 'Solaris' kam es zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 hpi zu leicht erhöhten Transkriptmengen bei den schwarzfäuleinfizierten Varianten. Bei der Sorte 'Börner' wurde eine vergleichbare Erhöhung bereits zu den Zeitpunkten 6 und 12 hpi beobachtet.

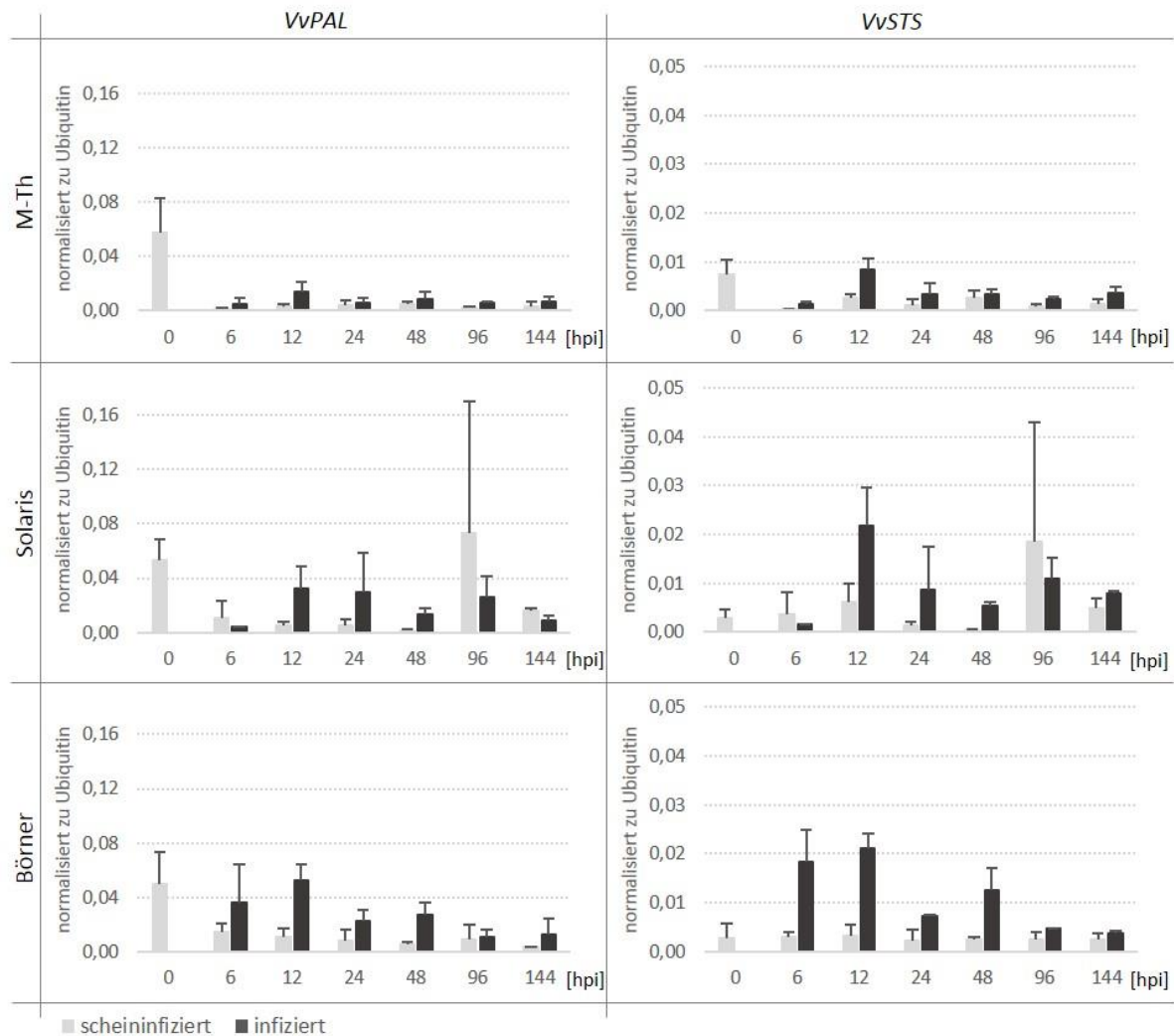


Abbildung 40. Expression von *VvPAL* und *VvSTS* der Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48, 96 und 144 h) nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule bestimmt mittels qPCR. Dargestellt sind scheininfizierte (hellgrau) und infizierte (dunkelgrau) Varianten. Die Expressionswerte wurden korrigiert durch das Haushaltsgen Ubiquitin. n = 2.

Die Expressionsergebnisse zu den Genen *VvPAL* und *VvSTS* waren ähnlich, sowohl die quantitative Abstufung zwischen den Sorten, als auch das Profilmuster innerhalb der einzelnen Sorten betreffend (Abbildung 40). Nur geringfügige Expressionslevel wurden bei der anfälligen Sorte 'M-Th' gemessen. Die Expressionswerte der Sorte 'Solaris' waren höher, mit einem ersten Peak bei 12 hpi, der bis zum Zeitpunkt 48 hpi abflachte und danach erneut anstieg. Ungewöhnlich ist der hohe Peak der scheininfizierten Varianten zum Zeitpunkt 96 hpi. Dieser wurde jedoch nur von einem Versuch generiert und konnte durch die Versuchswiederholung nicht bestätigt werden, was durch die hohe Standardabweichung angedeutet wird. Auch bei der Sorte 'Börner' zeichnete sich dieser biphasische Expressionsverlauf ab und war zusätzlich stärker ausgeprägt. Bereits 6 hpi waren deutliche Geninduktionen der infizierten Varianten festzustellen und der zweite Peak trat im Vergleich früher (48 hpi) auf.

Generell wurde bei den Untersuchungen zu *VvPAL* eine sortenunabhängige auffällig hohe Transkriptmenge zum Kontrollzeitpunkt 0 hpi beobachtet.

4.4.4 Untersuchungen zur Rolle der Zellwandzusammensetzung in der Resistenz

Die Ergebnisse zur Biologie der Schwarzfäule, wie das subkutikuläre Hyphenwachstum auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermiszellen und die Ernährungsweise des Erregers, aber auch die Tatsache, dass Myzele auf resistenten Genotypen und alten Blättern in ihrer Entwicklung eingeschränkt sind, lassen vermuten, dass die Zellwandzusammensetzung, speziell der Pektin Gehalt, einen Einfluss auf die Entwicklung des Erregers und letztlich auch die Resistenzausprägung der Rebe bzw. des entsprechenden Pflanzenorgans hat.

Diese Vermutung wurde anhand zwei verschiedener Versuchsansätze überprüft und untersucht. Zum einen wurden mehrere Schwarzfäuleisolate hinsichtlich ihrem Vermögen Zellwandkomponenten zu degradieren und für ihr Wachstum zu nutzen differenziert und dessen Einfluss auf die Virulenz in einer Korrelationsanalyse ermittelt. Im zweiten Ansatz wurden die Zellwandkomponenten und die Komplexität der Pektine von Rebblättern verschieden resistenter Genotypen analysiert.

4.4.4.1 Einfluss der Abbaubarkeit- und Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Virulenz

Im ersten Versuchsansatz wurden verschiedene Schwarzfäuleisolate (8088-2, 8088, 9390, 9680, 9449, 9450, 9494 und 9495) hinsichtlich ihrer Wachstumsrate und Abbauzone der Kohlenstoffquellen 15 dpi auf verschiedenen Nährmedien verglichen. Ähnlich wie die in Kapitel 4.2.5 beschriebenen Versuche basierten die Tests auf einem Minimalmedium bestehend aus Nährsalzen, das jeweils mit Stärke, carboxymethylierter Cellulose (CMC), der Hemicellulose Xylan oder Pektin versetzt war. Das pektinhaltige Medium wurde zum einen auf pH 7 zum Nachweis der Pektatlyaseproduktion und zum anderen auf pH 5 zur Überprüfung der Polygalacturonaseaktivität justiert. Auch das Potential zur Bildung von Phenoloxidasen wurde mit Hilfe des Bavendammtests überprüft.

Ausgewählte Isolate wurden anschließend auf ihre Virulenz an zwei verschiedenen Rebsorten getestet. Ziel war es die Ergebnisse in einer Korrelationsanalyse zusammenzuführen und zu zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Eigenschaften besteht. Entsprechend der Hypothese wurde erwartet, dass Isolate, die Zellwandbausteine wie Pektine besser abbauen und/oder verwerten können als andere Isolate, virulenter sind.

4.4.4.1.1 Differenzierung verschiedener Schwarzfäuleisolate mittels Nährmedientests

Alle getesteten Schwarzfäuleisolate waren in der Lage, auf dem kohlenstofffreien Minimalmedium Hyphen zu bilden, wenn auch nur sehr kurze und für den Erreger untypisch hyaline. Unterschiede zwischen den Isolaten waren vorhanden, konnten jedoch nicht statistisch belegt werden (Abbildung 41 A). Ähnliches galt für das Wachstum der Isolate auf dem stärkehaltigen Medium, jedoch war hier das Wachstum generell stärker und das Myzel bei allen Isolaten schwarz und dicht, was dem typischen Wachstum der Schwarzfäule auf Vollmedien entspricht. Hoch signifikante Unterschiede haben sich hier vor allem beim Vergleich des Stärkeabbaus ergeben (Abbildung 41 B). Die größte Stärkeabbauzone

wurde bei dem Isolat 9390 gefolgt von 8088 beobachtet, welche sich diesbezüglich signifikant von den Isolaten 9680, 9449 und 9450, umgeben von einem kleinen Halo unterschieden, während die Isolate 8088-2, 9494 und 9495 mittelgroße Abbauzonen aufwiesen. Das Verhältnis von Substratabbauzone zu Wachstumszone war auf dem cellulose- und hemicellulosehaltigem Medium sehr ähnlich und zeichnete sich durch ein nur geringfügiges Wachstum bei einer im Vergleich sehr großen Substratabbauzone aus (Abbildung 41 C, D). Auch zwischen den einzelnen Isolaten waren keine nennenswerten Unterschiede festzustellen. Eine größere Variabilität zwischen den einzelnen Isolaten war hinsichtlich ihres Wachstums und des Substratabbaus auf pektinhaltigen Medien zu beobachten (Abbildung 41 E, F). Im Gegensatz zu den anderen Medien variierte hier auch das Verhältnis von Substratabbau zu Wachstum zwischen den einzelnen Isolaten stark und ist zur besseren Verdeutlichung in Abbildung 42 dargestellt. Werte kleiner als eins zeigen dabei eine größere Wachstumsrate im Vergleich zum Substratabbau an und weisen auf eine gute Verwertbarkeit des Substrats zugunsten des Wachstums hin. Bei Werten größer eins dominiert der Substratabbau im Vergleich zur Wachstumsrate.

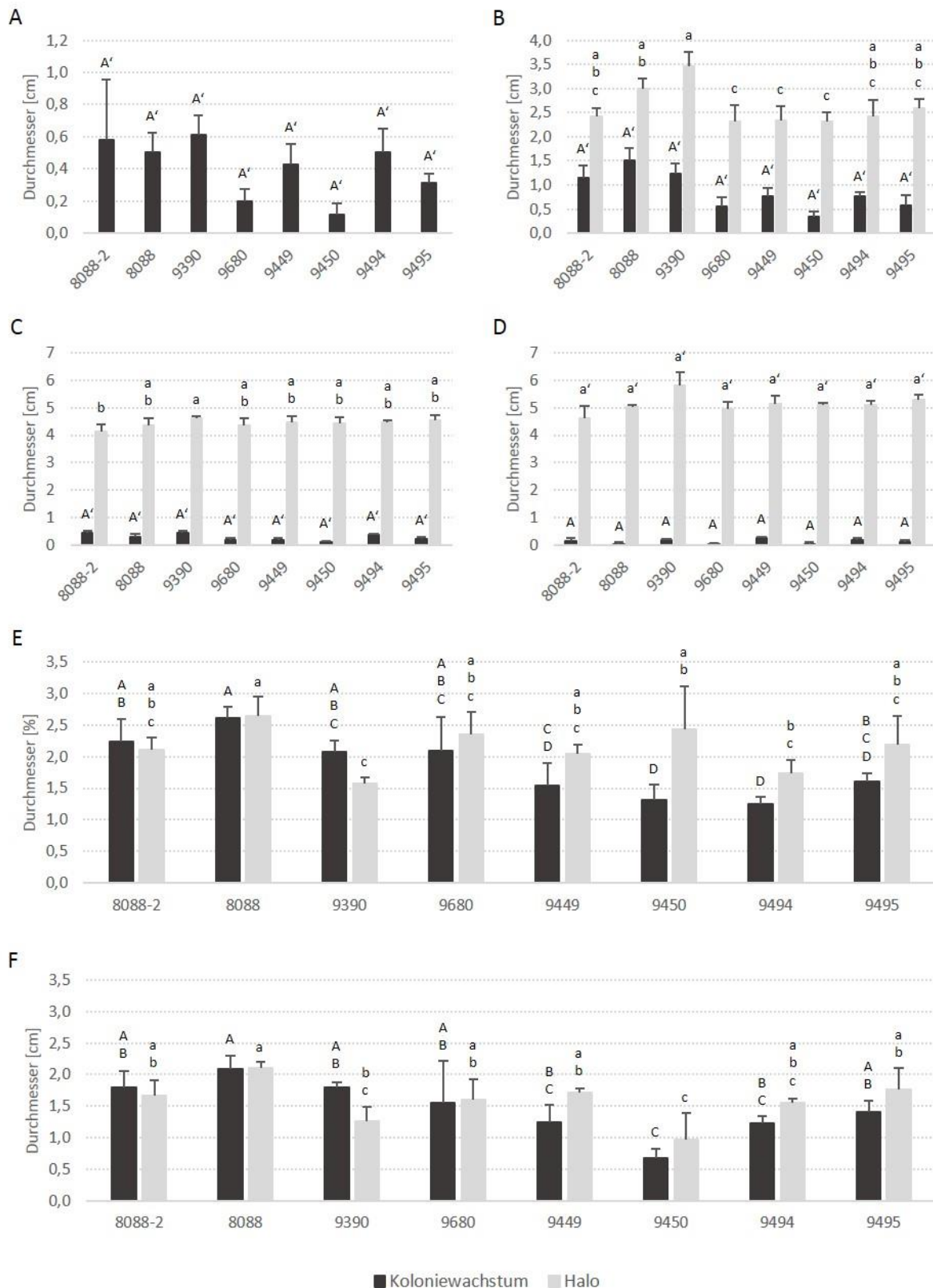


Abbildung 41. Vergleich der Wachstumsrate und des Substratabbaus verschiedener Schwarzfäuleisolate (8088-2, 8088, 9390, 9680, 9449, 9450, 9494 und 9495) auf Minimalmedium (A) ergänzt durch Stärke (B), CMC (C), Xylan (D) und Pektin, justiert auf einen pH-Wert von 5 (E) und einen pH-Wert von 7 (F). Die Signifikanzgruppen beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Isolaten hinsichtlich Wachstum (Großbuchstaben) oder Substratabbau (Kleinbuchstaben). Signifikanzgruppen mit einem Apostroph (') gekennzeichnet, wurden ermittelt nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$; Signifikanzgruppen ohne Apostroph (') nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$. n = vier Versuche mit jeweils sechs unabhängigen Wiederholungen.

Auf beiden pektinhaltigen Medien zeigten die Isolate 8088-2, 8088, 9390 und 9680 ein vergleichbar gutes und größeres Wachstum als die anderen Isolate bei tendenziell gleichem oder geringfügig kleinerem Substratabbau. Diese Isolate ergeben in der Abbildung 42 A und B demzufolge Werte von kleiner eins oder knapp oberhalb von eins im Falle des Isolats 9680. Das Wachstum der Schwarzfäuleisolate 9449, 9450, 9494 und 9495 war hingegen auf beiden Medien tendenziell geringer, die Substratabbauzone jedoch relativ gesehen höher, was in Abbildung 42 A und B durch Werte oberhalb von eins wiedergespiegelt wird. Deutlich, jedoch nicht in allen Fällen signifikant, unterscheidet sich das Isolat 9450 durch ein besonders großes Verhältnis von Substratabbau zu Wachstum von den anderen Isolaten.

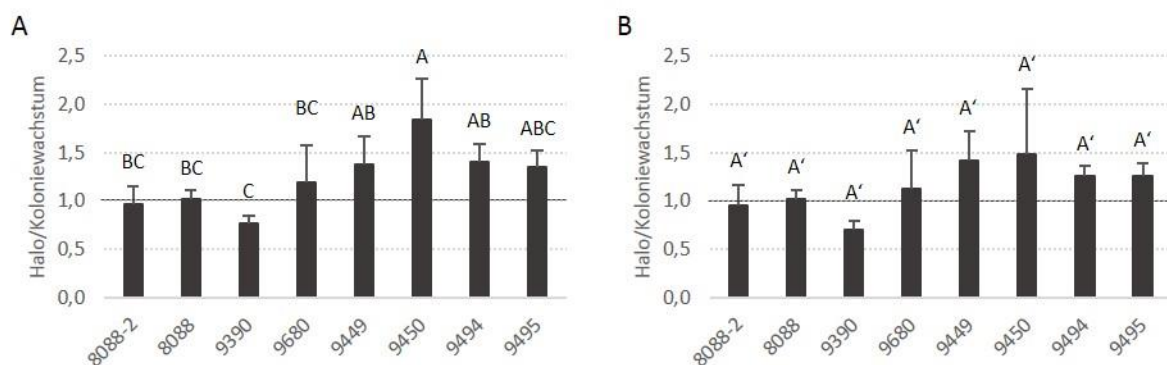


Abbildung 42. Verhältnis von Substratabbau zu Wachstum der verschiedenen Schwarzfäuleisolate auf pektinhaltigen Medien justiert auf pH 5 (A) und pH 7 (B). Signifikanzgruppen ohne Apostroph (‘) wurden ermittelt nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$, Signifikanzgruppen mit einem Apostroph (‘) gekennzeichnet nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. n = vier Versuche mit jeweils sechs unabhängigen Wiederholungen.

4.4.4.1.2 Virulenztests

Für nähere Untersuchungen bezüglich der Virulenz der Schwarzfäuleisolate wurden die Isolate 8088-2, 9494 und 9450 ausgewählt. Diese Auswahl war der Tatsache geschuldet, dass nicht mehr alle Isolate in der Lage waren, Pyknidien und die darin enthaltenen Pyknidiosporen zu bilden, die essentiell für die Infektion von Pflanzen sind. Zum anderen unterschieden sich die genannten Isolate deutlich in den Nährmedientests, vor allem bezüglich Wachstum und Substratabbau auf pektinhaltigen Medien.

Die Virulenz der drei Schwarzfäuleisolate 8088-2, 9494 und 9450 wurde anhand der anfälligen Rebsorte ‘M-Th’ und der teilresistenten Sorte ‘Solaris’ untersucht. Dies wurde in fünf Versuchen mit jeweils zehn biologisch unabhängigen Wiederholungen pro Isolat durchgeführt. Sowohl die Befallshäufigkeit als auch die Befallsstärke der zum Zeitpunkt der Inokulation zehn jüngsten Blätter wurde 21 dpi bestimmt.

Bei beiden Sorten führte das Isolat 9494 zu der höchsten Befallshäufigkeit und Befallsstärke und unterschied sich signifikant von den anderen beiden Isolaten 8088-2 und 9450, es stellt somit das virulenteste Isolat dar (Abbildung 43). Das Isolat 8088-2 wies bei beiden Sorten einen tendenziell

höheren Befall als das Isolat 9450 auf, was jedoch nur hinsichtlich der Ausprägung der Befallsstärke bei der Sorte ‘M-Th’ statistisch belegt werden konnte.

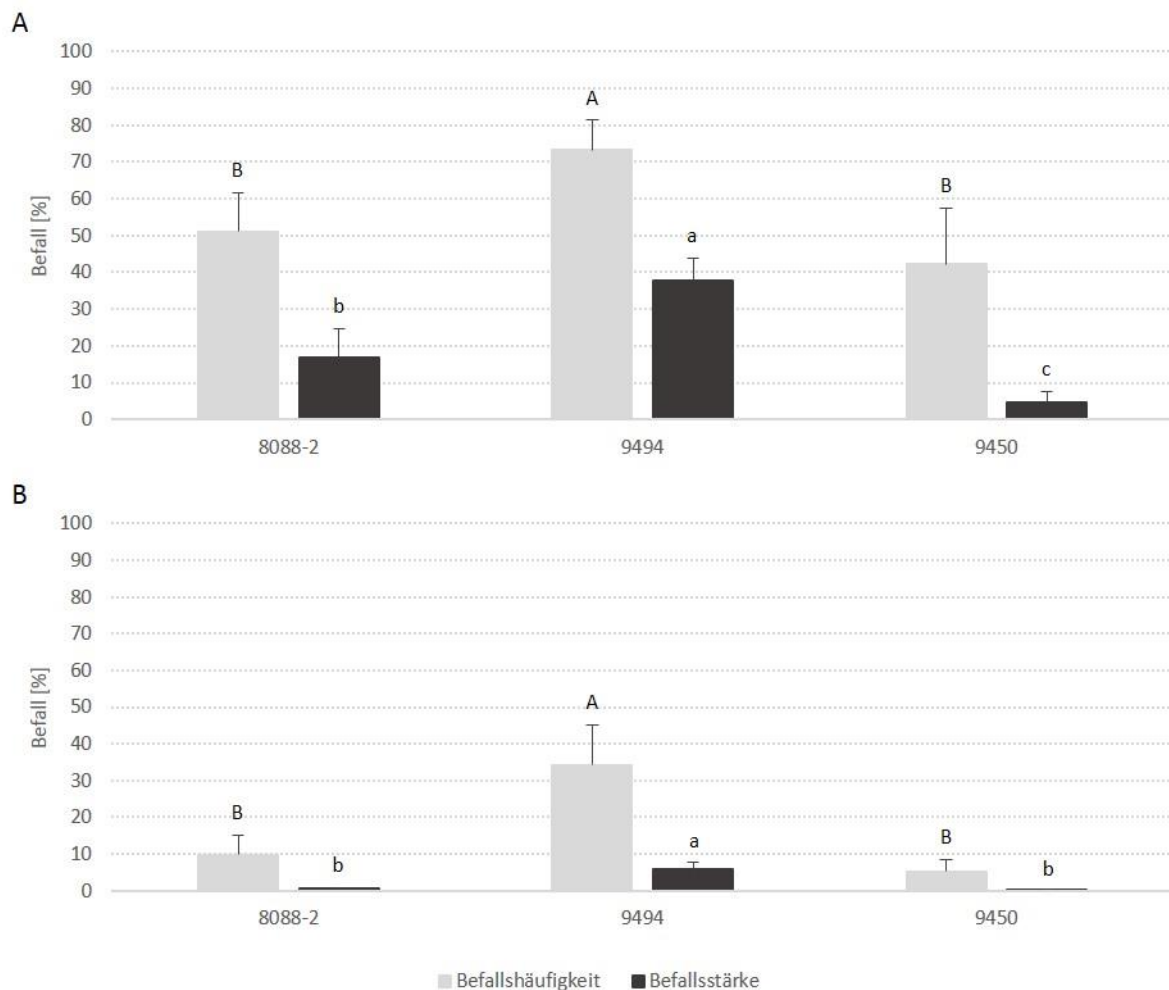


Abbildung 43. Tests auf Virulenz der Schwarzfäuleisolate 8088-2, 9494 und 9450 an den Rebsorten ‘M-Th’ (A) und ‘Solaris’ (B). Dargestellt sind die Befallshäufigkeit und Befallsstärke 21 dpi der zehn jüngsten Blätter zum Zeitpunkt der Inokulation. Signifikanzgruppen wurden bestimmt nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,5$. N = fünf Versuche mit jeweils zehn biologisch unabhängigen Wiederholungen.

