

Nutzung genetischer Ressourcen der Europäischen Wildrebe für die Züchtung von Mehltau- und Schwarzfäule-resistenten Reben

Using the gene pool of European Wild Grapes for cross-breeding to obtain resistant grapes
against Mildew and Blackrot

FKZ: 10OE067, 10OE113 und 10OE114

Projektnehmer (Koordination des Verbundvorhabens):

Karlsruher Institut für Technologie
Botanisches Institut
Fritz-Haber-Weg 4, 76131 Karlsruhe
Tel.: +49 721 608 42144
Fax: +49 721 608 44193
E-Mail: peter.nick@kit.edu
Internet: www.botanik.kit.edu/botzell/index.php

Autoren:

Nick, Peter; Kortelkamp, Andreas; Eibach, Rudolf; Trapp, Oliver

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere
Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse
und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam.
Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer
Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Peter Nick (KIT), Dr. Andreas Kortekamp (DLR), Dr. Rudolf Eibach (JKI)	Förderkennzeichen: FKZ 10OE067 Einzelkennung: 2810OE067, 2810OE113, 2810OE114
---	--

Vorhabenbezeichnung: (Thema)

Nutzung genetischer Ressourcen der Europäischen Wildrebe für die Züchtung von Mehltau- und Schwarzfäule-resistenten Reben

Laufzeit des Vorhabens:

Laufzeit: 01.08.2011 bis 31.07.2014

Verlängerte Laufzeit 01.08.2014 bis 30.04.2017

Prof. Dr. Peter Nick,

Botanisches Institut, Karlsruher Institut für Technologie, Fritz-Haber-Weg 4, 76128 Karlsruhe,
Tel. 0721-608 42144 (Skr. 42142), Fax 0721-608 44193
peter.nick@kit.edu, <http://www.botanik1.uni-karlsruhe.de/Nick-Lab/index.php>

Dr. Andreas Kortekamp,

Abt. Phytomedizin, Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Breitenweg 71,
67435 Neustadt a. d. W., Tel. 06321-672337, Fax 06321-671387
andreas.kortekamp@dlr.rlp.de

Dr. Rudolf Eibach,

Julius-Kühn-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Tel. 06345-41118
rudolf.eibach@jki.bund.de
(seit 01.04.2017 im Ruhestand, Nachfolger Dr. Oliver Trapp, oliver.trapp@jki.bund.de)



Karlsruhe, 27. Mai 2017

Prof. Dr. Peter Nick

Kurzfassung

Zur Bekämpfung der Schwarzfäule werden im ökologischen Weinbau nach wie Kupfer- oder Schwefelpräparate eingesetzt. Als Alternative sollte das Potential der Europäischen Wildrebe (*Vitis sylvestris*) für die Resistenzzüchtung untersucht werden. Dies würde zum einen die natürliche Artbarriere respektieren und neue Resistenzquellen für eine nachhaltige Pyramidisierung erschließen. Grundlage war eine im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebenssicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes *in-situ* Management“ im Botanischen Garten des KIT etablierte Sammlung von *V. sylvestris*, die nach derzeitigem Kenntnisstand die in Deutschland für diese Art noch vorhandene genetische Diversität vollständig abbildet. In dieser Sammlung waren Hinweise auf Resistenzen gegen die Rebenkrankheiten Falscher Mehltau, Echter Mehltau und Schwarzfäule entdeckt worden. Diese Population wurde sehr detailliert in Bezug auf Resistenz gegenüber Schwarzfäule, Falschem Mehltau, Echem Mehltau, anatomischen und chemischen Merkmalen, und genetisch mit 5-10 hochauflösenden Mikrosatellitenmarkern je Chromosom kartiert. Für zwei interessante *sylvestris* Genotypen konnten umfangreiche Kreuzungspopulationen mit *vinifera* erzeugt werden. Weiterhin wurden für die Schwarzfäule viele Aspekte der Infektion aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass während der biotrophen Phase Pektine aus der Zellwand des Wirts als Nahrungsquelle genutzt werden, und dass die bessere Altersresistenz einiger *sylvestris* Genotypen mit Modifikationen des Pektins zusammenhängt und ein interessantes Ziel für die Resistenzzüchtung darstellen könnten. Weiterhin konnten für zwei Beispiele von nichtamerikanischen Wildreben molekulare Mechanismen aufgezeigt werden, die zu einer wirkungsvolleren basalen Immunität gegen Falschen oder Echten Mehltau führen. Das Projekt legt damit die Grundlage für die Erschließung unserer heimischen Wildrebe *V. sylvestris* als genetische Ressource für den nachhaltigen Weinbau der Zukunft.

Summary

Black Rot is controlled in ecological viticulture by copper or sulphur preparations. As alternative strategy, the potential of the European Wild Grape (*Vitis sylvestris*) for resistance breeding should be investigated. This would allow to respect the natural species barrier and to find new resistance sources for a sustainable pyramidisation. Start point was a collection of *V. sylvestris*, established in the Botanical Garden of the KIT in frame of the BLE project „Safeguard of the Wild Grape in the Alluvial Rhine Woods by targeted *in-situ* management“. This collection represents, to the best of our knowledge, the current genetic diversity in Germany for this species. In this collection resistance against the grape pests Downy and Powdery Mildew, and Black Rot have been discovered. This population was mapped in great detail with respect to resistance against these pests, but also anatomical and chemical traits, as well as genetically by 5-10 highly variable microsatellite markers per chromosome. For two promising *sylvestris* genotypes extensive crossing populations with *vinifera* could be established. Further, many aspects of Black Rot infection could be elucidated. For instance, it was shown that during the biotrophic stage, pectins from the host cell wall are used as carbon source, and that the superior age resistance of several *sylvestris* genotypes is linked with pectin modifications, providing interesting targets for resistance breeding. Further, for two non-American grapes molecular mechanisms enhancing basal immunity against Downy or Powdery Mildew were demonstrated. The project, thus, paves the way for future exploitation of the European Wild Grape as genetic resource for the sustainable viticulture of the future.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einführung	
I.1.	Gegenstand des Vorhabens	5
I.2.	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen	5
I.3.	Planung und Ablauf des Projekts	6
II.	Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde	
II.1.	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens	7
II.2.	Eigene Vorarbeiten	8
II.3.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	8
III.	Material und Methoden	
III.1.	Material: Wildrebensammlung des KIT	9
III.2.	Material: Pathogenstämme	9
III.3.	Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Falschem Mehltau	9
III.4.	Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Echtem Mehltau	10
III.5.	Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Schwarzfäule	10
III.6.	Methoden: Minimal invasiver Assay für Schwarzfäule	10
III.7.	Methoden: Quantifizierung und Analyse morphologischer Parameter	10
III.8.	Methoden: Stilbenanalytik	11
III.9.	Methoden: Phenolanalytik	11
III.10.	Methoden: Typisierung Kohlenstoffquelle der Schwarzfäule	12
III.11.	Methoden: Zeitverlaufsstudien von Abwehrgenen	12
III.12.	Methoden: Histochemischer Nachweis von frühen Abwehrreaktionen	12
III.13.	Methoden: Quantifizierung von Promotoraktivität	13
III.14.	Methoden: Genetische Grobkartierung	13
IV.	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	
IV.1.	Ausführliche Kartierung der <i>sylvestris</i> Sammlung	13
IV.1.1.	Kartierung blattanatomischer und morphologischer Parameter	14
IV.1.2.	Kartierung Anfälligkeit gegenüber Falschem Mehltau, Echtem Mehltau und Schwarzfäule	17
IV.1.3.	Kartierung Stilbenakkumulation und –profil	20
IV.2.	Zelluläre Analyse der Infektion mit dem Erreger der Schwarzfäule	22
IV.2.1.	Zelluläre Analyse der biotrophen Phase von <i>Guignardia bidwelli</i>	22
IV.2.2.	Zelluläre Analyse von später Infektionsphase und Symptomausprägung	23
IV.2.3.	Aufklärung der Kohlenstoffquelle während der biotrophen Phase von <i>Guignardia bidwelli</i>	25
IV.2.4.	Untersuchung der Abwehrreaktionen der Wirtspflanze	26
IV.2.5.	Pektin-Modifikation und Altersresistenz	29
IV.3.	Etablierung einer Kreuzungspopulation	30
IV.4.	Steuerung der basalen Immunität	32
IV.5.	Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau	35
V.	Diskussion	
V.1.	Charakterisierung der <i>sylvestris</i> Population	38
V.2.	Aufklärung von Zielstrukturen für die Kontrolle der Schwarzfäule	38
V.3.	Basale Immunität als Züchtungsziel	39
VI.	Nutzen und Verwertbarkeit	40
VII.	Gegenüberstellung geplante und erreichte Ziele, weiterführende Fragen	41
VIII.	Zusammenfassung	42
IX.	Literaturverzeichnis	43
X.	Öffentliche Darstellung des Projekts	43