4.4.4.1.3 Korrelationsanalyse hinsichtlich der Abbau- und Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen und der Virulenz

Mit den Befallsdaten zu der Sorte ‘M-Th’ und den Ergebnissen der Nährmedientests der Schwarzfäuleisolate 8088-2, 9494 und 9450 wurde eine Korrelation nach Pearson ($\alpha = 0,05$) durchgeführt (Abbildung 44). Ziel war es, den Einfluss der Abbaubarkeit und der Verwertung verschiedener in der Zellwand vorkommender Substrate wie Cellulose (CMC), Hemicellulose (Xylan) und Pektin (pH 5 und pH 7) oder auch Stärke auf die Virulenz der Isolate zu untersuchen. Die für diesen Zusammenhang wichtigen Korrelationsergebnisse wurden in Abbildung 44 durch einen roten Kasten markiert. Der Befall, in dem sich die Virulenz der Isolate spiegelt, wurde als Befallsstärke und

Befallshäufigkeit angegeben. Da nur drei Isolate für die Korrelationsanalyse zur Verfügung standen, polarisierten die Korrelationen stark und fielen daher meist sehr hoch oder sehr gering aus.

Eine hohe jedoch nicht signifikante negative Korrelation wurde zwischen der Substratabbauzone auf pektinhaltigem Medium justiert auf pH 5 und der Befallsstärke aber auch der Befallshäufigkeit gefunden. Alle anderen Ergebnisse der Nährmedientests zeigten keine oder eine nur geringe Beziehung zum Ausmaß des Schwarzfäulebefalls. Die Erwartung, dass Schwarzfäuleisolate, die Pektine besser abbauen und verwerten können als andere Isolate, virulenter sind, konnte demnach nicht bestätigt werden. Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Nährmedientests wurden nicht berücksichtigt.

Variablen	Befallsstärke	Befallshäufigkeit	Wachstum						Substratabbau					S/W	
			MM	CMC	Pektin pH5	Pektin pH7	Stärke	Xylan	CMC-S	Pektin pH5	Pektin pH7	Stärke	Xylan	pH5	pH7
Befallsstärke	1	0,995	0,402	0,297	-0,509	0,037	0,085	0,778	0,525	-0,909	0,392	0,522	0,477	-0,054	0,051
Befallshäufigkeit		1	0,490	0,390	-0,422	0,135	0,183	0,837	0,439	-0,945	0,481	0,604	0,388	-0,153	-0,047
Wachstum	CMC		1	0,994	0,670	0,965	0,977	0,831	-0,656	-0,669	0,995	0,969	-0,698	-0,970	-0,938
	MM			1	0,583	0,930	0,947	0,888	-0,568	-0,748	1,000	0,991	-0,613	-0,936	-0,894
	Pektin pH5				1	0,841	0,814	0,144	-1,000	0,103	0,592	0,468	-0,999	-0,831	-0,886
	Pektin pH7					1	0,999	0,656	-0,831	-0,451	0,934	0,871	-0,861	-1,000	-0,996
	Stärke						1	0,692	-0,803	-0,494	0,950	0,894	-0,835	-1,000	-0,991
	Xylan							1	-0,125	-0,969	0,883	0,942	-0,181	-0,669	-0,587
Substratabbau	CMC								1	-0,122	-0,577	-0,451	0,998	0,821	0,877
	Pektin pH5									1	-0,741	-0,831	-0,066	0,467	0,370
	Pektin pH7										1	0,989	-0,622	-0,940	-0,899
	Stärke											1	-0,501	-0,880	-0,825
	Xylan												1	0,852	0,902
S/W	pH5													1	0,994
	pH7														1

Abbildung 44. Korrelationsanalyse zwischen dem Schwarzfäulebefall (Befallsstärke und Befallshäufigkeit) der Sorte 'M-Th' und dem Wachstum und Substratabbau auf verschiedenen Nährmedien (MM, CMC, Pektin pH 5, Pektin pH 7, Stärke und Xylan) bzw. dem Verhältnis aus Substratabbau zu Wachstum für die pektinhaltigen Nährmedien (pH 5 und pH 7) anhand der Daten zu den Schwarzfäuleisolaten 8088-2, 9494 und 9450 nach Pearson: $\alpha = 0,05$.

4.4.4.2 Pektinanalyse

In Kooperation mit der AG Lebensmittelchemie und Phytochemie des KIT Karlsruhe (Herr Prof. Mirko Bunzel und Dr. Daniel Wefers) wurde in einem Vorversuch die Zusammensetzung der Zellwände der jeweils vierten Blätter der Genotypen 'M-Th', 'Solaris', 'Börner' und der Wildrebe K16 näher untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse der Pektine lag. Mit Hilfe der Monosaccharid- und Methylierungsanalyse konnte ein erster Überblick über den Aufbau und die physiochemischen Eigenschaften der Zellwände gewonnen werden. Die Monosaccharidanalyse wurde parallel mit zwei unterschiedlichen Hydrolysemethoden durchgeführt, der Hydrolyse mittels Schwefelsäure (Abbildung 45) und der Methanolyse (Anhang), die sich hinsichtlich der Güte der Hydrolyse der Cellulose und der Bestimmung der Uronsäuren (Galacturonsäure und Glucuronsäure) unterscheiden. Das Verhältnis der einzelnen Pektinbausteine zueinander war indes sehr ähnlich.

Die Monosaccharidanalyse ist an eine GC-MS (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) gekoppelt, die die einzelnen Komponenten auftrennt, identifiziert und quantifiziert. Da die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen häufig sehr nah beieinander liegen und sich teilweise überlappen, ist eine exakte Quantifizierung schwierig (Pettolino et al., 2012). Die Mengenangabe erfolgte daher in Prozent.

In Abbildung 45 sind die Hauptbestandteile des Pektins als Monosaccharideinheiten angegeben. Die grünen Säulen stellen die Summen der einzelnen Bausteine dar und sollen den Gesamtpektingehalt repräsentieren. Es dominierte die Galactose gefolgt von der Arabinose. Die Konzentration der Galacturonsäure, die das Rückgrat der Pektinmoleküle bildet, war bei allen Proben vergleichbar hoch und der Pektinbaustein Rhamnose wies stets die geringsten Konzentrationen auf. Im Genotypenvergleich war eine Abnahme aller hier gemessenen Pektinbestandteile von der anfälligen Sorte 'M-Th' über die Sorten 'Solaris' und 'Börner', hin zu der Wildrebe K16 zu verzeichnen.

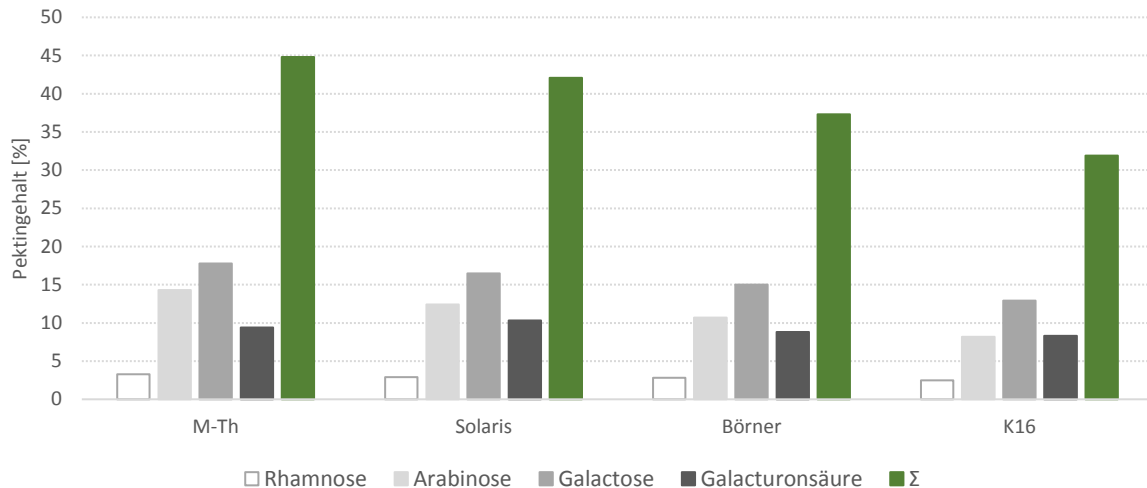


Abbildung 45. Konzentrationen der Pektinbausteine Rhamnose, Arabinose, Galactose, Galacturonsäure und ihrer Summe des viert ältesten Blattes der Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’ und K16 bestimmt anhand einer Monosaccharidanalyse basierend der Hydrolyse durch Schwefelsäure. n = eine Mischprobe aus mindestens vier Blättern.

Während die Monosaccharidanalyse Aufschluss über die einzelnen Komponenten der Zellwand gibt, erlaubt die Methylierungsanalyse Rückschlüsse auf die Feinstruktur der Polysaccharide. Für jedes Zuckermolekül kann dabei die Bindungsstelle im Polysaccharid hergeleitet werden.

In Abbildung 46 sind exemplarisch die Arabinofuranosen 1,5-Araf, 1,3,5-Araf, 1,2,5-Araf, 1,2,3,5-Araf und deren Verhältnis $(1,5\text{-Araf} / (1,3,5\text{-Araf} + 1,2,5\text{-Araf} + 1,2,3,5\text{-Araf}))$ dargestellt. Die Arabinofuranose 1,5-Araf stellt die lineare Form dar und ist ein Vorläufer für verzweigtere Formen wie beispielsweise der Arabinofuranose 1,3,5-Araf, die in einem Fließgleichgewicht zueinander stehen. Bei der Sorte ‘Börner’ und der Wildrebe K16 sind die Anteile der 1,5-Araf Arabinofuranose gegenüber den Sorten ‘M-Th’ und ‘Solaris’ deutlich reduziert und die 1,3,5-Araf Arabinofuranose scheint vor allem bei K16 erhöht zu sein. Das Verhältnis der mehr linearen Form 1,5-Araf zu den mehr verzweigten Arabinofuranosen 1,3,5-Araf, 1,2,5-Araf und 1,2,3,5-Araf war bei der Sorte ‘Solaris’ am geringsten, gefolgt von der Sorte ‘M-Th’. Bei der Sorte ‘Börner’ und vor allem der Wildrebe K16 war der Quotient höher und deutet auf eine Verschiebung zu mehr verzweigten Arabinofuranosen hin.

Die vollständigen Ergebnisse zu den Monosaccharid- und Methylierungsanalysen sind im Anhang angegeben.

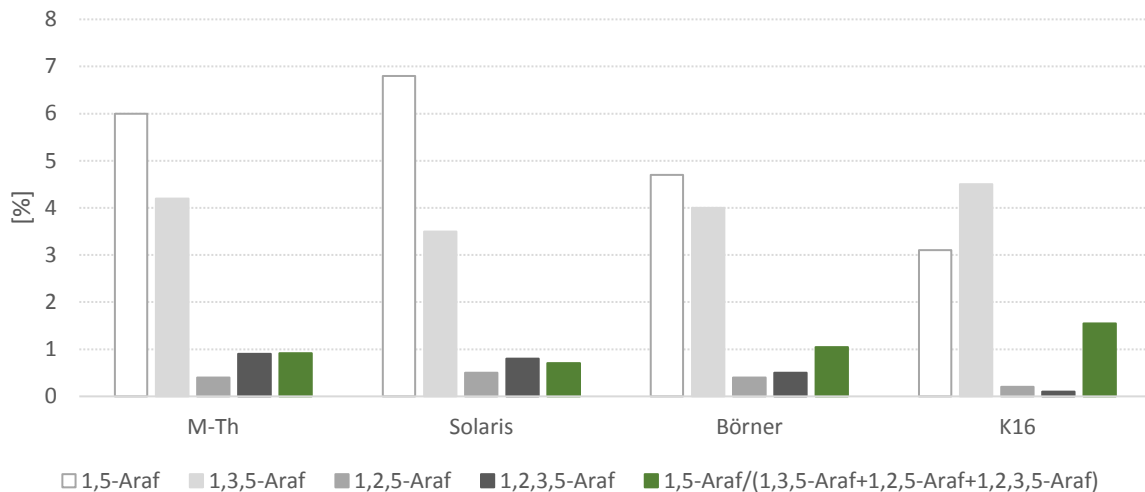


Abbildung 46. Mengen der Arabinofuranosen 1,5-Araf, 1,3,5-Araf, 1,2,5-Araf, 1,2,3,5-Araf und deren Verhältnis (1,5-Araf/ (1,3,5-Araf + 1,2,5-Araf + 1,2,3,5-Araf)) der viert ältesten Blätter der Genotypen ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’ und K16 bestimmt mittels Methylierungsanalyse. Araf = Arabinofuraose. Die Zahlen repräsentieren die Positionen an denen die jeweiligen Monomereinheiten substituiert sind. n = eine Mischprobe aus mindestens vier Blättern.

Die Hypothese konnte anhand dieses Vorversuchs nur teilweise bestätigt werden. Die resistente Sorte ‘Börner’ und die teilresistente Wildrebe K16, wiesen beide geringere Pektingehalte auf als die anfällige Sorte ‘M-Th’, nicht jedoch die teilresistente Sorte ‘Solaris’. Vor allem die Wildrebe K16 schien mehr verzweigtere und damit komplexere Arabinofuranosestrukturen aufzuweisen als die anderen Genotypen.

4.4.5 Untersuchungen zu den Hintergründen der altersbedingten Resistenz - Pflanzenwachstum und Blattlängenzunahme verschiedener Rebgenotypen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, verursacht der Erreger der Schwarzfäule, *P. ampellicida*, nur auf jungem, noch expandierendem Gewebe Symptome und ist in der Lage sich zu reproduzieren. Es besteht folglich eine altersbedingte Resistenz, die auch beim Schwarzfäulescreening der Europäischen Wildreben und einigen Vergleichssorten festzustellen war. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass diese Altersresistenz bzw. der Übergang von anfälligen zu resistenten Blättern abhängig vom Genotyp variierte, was in Abbildung 7 dargestellt, bzw. in Kapitel 4.1.3 beschrieben ist. Zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Ursachen, wurden die Rebsorten ‘M-Th’, ‘Solaris’ und ‘Börner’ und die Wildrebe K18 hinsichtlich ihres Pflanzenwachstums und der Blattentwicklung näher charakterisiert. Hierzu wurde die Längenzunahme der Reben, die Anzahl der neu zugewachsenen Blätter und die Blattgrößenzunahme der Blättertags eins bis vier (Abbildung 48 A) in 14 Tagen, mittels drei Versuchen mit jeweils sechs biologisch unabhängigen Wiederholungen, dokumentiert. Die Blattgrößenzunahme wurde über die Länge der Mittelrippe bestimmt.

Die Sorte ‘Börner’ und die Wildrebe K18 haben in 14 Tagen ein deutlich stärkeres Längenwachstum gezeigt als die Sorten ‘M-Th’ und ‘Solaris’, was jedoch nur für ‘Börner’ statistisch nachgewiesen

werden konnte (Abbildung 47 A). ‘M-Th’ und ‘Solaris’ waren sich hinsichtlich der Reblängenzunahme sehr ähnlich. Die Anzahl der in zwei Wochen neu gewachsenen Blätter lag durchschnittlich bei fünf bis sechs Blättern und ergab nur geringfügige Genotypenunterschiede (Abbildung 47 B). Die Wildrebe K18 entwickelte in dieser Zeit tendenziell die meisten Blätter, die Sorte ‘Börner’ die wenigsten.

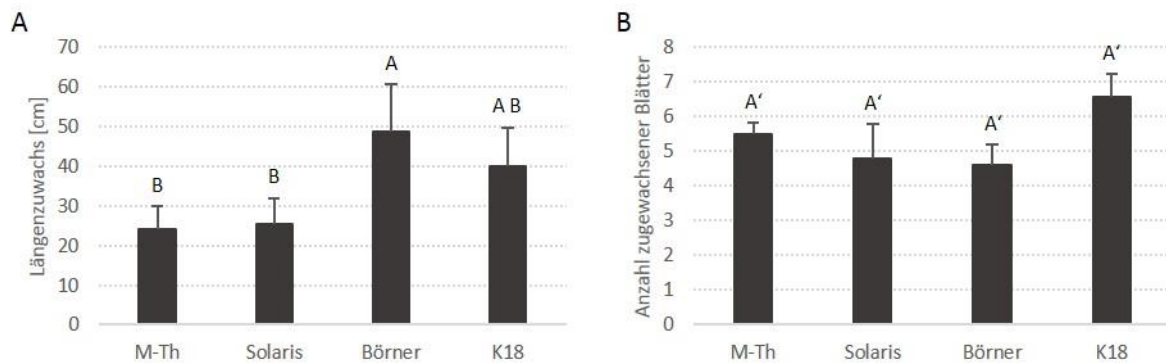


Abbildung 47. Vergleich des Längenzuwachses der Reben (A) und der Anzahl neu gebildeter Blätter (B) der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’ und der Wildrebe K18 in 14 Tagen. Signifikanzgruppen ohne Apostroph (‘) wurden ermittelt nach Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$, Signifikanzgruppen mit einem Apostroph (‘) nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$. n = drei Versuche mit jeweils sechs Reben.

Deutlichere Sortenunterschiede wurden bezüglich der Blattgrößenzunahme innerhalb von 14 Tagen beobachtet (Abbildung 48 B). Über alle Blattetagen hinweg zeigten die Blätter der Sorte ‘Solaris’, aber vor allem der Sorte ‘Börner’, die stärkste Größenzunahme. Beide Sorten, insbesondere jedoch die Sorte ‘Börner’, zeichnen sich generell durch vergleichsweise große Blätter aus. Die Wildrebe K18 wies das geringste Wachstum auf; ‘M-Th’ nahm eine intermediäre Stellung ein. Dies wird auch durch die Angabe der Signifikanzen deutlich, die Sorte ‘Börner’ unterschied sich bei den Blattetagen 1 bis 3 stets signifikant von der Sorte ‘M-Th’ und der Wildrebe K18. Allen Sorten gemein war die Tatsache, dass das Blattwachstum der jungen Blätter Blatt 1 und 2 höher war als das der älteren Blätter.

Der Fokus der Untersuchung lag jedoch auf der Dynamik der Blattgrößenzunahme vom jungen zum älteren Blatt hin. Bei der Sorte ‘M-Th’ nahm das Wachstum der Blätter von Blatt 1 zu Blatt 4 hin nur geringfügig ab, statistisch gesehen unterschied sich das Wachstum der Blattetagen nicht voneinander. Blatt 4 zeigte folglich ein verhältnismäßig hohes Wachstum, ähnlich wie das der jüngeren Blätter. Eine vergleichbare Wachstumsdynamik war auch bei den Rebsorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ für die Blattetagen 1 bis 3 zu erkennen, nur die vierte Blattetage war bereits deutlich in ihrem Wachstum reduziert. Bei der Wildrebe K18 nahm das Blattwachstum von den jungen zu den älteren Blättern am stärksten ab, was auch statistisch belegt werden konnte (Abbildung 48 B). Blatt 4 zeigte folglich ein im Vergleich zu Blatt 1 deutlich reduziertes Wachstum.

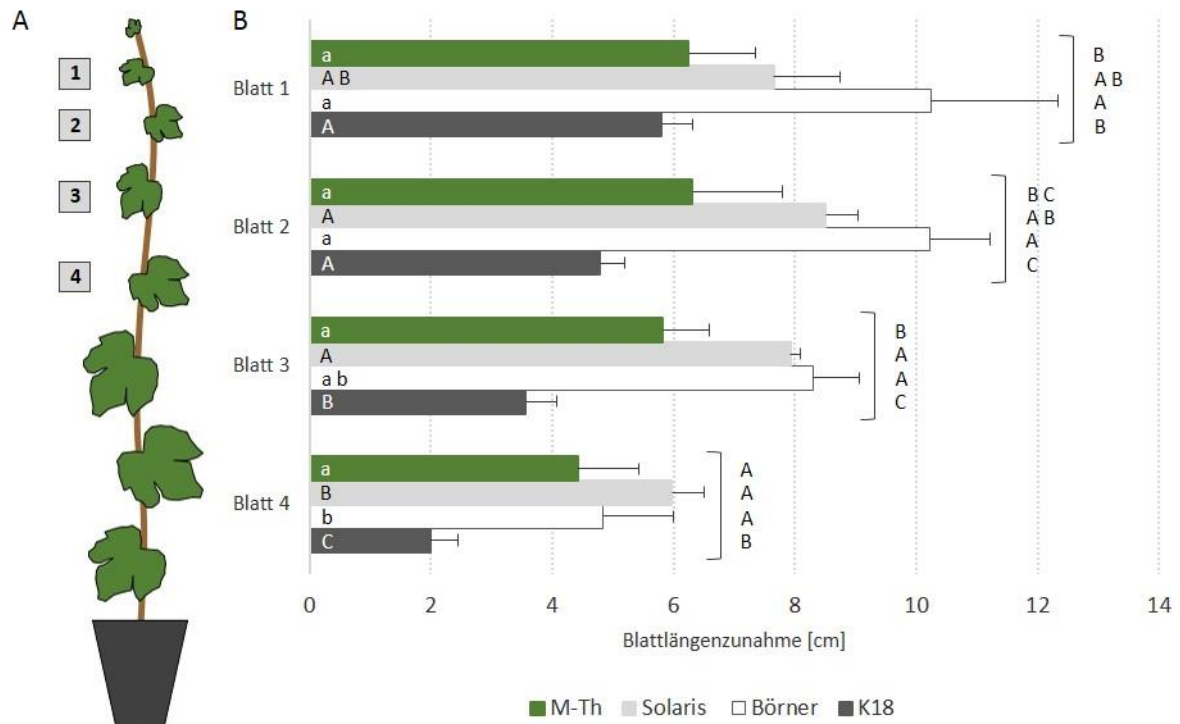


Abbildung 48. Vergleich der Blattlängenzunahme (**B**) der Sorten ‘M-Th’, ‘Solaris’, ‘Börner’ und der Wildrebe K18 in 14 Tagen. Zur Ermittlung der Blattlängenzunahme wurde die Mittelrippe der Blättertage 1 bis 4, festgelegt und markiert zu Versuchsbeginn (**A**), gemessen. Die Signifikanzgruppen in den Balken (Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$) geben Unterschiede innerhalb der Genotypen zwischen den Blättertagen an, Signifikanzgruppen an den Klammern (Tukey (HSD): $\alpha = 0,05$) verweisen auf Genotypenunterschiede innerhalb einer Blättertage. n = drei Versuche mit jeweils sechs Reben.