Anhang Erfolgskontrollbericht

1.	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen	47
2.	wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens	47
3.	Erfindungen oder Schutzrechtsanmeldungen	47
4.	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)	47
5.	Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)	48
6.	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	48
7.	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	48
8.	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	48
9.	Einhaltung von Ausgaben- und Zeitplanung	48

Abkürzungen

BSA Bulk Segregant Analysis; dpi days post inoculation; hpi hours post inoculation; PiWi pilzwiderstandsfähige Reben; QTL quantitative trait locus; Rpv3 Resistance to *Plasmopara viticola* 3; SSR Single Sequence Repeat

I. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Eine zentrale Motivation des ökologischen Landbaus ist die Vermeidung von chemischen Pflanzenschutzmitteln, was vor allem den Weinbau vor große Herausforderungen stellt. Im Mittelpunkt standen dabei bisher der Echte und der Falsche Mehltau. Seit etwa zehn Jahren wird jedoch zunehmend auch die Schwarzfäule zum Problem. Zur Bekämpfung werden im ökologischen Weinbau Kupfer- oder Schwefelpräparate eingesetzt, für die Schwarzfäule oft sogar Kombinationspräparate. Die Belastung von Boden und Grundwasser mit Kupfer ist problematisch und es wird daher national und international versucht, den Kupfereintrag in die Umwelt zu vermindern. Ein wichtiger Ansatz ist dabei die Züchtung pilzwiderstandsfähiger Rebsorten. Als Resistenzquelle gegenüber den Mehltaukrankheiten wurden in der Vergangenheit vorwiegend amerikanische, aber auch asiatische Wildreben züchterisch genutzt. Dabei gibt es immer wieder die Kritik von Ökowitzern, dass hier die natürliche Artbarriere durchbrochen werde. Außerdem muss der sogenannte "Fuchston" über langwierige Rückkreuzungsprogramme eliminiert werden. Ein drittes Problem ist die inzwischen schon deutlich sichtbare Erosion der Resistenz bei den kommerziell genutzten pilzwiderstandsfähigen Sorten (im Extremjahr 2016 besonders ausgeprägt). Um hier mittelfristig Alternativen entwickeln zu können, sollte im Rahmen des Projekts das Potential der Europäischen Wildrebe (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, im Folgenden als *V. sylvestris* bezeichnet) für die Resistenzzüchtung untersucht werden.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Ziel des Projekts ist es, die im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebenssicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes *in situ*-Management“ am Botanischen Garten des Karlsruher Institut für Technologie etablierte *ex-situ* Sammlung der Europäischen Wildrebe (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) für den nachhaltigen Weinbau nutzbar zu machen. Die in diesen Wildreben überraschenderweise vorhandenen Resistenzfaktoren gegen Falschen Mehltau, Echten Mehltau und vor allem gegen die Schwarzfäule sollen in Kulturreben eingekreuzt und mithilfe einer Verbindung aus molekulargenetischer Kartierung, Infektionsversuchen, zellbiologisch-morphologischen und biochemischen Untersuchungen identifiziert und für die Züchtung nutzbar gemacht werden. Mittelfristiges Ziel ist eine Alternative zum Einsatz von Kupferpräparaten im Ökologischen Weinbau.

Das von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (Bekanntmachung Nr. 05/10/51 vom 28.06.2010) aufgelegte Programm über die Durchführung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben (FuE-Vorhaben) für den Bereich „Pflanzenzüchtung für den ökologischen Landbau“ im Rahmen des Bundesprogramms „Ökologischer Landbau“ hat das Ziel, das Sorten- und Artenspektrum zu erweitern und hinsichtlich der Ziele und Anforderungen des Öko-Landbaus in der ökologischen Pflanzenzüchtung zu optimieren. Explizit wird die „züchterische Weiterentwicklung von Kulturen für die Bedingungen des ökologischen Anbaus hinsichtlich der Eignung für den ökologischen Anbau typische Anbauformen, insbesondere hinsichtlich Resistenzeigenschaften gegenüber samenbürtigen, bodenbürtigen und anderen Krankheitserregern“ genannt.

Die in Deutschland traditionell angebauten Rebsorten sind alle sehr anfällig gegen die Krankheiten, die im 19. Jahrhundert aus Nordamerika eingeschleppt wurden. Die Bekämpfung von Falschem und Echem Mehltau, zunehmend aber auch der Schwarzfäule erfordert sehr intensive Maßnahmen im Pflanzenschutz. Klimaerwärmung und die zu erwartende Zunahme von extremen Wettersituationen (z.B. sommerlicher Starkregen: fördert Falschen Mehltau und Schwarzfäule; ausgedehnte Trockenperioden: fördert Echten Mehltau) werden dies noch weiter verschärfen. Hiervon wird insbesondere der ökologische Weinbau betroffen sein, da die hier eingesetzten Pflanzenschutz-Produkte im Allgemeinen weniger stark wirken. Die deshalb im ökologischen Weinbau ohnehin schon dichten Applikationsintervalle müssen daher u.U. noch mehr verkürzt werden, was zu verstärkten Bodenverdichtungen beiträgt und den Bemühungen um die Erhaltung bzw. Steigerung der Bodenfruchtbarkeit zuwiderläuft. Zentrales Problem des ökologischen Anbaus ist jedoch nach wie vor der durch die Pflanzenschutzbehandlungen bedingte Eintrag von Kupfer in den Boden. Zur Reduzierung dieses Problems kann die Resistenzzüchtung einen entscheidenden Beitrag leisten. Im Kontext zur Ausschreibung sollen in dem vorgeschlagenen Projekt neue Resistenzquellen züchterisch verfügbar gemacht werden, die einen wichtigen Beitrag für die Steigerung der Pilzwiderstandsfähigkeit von neuen Sorten liefern und somit eine Reduktion des Pflanzenschutzaufwandes ermöglichen. Erstmals bietet sich hier auch ein züchterischer Ansatz für die nachhaltige und ökologisch verträgliche Eindämmung der Schwarzfäule. Das Projekt adressiert also ein zentrales Ziel des Programms „Pflanzenzüchtung für den ökologischen Landbau“.