5 Diskussion

5.1 Biologie und Ernährungsweise von *P. ampellicida*

Der asexuelle Infektionszyklus, dient in niederschlagsreichen Frühjahren und -sommern der epidemischen Ausbreitung der Schwarzfäule und muss zum Schutz der Trauben bekämpft bzw. unterbunden werden. Ein detailliertes Wissen zur Biologie des Erregers kann dabei helfen Schwachstellen bzw. Angriffsstelle für biologische Pflanzenschutzmittel und Fungizide zu finden. Darüber hinaus können beobachtete Abwehrmechanismen oder Expressionsprofile der Weinrebe den entsprechenden Entwicklungsstadien des Pathogens zugeordnet und angemessen diskutiert werden.

Die frühen Entwicklungsstadien, von der Anheftung der Pyknidiospore, über die Appressorienbildung bis hin zur Etablierung von Hyphen in der Pflanze, wurden in den 90er Jahren bereits eingehend von der Forschungsgruppe um Kuo und Hoch (Shaw et al., 1998, Kuo & Hoch, 1996a, Kuo & Hoch, 1996b) untersucht und ihre Beobachtungen und Erkenntnisse stimmen mit den hier gewonnenen Ergebnissen weitestgehend überein.

Die von Kuo und Hoch (1996a) aber auch von Sivanesan und Holliday (1981) beschriebenen Appendizes der Pyknidiosporen am apikalen Ende konnten in diesen Untersuchungen jedoch weder mittels Rasterelektronenmikroskopie noch mit Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Auch Ullrich et al. (2009) konnten bei ihren mikroskopischen Studien keine Appendizes beobachten. Das Vorhandensein bzw. die Ausbildung dieses Appendix könnte daher möglicherweise isolatspezifisch sein, wie es diesbezüglich auch artspezifische Unterschiede innerhalb der Gattung *Phyllosticta* gibt (Wikee et al., 2013). Da das hier verwendete Isolat zu Infektionen mit typischen Symptomen führte, scheint dieser Anhang nicht essentiell für die erfolgreiche Infektion von Reben zu sein.

Die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen zeigten häufig ein bis zwei weißliche, hell leuchtende, transversale Unterteilungen der dunklen Appressorien, die an Septen erinnern. Von Septierungen innerhalb der Appressorien wurde bisher nicht berichtet, weder bei *P. ampellicida*, noch bei anderen *Phyllosticta*-Arten (Wikee et al., 2013). Einzig das Septum zwischen Pyknidiospore und Appressorium, das drei der vier Kerne im Appressorium einschließt, wurde beschrieben (Shaw et al., 1998). Verschiedene mikroskopische Untersuchungen (Fluoreszenzmikroskopie, Nomarski DIC) anhand von Dünnschnitten der Appressorien des Erregers wiesen ebenfalls nicht auf Septen hin (Shaw et al., 1998). Der Fluoreszenzfarbstoff Anilinblau bindet in erster Linie an β -1,3-Glukane. Die Septen der meisten Pilze bestehen jedoch zu großen Teilen aus Chitin (Carlile et al., 2001), auch wenn teilweise Glukane am Bildungsprozess der Septen beteiligt sind (Muñoz et al., 2013). Bei dem Oomyceten *P. viticola* konnte enzymatisch sogar nachgewiesen werden, dass die Septen in erster Linie aus Glukanen bestehen (Kortekamp, 2005). Die β -1,3-Glukane gehören neben Chitin zu den Hauptstrukturelementen der pilzlichen Zellwand und verleihen ihr Festigkeit (Klis et al., 2006, Roncero, 2002). Glukanreiche Septen

innerhalb der Appressorien könnten daher den Appressorien zu mehr Stabilität verhelfen, die für den Penetrationsprozess erforderlich ist.

Die Penetration der pflanzlichen Kutikula unterhalb des Appressoriums durch die Penetrationshyphen wurde bisher weder mittels mikroskopischer Aufnahmen dargestellt, noch deren zeitliches Auftreten bestimmt. Mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen wurde in dieser Arbeit der Zeitpunkt der erfolgten Penetration auf etwa 24 h nach Inokulation datiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden sowohl mittels Rasterelektronenmikroskopie Penetrationslöcher beobachtet, als auch bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen dunkle punktförmige Flecken unterhalb der Appressorien festgestellt, die auf die Ausbildung einer Penetrationshyphen hinweisen. Die zeitliche Einordnung steht in Einklang mit den Ergebnissen von Shaw et al. (1998), die eine Penetrationshyphen der Schwarzfäule auf einem künstlichen Polykarbonatsubstrat ebenfalls 24 Stunden nach Anheftung der Pyknidiospore nachweisen konnten. Die darauffolgenden ersten Hyphen, deren Spitzen gerade so seitlich der Appressorien hervortraten, waren ca. 32 hpi sichtbar und schränkten den Penetrationszeitpunkt ebenfalls ein.

Die Hyphen wuchsen im weiteren Verlauf ausschließlich auf den antiklinalen Zellwänden zwischen der Epidermis und der Kutikula, einem für die Schwarzfäule an Weinreben charakteristischem und einzigartigem Wachstum, das in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde (Kuo & Hoch, 1996b, Ullrich et al., 2009, Galet, 1977). Etwa zehn bis zwölf Tage nach Inokulation wurde ein verändertes Hyphenwachstum festgestellt. Die Hyphenspitzen verdickten und lappten sich und gingen anschließend in ein dreidimensionales Wachstum über. Der modifizierte Infektionsversuch (Kapitel 4.2.4), bei dem die Blattunterseite inokuliert wurde und sich in Folge Symptome mit Pyknidien auf der Blattoberseite bildeten, zeigte eindrücklich, dass der Erreger in der Lage ist, in dieser Phase das Blatt zu durchdringen und somit alle Zellschichten zu kolonisieren. Während dieser Entwicklungsphase war auch ein Kollabieren der pflanzlichen Zellen im Koloniebereich wahrzunehmen und verweist auf eine nun nekrotrophe Lebensphase von *P. ampellicida*. Der in dieser Arbeit erstmalig dokumentierte Übergang vom zweidimensionalen subkutikulären Hyphenwachstum zum dreidimensionalen Wachstum der Hyphen scheint somit auch der Übergang von der biotrophen oder wie von Luttrell (1974) als endophytisch bezeichneten Lebensphase in die Nekrotrophie zu sein.

Zu den typischen Symptomen der Schwarzfäule gehört neben den Nekrosen auch das Auftreten von dunklen Pyknidien. Die mikroskopischen Bilder zeigen, dass diese aus sich zusammenlagernden Hyphen im dreidimensionalen Wachstumsbereich des Myzels unterhalb der Kutikula entstehen. Diese Beobachtung wird durch das Muster bzw. der Anordnung der Pyknidien in den Symptomflecken gestützt, die charakteristischerweise kreisförmig im Randbereich, dem Ort des anfänglich dreidimensionalen Myzelwachstums und nur vereinzelt auch in der Mitte auftreten. Für eine erfolgreiche Vermehrung von *P. ampellicida*, ist den Ergebnissen zufolge der Übergang in die nekrotrophe Phase essentiell.

Die anfängliche Kolonisierung des Wirtsgewebes erfolgte über Hyphen, die ausschließlich auf den antiklinalen Zellwänden in der subkutikulären Region der Epidermiszellen wachsen und ein dichtes

zweidimensionales Myzel bilden. Unter Berücksichtigung der verhältnismäßig langen Zeit, von minimal zehn bis elf Tagen, die der Pilz in dieser Phase verbringt, scheint dieses Wachstum einzigartig für den Erreger der Schwarzfäule an Reben zu sein (Kuo & Hoch, 1996b). Bei *Colletotrichum*-Arten wurde in Abhängigkeit von Wirt und Gewebe eine subkutikuläre intramurale Nekrotrophie als Infektionsstrategie beschrieben, die biotrophe Phase ist bei dieser Strategie allerdings kaum vorhanden (Perfect et al., 1999) und hat eine schnelle, direkte Penetration der Epidermiszellen zur Folge (Curry et al., 2002, Diéguez-Uribeondo et al., 2005). Andere Pilze, wie die Schorferreger an Apfel (*Venturia inaequalis*) und Birne (*Venturia nashicola*) bilden ebenfalls ein subkutikuläres Myzel, auch Stroma genannt, dass jedoch nicht zwingend auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermis wächst (Sivanesan et al., 1974, Park et al., 2000, Jiang et al., 2007).

Der Grund für das charakteristische Hyphenwachstum von *P. ampellicida* ist nach wie vor ungeklärt und unbekannt. Sowohl Kuo und Hoch (1996b) als auch (Ullrich et al., 2009) vermuteten, dass das Hyphenwachstum mit der Nahrungsaufnahme des Pilzes in Verbindung steht, da *P. ampellicida* weder Haustorien, die typischen Ernährungsorgane biotropher Pilze, bildet, noch die angrenzenden Zellen direkt penetriert oder zerstört. Kuo und Hoch (1996b) diskutierten ein erhöhtes Aufkommen spezieller chemischer Komponenten, wie beispielsweise Pektin als Grund für die Präferenz des antiklinalen Bereichs, während Ullrich et al. (2009) annahmen, dass Assimilationsprodukte wie Zucker und Aminosäuren das Hyphenwachstum leiten. Bei *Venturia inaequalis* wird die Abgabe zellwanddegradierender Enzyme zum Aufschluss der Zellwand vermutet, da ebenfalls keine Haustorienbildung vorliegt (Jha et al., 2009).

Die Untersuchungen zur Ernährungsweise von *P. ampellicida* zeigten, dass basierend auf Plattentests, der Pilz in der Lage ist, alle grundlegenden Zellwandkomponenten, wie Cellulose, Hemicellulose und Pektin, abzubauen. Auch wenn der Nachweis des Substratabbaus nur auf Nährmedium erfolgte, ist anzunehmen, dass *P. ampellicida* auch fähig ist, die entsprechenden Enzyme in der Pflanze zu bilden und zu sekretieren. Die lateralen Hyphenverzweigungen, die etwa 8 dpi im Zentrum des Myzels auftreten, dienen möglicherweise als Oberflächenvergrößerung des Hyphennetzwerks und damit einer besseren Nährstoffaufnahme. Auch die Vermeidungsstrategie der Hyphen, die zu den vielen kleinen Lücken zwischen den Hyphenspitzen oder Hyphenspitzen und Hyphenseiten führte und bereits häufiger bei vegetativen Hyphen beobachtet wurde (Carlile et al., 2001), dient vermutlich zur besseren Ausnutzung der vorhandenen Nahrungsressourcen.

Die Untersuchungen ergaben, dass Pektin die für das pilzliche Wachstum wichtigste Zellwandkomponente darstellt. Durch die Justierung des Mediums auf unterschiedliche pH-Werte (pH 5 und pH 7) wurde in Anlehnung an Hankin und Anagnostakis (1975) das Vorhandensein und die Aktivität zweier pektinolytischer Enzymgruppen getestet, die unterschiedliche pH-Optima besitzen. Beide Medien zeigten ein ähnliches Ergebnis. Demnach ist die Schwarzfäule wahrscheinlich fähig, sowohl Polygalacturonasen, als auch Pektatlyasen zu bilden, Enzyme die jeweils zu einer der beiden

Hauptgruppen pektindegradierender Enzyme gehören, jedoch nur einen kleinen Ausschnitt der Pektin abbauenden Enzyme darstellen (van den Brink & de Vries, 2011).

Da Pektin vor allem in den Mittellamellen zu finden ist (Taiz & Zeiger, 2002), wäre dies ein Erklärungsansatz für die Präferenz des antiklinalen Epidermisbereichs. Die hohe Sekretion von Cellulasen und Hemicellulasen, was die vergleichsweise großen Abbauzonen auf den entsprechenden Nährmedien belegten, erlaubt möglicherweise einen besseren Zugang zu Pektin, das eng verwoben mit Hemicellulose, Cellulose und Proteinen auch einen Bestandteil der primären Zellwand darstellt (Taiz & Zeiger, 2002).

Jha et al. (2009) vermuten eine kontrollierte Abgabe zellwanddegradierender Enzyme des Apfelschorferregers während der subkutikulären Wachstumsphase, um die Induktion der Wirtsabwehr zu vermeiden. Eine ähnliche Strategie ist auch bei der Schwarzfäule zu vermuten. Rasterelektronenmikroskopische Bilder zeigten, dass die Hyphen von *P. ampellicida* die Kutikula deutlich anheben und lassen daher den Rückschluss zu, dass sie zum Großteil auf und nicht in der Zellwand wachsen. Auch eine offensichtliche Schädigung des Wirtsgewebes war mit den hier eingesetzten mikroskopischen Methoden nicht zu erkennen. Es ist denkbar, dass eine solche Wachstums- aber auch Ernährungsweise die Freisetzung endogener Elicitoren vermeidet oder verzögert und der Pilz sich längere Zeit unerkannt im subkutikulären Raum etablieren kann.

In Bezug auf die Praxis bedeutet die sehr kurze Entwicklungsphase des Pilzes auf der Reboberfläche ein nur kleines Zeitfenster für den erfolgreichen Einsatz von Kontaktmitteln, zu denen auch die ökologischen Pflanzenschutzmittel wie Kupfer oder Schwefel gehören. Durch das lange Hyphenwachstum unterhalb der Kutikula könnten auch translaminar wirkende Pflanzenschutzmittel eine kurative Wirkung zeigen, wie von Molitor et al. (2011) deutlich am Beispiel des Strobilurins Pyraclostrobin bewiesen wurde. Strobilurine werden zwar vom Pflanzengewebe aufgenommen, ihre Verteilung ist jedoch meist stark eingeschränkt (Bartlett et al., 2002). Darüber hinaus stehen sie nur dem konventionellen Anbau zur Verfügung. Daher liegt der Fokus vermehrt auf der Identifikation von Resistenzen und Resistenzquellen zur Züchtung schwarzfäule-resistenter Rebsorten als Alternative für den ökologischen Weinbau.

5.2 Pektingehalt/-komplexität als Resistenzfaktor?

Das Vermögen Pektine zu degradieren, aber vor allem das gute und schwarzfäuletypische Wachstum von *P. ampellicida* auf pektinhaltigen Nährmedien, lässt den Zellwandbaustein Pektin zu einem potentiellen Schlüsselmolekül in der Entwicklung des Erregers avancieren. Dies lässt die Frage aufkommen, ob veränderte Pektingehalte und/oder Bindungsformen bzw. die Komplexität der Pektine möglicherweise auch die Anfälligkeit verschiedener Genotypen oder unterschiedlich alter Pflanzenorgane beeinflusst. Die beobachtete eingeschränkte Hyphenentwicklung und Penetration auf resistenten und alten Blättern könnte demnach nicht nur auf einer direkten Hemmung seitens der Pflanze durch Abwehrmechanismen beruhen, sondern auch durch eine schlechte Nährstoffversorgung bedingt

sein, wie von Jeun und Hwang (1991) beschrieben. Sie untersuchten die Altersresistenz von Pfefferpflanzen gegenüber *Phytophthora capsici* und vermuteten, dass die Ausprägung dieser Resistenz morphologischen und ernährungsphysiologischen Veränderungen des Gewebes unterliegt, die auf einer Abnahme von Makronährstoffen wie Stickstoff, Phosphor und Calcium mit zunehmendem Alter der Pflanzen beruht. Auch Simon et al. (2014) vermuten eine Änderung des metabolischen Profils als Ursache für die ontogenetische Resistenz an Rettichwurzeln gegenüber *Rhizoctonia solani*.

Um zu untersuchen, ob vor allem die Altersresistenz, aber auch die genotypbedingte Resistenz junger Pflanzenteile durch eine suboptimale Nährstoffversorgung begründet wird, wurden zwei Untersuchungsansätze verfolgt. In einem indirekten Versuchsansatz wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Virulenz verschiedener Schwarzfäuleisolate und deren Vermögen, Kohlenstoffquellen abzubauen und/oder zu verwerten, durchgeführt. In vielen Pathosystemen scheinen pektindegredierende Enzyme wie Endopolygalacturonasen und Pectatlyasen eine Rolle in der Virulenz der Erreger zu spielen (Rogers et al., 2000, García-Maceira et al., 2001). In einem weiteren Ansatz wurde die Monosaccharidzusammensetzung der Zellwände verschiedener Genotypen näher untersucht und zu deren Resistenzniveau in Beziehung gesetzt.

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse konnten keine klaren Zusammenhänge ermittelt werden. Schwarzfäuleisolate die Zellwandkomponenten, speziell Pektin, gut abbauen und verwerten können, führen demnach nicht zwangsläufig zu einem höheren Befall. Einzig der Substratabbau auf pektinhaltigem Medium, justiert auf pH 5, korrelierte leicht negativ mit dem Schwarzfäulebefall, ist kausal jedoch nicht zu erklären.

Allerdings ist zu vermerken, dass die Korrelation nur auf Ergebnissen von drei Isolaten beruht, was aus statistischer Sicht eine geringe Datengrundlage darstellt und eine repräsentative Aussage erschwert. Zusätzlich wurden anhand der Nährmedientests nur die Hauptkomponenten der Zellwände untersucht, andere Substanzen wie Aminosäuren, Makro- oder Mikronährstoffe wurden nicht berücksichtigt. Am Beispiel des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) konnte jedoch gezeigt werden, dass vor allem die Aminosäure Thiamin das Wachstum des Pilzes in Flüssigkultur stark stimulierte (Fothergill & Ashcroft, 1955a). Auch synergistische Effekte wären denkbar, die hier unbeachtet blieben. Fothergill und Ashcroft (1955b) berichteten beispielsweise, dass ein ausgewogenes Verhältnis sowohl aus Mikronährstoffe als auch Kohlenstoff- und Stickstoffquellen erforderlich ist, um ein gutes Wachstum von *Venturia inaequalis* zu gewährleisten. Beispielsweise könnte die Schwarzfäule auf eine hohe Produktion von cellulose- und hemicelluloseabbauenden Enzymen angewiesen sein, die möglicherweise einen besseren Zugang zu den Pektinen erlauben.

Zudem sind die Nährmedientests sehr artifiziell und für jedes Substrat wurde nur eine Art bzw. Quelle verwendet. Pektin kann beispielsweise aus Apfel, Citrus oder Rüben gewonnen werden und unterschiedlich stark verestert sein, was Auswirkungen auf den Brennwert (Kienzle et al., 2001) und möglicherweise auch auf die Verwertbarkeit hat. Die Nährmedientests geben somit nur einen

ungefähren Einblick in das Potential von *P. ampellicida* Kohlenstoffquellen abzubauen und zu verwerten.

Ein weiterer Untersuchungsansatz bestand in der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Zellwände von Blättern verschiedener Rebgenotypen mit Schwerpunkt auf der Pektinanalyse, die in Kooperation mit dem KIT Karlsruhe (Prof. Bunzel und Dr. Wefers, Institut für angewandte Biowissenschaften) erfolgte. Die Monosaccharidanalyse ergab eine Abnahme fast aller Pektinkomponenten von der anfälligen Sorte 'M-Th' über die Sorten 'Solaris' und 'Börner', hin zu der Wildrebe K16. Ergänzend zur Monosaccharidanalyse wurde eine Methylierungsanalyse durchgeführt, die Aufschluss darüber gibt in welchen glykosidischen Bindungsverhältnissen die einzelnen Monosaccharide involviert sind. Am Beispiel der Arabinofuranosen sieht man, dass die 1,5-Arabinofuranose, welche linearen Charakter besitzt und das Rückgrat der Pektine bildet, von der anfälligen Sorte 'M-Th' über die Sorten 'Solaris' und 'Börner', hin zu der Wildrebe K16 abnahm, während die verzweigteren Arabinofuranosen (1,3,5-, 1,2,5-, 1,2,3,5-Arabinofuranosen) nur geringfügige Unterschiede aufwiesen. Vor allem in der Wildrebe K16, aber auch der Sorte 'Börner' dominieren demnach im Verhältnis die verzweigteren Arabinofuranosen, die vermutlich schwieriger durch phytopathogene Pilze abzubauen sind.

Vor allem die geringeren Pektingehalte als auch die komplexere Pektinstruktur im Vergleich zu anfälligen Sorten könnten zu einer schlechteren Versorgung der Hyphen führen und die beobachtete reduzierte Myzelentwicklung auf der teilresistenten Wildrebe K16 und der resistenten Sorte 'Börner' erklären. Für eine Festigung dieser vorläufigen Ergebnisse, sind jedoch weitere Untersuchungen mit einer größeren Zahl biologischer Wiederholungen und einem erweiterten Genotypenspektrum erforderlich.

Zellwände von Pflanzen unterliegen während ihrer Entwicklung dynamischen Prozessen, bei denen vor allem der Zellwandbaustein Pektin eine regulatorische Rolle spielt (Palin & Geitmann, 2012). Studien an Bohnenhülsen zeigten, dass in jungem Gewebe ein hohes Level an Pektinasen gemessen wurde (Stolle-Smits et al., 1999), was vermuten lässt, dass neben der Neusynthese und im Zuge des Umbaus von Pektinen auch ein Abbau stattfindet. Es wäre denkbar, dass Pilze von den Um- und Abbauprozessen in jungem Gewebe profitieren, da Pektine dadurch möglicherweise leichter zu degradieren oder zugänglicher sind.

Dem Kation Ca^{2+} kommt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellwand und Mittellamelle pflanzlicher Zellen zu, da es neben Mg^{2+} die Carboxylgruppen der Pektine miteinander verknüpft und somit große Pektinnetzwerke ermöglicht, die jedoch relativ reversibel sind (Taiz & Zeiger, 2002). Die Menge an freiem Ca^{2+} könnte daher möglicherweise die Pektinzusammensetzung oder Umbau bzw. Abbauprozesse der Pektine widerspiegeln und somit Einfluss auf das pilzliche Wachstum ausüben. Bei dem Oomyceten *Saprolegnia ferax*, ein Fischpathogen, wird Calcium eine große Bedeutung in der Induktion der Verzweigung beigemessen (Grinberg & Heath, 1997). Die Hyphenverzweigung dient dem

Pilz in erster Linie als Oberflächenvergrößerung der Kolonie. Die Zellen an der Hyphenspitze sind in der Regel für die Nährstoffaufnahme verantwortlich (Harris, 2008). Durch die Verzweigung werden mehr Hyphenspitzen generiert, die somit eine optimale Nährstoffversorgung des immer größer werdenden Myzels gewährleisten (Harris, 2008). Shaw und Hoch (2000) zeigten darüber hinaus, dass Calcium-Ionen (Ca^{2+}) auch bei *P. ampellicida* eine Signalfunktion haben und in die Keimung und Appressorienbildung involviert sind.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Hyphenverzweigung von *P. ampellicida* auf alten Blättern stark reduziert war. Pektine in Zellwänden ausgewachsener Blätter, die kein Wachstum und keine Elongation mehr erfahren, sind unter Umständen stärker in die umgebende Matrix, bestehend aus Cellulose und Hemicellulose, eingebunden und dadurch schwieriger für *P. ampellicida* zu erreichen oder aufzuschließen. Ein entsprechender Calciumspiegel könnte möglicherweise als Signalgeber Hyphenwachstum und -verzweigung hemmen. An dieser Stelle kann jedoch nur spekuliert werden, da nur wenige Studien zu den Monosaccharidgehalten und deren Bindungseigenschaften in unterschiedlich alten Pflanzenorganen vorliegen, speziell zur Weinrebe gibt es bisher keine Erkenntnisse. Auch Zusammenhänge zur Anfälligkeit bzw. Resistenz wurden kaum beschrieben. Daher sollten in zukünftigen Analysen auch unterschiedlich alte Blätter integriert werden, um genauere Aussagen hinsichtlich der altersbedingten Resistenz treffen zu können, die auch in der Resistenz der Europäischen Wildreben eine Rolle spielt.

5.3 Mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der Schwarzfäule

Neben der anfälligen Kulturrebsorte 'M-Th' wurden die Sorten 'Solaris' und 'Börner' als Vergleichsrebsorten herangezogen, welche Erbgut amerikanischer Wildreben beinhalten. Diese amerikanischen Wildreben haben eine lange Coevolution mit unterschiedlichen Pilzkrankheiten wie dem Echten und Falschen Mehltau, aber auch der Schwarzfäule durchschritten, aus der verschiedene Resistenzmechanismen hervorgegangen sind.

Aufbauend auf einer Basalresistenz bzw. genauer der PTI (pathogen-associated molecular pattern triggered immunity) sind erfolgreiche Pathogene gezwungen, komplexere Virulenzfaktoren, sogenannte Effektoren zu bilden, die die Abwehr der Wirtszelle zu unterdrücken versuchen (Jones & Dangl, 2006). In diesem Zusammenhang sind auch die Ernährungsorgane vieler biotropher Pathogene, die Haustorien, zu nennen. Diese werden in intakte Wirtszellen eingestülpt, manipulieren sie mit Hilfe von Effektoren und gehen mit ihr eine dauerhafte Interaktion ein (Hückelhoven, 2007). Als Antwort hat der Wirt seinerseits Rezeptoren entwickelt, die diese Effektoren erkennen und eine schneller einsetzende und stärkere Abwehr auslösen (Dangl & Jones, 2001). Dabei kommt es häufig auch zu einer hypersensitiven Reaktion (HR), die als Indikator für die Existenz der sogenannten effector-triggered immunity (ETI, Jones & Dangl, 2006) gilt. Auch Amerikanische Wildreben reagieren auf Infektionen mit dem Echten und Flaschen Mehltau teilweise mit hypersensitiven Reaktionen (Feechan et al., 2011, Kortekamp & Zyprian, 2003), die auf eine coevolutionär erworbene ETI verweisen. Der gezielte Zelltod der

entsprechenden Wirtszelle entzieht dem Pathogen dabei die Nahrungsgrundlage und stoppt sein Wachstum. Bei den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ wurden nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule nur leichte Verbräunungen im Durchlicht beobachtet (Kapitel 4.4.1.1), jedoch kein Absterben ganzer Zellen. Eine ETI ist daher weitestgehend auszuschließen, auch wenn die evolutionären Hintergründe der Elternteile auf eine ETI schließen lassen würden. Da die Schwarzfäule im Gegensatz zu den meisten biotrophen Pathogenen in ihrer biotrophen Phase keine Haustorien bildet oder die Zellen direkt penetriert, wäre der Zelltod einzelner Zellen darüber hinaus nur wenig effektiv. Möglicherweise beruht die Resistenz von ‘Solaris’ und ‘Börner’ auf stärkeren und früher einsetzenden Abwehrmechanismen, die der PTI oder einer schwachen ETI ohne HR zugeordnet werden können.

Zum besseren Verständnis der Abwehr von *P. ampellicida* wurden grundlegende Entwicklungsschritte auf unterschiedlich resistenten Genotypen verglichen. Die oberflächlichen Entwicklungsstadien wie Pyknidiosporenanheftung und Appressorienbildung waren auf allen Genotypen, ungeachtet ihres Resistenzgrades, nahezu gleich, wie auch bei zahlreichen anderen Pathosystemen, wie *Pyrus* sp. – *Venturia nashicola* (Jiang et al., 2014, Park et al., 2000), *Malus* – *Venturia inaequalis* (Ortega et al., 1998) oder *Oenothera biennis* – *Erysiphe polygoni* (Dickey & Levy, 1979) beobachtet wurde. Genotypenunterschiede waren vor allem bei der Hyphenbildung zu beobachten. Auf den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ waren weniger Appressorien in der Lage, Hyphen im Wirtsgewebe zu etablieren. Bereits Qiu et al. (2015) beschrieben die Penetrationsresistenz als eine von zwei Hauptstrategien zur Verhinderung der Invasion biotropher Pathogene, wie sie beispielsweise bei amerikanischen Wildreben nach einer Inokulation mit dem Echten Mehltau vorkommt (Qiu et al., 2015, Feechan et al., 2011). Darüber hinaus war die Hyphenentwicklung bei den beiden Sorten beeinträchtigt. Die Hyphen waren kürzer und weniger stark verzweigt. Auch Ortega et al. (1998) zeigten, dass die Konidien von *Venturia inaequalis* ungeachtet der Wirtsresistenz keimten, die Entwicklung der primären Hyphe jedoch verzögert und die der stromaformenden Hyphen unterdrückt waren. Ähnlich verhielt sich *Venturia nashicola* auf resistenten und Nichtwirts-Pflanzen. Es wurden weniger Hyphen als in anfälligen Sorten gefunden (Jiang et al., 2007), teilweise waren die Hyphen auch modifiziert (Park et al., 2000).

Da die Penetration aber vor allem die Hyphenentwicklung auf den (teil-)resistenten Sorten eingeschränkt war, lag der Fokus der Untersuchungen vorrangig auf zellwandassoziierten und den Apoplasten betreffenden Abwehrmechanismen, die darüber hinaus eine wichtige Rolle in der basalen Abwehr spielen (Hückelhoven, 2007).

5.3.1 Frühe Abwehrreaktionen

Frühe Reaktionen, wie der Ionen-Flux, der beispielsweise zu einer Alkalisierung des Apoplasten führen kann, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid oder Superoxidanionen, oder die Proteinphosphorylierung sind an der Signalweiterleitung beteiligt, können teilweise aber auch einen direkten Einfluss auf Pathogene haben (Mishra et al., 2012, Hückelhoven, 2007)

Nach der Mischfärbung mit Ethacridinlactat-Acridinorange wurde eine gelb-grüne Fluoreszenz unterhalb der Appressorien, also am Ort der Penetration, beobachtet, die hinsichtlich Farbe, Ausmaß und Form den von Müller et al. (2014) beschriebenen Reaktionen nach *P. viticola*-Infektion sehr ähnlich waren. Methodische Untersuchungen wiesen auf eine Alkalisierung des Apoplasten als Ursache der Färbung hin (Müller, 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass Acridinorangefärbungen pH-abhängig sind (Kronvall & Myhre, 1977, Wilson et al., 1978). Auch die frühe Detektion der von Müller (2014) beobachteten Reaktionen drei Stunden nach Inokulation mit *P. viticola*, spricht für einen pH-Anstieg des Apoplasten. Nach Schwarzfäuleinokulation wurden jedoch unabhängig vom Genotyp die meisten Reaktionen 72 hpi detektiert, 48 h nach der vermeintlichen Penetration der Pflanze durch den Pilz, einem vergleichsweise späten Zeitpunkt. Felle et al. (2004) beobachteten teilweise auch eine spätere und länger anhaltende Alkalisierung, die aber nur in Gerstengenotypen auftrat, die mit einer hypersensitiven Reaktion auf den Befall durch den Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) reagierten, welche bei der Schwarzfäule jedoch nicht beobachtet wurde. Ob die beobachteten Reaktionen tatsächlich eine Alkalisierung des Apoplasten anzeigen und die Besiedlung von *P. ampellicida* erfolgreich einschränken bzw. stoppen können bleibt unklar. Eine simultane Färbung der pilzlichen Hyphen könnte helfen die Reaktionen und ihre Rolle in der Abwehr besser einzuordnen.

Signifikant mehr und stärkere Reaktionen wurden auf der resistenten Sorte 'Börner' nach Schwarzfäulebefall beobachtet. *Vitis riparia*, ein Elternteil der Sorte 'Börner', zeigte bereits in den Versuchen von Müller et al. (2014) eine starke Reaktion nach Befall durch den Falschen Mehltau, während die Sorte 'M-Th' kaum reagierte. Die Verschiebung des apoplastischen pH-Wertes hat neben der Signalwirkung auch einen direkten Einfluss auf die Aktivität zellwanddegradierender Enzyme (Felle et al., 2004). Eine verminderte Enzymaktivität hätte möglicherweise eine reduzierte Nahrungsaufnahme und Myzelentwicklung zur Folge, wie sie bei 'Börner' beobachtet wurde. Dennoch war nur ein kleiner Teil der Appressorien (30 %) mit dieser Reaktion assoziiert, wodurch den der Reaktion zugrundeliegenden Mechanismen auch nur ein kleiner Anteil an der Resistenzausprägung beigemessen werden kann.

Nach Infektionen mit dem Erreger der Schwarzfäule konnten ebenfalls Superoxidanionen unterhalb der Appressorien entlang der antiklinalen Zellwände, bzw. bei starken Reaktionen auch flächig im Bereich der periklinalen Epidermiszellwand detektiert werden. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass Superoxidanionen durch die membrangebundene NADPH-Oxidase gebildet werden, nicht membranpermeabel und daher räumlich auf den Apoplasten beschränkt sind (Lamb & Dixon, 1997, Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Auch bei der Superoxidanionenbildung wurde bei Pflanzen ein genereller Anstieg hinsichtlich Intensität und Häufigkeit über die Zeit beobachtet, auch wenn die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als frühe Reaktion beschrieben wird. Nach 72 hpi war meist eine Stagnation zu beobachten, die zum einen den Abbau der Superoxidanionen spontan oder über die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (Udilova, 1999) oder zum anderen eine geringere Neusynthese von Superoxidanionen als Ursache haben

könnte. Die meisten Untersuchungen zum Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies bei der Weinrebe nach Pathogenbefall konzentrieren sich auf den Zeitraum zwischen Inokulation und 24 hpi (Kortekamp & Zyprian, 2003). Da der Erreger der Schwarzfäule sich nur sehr langsam entwickelt, wurden vergleichsweise späte Zeitpunkte für die Untersuchungen gewählt.

Deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede, wurden zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt. Die teilresistente Sorte 'Solaris' und die ebenfalls teilresistenten Wildreben zeigten zum Zeitpunkt 72 hpi die stärkste Blaufärbung, die auf einen möglichen Beitrag der Superoxidanionen zur Resistenzausprägung schließen lassen könnte. Während Doke (1983) sowie Kortekamp und Zyprian (2003) Superoxidanionen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Oomyceten zusprach, fanden (Hückelhoven & Kogel, 1998) und Trujillo et al. (2004) Superoxidanionen vor allem assoziiert mit erfolgreich penetrierten Epidermiszellen durch den Echten Mehltau bei Nicht-Wirt-Interaktionen und in Zellen, die an eine hypersensitive Reaktion angrenzen. Kortekamp und Zyprian (2003) beobachteten eine frühe Bildung von Superoxidradikalen in resistenten Rebsorten nach Infektionen mit dem Erreger des Falschen Mehltaus und vermuten, dass diese dem Pathogen den Zugang zum Gewebe erschweren. Auch hier würde eine simultane Färbung von Hyphen und Superoxidanionen helfen deren Beitrag bei der Penetrationsresistenz oder Einschränkung des Hyphenwachstums einzuschätzen. Die geringe Radikalbildung bei der resistenten Sorte 'Börner', die vergleichbar war mit der anfälligen Sorte 'M-Th', lässt auf andere Abwehrstrategien schließen.

Sowohl die vergleichsweise späte Bildung und geringe Ausprägung als auch die Tatsache, dass die Superoxidanionenbildung nicht zweifelsohne resistenteren Sorten oder Genotypen zugesprochen werden kann, lässt deren Beitrag an einer erfolgreichen Abwehr im Unklaren. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte die in Kapitel 5.1 bereits aufgestellte Vermutung sein, dass *P. ampellicida* bedingt durch seine Biologie und Ernährungsweise, die Wahrnehmung durch den Wirt vermeidet oder verzögert.

5.3.2 Zellwandverstärkungen

Kalloseablagerungen wurden vor allem bei der teilresistenten Sorte 'Solaris' beobachtet. Aber auch auf der Sorte 'Börner' wurden Kalloseeinlagerungen gefunden, die jedoch oftmals nicht eindeutig den Penetrationsversuchen von *P. ampellicida* zugeordnet werden konnten, da die entsprechenden pilzlichen Strukturen, wie Appressorien, fehlten. Vermutlich lösten sich einige der oberflächlichen Pilzstrukturen durch den Entfärbungsprozess. Die hier gewählten Zeitpunkte von 8 und 21 dpi sind offensichtlich zu späte Zeitpunkte. Da jedoch häufig frühe Entwicklungsschritte wie die Penetration oder die Entwicklung erster subkutikulärer Hyphen unterbunden waren, muss die Kalloseeinlagerung entsprechend früher stattgefunden haben. Kallose zählt zu den Hauptbestandteilen von Papillen, die sich meist als Zellwandverdickungen am Ort der Infektion zeigen und als Beitrag zur Penetrationsresistenz verstanden werden (Hückelhoven, 2014, Jacobs et al., 2003). Ihr Vorkommen wurde ebenfalls nach Infektionen mit Erregern des Echten Mehltaus (Heintz & Blaich, 1990), aber auch des Falschen Mehltaus (Toffolatti et

al., 2012, Gindro et al., 2003) in resistenten Rebsorten beschrieben. Ihr Einfluss auf die pilzliche Entwicklung und die Resistenzausprägung im Allgemeinen ist dennoch umstritten (Jacobs et al., 2003, Cohen et al., 1990), auch wenn sie häufig in inkompatiblen Pathosystemen am Ort der Infektion detektiert wurde. Erfolgreiche Kalloseanreicherungen, die eine Weiterentwicklung der Hyphen nicht verhinderten, wurden ebenfalls beobachtet, häufig entlang und unterhalb von Hyphen, jedoch zu späten Zeitpunkten in der Myzelentwicklung. Diese Beobachtung bestätigt die Erkenntnis, dass nur frühe und schnelle Kalloseformationen effizient sind (Kortekamp et al., 1997, Gindro et al., 2003, von Röpenack et al., 1998, Aist & Israel, 1977).

Auch Phenolische Verbindungen werden häufig als wichtige Bestandteile von Papillen unterhalb der Anheftungsorgane von Pilzen und Oomyceten angegeben, die nachweislich deren Penetration verhindern können (Collinge 2009, Carver et al. 1998, Heintz & Blaich 1990). Eine gelbe Autofluoreszenz wurde verstärkt unterhalb von Appressorien und entlang der antiklinalen Zellwände der Sorten 'Solaris' und 'Börner' wahrgenommen, die allgemein durch phenolische Substanzen verursacht wird (Carver et al., 1998, Bennett et al., 1996, Boubakri et al., 2013, Stadnik & Buchenauer, 2000) und sich im Durchlicht als Verbräunung zeigt (Pertot et al.). Weber et al. (1995) vermuteten, dass vor allem phenolische Verbindungen, die kovalent an die Zellwand gebunden sind, zur Resistenz der Pflanze beitragen. Ob dies über die erneute Freigabe der antifungal wirkenden phenolischen Verbindungen durch zellwandabbauende Pathogene oder durch die Festigung der Zellwände via Quervernetzungen einzelner Zellwandbestandteile (Stadnik & Buchenauer, 2000, Gregersen et al., 1997) geschieht, ist dabei unklar (Weber et al., 1995). Zellwandverstärkungen stellen möglicherweise eine Barriere für die subkutikulär wachsenden Hyphen von *P. ampellicida* dar bzw. erschweren den Abbau der Zellwand und damit die Ernährung des Pathogens, was in Folge zur beobachteten Hemmung der pilzlichen Entwicklung führen könnte.

Die Ergebnisse der HPLC-Analysen zu den gebundenen Phenolen wiesen darauf hin, dass genotypenübergreifend vor allem *p*-Coumarsäure, aber auch die Ferulasäure vermehrt in infizierten Reben gemessen wurden. Pathogeninduziert wurden sie ebenfalls gebunden an Zellwänden in anderen Pflanzenarten nachgewiesen (Stadnik & Buchenauer, 2000, de Farias Viegas Aquije et al., 2010).

Weitere Analysen zur Quantifizierung, aber auch Identifizierung einzelner phenolischer Verbindungen, die an der Resistenzausprägung beteiligt sein könnten waren weitestgehend erfolglos. Sowohl mit dem FC-Test als auch der HPLC konnten kaum Unterschiede zwischen infizierten und scheininfizierten Pflanzen oder verschiedenen Genotypen ermittelt werden. Vor weiteren Untersuchungen sollten die Zeitpunkte der Probenahme, die Inokulationsmethode (ganze Pflanze vs. Blattscheibe) aber auch die Methodik (Ergänzung durch saure Hydrolyse) überdacht werden.

Phenolakkumulationen wurden häufig auch mit der Neubildung phenolischer Substanzen über die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und den sequentiell folgenden Enzymen assoziiert (Bennett et al., 1996). Auch die Ergebnisse der Expressionsanalyse weisen auf eine Neusynthese hin. Sowohl bei der

resistenten Sorte ‘Börner’ als auch der teilresistenten Sorte ‘Solaris’, wurde eine erhöhte Transkriptmenge der PAL, dem Schlüsselenzym des Phenolstoffwechsels, nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule im Vergleich zur anfälligen Rebsorte ‘M-Th’ ermittelt. Auch nach Infektionen mit dem Falschen Mehltau an Reben wurde bei der resistenten Rebart *V. riparia*, die ein Elternteil der Sorte ‘Börner’ darstellt, eine verstärkte Induktion der PAL und anderer den Sekundärmetabolismus betreffenden Enzyme festgestellt (Polesani et al., 2010).

Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Expressionsprofilen der STS, die ebenfalls zum Phenolstoffwechsel gehört und das Schlüsselenzym der Stilbensynthese darstellt. Neben der Synthese von PR-Proteinen ist die Akkumulation von Phytoalexinen der am häufigsten beobachtete und besten untersuchte Abwehrmechanismus in Weinreben (Jeandet et al., 2002). Pezet et al. (2004a) und Paolucci et al. (2014) zeigten beispielsweise, dass nach künstlicher Infektion mit dem Erreger des Falschen Mehltaus die mehltaresistente Sorte ‘Solaris’ im Gegensatz zur anfälligen Sorte ‘Chasselas’ hohe Mengen an Stilbenen am Ort der Infektion akkumuliert. Malacarne et al. (2011) untersuchten eine F1-Generation aus einer Kreuzung mit der Sorte ‘Merzling’, die zugleich ein Elternteil der Sorte ‘Solaris’ darstellt, die hinsichtlich Mehltaresistenz segregierte. Sie ermittelten eine positive Korrelation zwischen oligomeren Stilbenen, wie den unterschiedlichen Viniferinen und der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau.

Vor allem bei den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ war ein biphasischer Verlauf der PAL-, aber auch der STS-Expression zu beobachten. Ein vergleichbares Expressionsmuster beide Enzyme betreffend erzielten Boubakri et al. (2013) in Rebblättern nach Elicitorbehandlung. Jeandet et al. (2002) berichten, dass Adrian et al. (1997) einen biphasischen Verlauf (8-12h und 20-24 h) der STS bei *in vitro*-Reben nach UV-Behandlung beobachteten und diskutierten, ob die häufig beobachteten zwei zeitlich versetzten Peaks der STS-Expression durch zwei unterschiedliche STS-Gengruppen hervorgerufen werden. Da die hier verwendeten Primer mehrere Stilbensynthesen einschließen, werden möglicherweise mehrere STS-Gengruppen gleichzeitig erfasst.

Der erste Peak war bei beiden Sorten und beiden Genen bereits bei 12 hpi zu beobachten, wobei die PAL bereits 6 hpi deutlich auf die Schwarzfäuleinokulation reagierte. Die Expression der STS war im Vergleich zur PAL-Expression leicht zu späteren Zeitpunkten hin versetzt, was vermutlich der Tatsache geschuldet ist, dass im Phenolstoffwechsel die STS der PAL nachgeschaltet ist. Die Induktion der PAL ist nicht nur zur Neusynthese phenolischer Verbindungen, sondern auch für die verstärkte Synthese der Stilbene erforderlich (Jeandet et al., 2002).

Auffällig waren, unabhängig von der Sorte, die hohen Transkriptmengen der *VvPAL* zum Zeitpunkt 0 hpi, also der Kontrolle. Gleiches wurde von Kortekamp (2006) bei den Sorten ‘Gloire’ und ‘Riesling’ beobachtet. Eine konstitutiv höhere Expression der *VvPAL* ist jedoch auszuschließen, da die scheininfizierten Varianten zu den anderen Zeitpunkten deutlich geringere Expressionslevel aufwiesen. Vermutlich ist die hohe Transkriptmenge der Reaktion auf Verwundung geschuldet, da die Probenahme kurze Zeit nach dem Ausstechen der Blattscheiben erfolgte. Die Induktion der PAL durch Verwundung

wurde beispielsweise bereits an Rebholz (Pierron et al., 2016), *Arabidopsis thaliana* (Reymond et al., 2000) oder der Sitka-Fichte (Deflorio et al., 2011) demonstriert. Zu den späteren Probenahmezeitpunkten schien sich das verwundungsbedingte erhöhte Transkriptlevel bereits abgebaut zu haben.

Die sehr hohe STS-Expression der scheininfizierten Variante zum Zeitpunkt 96 hpi, beruht nur auf dem Ergebnis eines Versuchs, was die große Standardabweichung verdeutlicht. Sie könnte beispielsweise durch eine vorherige unauffällige Infektion mit *Erysiphe necator* verursacht worden sein.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verstärkte Induktion der PAL und der STS in der teilresistenten Sorte 'Solaris' und der resistenten Sorte 'Börner' einen Einfluss auf die Resistenzausprägung gegenüber der Schwarzfäule haben könnte. Vor allem zellwandgebundene Phenole können neben der Akkumulation von Kallose die Penetration und das Hyphenwachstum von *P. ampellicida* erschweren. Um ein besseres Verständnis hinsichtlich der Rolle phenolischer Verbindungen und vor allem der Stilbene in der Abwehr gegenüber der Schwarzfäule zu erlangen, wäre es jedoch nötig, weitere Phenole und einzelnen Stilbene, wie Resveratrol oder verschiedene Viniferine, im infizierten Gewebe nachzuweisen und zu quantifizieren. Chang und Nick (2002) zeigten beispielsweise eine erhöhte STS-Expression, sowohl in Zellkulturen der anfälligen Sorte 'Spätburgunder' als auch der resistenten Art *Vitis rupestris* nach Elicitorbehandlung (Harpin), jedoch bildete sich bei der anfälligen Sorte vorwiegend das inaktive Glykosid Transpiceid, während in der resistenten Rebart signifikante Mengen an Resveratrol und seines Dimers δ -Viniferin gebildet wurden. Vor allem Viniferine, die oxidative Dimere des Resveratrols darstellen, wurden in direkten Assays als toxisch (Pezet et al., 2004b) oder bei Untersuchungen unterschiedlich resistenter Genotypen gegenüber *P. viticola* als effektiv eingestuft (Paolucci et al., 2014, Malacarne et al., 2011, Alonso-Villaverde et al., 2011, Pezet et al., 2004a) und gelten daher als wichtige Resistenzmarker gegenüber dem Falschen Mehltau und möglicherweise auch gegenüber der Schwarzfäule.