I.3. Planung und Ablauf des Projekts

Voraussetzungen: Im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebenssicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes *in-situ* Management“ wurde im Botanischen Garten des KIT eine Sammlung von *V. sylvestris* etabliert. Nach derzeitigem Kenntnisstand bildet diese Sammlung die in Deutschland für diese Art noch vorhandene genetische Diversität vollständig ab. In dieser Sammlung waren Hinweise auf Resistenzen gegen die Rebenkrankheiten Falscher Mehltau, Echter Mehltau und Schwarzfäule entdeckt worden. Diese neuen, bisher unbekanntenen Resistenzquellen sollten nun mithilfe molekularer Marker für die Rebenzüchtung erschlossen werden, um sie später mit bereits vorhandenen und bekannten Resistenzen kombinieren zu können. Von einer solchen Pyramidisierung teilweise verschiedener Resistenzmechanismen erhofft man sich eine erhöhte Dauerhaftigkeit der Resistenz. Von herausgehobenem Interesse war hier die Schwarzfäule, die besonders im ökologischen Weinbau zunehmend Probleme macht und von den bisherigen pilzwiderstandsfähigen Rebsorten nicht adressiert wird. Während die Resistenzquellen aus amerikanischen Wildreben vermutlich auf eine durch Koevolution entstandene sogenannte Effektor-getriebene Resistenz zurückzuführen sind, wurden für *V. sylvestris* vor allem Faktoren der sogenannten basalen Resistenz vermutet, da diese Art keine Koevolution mit aus USA stammenden Pathogenen für Falschen und Echten Mehltau oder Schwarzfäule durchlaufen hat. Die grundsätzliche Verschiedenheit der Resistenzmechanismen böte so eine gute Voraussetzung für eine erfolgreiche Pyramidisierung.

Planung:

Das Vorhaben umfasste in der Hauptphase drei thematische Blöcke:

1. Ausführliche Kartierung der *sylvestris* Sammlung:

- Antwort auf gezielte Infektion mit *Guignardia bidwelli*, dem Erreger der Schwarzfäule
- Antwort auf gezielte Infektion mit *Plasmopara viticola*, dem Erreger des Falschen Mehltaus
- Antwort auf gezielte Infektion mit *Erysiphe necator*, dem Erreger des Echten Mehltaus
- Induktion von Stilbenen (wichtigen Abwehrstoffen, zentrale Antwort der basalen Immunität)
- Mikrosatelliten-Marker, die das gesamte Genom abdecken (Ziel 3-5 Marker pro Chromosom)

Ziel dabei war es, Korrelationen zwischen genetischen Markern (Mikrosatelliten) und Unterschieden in Anfälligkeit gegen diese Pathogene und die Akkumulation von Stilbenen zu finden, um dies später züchterisch nutzen zu können (Marker-gestützte Kreuzung).

2. Zelluläre Analyse des Infektionsgeschehens bei *Guignardia bidwelli*, dem Erreger der Schwarzfäule

Ziel dabei war es, die in großen Teilen unbekanntenen Details des Infektionsgeschehens aufzudecken, um so Ziele für die Entwicklung von Resistenzen gegen Schwarzfäule zu identifizieren.

3. Etablierung einer Kreuzungspopulation aus interessanten *sylvestris* Kandidaten und Kulturreben

Ziel dabei war es, die in Vorversuchen als vielversprechend identifizierten *sylvestris* Genotypen mit Augster Weiss (einer männlich-sterilen *vinifera*-Varietät) oder Weißburgunder zu kreuzen.

Im Rahmen der Verlängerungsphase wurden noch zwei weitere Themen mit eingebunden:

4. Steuerung der basalen Immunität

Ziel dabei war es, die Mechanismen der basalen Immunität zu verstehen, da die momentan in PIWI-Reben genutzten Resistenzen auf Effektor-getriebener Immunität beruhen.

5. Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau

Ziel war hier, mithilfe neuer, genetisch definierter Pathogen-Stämme Einblicke in die gerade auch im letzten Jahr beobachtete Resistenzerosion von PIWI-Reben zu gewinnen.

Tatsächlicher Ablauf:

1. Ausführliche Kartierung der *sylvestris* Sammlung:

Die oben formulierten Ziele wurden alle erreicht - die *sylvestris* Population ist nun detailliert und in hoher Qualität phänotypisiert worden, ebenso konnte sie mit 5-10 informativen Markern je Chromosom genotypisiert werden.

2. Zelluläre Analyse des Infektionsgeschehens bei *Guignardia bidwelli*, dem Erreger der Schwarzfäule

Hier wurde das Ziel nicht nur erreicht, sondern die Analyse mit der Identifikation von Pektin-Modifikationen sogar auf die molekulare Ebene vorangetrieben werden. Damit wurde ein ganz konkreter Mechanismus entdeckt, mit dem man künftig arbeiten kann.