5.3.3 Abwehrrassozierte Proteine

Auch PR-Proteine werden häufig als Antwort auf Pathogenbefall gebildet. Das (PR-)Protein PR10.1 ist eins von 17 identifizierten und teilweise charakterisierten PR10-Proteinen in der Weinrebe (Lebel et al., 2010), das eine wichtige Rolle in der Rebe bei der Abwehr von Pathogenen wie *P. viticola* (Müller, 2014, Merz, 2014, Kortekamp, 2006) oder *E. necator* (Xu et al., 2014) zu spielen scheint.

Das Zeitprofil der Expressionslevel von *VvPR10.1* zeigte bei allen drei untersuchten Sorten nach einer Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule einen leichten biphasischen Verlauf, mit einem ersten Peak bei 6 hpi, der anschließend abflachte und bei 24 hpi wieder anstieg. Eine ähnliche Dynamik wurde ebenfalls von Merz (2014) nach Infektion mit dem Erreger *P. viticola* bei der resistenten Sorte 'Regent' beobachtet, auch hier lag das erste Expressionsmaximum bei 6 hpi. Überraschend war die sehr starke Induktion bei der anfälligen Sorte 'M-Th' zum frühen Zeitpunkt 6 hpi, die durch beide biologisch unabhängige Versuche bestätigt wurde, denn anhand der Ergebnisse von Merz (2014) und Müller (2014)

wurde eine stärkere infektionsbedingte Induktion in den teilresistenten und resistenten Sorten erwartet. Untersuchungen zur Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau ergaben jedoch ebenfalls eine verstärkte Expression von PR10 in der anfälligen *V. vinifera* -Sorte ‘Cabernet Sauvignon’, nicht jedoch in der resistenten Art *V. aestivalis* (Fung et al., 2008).

Ob PR10 eine wichtige Rolle in der Abwehr gegenüber der Schwarzfäule spielen kann, ist weitestgehend offen, da PR10 im Cytoplasma agiert (Lebel et al., 2010) und mit dem der Erreger erst in seiner späten nekrotrophen Phase in direkte Berührung kommt. Auch die hypersensitiven Reaktionen, die häufig bei der Abwehr biotropher Pathogene, wie dem Falschen und Echten Mehltau an der Weinrebe beobachtet werden und laut Kim et al. (2011) und Kim et al. (2008) mit der Expression von PR10 verknüpft sind, wurden bei keiner der untersuchten Sorte nach Schwarzfäulebefall detektiert.

Aufgrund der besonderen Lebensweise von *P. ampellicida*, die durch das subkutikuläre Hyphenwachstum auf den Zellwänden der Epidermis und der nachweislichen Degradation und Verwertung von Pektinen gekennzeichnet ist, wurde eine mögliche Rolle der PGIPs, vornehmlich in resistenten Sorten, als Baustein der Abwehr vermutet. Durch ihre Lokalisierung in der Zellwand und die Hemmung der pilzlichen Endopolygalacturonasen (Di et al., 2006), die zum Abbau der pflanzlichen Zellwand dienen, könnte sowohl die Ernährung als auch die Hyphenentwicklung der Schwarzfäule eingeschränkt werden.

Das zeitliche Expressionsprofil von *VvPGIP* variiert stark zwischen den einzelnen Sorten. Überraschenderweise wurden die höchsten Transkriptmengen bei der anfälligen Sorte ‘M-Th’ gemessen. Jedoch zeigten auch die scheininfizierten Varianten erhöhte Expressionslevel und nur zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi kam es zu einer infektionsbedingten Induktion. Erhöhte PGIP-Expressionslevel wurden ebenfalls von Bézier et al. (2002) in der anfälligen Sorte Chardonnay nach Infektionen mit *Botrytis cinerea* ermittelt. Die Ergebnisse sind mit hohen Standardabweichungen behaftet und implizieren somit eine schlechte Repräsentativität, möglicherweise beeinflussen auch andere Faktoren die PGIP-Expression. PGIPs wurden pflanzenartenübergreifend in vielen Pflanzenorganen und -geweben gefunden (De Lorenzo & Ferrari, 2002) und spielen nachweislich auch bei Entwicklungs- und Wachstumsprozessen eine Rolle (Di et al., 2006). Für PGIP1, PGIP2 und PGIP3 von *Phaseolus vulgaris* (Bohne) wurde zusätzlich die Induktion nach Verwundung nachgewiesen (De Lorenzo & Ferrari, 2002). Möglicherweise reagiert ebenfalls das hier untersuchte PGIP-Gen der Rebe sensitiv auf Verwundung, was die erhöhten Expressionslevel der scheininfizierten Varianten erklären könnte.

Die höchsten Expressionslevel wurden zwar in der anfälligen Rebsorte ‘M-Th’ gemessen, jedoch war eine infektionsbedingte Induktion bei den Sorten ‘Solaris’ und ‘Börner’ bereits 12 hpi und damit früher nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt bzw. in dem Zeitraum um 12 hpi bis hin zu 24 hpi findet laut den Untersuchungen zur Biologie des Erregers die Penetration der Kutikula statt. Resistenzmechanismen, die die Penetration oder die Entwicklung von Hyphen eingrenzen sollen, müssen folglich bereits

aktiviert sein. Eine frühere Induktion, auch wenn sie vergleichsweise schwach ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch PGIPs an der Resistenz gegenüber der Schwarzfäule beteiligt sind.

5.4 Europäische Wildreben als Resistenzquellen?

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand darin, die Population der Europäischen Wildreben auf ihre Resistenz gegenüber dem Falschen und Echten Mehltau sowie der Schwarzfäule zu testen und deren Eignung für die Züchtung pilzwiderstandsfähiger Rebsorten einzuschätzen.

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse wurden verschieden resistente Sorten als Vergleich ausgewählt und in den Screenings mitgeführt. Die Kulturrebsorte 'M-Th' diente dabei als Positivkontrolle, die wie alle der in Deutschland zur Weinbereitung zugelassenen Rebsorten der Art *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* angehört und hinlänglich als anfällig gegenüber den drei Rebkrankheiten bekannt ist (Bundessortenamt, 2015, Loskill et al., 2009). Dies konnte in allen Screenings bestätigt werden.

Die Sorte 'Regent' gilt als erfolgreichste neugezüchtete pilzwiderstandsfähige ("Piwi") Rotweinsorte und ist vor allem mit einer hohen Widerstandskraft gegenüber dem Falschen und Echten Mehltau ausgewiesen (Bundessortenamt, 2015, Eibach & Töpfer, 2003). Vor allem gegenüber dem Falschen Mehltau wurde jedoch meist ein Befall detektiert, allerdings vergleichbar gering in Ausmaß und Stärke, was ebenfalls von Merz (2014) aber auch Basler und Pfenninger (2001) beobachtet werden konnte. Im Schwarzfäulescreening zeigte die Sorte 'Regent' verhältnismäßig hohe Befallswerte, ähnlich der anfälligen Sorte 'M-Th' und wurde dementsprechend als anfällig eingestuft. Rex (2012) beschrieb 'Regent' mit einer mittleren Anfälligkeit und im Bericht zu den „Strategien zur Regulation der Schwarzfäule im ökologischen Weinbau“ (Loskill et al., 2009) wurde sie sowohl nach Gewächshaus- als auch Freilandversuchen als hochanfällig eingruppiert.

Die Neuzüchtung 'Solaris' wird in der Bundessortenliste (Bundessortenamt, 2015) und in der Literatur mit geringer Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau (Spring, 2001, Basler et al., 2002) und Falschen Mehltau (Boso & Kassemeyer, 2008, Gindro et al., 2003) angegeben, was sich in den Ergebnissen der entsprechenden Screenings widerspiegelt. In den Untersuchungen zur Schwarzfäuleresistenz zeigte diese Sorte nur selten Symptome und wurde in Folge als teilresistent eingestuft. Zum gleichen Ergebnis kamen Loskill et al. (2009) in Gewächshausversuchen. Da bei dem Elternteil 'Merzling' keine Anfälligkeit gegenüber der Schwarzfäule im Freiland beobachtet wurden (Loskill et al., 2009), geht die Schwarzfäuleresistenz möglicherweise auf die Seibel-Reben zurück, die Erbgut resistenter amerikanischer Wildreben enthalten und Vorfahren des 'Merzling' darstellen.

Die Arthybride 'Börner' stellt eine Kreuzung amerikanischer Wildreben (*Vitis riparia* x *Vitis cinerea*) dar, die weitestgehend als resistent gegenüber den drei Rebkrankheiten Echter Mehltau (Cadle-Davidson et al., 2011), Falscher Mehltau (Boso & Kassemeyer, 2008, Demaree et al., 1937) und der Schwarzfäule (Demaree et al., 1937, Rex, 2012) gelten, wie in den Screenings bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse der Europäischen Wildrebenpopulation aus den verschiedenen Resistenzscreenings zeigten stets eine sehr hohe Variabilität und nur graduelle Unterschiede. Sowohl bezogen auf die

Befallsstärke, als auch die Befallshäufigkeit variierte der Befall dabei nahezu stufenlos von ‘resistent‘ bzw. ‘teilresistent‘, vergleichbar mit der Sorte ‘Solaris‘ oder der Sorte ‘Börner‘ bis hin zu ‘hoch anfällig‘, wie die Sorte ‘M-Th‘ oder sogar darüber hinaus. Die Ergebnisse lassen eine hohe genetische Diversität vermuten, die jedoch nicht von Ledesma-Krist et al. (2015) bestätigt werden konnte. Die genetische Vielfalt der Wildreben der Halbinsel Ketsch wurde mithilfe von 36 Mikrosatelliten als sehr gering eingeschätzt. Auch anderen Wildrebenpopulationen wurde eine geringe genetische Diversität attestiert, vermutlich zu erklären durch Inzucht innerhalb der kleinen und isolierten Populationen und dem Verlust von Allelen auf Grund des Selektionsdrucks (Ocete et al., 2015, Zdunić et al., 2015).

Die hohe Variabilität der Screeningergebnisse ist auch methodisch bedingt. Die Versuche wurden aufgrund quantitativ nicht ausreichendem Wildrebenmaterial auf mehrere Versuche verteilt und dadurch zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt. Dies hat vermutlich die Pflanzenphysiologie und Infizierbarkeit der Reben stärker beeinträchtigt als zunächst angenommen, auch wenn die Versuche in klimatisierten Gewächshäusern stattfanden. Dadurch zeigten die Akzessionen möglicherweise einen geringeren Befall als sie unter optimalen Wachstums- und Infektionsbedingungen tun würden. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen führen und hat folglich Einfluss auf den Mittelwert.

Durch die Mittelwertbildung heterogener Boniturwerte ergibt sich ein starkes Mittelfeld in der Datenverteilung statt einer Polarisierung. Die resultierenden hohen Standardabweichungen sind auf die geringe Zahl der Wiederholungen zurückzuführen. Auch wenn die Wiederholungsanzahl rein rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Standardabweichung haben muss, würden mehr Wiederholungen ein Auffinden von Ausreißern erleichtern.

Da die Europäischen Wildreben bis heute ohne jegliche Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in den Auenwäldern des Oberrheins überdauert haben, ist anzunehmen, dass sie Eigenschaften besitzen, die eine Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen vermitteln. Da sowohl der Echte und Falsche Mehltau als auch die Schwarzfäule erst im 19. Jahrhundert nach Europa eingeschleppt wurden, war es den Europäischen Wildreben folglich nicht möglich eine Coevolution mit diesen Pathogenen zu erfahren und gelten somit als naive Wirte. Ihre Widerstandsfähigkeit muss demnach auf anderen Mechanismen beruhen als der ETI, die bereits in Kapitel 5.3 im Zuge der Resistenz der Sorten ‘Solaris‘ und ‘Börner‘ diskutiert wurde. REM-Aufnahmen zeigten, dass die Epidermiszellen der Europäischen Wildreben häufig stärker gelappt und ineinander verzahnt waren als bei der anfälligen Rebsorte ‘M-Th‘ (Tisch et al., 2013), auch schienen bei manchen Wildrebenakzessionen die Wachsauflagerungen (Rehn, 2011) oder die Trichombildung (eigene Beobachtung) stärker ausgeprägt zu sein. Solche präformierten Resistenzmechanismen, die möglicherweise auch andere biologische Funktionen haben, können die Adhäsion von Wasserstropfen, aber auch Pilzsporen herabsetzen (Taiz & Zeiger, 2002, Kortekamp et al., 1999). Die Ergebnisse zum Vergleich der Entwicklung von *P. ampellicida* auf verschiedenen Genotypen (Kapitel 4.3) zeigten jedoch, dass weder die Sporenanheftung noch die Bildung der Appressorien, welche die Haftorgane der Pilze darstellen, auf den ausgewählten Wildrebenakzessionen

deutlich reduziert waren. Die Mikrostruktur der Blattoberfläche der Wildreben scheint demnach nur einen minimalen Einfluss auf ihre erhöhte Widerstandsfähigkeit zu haben.

Auch Kalloseakkumulationen, die nachweislich die Penetrationsresistenz bei Mehltauerregern erhöhen (Toffolatti et al., 2012, Qiu et al., 2015), wurden ebenfalls bei den Wildreben nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule detektiert, jedoch zu gering in ihrem Auftreten, um einen maßgeblichen Einfluss auf die Resistenzausbildung zu haben. Ähnlich verhielt es sich mit der Autofluoreszenz und die korrespondierende Verbräunung am Ort der Penetration, die auf die Anreicherung von Phenolen verweisen (Bennett et al., 1996, Carver et al., 1998). Da die Autofluoreszenz sich meist auf die antiklinalen Zellwände beschränkte, dem Ort, an dem sich die Hyphen von *P. ampellicida* entwickeln, ist davon auszugehen, dass es sich um zellwandgebundene phenolische Verbindungen wie *p*-Coumarsäure und Ferulasäure handelte, die auch bei anderen Pflanzenarten nach Pathogenbefall verstärkt detektiert wurden (de Farias Viegas Aquije et al., 2010, Stadnik & Buchenauer, 2000). Deren Quervernetzung, auch mit Polysacchariden und Glykoproteinen in Gegenwart der Peroxidase und H₂O₂ sorgt für eine Verstärkung der Zellwände (Kerby & Somerville, 1989, Stadnik & Buchenauer, 2000). Es ist anzunehmen, dass dadurch eine Freisetzung von Kohlenstoffquellen aus der Zellwand und damit die Ernährung von *P. ampellicida* erschwert wird, was die beobachtete eingeschränkte Hyphenentwicklung auf den Wildreben (Kapitel 4.3.3) zur Folge haben könnte.

Im Zuge des Wildrebenscreenings hinsichtlich der Schwarzfäuleresistenz war auffällig, dass vor allem bei den resistenteren Wildreben der Signifikanzgruppe AB weniger Blätter befallen waren, als bei der anfälligen Rebsorte 'M-Th' (Kapitel 4.1.3, Abbildung 7). Es scheint, als würde die bereits häufig beobachtete und stark ausgeprägte Altersresistenz gegenüber der Schwarzfäule (Kuo & Hoch, 1996b, Galet, 1977) bei den Wildreben früher bzw. schneller einsetzen, als bei der anfälligen Rebsorte 'M-Th'. Kuo und Hoch (1996b) haben diese Form der Resistenz gegenüber der Schwarzfäule näher untersucht und den Terminus „altersbedingte Resistenz“ präzisiert. Sie stellten fest, dass nur junge noch expandierende, sich also im Wachstum befindende Blätter, nach Inokulation fähig sind, Symptome auszubilden. Ausgewachsene Blätter können zwar infiziert werden, bilden jedoch keine typischen Nekrosen aus und der Pilz kann sich nicht reproduzieren. Vergleichende Studien an Blattscheiben und ganzen Pflanzen ließen ebenfalls erkennen, dass Myzelien auf ganzen Blättern, die bis zur Probenahme Teil einer intakten, wachsenden Pflanze waren, größer und besser entwickelt waren, als auf Blattscheiben von Blättern gleichen Alters (eigene Beobachtung). Auch Versuche zur Etablierung eines minimalinvasiven Testsystems auf Schwarzfäuleresistenz (Rehn, 2011, Rex, 2012) zeigten, dass sich keine Symptome an Blattscheiben oder abgetrennter Blätter entwickelten. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass Expansion und Wachstum von Gewebe, die zugrundeliegenden Prozesse und damit die Pektinumlagerung essentiell für das Hyphenwachstum von *P. ampellicida* sind. Untersuchungen zur Blattlängenzunahme verschiedener Genotypen zeigten, dass die ersten beiden Blätter vergleichbare Wachstumsraten hatten, während die Blätter an Position drei und vier der Sorte 'M-Th' deutlich stärker

wuchsen als die Blätter der Wildrebe K18 (Signifikanzgruppe AB). Dies kann mit der Tatsache begründet werden, dass die ausgewachsenen Blätter der Wildreben in der Regel kleiner sind als die der anderen Rebsorten, wie aus den ampelographischen Untersuchungen von Ledesma-Krist et al. (2015) und eigenen Beobachtungen hervorgeht. Das vermehrt eingeschränkte Längenwachstum mit zunehmendem Blattalter könnte somit die frühere Resistenz der Blätter der Wildreben erklären. Jedoch wäre es sinnvoll weitere Wildrebenakzessionen beider Signifikanzgruppen in diese Untersuchung zu integrieren, um die Ergebnisse und damit die Hypothese zu bestätigen.

Obwohl die Sorten 'Solaris' und 'Börner' eine komplette bzw. nahezu komplette Resistenz aufwiesen, zeigten sie die höchsten Wachstumsraten über alle untersuchten Blattetagen. Dies kann zum einen durch ihre sehr großen Blätter erklärt werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass bei diesen Sorten zusätzlich andere Resistenzmechanismen zum Tragen kommen, die auf amerikanischem Erbgut beruhen und ebenfalls die jungen Blätter vor einem Schwarzfäulebefall schützen.

Die Ursachen der ontogenetischen Resistenz wurden in vielen Pathosystemen untersucht. Teilweise wurde von physiologischen Barrieren wie beispielsweise der Kutikula gesprochen, die in resistenteren Pflanzenorganen meist dicker oder stärker ist (Ficke et al., 2003, Ficke et al., 2002, Jha et al., 2009). Aber auch chemische Veränderungen, wie zum Beispiel die erhöhte Aktivität bzw. verstärkte Expression von PR-Proteinen, wie β -1,3-Glucanasen, Chitinasen, Peroxidasen und Thaumatin-ähnliche Proteine (Wyatt et al., 1991, Tattersall et al., 1997, Salzman et al., 1998) wurden diskutiert.

Bei der Schwarzfäule war die Sporenanheftung und Appressorienbildung bei allen Genotypen auf den älteren Blättern leicht reduziert. Kuo und Hoch (1996a) fanden heraus, dass Pyknidiosporen von *P. ampellicida* sich nur an Oberflächen anheften und auskeimen, die sich durch eine schlechte Benetzbarkeit auszeichnen. Ähnliches ist auch für die Appressorien denkbar, die als Haftorgane der Pilze bezeichnet werden. Unterschiede in der Hydrophobie der Blattoberflächen können demnach die Anheftung der Pyknidiosporen beeinflussen und dadurch zur Resistenz bzw. Anfälligkeit der Pflanze beitragen. Ähnliches wurde von Ishiga et al. (2013) bei *Phakopsora pachyrhizi* beobachtet, die epikutikuläre Wachse und Hydrophobie als wichtige Wirtssignale bezeichneten, die zur Ausbildung der Prepenetrationsstadien notwendig sind. Die Blattoberflächen verändern sich im Laufe des Blattwachstums und der Blattentwicklung, was bei der Rebe mit bloßem Auge bereits erkennbar ist. Junge Blätter zeigen einen höheren Glanz als ältere Blätter, die eher matt erscheinen. Bringe et al. (2006) untersuchten die ontogenetische Variation der Blattoberflächen von Apfelbäumen und stellten eine Abnahme der Hydrophobie zu älteren Blättern hin fest, die in der chemischen Zusammensetzung der Kutikula begründet ist. Eine solche Entwicklung könnte auch die Abnahme der Sporenanheftung auf älteren Blättern von Weinreben und einen Teil der altersbedingten Resistenz erklären. Auch Ficke et al. (2004) vermuten, dass die Widerstandsfähigkeit altersresistenter Weinbeeren gegenüber *E. necator* auf präformierten physikalischen oder biochemischen Barrieren nahe der Kutikulaoberfläche beruht und die Entwicklungsstadien vor der Penetration hemmen.

Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Versuche auf Blattscheiben basierten, die stets horizontal positioniert waren, wodurch ein Abrollen des Inokulationstropfens verhindert wurde. Die natürliche Blattausrichtung der Rebe ist zwar planophil, jedoch nicht gänzlich horizontal. Je nach Oberflächenbeschaffenheit, Behaarung und Gewebefestigkeit rollen Tropfen schneller oder langsamer ab und haben damit ebenfalls einen Einfluss auf die reale Anheftungsrates der Pyknidiosporen.

Jeun und Hwang (1991) untersuchten die Altersresistenz von Pfefferpflanzen gegenüber *Phytophthora capsici* und vermuteten, dass die Ausprägung dieser Resistenz morphologischen und ernährungsphysiologischen Veränderungen des Gewebes unterliegt. Auch das Polysaccharidprofil der Zellwand verändert sich mit zunehmendem Alter und der Reife (Schäfer et al., 2016, Stolle-Smits et al., 1999). Wie bereits in Kapitel 5.2 diskutiert, spielt möglicherweise auch der Pektin Gehalt sowie deren Komplexität bzw. Verbindung mit anderen Zellwandkomponenten eine Rolle in der altersbedingten Resistenz gegenüber der Schwarzfäule.

Auch die erhöhten konstitutiv vorliegenden freien Phenolgehalte in den älteren Blättern der Wildrebe K18 (Kapitel 0) könnten zu der im Vergleich zu 'M-Th' beobachteten früher einsetzenden Altersresistenz beitragen.

Bisher wurden in der Züchtung pilzwiderstandsfähiger Rebsorten vorrangig rezeptorbasierte Resistenzmechanismen amerikanischer und asiatischer Wildreben berücksichtigt. In der Regel beruht die Resistenz dabei auf einem Gen oder einiger weniger Gene, wie dem *Run1*, das eine Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau vermittelt oder dem *Rpv1*-Gen, das zur Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau führt (Eibach et al., 2007). Zur Erlangung einer dauerhaften und höheren Resistenzausprägung, ist es jedoch erstrebenswert, möglichst viele verschiedene Resistenzmechanismen zu kombinieren. Obwohl viele Untersuchungen hinsichtlich der Altersresistenz bei Weinreben unternommen wurden, gibt es kein klares Muster an Abwehrmechanismen. Da jedoch nicht bekannt ist, dass die altersbedingte Resistenz bislang gebrochen bzw. überwunden wurde, wird sie folglich als dauerhaft angesehen. Vergleichbare Beobachtungen wurden an Apfel hinsichtlich der Resistenz gegenüber dem Apfelschorf gemacht (Gusberti et al., 2013). Zusätzlich richtet sie sich neben der Schwarzfäule gegen weitere pilzliche Pathogene wie den Echten (Gee et al., 2008) oder Falschen Mehltau (Kennelly et al., 2005). Da die altersbedingte Resistenz jedoch keine vollständige Widerstandsfähigkeit vermittelt, ist von ihr nur ein geringer Effekt zu erwarten. Die Europäischen Wildreben bieten folglich grundlegend Potential für die Züchtung pilzwiderstandsfähiger Sorten, jedoch ist der züchterische Aufwand, auch gemessen in Zeit und Geld, gegenüber dem zu erwartenden Erfolg und Vorteil abzuwägen.

5.5 Schlussfolgerung

P. ampellicida, der Erreger der Schwarzfäule an Weinreben, gehört zu den hemibiotrophen Pathogenen und ist im Vergleich zu anderen Pathogenen durch eine sehr lange biotrophe, fast endophytische erste Phase gekennzeichnet, die durch ein zweidimensionales Hyphenwachstum auf den antiklinalen

Zellwänden der Epidermis unterhalb der Kutikula geprägt ist. Die mikroskopischen Ergebnisse zeigten, dass erst durch den Beginn des dreidimensionalen Hyphenwachstums *P. ampellicida* in die nekrotrophe Phase übergeht, die zur Symptomausprägung führt und die Reproduktion ermöglicht. Der Erreger penetriert während der biotrophen Phase weder direkt die Zellen noch bildet er Haustorien, wie die meisten biotrophen Pathogene, wodurch der Erreger in keinem direkten Kontakt mit den pflanzlichen Zellen steht. Mittels Nährmedientests wurde festgestellt, dass *P. ampellicida* fähig ist verschiedene Komponenten der Zellwand zu degradieren und vor allem Pektin für sein Wachstum zu nutzen, ein potentieller Erklärungsansatz für das charakteristische Hyphenwachstum im pektinreichen Zellwandbereich der Pflanze. Die besondere Wachstumsweise der Hyphen und der kontrollierte Abbau der Zellwand ermöglichen dem Pilz unter Umständen seine Wahrnehmung und die in Folge induzierten Abwehrmechanismen zu verzögern. Darauf weisen ebenfalls die späten Beobachtungen vermeintlich früher Reaktionen, wie die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen oder der pH-Anstieg im Apoplasten, hin.

Kalloseablagerungen, meist in Form von Papillen am Ort der Infektion, wurden generell verstärkt auf resistenten bzw. teilresistenten Genotypen detektiert und trugen in erster Linie zur Penetrationsresistenz bei. Bei den Sorten 'Solaris' und 'Börner' verwiesen erhöhte Transkriptmengen der PAL nach Inokulation mit *P. ampellicida* auf einen Neusynthese phenolischer Verbindungen. Zellwandgebundene Phenole können beispielsweise die Zellwand vor enzymatischem Abbau schützen und den Pilz in seiner Entwicklung hemmen, wie auf resistenten und teilresistenten Genotypen beobachtet wurde. Darüber hinaus deuten erhöhte Expressionslevel der Stilbensynthase auf einen möglichen Einfluss von Stilbenen in der Schwarzfäuleresistenz hin.

Die Erkenntnis, dass Pektin ein mögliches Schlüsselenzym in der Ernährung und Entwicklung von *P. ampellicida* darstellt, gibt einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch unterschiedliche Pektingehalte oder deren Bindungsformen Einfluss auf die Resistenz verschiedener Genotypen oder Pflanzenorgane haben könnten.

Obwohl die Vorfahren der Sorten 'Solaris' und 'Börner' eine Coevolution mit der Schwarzfäule durchlaufen haben, wurden keine hypersensitiven Reaktionen wahrgenommen, das Kennzeichen einer effektor-induzierten Immunität (ETI). Daher, aber auch auf Grund der beobachteten Abwehrmechanismen, die in resistenten Genotypen meist früher und verstärkt auftraten, ist anzunehmen, dass ihre Resistenz hauptsächlich auf einer basalen Immunität beruht (PTI).

Die Europäischen Wildreben sind naive Wirte, die keine Coevolution mit *P. ampellicida* erfahren haben, haben jedoch bis heute ohne die Applikation von Pflanzenschutzmitteln überlebt. Die Boniturergebnisse des Resistenzscreenings zeigten, dass meist nur sehr junge und insgesamt weniger Blätter der Europäischen Wildreben mit der Schwarzfäule befallen waren als bei der anfälligen Vergleichsrebsorte 'M-Th', was auf eine früher einsetzende Altersresistenz hindeutet. Diese ist durch ihre geringere Blattgröße und der damit verbundenen kürzeren Wachstumsphase zu erklären.

Die Europäischen Wildreben bieten grundlegend Potential für die Züchtung pilzwiderstandsfähiger Sorten. Da die Altersresistenz graduell ist und keine komplette Widerstandsfähigkeit vermittelt, ist ihr Effekt gegenüber der vermuteten Dauerhaftigkeit abzuwägen.

Die Resistenz einer Pflanze oder einzelner Organe gegenüber pilzlichen Schaderregern setzt sich aus unterschiedlichen Abwehrmechanismen zusammen. Obwohl die Resistenz und die ihr zugrundeliegenden Abwehrmechanismen seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung sind, bleibt ihre genaue Funktionsweise dennoch unklar. Die meisten der gut untersuchten biotrophen und hemibiotrophen Erreger an der Weinrebe, wie der Falsche oder Echte Mehltau penetrieren die Zellwand und etablieren Haustorien zur Nahrungsaufnahme. Einer der häufigsten Abwehrstrategien ist dabei der programmierte Zelltod, der zu einem schnellen Absterben der infizierten Zellen führt, um dem Pathogen die Nahrungsgrundlage zu entziehen und seine weitere Ausbreitung verhindert. Daher ist es schwierig Parallelen hinsichtlich der involvierten Resistenzmechanismen und deren Dynamik zu *P. ampellicida* zu ziehen. Die generelle Komplexität der pflanzlichen Abwehr aber auch die lange biotrophe Wachstumsphase und der Mangel an adequaten Vergleichsmöglichkeiten erschweren es ein detailliertes Verständnis über die Abwehr der Schwarzfäule zu gewinnen.

5.6 Ausblick

Aufbauend auf den Ergebnissen der real-time PCR, die erhöhte Transkriptmengen der STS nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule bei der resistenten Sorte 'Börner' und der teilresistenten Rebsorte 'Solaris' aufwies, wäre es sinnvoll auch den Einfluss von verschiedenen Stilbenen auf die Schwarzfäule bzw. deren Rolle in der Resistenzauspägung gegenüber der Schwarzfäule zu untersuchen.

Im Zuge der Methodenoptimierung der Phenolextraktion und -bestimmung, wurde ein Peak beschrieben, der ausschließlich bei infizierten Reben detektiert wurde. Ob es sich hierbei möglicherweise um ein Phytotoxin der Schwarzfäule, wie Guignardic acid oder Phenguignardic acid (Molitor et al., 2012) handelt, soll in weiterführenden Untersuchungen an der Universität Mainz (Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Prof. Thines) überprüft werden. Die Rolle von Phytotoxinen im Infektionsprozess der Schwarzfäule und ihre vermeintliche Rolle als Virulenzfaktoren, ist ebenfalls ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Auch die Analyse weiterer Blattproben verschiedener Genotypen und vor allem Blattalter hinsichtlich ihrer Zellwandkomposition und deren Bindungseigenschaften ist Gegenstand aktueller Forschung und soll helfen, vor allem die ontogenetische Resistenz besser zu verstehen.

Im Sinne der Winzer, vor allem derer die ökologisch wirtschaften, müssen auch alternative Bekämpfungsstrategien in der Forschung Berücksichtigung finden, angefangen von vorbeugenden Maßnahmen bis hin zu ökologischen Pflanzenschutzmittelapplikationen. Darüber hinaus wäre es

erstrebenswert auch weitere Resistenzquellen zu erschließen und die Schwarzfäuleresistenz verstärkt in zukünftige Züchtungsprojekte zu integrieren.

6 Literatur

- Agati, G., Cerovic, Z.G., Dalla Marta, A., Di Stefano, V., Pinelli, P., Traversi, M.L., Orlandini, S., 2008. Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. *Functional plant biology* **35**, 77-84.
- Aguero, C.B., Uratsu, S.L., Greve, C., Powell, A.L., Labavitch, J.M., Meredith, C.P., Dandekar, A.M., 2005. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Mol Plant Pathol* **6**, 43-51.
- Aist, J.R., Israel, H.W., 1977. Papilla Formation: Timing and Significance during Penetration of Barley Coleoptiles by *Erysiphe graminis hordei*. *Phytopathology* **67**, 455-61.
- Alonso-Villaverde, V., Boso, S., Santiago, J.-L., Gago, P., Rodríguez-García, M.I., Del Carmen Martínez, M., 2011. Leaf thickness and structure of *Vitis vinifera* L. CV. albarino clones and its possible relation with susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) infection. *OENO One* **45**, 161-9.
- Amarowicz, R., Narolewska, O., Karamac, M., Kosinska, A., Weidner, S., 2008. Grapevine leaves as a source of natural antioxidants. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **58**, 73-8.
- Arnold, C., Schnitzler, A., Douard, A., Peter, R., Gillet, F., 2005. Is there a future for wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *silvestris*) in the Rhine Valley? *Biodiversity & Conservation* **14**, 1507-23.
- Asalf, B., Gadoury, D.M., Tronsmo, A.M., Seem, R.C., Dobson, A., Peres, N.A., Stensvand, A., 2014. Ontogenic resistance of leaves and fruit, and how leaf folding influences the distribution of powdery mildew on strawberry plants colonized by *Podosphaera aphanis*. *Phytopathology* **104**, 954-63.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Verhagen, B., Conreux, A., Jeandet, P., Couderchet, M., 2007. Induction of phytoalexin synthesis, chitinase and beta-1, 3-glucanase in grapevine leaves by chitosan, and resistance to *Botrytis cinerea*. *IOBC WPRS BULLETIN* **30**, 225.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* **58**, 649-62.
- Basler, P., Pfenninger, H., 2001. Regent. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, 61-2.
- Basler, P., Pfenninger, H., Bill, R., 2002. Die deutschen Rebsorten Johanniter, Solaris, Bronner und Fr.242-73. *Obst- und Weinbau* **138**, 442-6.
- Bavaresco, L., 1997. Relationship between chlorosis occurrence and mineral composition of grapevine leaves and berries. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* **28**, 13-21.
- Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M., Mansfield, J., 1996. The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. *The Plant Journal* **9**, 851-65.
- Bézier, A., Lambert, B., Baillieul, F., 2002. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 111-20.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Lam, B.C., 1998. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **3**, 342-6.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of experimental botany* **53**, 1367-76.
- Boso, S., Kassemeyer, H.-H., 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* **47**, 39-49.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., Soustre-Gacougnolle, I., 2013. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC plant biology* **13**, 31.
- Bringe, K., Schumacher, C.F., Schmitz-Eiberger, M., Steiner, U., Oerke, E.-C., 2006. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry* **67**, 161-70.

- Bundessortenamt, 2015. *Beschreibende Sortenliste 2015 Reben*. Hannover: Bundessortenamt.
- Busam, G., Kassemeyer, H.-H., Matern, U., 1997. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol* **115**, 1029-38.
- Cadle-Davidson, L., Chicoine, D.R., Consolie, N.H., 2011. Variation within and among *Vitis* spp. for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*. *Plant disease* **95**, 202-11.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. *The Fungi*. London, UK: Academic Press.
- Carver, T., Thomas, B., Robbins, M., Zeyen, R., 1998. Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 223-43.
- Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F., De Lorenzo, G., 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. In: *Signal transduction in plants*. Basel, Schweiz: Birkhäuser Basel, 153-77.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R.A., Fincher, G.B., Little, A., 2014. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *New Phytol* **204**, 650-60.
- Cohen, Y., Eyal, H., Hanania, J., 1990. Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**, 191-204.
- Collinge, D.B., 2009. Cell wall appositions: the first line of defence. *Journal of experimental botany* **60**, 351-2.
- Curry, K.J., Abril, M., Avant, J.B., Smith, B.J., 2002. Strawberry Anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. *Phytopathology* **92**, 1055-63.
- Dai, G., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., 1994. Polyphenols and resistance of grapevines to downy mildew. *Acta Horticulturae* **381**, 763-6.
- Dai, G., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., 1995. Histochemical responses of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* **85**, 149-54.
- Dangl, J.L., Jones, J.D., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-33.
- Dayanandan, P., Kaufman, P., Franklin, C., 1983. Detection of silica in plants. *American Journal of Botany* **70**, 1079-84.
- De Farias Viegas Aquije, G.M., Zorzal, P.B., Buss, D.S., Ventura, J.A., Fernandes, P.M., Fernandes, A.A., 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Rep* **29**, 1109-17.
- De Lorenzo, G., D'ovidio, R., Cervone, F., 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 313-35.
- De Lorenzo, G., Ferrari, S., 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current opinion in plant biology* **5**, 295-9.
- Deflorio, G., Horgan, G., Woodward, S., Fossdal, C.G., 2011. Gene expression profiles, phenolics and lignin of Sitka spruce bark and sapwood before and after wounding and inoculation with *Heterobasidion annosum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **75**, 180-7.
- Del Río, J.A., Gómez, P., Baidez, A., Fuster, M.D., Ortuno, A., Frías, V., 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 87-94.
- Demaree, J.B., Dix, I.W., Magoon, C.A. Observations on the resistance of grape varieties to black rot and downy mildew. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 1937, 451-60.
- Dettweiler, E., Jung, A., Zyprian, E., Töpfer, R., 2000. Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis* **39**, 63-5.
- Dhekney, S.A., Li, Z.T., Gray, D.J., 2011. Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **47**, 458-66.

- Di, C., Zhang, M., Xu, S., Cheng, T., An, L., 2006. Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. *Critical reviews in microbiology* **32**, 91-100.
- Dickey, J.L., Levy, M., 1979. Development of powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) on susceptible and resistant races of *Oenothera biennis*. *American Journal of Botany* **66**, 1114-7.
- Diéguez-Uribeondo, J., Förster, H., Soto-Estrada, A., Adaskaveg, J., 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology* **95**, 751-8.
- Doke, N., 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology* **23**, 359-67.
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B., 2011. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci Against Microb Pathog* **2**, 1043-54.
- Eibach, R., 1994. Investigations about the genetic resources of grapes with regard to resistance characteristics to powdery mildew (*Oidium tuckeri*). *Vitis* **33**, 143-50.
- Eibach, R., Töpfer, R. Success in resistance breeding: "Regent" and its steps into the market. *Proceedings of the VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2003*. Kecskemet, Hungary: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 687-91.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R., 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*.
- Feechan, A., Kabbara, S., Dry, I.B., 2011. Mechanisms of powdery mildew resistance in the Vitaceae family. *Mol Plant Pathol* **12**, 263-74.
- Felle, H.H., Herrmann, A., Hanstein, S., Hückelhoven, R., Kogel, K.-H., 2004. Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 118-23.
- Ferrin, D.M., Ramsdell, D., 1977. Ascospore dispersal and infection of grapes by *Guignardia bidwellii*, the causal agent of grape black rot disease. *Phytopathology* **67**, 1501-5.
- Ferrin, D.M., Ramsdell, D., 1978. Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology* **68**, 892-5.
- Ficke, A., Gadoury, D.M., Seem, R.C., 2002. Ontogenic resistance and plant disease management: a case study of grape powdery mildew. *Phytopathology* **92**, 671-5.
- Ficke, A., Gadoury, D.M., Seem, R.C., Dry, I.B., 2003. Effects of Ontogenic Resistance upon Establishment and Growth of *Uncinula necator* on Grape Berries. *Phytopathology* **93**, 556-63.
- Ficke, A., Gadoury, D.M., Seem, R.C., Godfrey, D., Dry, I.B., 2004. Host Barriers and Responses to *Uncinula necator* in Developing Grape Berries. *Phytopathology* **94**, 438-45.
- Fothergill, P., Ashcroft, R., 1955a. Further nutritional studies of *Venturia inaequalis*. *Microbiology* **13**, 399-407.
- Fothergill, P., Ashcroft, R., 1955b. The nutritional requirements of *Venturia inaequalis*. *Microbiology* **12**, 387-95.
- Fung, R.W.M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P., Qiu, W., 2008. Powdery Mildew Induces Defense-Oriented Reprogramming of the Transcriptome in a Susceptible But Not in a Resistant Grapevine. *Plant Physiol* **146**, 236-49.
- Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Mansour, M., Ramming, D.W., Mackey, B.E., 2003. Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **93**, 1263-73.
- Gadoury, D.M., Seem, R.C., Ficke, A., Wilcox, W.F., 2003. Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. *Phytopathology* **93**, 547-55.
- Galet, P., 1977. *Les Maladies et les Parasites de la Vigne: Les champignons et les Virus*. Montpellier, France: Paysan du Midi.

- García-Maceira, F.I., Di Pietro, A., Huertas-González, M.D., Ruiz-Roldán, M.C., Roncero, M.I.G., 2001. Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2191-6.
- Gee, C.T., Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., 2008. Ontogenic Resistance to *Uncinula necator* Varies by Genotype and Tissue Type in a Diverse Collection of *Vitis* spp. *Plant disease* **92**, 1067-73.
- Genet, J., Steva, H., Vincent, O., Cazenave, C., 1997. A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO bulletin* **27**, 217-25.
- Gindro, K., Pezet, R., Viret, O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant physiology and biochemistry* **41**, 846-53.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V., 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**, 759-67.
- Gregersen, P., Thordal-Christensen, H., Förster, H., Collinge, D., 1997. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* sp. hordei (syn. *Erysiphe graminis* sp. hordei). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 85-97.
- Grinberg, A., Heath, I.B., 1997. Direct evidence for Ca²⁺ regulation of hyphal branch induction. *Fungal Genetics and Biology* **22**, 127-39.
- Gusberti, M., Gessler, C., Broggini, G.A., 2013. RNA-Seq analysis reveals candidate genes for ontogenic resistance in *Malus-Venturia* pathosystem. *PLoS One* **8**, e78457.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.-M., Mauch-Mani, B., 2005. β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 819-29.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The plant cell* **8**, 1773-91.
- Hankin, L., Anagnostakis, S., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* **67**, 597-607.
- Hansjakob, A., Riederer, M., Hildebrandt, U., 2011. Wax matters: absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11 mutant of maize compromises the prepenetration processes of *Blumeria graminis*. *Plant Pathology* **60**, 1151-61.
- Harris, S.D., 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia* **100**, 823-32.
- He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Guan, X., Yang, Y., Xu, W., Fu, Z., 2013. Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* **250**, 129-40.
- Heintz, C., Blaich, R., 1990. Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist* **115**, 107-17.
- Hoffman, L.E., Wilcox, W.F., 2002. Utilizing epidemiological investigations to optimize management of grape black rot. *Phytopathology* **92**, 676-80.
- Hoffman, L.E., Wilcox, W.F., Gadoury, D.M., Seem, R.C., 2002. Influence of Grape Berry Age on Susceptibility to *Guignardia bidwellii* and Its Incubation Period Length. *Phytopathology* **92**, 1068-76.
- Höll, J., 2014. *The R2R3 MYB Transcription Factors VvMYBB14 and VvMYB15 as Regulators of the Stilbene Biosynthesis in Vitis vinifera*: Universität Heidelberg Dissertation.
- Holz, B., 2003. Schwarzfäule der Rebe in Mosel-Saar-Ruwer: Plötzlich und unverhofft. *Das Deutsche Weinmagazin* **6**, 26-9.
- Holzappel, B., Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* **37**, 120-6.

- Hückelhoven, R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 101-27.
- Hückelhoven, R., 2014. The effective papilla hypothesis. *New Phytol* **204**, 438-40.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.-H., 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* **119**, 1251-60.
- Hückelhoven, R., Kogel, K.-H., 1998. Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 292-300.
- Ishiga, Y., Upplapatti, S., Mysore, K.S., 2013. Expression analysis reveals a role for hydrophobic or epicuticular wax signals in pre-penetration structure formation of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Signal Behav* **8**, e26959.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G.B., 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. *The plant cell* **15**, 2503-13.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P., 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-7.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2731-41.
- Jermini, M., Angst, A., Raynal, M., Gessler, C., Broggin, G., 2011. First study on the population genetic structure of *Guignardia bidwellii*. In: Agnès Calonnec CD, Cesare Gessler, Hanns-Heinz Kassemeyer, Michael Maixner, Denis Thiéry & Tirtza Zahavi, ed. *Proceedings of the IOBC-WPRS Working Group "Integrated Protection and Production in Viticulture"*, 2009. Staufen im Breisgau (Germany), 143-8.
- Jermini, M., Gessler, C., 1996. Epidemiology and control of grape black rot in southern Switzerland. *Plant disease* **80**, 322-5.
- Jeun, Y.C., Hwang, B.K., 1991. Carbohydrate, Amino acid, Phenolic and Mineral Nutrient Contents of Pepper Plants in Relation to Age-Related Resistance to *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* **131**, 40-52.
- Jha, G., Thakur, K., Thakur, P., 2009. The *Venturia* apple pathosystem: pathogenicity mechanisms and plant defense responses. *J Biomed Biotechnol* **2009**, 680160.
- Jiang, S., Park, P., Ishii, H., 2007. Ultrastructural study on scab resistance expressed in epidermal pectin layers of pear leaves. *Journal of General Plant Pathology* **73**, 314.
- Jiang, S., Park, P., Ishii, H., 2014. Penetration Behaviour of *Venturia nashicola*, Associated with Hydrogen Peroxide Generation, in Asian and European Pear Leaves. *Journal of Phytopathology* **162**, 770-8.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9.
- Jürges, G., Kassemeyer, H.H., Dürrenberger, M., Düggelin, M., Nick, P., 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* **11**, 886-98.
- Katalinić, V., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Teskera, A., Konta, I., Boban, M., 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **1**, 7-15.

- Kennelly, M.M., Gadoury, D.M., Wilcox, W.F., Magarey, P.A., Seem, R.C., 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* **95**, 1445-52.
- Kerby, K., Somerville, S., 1989. Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**, 323-37.
- Kienzle, E., Schrag, I., Butterwick, R., Opitz, B., 2001. Calculation of gross energy in pet foods: new data on heat combustion and fibre analysis in a selection of foods for dogs and cats. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **85**, 148-57.
- Kim, S.G., Kim, S.T., Wang, Y., Yu, S., Choi, I.S., Kim, Y.C., Kim, W.T., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kang, K.Y., 2011. The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants. *Molecules and cells* **31**, 25-31.
- Kim, S.T., Yu, S., Kang, Y.H., Kim, S.G., Kim, J.-Y., Kim, S.-H., Kang, K.Y., 2008. The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep* **27**, 593-603.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.
- Kofalvi, S., Nassuth, A., 1995. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**, 365-77.
- Kortekamp, A., 2005. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy. *Mycol Res* **109**, 640-8.
- Kortekamp, A., 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant physiology and biochemistry* **44**, 58-67.
- Kortekamp, A., Wind, R., Zyprian, E., 1997. The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis* **36**, 103-4.
- Kortekamp, A., Wind, R., Zyprian, E., 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *Journal of Plant Diseases and Protection* **105**, 475-88.
- Kortekamp, A., Wind, R., Zyprian, E., 1999. The role of hairs on the wettability of grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Vitis* **38**, 101-5.
- Kortekamp, A., Zyprian, E., 1999. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew on grape. *Journal of Phytopathology* **147**, 453-9.
- Kortekamp, A., Zyprian, E., 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J Plant Physiol* **160**, 1393-400.
- Kronvall, G., Myhre, E., 1977. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* **85**, 249-54.
- Kuo, K., Hoch, H., 1995. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. *Mycologia*, 759-71.
- Kuo, K., Hoch, H., 1996a. Germination of *Phyllosticta ampellicida* Pycnidiospores: Prerequisite of Adhesion to the Substratum and the Relationship of Substratum Wettability. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 18-29.
- Kuo, K., Hoch, H., 1996b. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia* **88**, 626-34.
- Lafon, R., Clerjeau, M., 1988. Downy Mildew. In: Pearson RC, Goheen AC, eds. *Compendium of Grape Diseases*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 11-3.
- Lamb, C., Dixon, R.A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology* **48**, 251-75.
- Latouche, G., Bellow, S., Poutaraud, A., Meyer, S., Cerovic, Z.G., 2013. Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. *Planta* **237**, 351-61.

- Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B., Maillot, P., 2010. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC plant biology* **10**, 184.
- Ledesma-Krist, G., Schumann, F., Maul, E., 2015. A population of wild grapevines (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris*) be found on the Rhine island Ketsch, southern Germany: a valuable genetic resource. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **66**, 106-18.
- Ledesma-Krist, G.M., Nick, P., Daumann, J., Maul, E., Dister, E., 2013. Safeguarding survival of the wild grapevine **Vitis vinifera** L. ssp. **silvestris** (C.C. Gmel.) Hegi in the Rhine river floodplain by specific *in situ*-management.
- Lipps, H., Harms, M., 2004. Schwarzfäule-Ein neues Problem. *Das Deutsche Weinmagazin* **11**, 10-3.
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A.K.M., 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 3-13.
- Liu, Y., Zhang, Z., Wang, X., Wang, S., Jia, H., Wang, H., Dong, C., Zhang, J., Tao, J., 2014. Function of VtPGIP in pathogenic fungus resistance of *Vitis thunbergii*. *African Journal of Biotechnology* **13**, 962-72.
- Loskill, B., Molitor, D., 2008. Ökologischer Weinbau: Regulierung der Schwarzfäule. *Das Deutsche Weinmagazin* **12**, 8-12.
- Loskill, B., Molitor, D., Koch, E., Harms, M., Berkelmann-Löhnertz, B., Hoffmann, C., Kortekamp, A., Porten, M., Louis, F., Maixner, M., 2009. Strategien zur Regulation der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau.
- Lott, H., Pfaff, F., Prior, B., 2010. *Taschenbuch der Rebsorten*. Mainz: Fachverl. Fraund.
- Lu, J., Zhang, Y., Wang, J. Genetic variation and mechanism of host resistance to Downy Mildew disease among oriental *Vitis* species. *Proceedings of the 6th Int. Workshop of Grapevine Downy and Powdery Mildew, 2010*. Bordeaux, France.
- Luttrell, E., 1974. Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* **66**, 1-15.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R., Moser, C., 2011. Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC plant biology* **11**, 114.
- Mayr, U., Michalek, S., Treutter, D., Feucht, W., 1997. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology* **145**, 69-75.
- Merz, P.R., 2014. *Die Untersuchung der Erkennung von Plasmopara viticola durch VRP1 Rezeptoren und der Regulation der Pathogenabwehr durch die Transkriptionsfaktoren VvWRKY33 und VvERF5 in der Weinrebe (Vitis sp.)*: Universität Heidelberg Dissertation.
- Merz, P.R., Moser, T., Höll, J., Kortekamp, A., Buchholz, G., Zyprian, E., Bogs, J., 2015. The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. *Physiologia plantarum* **153**, 365-80.
- Ministerium Für Umwelt, E., Ernährung Und Forsten Rheinland Pfalz, 2014. Rheinland-Pfalz – Öko-Weinbauland Nr.1. In.
- Mishra, A.K., Sharma, K., Misra, R.S., 2012. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of plant interactions* **7**, 95-120.
- Mohr, H.D., Herrmann, J.V., 2005. *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Molitor, D., 2009. *Studies on biology and control of black rot (Guignardia bidwellii) of vines*: Justus-Liebig-Universität Gießen Dissertation.
- Molitor, D., Baus, O., Berkelmann-Löhnertz, B., 2010. Schwarzfäule-was gibt es Neues? *Das Deutsche Weinmagazin*, 26-34.
- Molitor, D., Baus, O., Berkelmann-Löhnertz, B., 2011. Protective and curative grape black rot control potential of pyraclostrobin and myclobutanil. *Journal of Plant Diseases and Protection* **118**, 161-7.

- Molitor, D., Berkelmann-Loehnertz, B., 2011. Simulating the susceptibility of clusters to grape black rot infections depending on their phenological development. *Crop Protection* **30**, 1649-54.
- Molitor, D., Beyer, M., 2014. Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications—a review. *Annals of Applied Biology* **165**, 305-17.
- Molitor, D., Liermann, J.C., Berkelmann-Lohnertz, B., Buckel, I., Opatz, T., Thines, E., 2012. Phenguignardic acid and guignardic acid, phytotoxic secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *J Nat Prod* **75**, 1265-9.
- Müller, E., Kadisch, E., Schulze, G., Walg, O., 1999. *Der Winzer Band 1 Weinbau*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Müller, M., 2014. *Untersuchungen zum frühen Infektionsvorgang des Erregers des Falschen Mehltaus (Plasmopara viticola) an unterschiedlich resistenten Reben (Vitis spec.): Universität Hohenheim Masterarbeit*.
- Müller, M., Merz, P.R., Buchholz, G., Bogs, J., Kortekamp, A. Early events in the interaction between grapevine (*Vitis vinifera*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Proceedings of the 7th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew, 2014*. Vitoria/Gasteiz.
- Muñoz, J., Cortés, J.C.G., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J.A., Moreno, M.B., Martins, I.M., Pérez, P., Ribas, J.C., 2013. Extracellular cell wall β (1, 3) glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *The Journal of cell biology* **203**, 265-82.
- Ocete, R., Arroyo-Garcia, R., Morales, M., Cantos, M., Gallardo, A., Pérez, M., Gómez, I., López, M., 2015. Characterization of *Vitis vinifera* L. subspecies *sylvestris* (Gmelin) Hegi in the Ebro river Basin (Spain). *Vitis* **50**, 11-6.
- Ortega, F., Steiner, U., Dehne, H.W., 1998. Induced resistance to apple scab: Microscopic studies on the infection cycle of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Journal of Phytopathology* **146**, 399-405.
- Palin, R., Geitmann, A., 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystems* **109**, 397-402.
- Paolocci, M., Mugano, M., Alonso-Villaverde, V., Gindro, K., 2014. Leaf morphological characteristics and stilbene production differently affect downy mildew resistance of *Vitis vinifera* varieties grown in Italy. *Vitis* **53**, 155-61.
- Park, P., Ishii, H., Adachi, Y., Kanematsu, S., Ieki, H., Umemoto, S., 2000. Infection Behavior of *Venturia nashicola*, the Cause of Scab on Asian Pears. *Phytopathology* **90**, 1209-16.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sellappan, S., Krewer, G., 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5497-503.
- Pearson, R.C., 1988. Powdery Mildew. In: Pearson RC, Goheen AC, eds. *Compendium of Grape Diseases*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 9-11.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'connell, R.J., Green, J.R., 1999. Colletotrichum: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology* **27**, 186-98.
- Pertot, I., Vecchione, A., Musetti, R., Grando, M.S., Zulini, L. Expression of hypersensitive reaction to *Plasmopara viticola* infection on a grapevine segregating population. In: Lozzia C, ed. *Proceedings of the IOBC/WPRS working group 'Integrated Protection and Production in Viticulture' 18.-22. März 2003*. Volos, Greece, 51-7.
- Pettolino, F.A., Walsh, C., Fincher, G.B., Bacic, A., 2012. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols* **7**, 1590-607.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004a. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**, 145-8.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Spring, J.-L., 2004b. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 297-303.

- Pezet, R., Jermini, M., 1989. Le Black-Rot de la vigne: symptômes, épidémiologie et lutte. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **21**, 27-34.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, 1-10.
- Pierron, R.J., Pouzoulet, J., Couderc, C., Judic, E., Compant, S., Jacques, A., 2016. Variations in early response of grapevine wood depending on wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Frontiers in plant science* **7**, 268.
- Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M., Polverari, A., 2010. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC genomics* **11**, 117.
- Pratt, C., Goffinet, M.C., Welser, M.J., 1984. Powdery mildew of *Vitis*: Papillae (wall appositions) as a host response to infection. *Vitis* **23**, 225-9.
- Qiu, W., Feechan, A., Dry, I., 2015. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Hortic Res* **2**, 15020.
- Ramsdell, D.C., Milholland, R.D., 1988. Black Rot. In: Pearson RC, Goheen AC, eds. *Compendium of Grape Diseases*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 15-7.
- Rehn, S., 2011. *Untersuchungen zur Widerstandsfähigkeit europäischer Wildreben gegenüber wirtschaftlich wichtigen pilzlichen Schaderregern*: Forschungsanstalt Geisenheim Bachelorarbeit.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC plant biology* **6**, 27.
- Rex, F., 2012. *Resistenz gegen die Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) in der Weinrebe (*Vitis spec.*) – Etablierung phänotypischer Erfassungsmethoden und genetische Kartierung von Resistenzloci*: Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Dissertation.
- Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Topfer, R., 2014. QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock 'Borner' (*V. riparia* Gm183 x *V. cinerea* Arnold). *Theor Appl Genet* **127**, 1667-77.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E., 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The plant cell* **12**, 707-19.
- Rogers, L.M., Kim, Y.-K., Guo, W., González-Candelas, L., Li, D., Kolattukudy, P.E., 2000. Requirement for either a host-or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9813-8.
- Romao, A., Sposito, M., Andreote, F., Azevedo, J., Araujo, W., 2011. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genetics and Molecular Research* **10**, 243-52.
- Roncero, C., 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* **41**, 367-78.
- Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* **117**, 465-72.
- Schäfer, J., Brett, A., Trierweiler, B., Bunzel, M., 2016. Characterization of Cell Wall Composition of Radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) and Maturation Related Changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 8625-32.
- Schmidt, O., 1994. *Holz-und Baumpilze: Biologie, Schäden, Schutz, Nutzen*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W., Crous, P.W., 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* **98**, 1041-52.

- Schröder, S., Kortekamp, A. European wild grapes - Genetic relations and susceptibility to fungal pathogens. In: Calonnec A, Delmotte F, Emmet B, et al., eds. *Proceedings of the 6th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew, 4-9 Jul 2010, 2010*. Bordeaux; France, 27-8.
- Schröder, S., Kortekamp, A., Heene, E., Daumann, J., Valea, I., Nick, P., 2015. Crop wild relatives as genetic resources – the case of the European wild grape. *Canadian Journal of Plant Science* **95**, 905-12.
- Schultz, H.-R., Stoll, M., 2015. *Deutsches Weinbaujahrbuch 2016*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Schulze-Lefert, P., Panstruga, R., 2003. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 641-67.
- Shaw, B.D., Hoch, H.C., 2000. Ca²⁺ regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. *Fungal Genet Biol* **31**, 43-53.
- Shaw, B.D., Kuo, K., Hoch, H.C., 1998. Germination and Appressorium Development of *Phyllosticta ampellicida* Pycnidiospores. *Mycologia* **90**, 258-68.
- Simon, T.E., Le Cointe, R., Delarue, P., Morliere, S., Montfort, F., Herve, M.R., Poggi, S., 2014. Interplay between parasitism and host ontogenic resistance in the epidemiology of the soil-borne plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *PLoS One* **9**, e105159.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 152-78.
- Sivanesan, A., Holliday, P., 1981. *Guignardia bidwellii*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* **710**.
- Sivanesan, A., Waller, J., Mordue, J., 1974. *Venturia inaequalis*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* **401**.
- Spotts, R., 1980. Infection of grape by *Guignardia bidwellii*: factors affecting lesion development, conidial dispersal, and conidial populations on leaves. *Phytopathology* **70**, 252-5.
- Spotts, R.A., 1977. Effect of leaf wetness duration and temperature on the infectivity of *Guignardia bidwellii* on grape leaves. *Phytopathology* **67**, 1378-81.
- Spring, J.L., 2001. First experiences with the interspecific grape varieties Merzling, Johanniter, Bronner and Solaris in Western Switzerland. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* **33**, 57-64.
- Stadnik, M., Buchenauer, H., 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**, 25-34.
- Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J.G., Kok, M.T., Pijnenburg, M., Recourt, K., Derksen, J., Voragen, A.G., 1999. Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiol* **121**, 363-72.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Tattersall, D.B., Van Heeswijk, R., Hoj, P.B., 1997. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol* **114**, 759-69.
- Taware, P.B., Dhumal, K.N., Oulkar, D.P., Patil, S.H., Banerjee, K., 2010. Phenolic alterations in grape leaves, berries and wines due to foliar and cluster powdery mildew infections. *Int. J. Pharm. Biol. Sci* **1**, 1-14.
- Terhune, B., Hoch, H., 1993. Substrate hydrophobicity and adhesion of *Uromyces* urediospores and germlings. *Experimental Mycology* **17**, 241-52.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**, 1187-94.
- Tisch, C., Nick, P., Kortekamp, A., 2013. Von wilden Reben lernen - Natürliche Resistenzen gegen die Schwarzfäule. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **65**, 118-22.

- Toffolatti, S.L., Venturini, G., Maffi, D., Vercesi, A., 2012. Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. *BMC plant biology* **12**, 124.
- Töpfer, R., Maul, E., Eibach, R., 2011. Geschichte und Entwicklung der Rebenzüchtung auf dem Geilweilerhof. *Schriften zur Weingeschichte* **Nr 172**.
- Trujillo, M., Kogel, K.-H., Hückelhoven, R., 2004. Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 304-12.
- Udilova, N., 1999. *Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen*: Humboldt-Universität zu Berlin Dissertation.
- Ullrich, C.I., Kleespies, R.G., Enders, M., Koch, E., 2009. Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal für Kulturpflanzen* **61**, 82-90.
- Van Den Brink, J., De Vries, R.P., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology* **91**, 1477-92.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135-62.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Demattè, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Van De Peer, Y., Salamini, F., Viola, R., 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS One* **2**, e1326.
- Voigt, C.A., 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front Plant Sci* **5**, 168.
- Von Röpenack, E., Parr, A., Schulze-Lefert, P., 1998. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* **273**, 9013-22.
- Walz, A., 2005. *Oxalsäure, reaktive Sauerstoffverbindungen und Zelltodmechanismen in der Pathogenese von Sclerotinia sclerotiorum an Nicotiana tabacum L.*: Universität Hohenheim Dissertation.
- Weber, B., Hoesch, L., Rast, D.M., 1995. Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry* **40**, 433-7.
- Wefers, D., Bunzel, M., 2015. Characterization of Dietary Fiber Polysaccharides from Dehulled Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Seeds. *Cereal Chemistry* **92**, 598-603.
- Werneck, H.L., 1955. Kahlschlag und Fichtenreinkultur- Die Ursachen zum Untergange der Wildobsthölzer und damit des Obstbaues auf bodenständigen Unterlagen. *Acta ZooBot Austria* **95**, 88-103.
- Wikee, S., Lombard, L., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Cheewangkoon, R., Mckenzie, E.H., Hyde, K.D., Crous, P.W., 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). *Stud Mycol* **76**, 1-29.
- Wilson, C.L., Jumper, G.A., Mason, D.L., 1978. Acridin Orange as a Lysosome Marker in Fungal Spores. *Cytology and Histology* **68**, 1564-7.
- Wyatt, S.E., Pan, S.Q., Kuć, J., 1991. β -1, 3-Glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 433-40.
- Xu, T.-F., Zhao, X.-C., Jiao, Y.-T., Wei, J.-Y., Wang, L., Xu, Y., 2014. A pathogenesis related protein, VpPR-10.1, from *Vitis pseudoreticulata*: An insight of its mode of antifungal activity. *PLoS One* **9**, e95102.
- Yamamoto, M., Nakatsuka, S., Otani, H., Kohmoto, K., Nishimura, S., 2000. (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* **90**, 595-600.

Zdunić, G., Preece, J.E., Aradhya, M., Velasco, D., Koehmstedt, A., Dangl, G.S., 2015. Genetic diversity and differentiation within and between cultivated (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) and wild (*Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*) grapes. *Vitis* **52**, 29-32.

7 Anhang

Anhang I: Auflistung der verschiedenen Europäischen Wildrebenakzessionen

Tabelle A1: Bezeichnung der verwendeten Europäischen Wildreben und deren Herkunft.

Wildrebenbezeichnung (Akzession)	Herkunft	Wildrebenbezeichnung (Akzession)	Herkunft
Co5	Rheinaue bei Colmar	K76	Halbinsel Ketsch
HÖ17	Hördt	K77	Halbinsel Ketsch
HÖ29	Hördt	K78	Halbinsel Ketsch
K2	Halbinsel Ketsch	K79	Halbinsel Ketsch
K7	Halbinsel Ketsch	K81	Halbinsel Ketsch
K10	Halbinsel Ketsch	K82	Halbinsel Ketsch
K11	Halbinsel Ketsch	K83	Halbinsel Ketsch
K12	Halbinsel Ketsch	K84	Halbinsel Ketsch
K13	Halbinsel Ketsch	K86	Halbinsel Ketsch
K15	Halbinsel Ketsch	K87	Halbinsel Ketsch
K16	Halbinsel Ketsch	K88	Halbinsel Ketsch
K17	Halbinsel Ketsch	K89	Halbinsel Ketsch
K18	Halbinsel Ketsch	K90	Halbinsel Ketsch
K20	Halbinsel Ketsch	K91	Halbinsel Ketsch
K22	Halbinsel Ketsch	K92	Halbinsel Ketsch
K24	Halbinsel Ketsch	K93	Halbinsel Ketsch
K26	Halbinsel Ketsch	K94	Halbinsel Ketsch
K27	Halbinsel Ketsch	K95	Halbinsel Ketsch
K28 a	Halbinsel Ketsch	K96	Halbinsel Ketsch
K28 b	Halbinsel Ketsch	K98	Halbinsel Ketsch
K28 c	Halbinsel Ketsch	K99	Halbinsel Ketsch
K30	Halbinsel Ketsch	K100	Halbinsel Ketsch
K32	Halbinsel Ketsch	K101	Halbinsel Ketsch
K33	Halbinsel Ketsch	K1016	Halbinsel Ketsch
K34	Halbinsel Ketsch	K103	Halbinsel Ketsch
K35	Halbinsel Ketsch	K104	Halbinsel Ketsch
K36	Halbinsel Ketsch	K105	Halbinsel Ketsch
K38	Halbinsel Ketsch	K106	Halbinsel Ketsch
K39	Halbinsel Ketsch	K107	Halbinsel Ketsch
K42	Halbinsel Ketsch	K108	Halbinsel Ketsch
K44 a	Halbinsel Ketsch	K109	Halbinsel Ketsch
K47	Halbinsel Ketsch	K110	Halbinsel Ketsch
K48	Halbinsel Ketsch	K112	Halbinsel Ketsch
K51	Halbinsel Ketsch	K114	Halbinsel Ketsch
K53	Halbinsel Ketsch	K115	Halbinsel Ketsch
K54	Halbinsel Ketsch	K116	Halbinsel Ketsch
K56	Halbinsel Ketsch	K118	Halbinsel Ketsch
K58	Halbinsel Ketsch	K119	Halbinsel Ketsch
K61	Halbinsel Ketsch	K120	Halbinsel Ketsch
K71	Halbinsel Ketsch	K2DLR	Halbinsel Ketsch
K74	Halbinsel Ketsch	RM02	Römerberg
K75	Halbinsel Ketsch		

Anhang II: Zeitlicher Verlauf des Wachstums und Substratabbaus des Schwarzfäuleisolats 8088-2

Zur Bestimmung des optimalen Untersuchungszeitpunktes wurde sowohl das Koloniewachstum als auch der Substratabbau auf den verschiedenen zu testenden Nährmedien zu den Zeitpunkten 3, 5, 10, 15 und 20 Tage nach Inokulation verglichen.

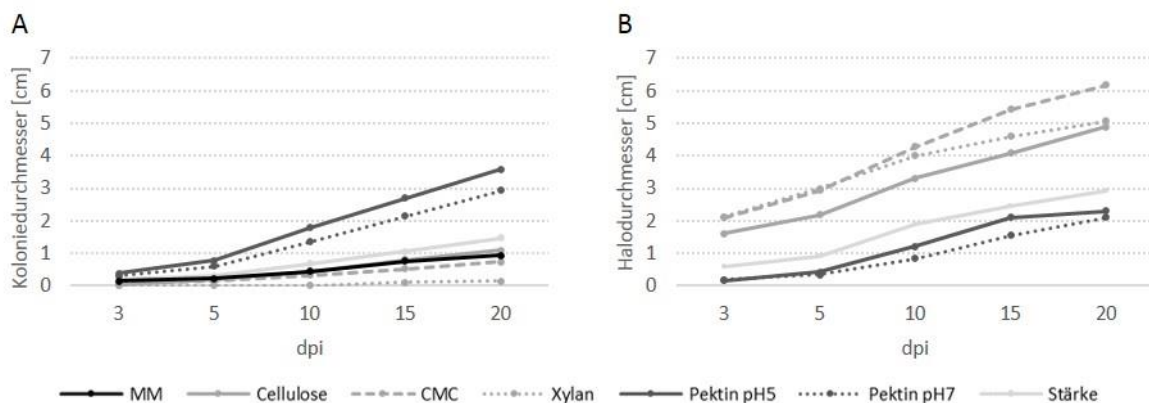


Abbildung A1. Zeitlicher Verlauf des Wachstums und des Substratabbaus angegeben als Kolonie- und Halodurchmesser des Schwarzfäuleisolats 8088-2 auf Minimalmedium und Minimalmedium versetzt mit verschiedenen Kohlenstoffquellen wie Cellulose, CMC, Hemicellulose (Xylan), Stärke und Pektin (justiert auf pH 5 und 7).

Anhang III: Kalibrierkurven für die kolorimetrische Gesamtphenolbestimmung mit Hilfe des FC-Tests

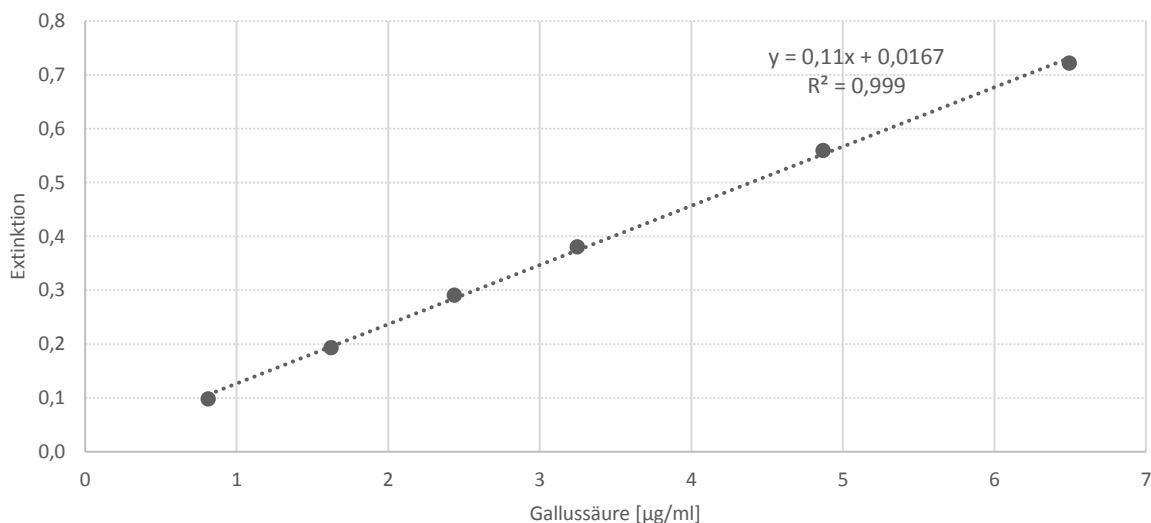


Abbildung A2. Kalibrierkurve mit Gallussäure zur Quantifizierung der freien Phenole nach Folin-Ciocalteu bei einer Wellenlänge von 720 nm. Angegeben ist die Funktion der Trendlinie und das Bestimmtheitsmaß R^2 .

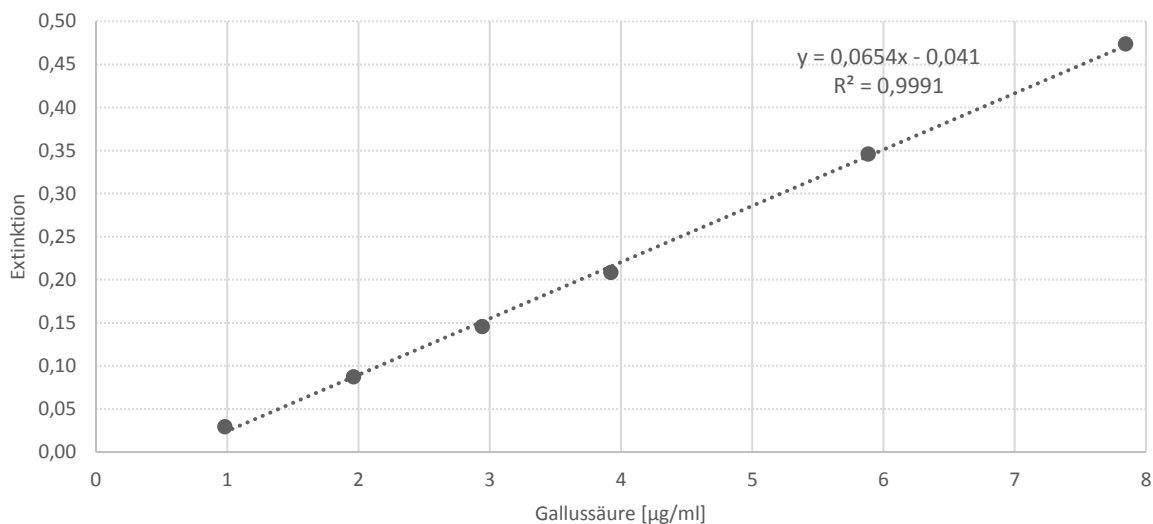


Abbildung A3. Kalibrierkurve mit Gallussäure zur Quantifizierung der zellwandgebundenen Phenole nach Folin-Ciocalteu bei einer Wellenlänge von 720 nm. Angegeben ist die Funktion der Trendlinie und das Bestimmtheitsmaß R^2 .

Anhang IV: Ergänzende Chromatogramme zur Bestimmung phenolischer Verbindungen mittels HPLC

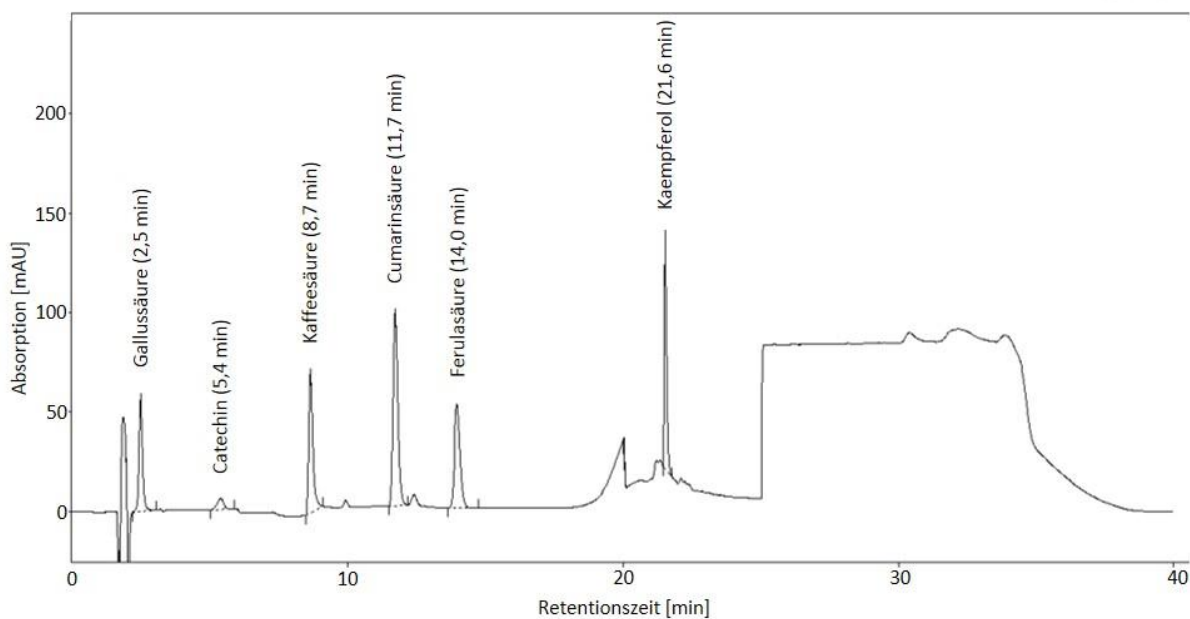


Abbildung A4. Chromatogramm aus der Kalibrierung mit externen Standards für Gallussäure, Catechin, Kaffeesäure, *p*-Coumarsäure, Ferulasäure und Kaempferol. Die Konzentrationen der Standards betragen jeweils 5 µg/ml. Gemessen wurde in Messfenstern wie in Tabelle 7 angegeben, die die Absorptionsmaxima der jeweiligen Standards widerspiegeln.

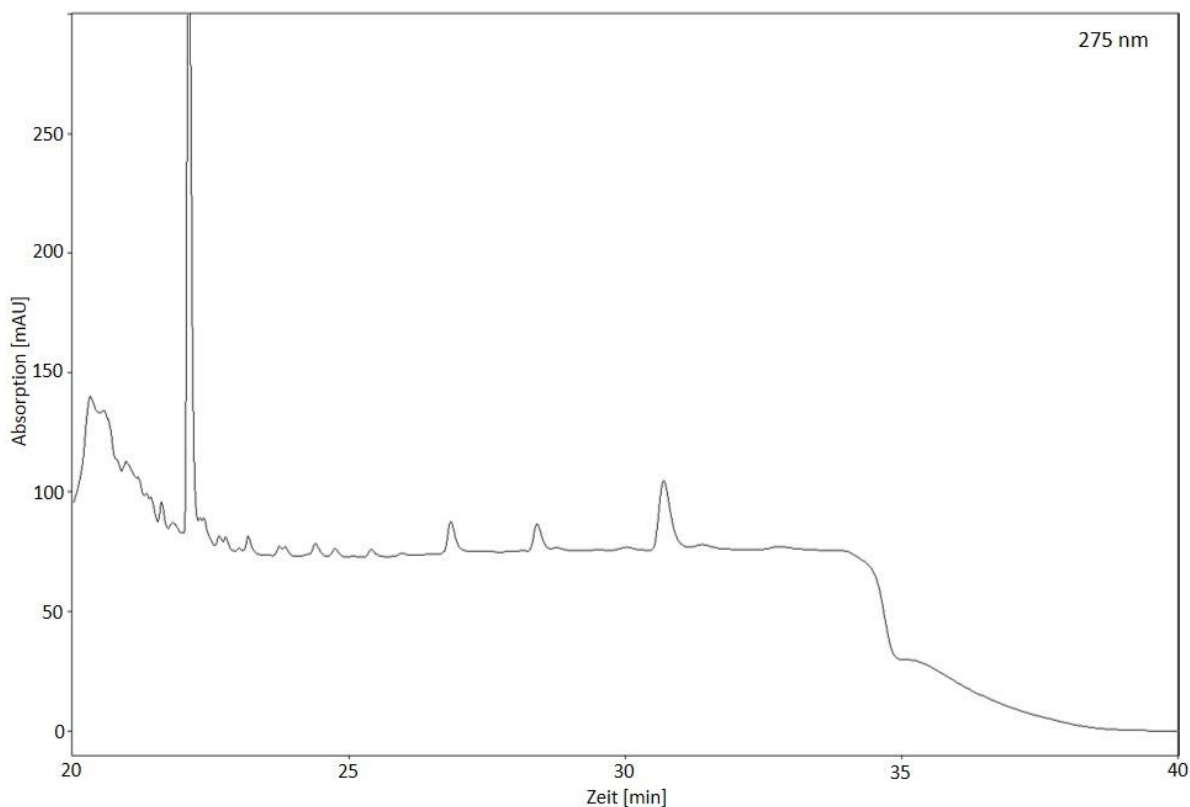


Abbildung A5. Chromatogrammausschnitt von 20 bis 40 min der Extrakte der freien Phenole der Wildrebe K16 infiziert mit dem Erreger der Schwarzfäule 6 dpi, dargestellt bei einer Wellenlänge von 275 nm.

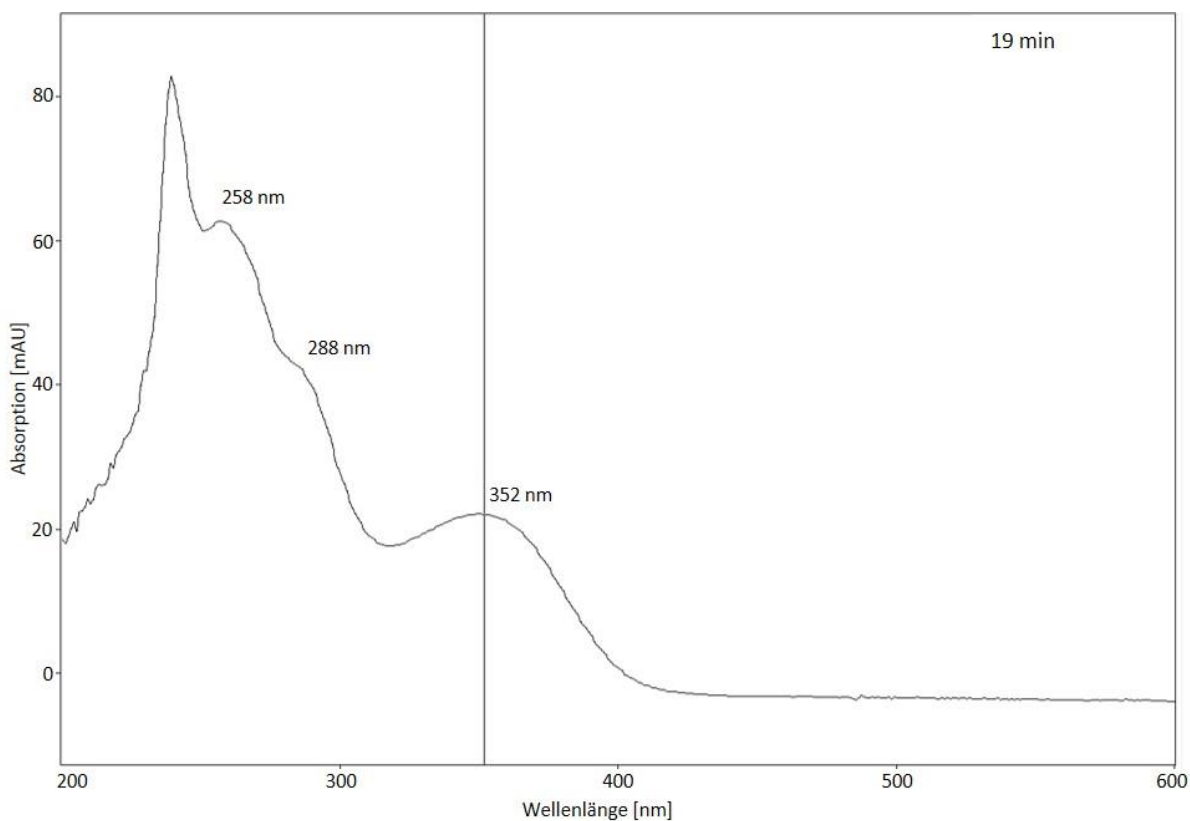


Abbildung A6. UV-Spektrum von Peak Nummer 8 aus der Peakanalyse der freien Phenole bei einer Retentionszeit von 19 min und den Absorptionsmaxima bei 258, 288 und 352 nm.

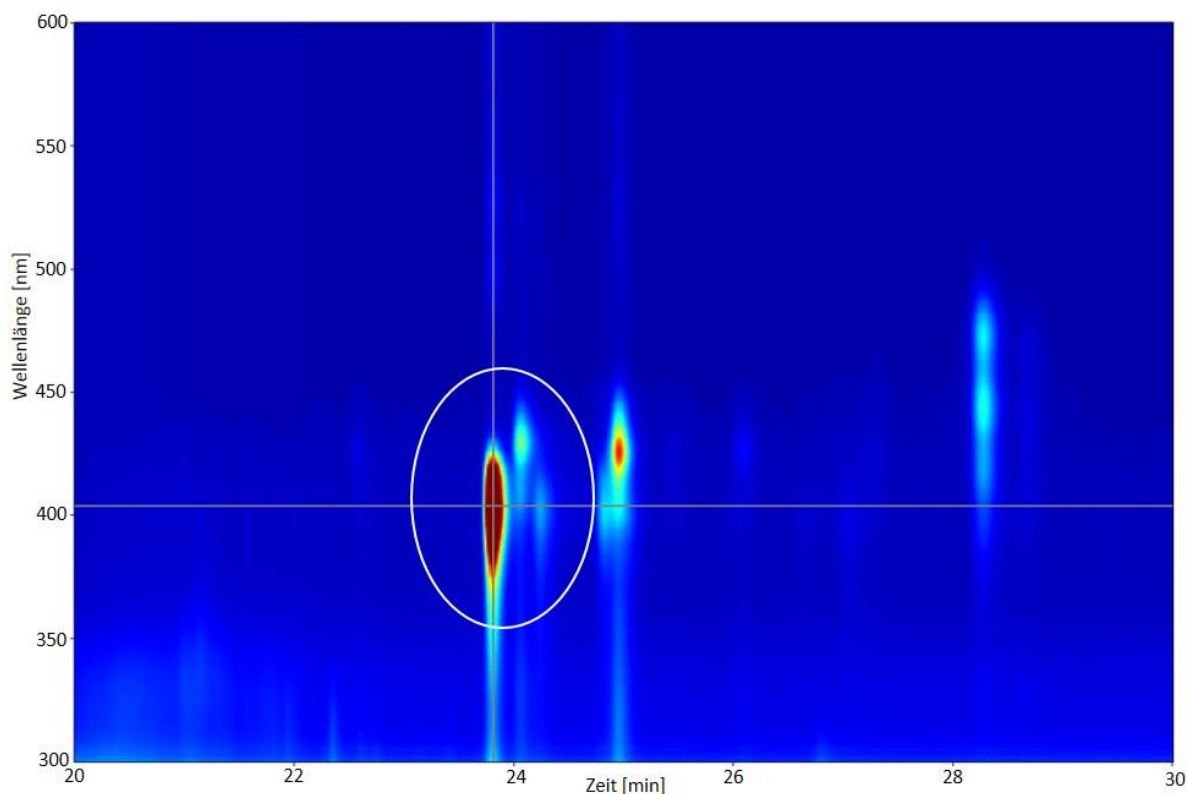


Abbildung A7. Isoplot-Ansicht von Peak Nummer 5 aus der Peakanalyse zu den zellwandgebundenen Phenolen im Wellenlängenbereich von 300 bis 600 nm, bei einer Retentionszeit von etwa 24 min. Die drei farbigen bzw. hellen Flecken (eingekreist), sind deutlich voneinander abgegrenzt und weisen daher auf drei unterschiedliche Substanzen hin, die im Chromatogramm (Abbildung 37) jedoch zu einem Dreifachpeak verschmelzen.

Anhang V: Vollständige Ergebnisse der Monosaccharid- und Methylierungsanalyse

Tabelle A2. Monosaccharidanalyse der jeweils vierten Blattetage der Genotypen 'M-Th', 'Solaris', 'Börner' und K16 nach Hydrolyse mittels Schwefelsäure (H_2SO_4) und Methanolyse.

Monosaccharide [%]	Hydrolyse mittels H_2SO_4				Methanolyse			
	M-Th	Solaris	Börner	K16	M-Th	Solaris	Börner	K16
Fucose	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
Rhamnose	3,3	2,9	2,8	2,5	7,4	7,4	6,4	5,7
Arabinose	14,3	12,4	10,7	8,2	21,2	20,6	15,5	12,2
Galactose	17,8	16,5	15,0	12,9	25,3	25,3	20,5	17,8
Glucose	42,0	44,3	49,9	56,4	20,7	20,2	34,2	43,6
Xylose	5,8	5,9	5,8	5,9	7,1	7,1	6,3	5,4
Mannose	4,8	5,0	4,8	4,2	3,9	4,1	3,4	2,8
Glacturonsäure	9,4	10,3	8,8	8,3	11,2	12,4	11,2	10,4
Glucuronsäure	2,6	2,7	2,1	1,6	3,1	3,0	2,5	2,0

Tabelle A3. Methylierungsanalyse der jeweils vierten Blattetage der Genotypen M-T, ‘Solaris’, ‘Börner’ und K16. t = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, Rha = Rhamnose, Xyl = Xylose, Glc = Glucose, Man = Mannose, f = Furanose, p = Pyranose. Die Zahlen repräsentieren die Positionen an denen die jeweiligen Monomereinheiten substituiert sind.

Strukturelemente [%]	M-Th	Solaris	Börner	K16
t-Araf	11,4	9,5	7,7	6,6
t-Arap	1,7	1,1	0,7	0,9
1,5-Araf	6	6,8	4,7	3,1
1,3,5-Araf	4,2	3,5	4	4,5
1,2,5-Araf	0,4	0,5	0,4	0,2
1,2,3,5-Araf	0,9	0,8	0,5	0,1
t-Galp	2,3	2,1	1,7	1,6
1,4-Galp	2,4	2,6	2,4	1,9
1,3-Galp	0,4	0,3	0,3	0,1
1,6-Galp	0,3	0,4	0,3	0,2
1,3,6-Galp	2,6	2,3	1,8	0,9
1,2-Rhap	0,6	0,6	0,5	0,4
1,2,4-Rhap	0,5	0,6	0,3	0,3
t-Xylp	3,9	3,5	3,5	2,9
1,4-Xylp	6,1	6	5,4	5
1,2-Xylp	1,8	1,7	1,8	1,4
t-Glcp	2,6	2,2	3,1	4
1,4-Glcp	44,8	48,3	52,7	59,1
1,4,6-Glcp	3,7	3,8	4,6	4
t-Manp	0,5	0,5	0,5	0,3
1,4-Manp	2,9	3	3,1	2,5

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Biologie der Schwarzfäule an Reben und potentielle Abwehrmechanismen bei der Europäischen Wildrebe und verschiedenen resistenten Sorten“ selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Inhalte, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Arbeiten entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Peter Nick für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas und die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Eva Zyprian danke ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Andreas Kortekamp für seine fachlich kompetente und menschlich sehr angenehme Betreuung! Lieber Andreas, ich danke Dir für deine Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und vielen Ideen hinsichtlich Methodik und Ergebnisinterpretation, das vertrauensvolle Verhältnis gespickt mit viel Ironie und Humor, für deine Motivation und dein Empathievermögen, und letztlich für deine Geduld und Mühe! DANKE

Ein weiterer sehr großer Dank geht an meine Kollegen der Arbeitsgruppe Mykologie. Vor allem Doris Dersch-Fischer, Adelinde Andrae und Maja Kube für die Hilfe bei verschiedenen Versuchen oder deren Fortführung während meines Mutterschutzes. Ebenfalls gilt mein Dank Tabitha Kellerer, Rainer Rueff und Constanze Mesca! Ich danke euch für eure Hilfsbereitschaft, die offene und ehrliche Zusammenarbeit und das herzliche, familiäre Verhältnis.

Liebe Martina, auch dir möchte ich danken; für viele gute und inspirierende Diskussionen und Gespräche, sowohl hinsichtlich fachlicher als auch lebensorientierter Fragen.

Auch der Arbeitsgruppe Analytik möchte ich an dieser Stelle für diverse Nachhilfeeinheiten im Fach Chemie und Diskussionen rund um die Analyse phenolischer Verbindungen danken! Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Michael Twertek, für seinen unermüdlichen Einsatz, Ideenreichtum und große Hilfsbereitschaft!

Danke auch an alle anderen Mitarbeiter der Abteilung Phytomedizin, vor allem Martin Sauerhöfer für seine Hilfe im Gewächshaus. Darüber hinaus danke ich Herrn Jutzi für die Beantwortung vieler Fragen rund um die Statistik und Dr. Claudia Huth für die Durchsicht des Ergebnisteils und konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Günther Buchholz, Prof. Bogs, Patrick Merz, Birgit Eisenmann und Christian Vogelei für fruchtbare Gespräche und Diskussionen.

Herzlichen Dank auch an Herrn Joachim Daumann vom Botanischen Garten in Karlsruhe für die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit.

Auch bei Dr. Daniel Wefers und Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel der AG Lebensmittelchemie und Phytochemie des KIT Karlsruhe möchte ich mich für die Zellwandanalysen bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich vor allem meiner Familie, aber auch Jochen und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihr Vertrauen und Verständnis bedanken! Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Aber auch Anne und Reinhold gilt großer Dank, die mir immer wieder den Rücken freigehalten und so Zeit zum Schreiben verschafft haben.