3. Etablierung einer Kreuzungspopulation aus interessanten *sylvestris* Kandidaten und Kulturreben

Dieses Ziel wurde nicht erreicht: Hier handelte es sich um züchterische Pionierarbeit unter schwierigsten Bedingungen, da die Wildreben zum einen zweihäusig sind, zum anderen erst sehr junges Material zur Verfügung stand und zum dritten die Kreuzungskampagnen der ersten beiden Jahre durch Witterungseinbrüche während der Blütezeit weitgehend zunichtegemacht wurden. Erst im dritten Jahr gelang es Kreuzungspopulationen zu etablieren, mit denen man die Arbeit beginnen konnte. Da die Entwicklungsdauer von Reben mit dem engen Zeitrahmen eines solchen Projekts in Konflikt steht, war diese Verzögerung nicht mehr aufzuholen. Die Kreuzungspopulation ist zwar inzwischen etabliert, aber noch zu jung, um genügend Material für Infektionsstudien zu bieten. Weiterhin zeigten die Ergebnisse von Block 1, dass andere Kreuzungspartner sinnvoller gewesen wären - dies war aber ein Ergebnis des Projekts selbst und daher zu Beginn noch nicht bekannt. Hätte man dieses Wissen *a priori* gehabt, wäre Schritt 3 anders konzipiert worden

4. Steuerung der basalen Immunität

Hier konnten genetisch bedingte Unterschiede in der Induzierbarkeit von Stilbenen gezeigt und analysiert werden. Für zwei nichtamerikanische Wildreben, die also keine Effektor-getriebene Immunität besitzen sollten, konnten zwei völlig unterschiedliche Mechanismen detailliert entschlüsselt werden, die zu einer Verstärkung der basalen Immunität führen. Dieser Block verlief also ebenfalls erfolgreicher als erwartet.

5. Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau

Hier konnten mithilfe neuer Werkzeuge erste Einblicke in die Mechanismen der Resistenzerosion gewonnen werden, die noch einmal deutlich machen, dass diese Erosionen relativ einfach evolviere können. Dieser Block war also ebenfalls erfolgreich und ist für die F&E Strategie im nachhaltigen Weinbau von hoher Relevanz.

Fazit:

Trotz des begrenzten Zeitrahmens dieses Projekts, konnten vier der fünf selbstgesteckten Ziele erreicht werden. Aufgrund der langen Entwicklungsdauer der Weinrebe wäre eine züchterische Vorbereitung im Rahmen der Projektlaufzeit nur unter optimalen Bedingungen und selbst dann nur im Ansatz möglich gewesen. Da das Kreuzen von *sylvestris* nicht trivial ist und auch witterungsbedingte Widrigkeiten in den ersten zwei Projektjahren den Erfolg zunichtemachten, war Block 3 nicht erfolgreich. Dafür konnten Block 2 und 4 erfolgreicher entwickelt werden als zunächst zu vermuten war. Insgesamt hat das Projekt zwei große Erfolge gezeitigt:

A. Die in Deutschland vorhandene genetische Diversität der Europäischen Wildrebe wurde hinsichtlich der Resistenz gegen drei wichtige Rebkrankheiten, der Bildung von Abwehrstoffen und informativer Mikrosatellitenmarker in großer Detailtiefe erschlossen.

B. Mit qualitativ hochwertigen Daten konnten wichtige Einblicke in das Infektionsgeschehen der Schwarzfäule gewonnen werden. Damit gelang es, Pektin-Modifikationen in der Zellwand des Wirts als molekularen Schlüssel für die Resistenz gegen Schwarzfäule zu identifizieren.

II. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

II.1. Stand des Forschungsfelds zu Beginn des Vorhabens

Die Weinrebe stellt wegen ihrer Anfälligkeit für Pathogene die ökologische Landwirtschaft vor besonders hohe Herausforderungen. Die Weinrebe ist ein Paradebeispiel für die Globalisierung von Pflanzenpathogenen wie Echtem und Falschem Mehltau, aber auch der Reblaus und der Schwarzfäule. Die meisten dieser Pathogene wurden im 19. Jahrhundert aus Nordamerika eingeschleppt, wo sie sich gemeinsam mit ihren Wirtspflanzen, amerikanischen Wildreben, entwickelt haben. Im Ursprungsgebiet hat sich ein evolutionäres Gleichgewicht zwischen Wirt und

Pathogen eingestellt, in Europa trafen nun diese hochgerüsteten Pathogene auf einen sogenannten "naiven Wirt" mit katastrophalen Folgen.

Die Idee, Resistenzfaktoren aus amerikanischen Wildreben in Kulturreben einzukreuzen, entstand schon Ende des 19. Jahrhunderts in Frankreich, wurde dort später aber nicht weiterverfolgt. Da die Genetik der Rebe aufgrund der langen Generationsdauer nur ansatzweise bekannt war, dauerte es bis in die 80er Jahre des 20. Jahrhunderts, bis die ersten PIWI-Reben (für pilzwiderstandsfähig) zugelassen wurden. Die große Mehrheit dieser PIWI-Reben nutzen dieselben Resistenzfaktoren (etwa den Locus *Rpv3* für Resistenz gegen *Plasmopara viticola*, den Erreger des Falschen Mehltau). Da die Evolution nicht stehenbleibt, führt dies natürlich zu einem Selektionsdruck auf das Pathogen, diesen Resistenzfaktor auszuhebeln. In der Tat beobachtet man seit etwas mehr als einem Jahrzehnt Stämme von *P. viticola*, die auch PIWI-Reben wie etwa die Sorte 'Regent' infizieren können. Der Einsatz von PIWI-Reben macht es möglich, im ökologischen Weinbau den Einsatz von Kupferpräparaten zu reduzieren. Der derzeitige Grenzwert in Deutschland liegt mit 3 kg/ha, deutlich niedriger als in anderen europäischen Ländern. Eine Resistenzerosion bei den PIWI-Reben würde diesen Alternativansatz verunmöglichen, mit katastrophalen Folgen für den ökologischen Weinbau.

Genetische Untersuchungen, unter anderem bei am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof haben inzwischen zahlreiche sogenannte QTLs (*quantitative trait loci*) identifiziert, die mit Resistenzen gegenüber dem Falschen und dem Echten Mehltau korreliert sind und züchterisch genutzt werden könnten (Fischer et al. 2004, Di Gaspero et al. 2007). Würden solche Faktoren über entsprechende Kreuzungen kombiniert (sogenannte Pyramidisierung), entstünden so Resistenzen, die auf mehreren Faktoren beruhen und daher evolutionär deutlich stabiler sind als die derzeitigen PIWI-Reben (Eibach et al. 2007). Molekulare Marker, die mit diesen Loci gekoppelt sind, erlauben es, die Vererbung der Resistenz in der Nachkommenschaft zu verfolgen und Pflanzen mit Resistenz bereits im Sämlingsstadium zu identifizieren (sogenannte Marker-gestützte Züchtung, nicht zu verwechseln mit Gentechnik, es wird nur natürlicher Genfluss über sexuelle Fortpflanzung genutzt).

Eine weitere Herausforderung für den ökologischen Weinbau ist die Ausbreitung einer weiteren Krankheit, der Schwarzfäule, die durch den Pilz *Guignardia bidwellii* hervorgerufen wird. Erstmals 2002 trat diese Krankheit verstärkt in Mosel, Mittelrhein, Nahe und später auch in der Pfalz auf. Die befallenen Beeren verfärben sich violett und mumifizieren. Darauf entstehen die Fruchtkörper (Perithezien), in denen der Pilz überwintert. Die Schwarzfäule gefährdet Ertrag und Qualität des Weins, vor allem auf ökologisch bewirtschaftete Rebflächen. Im konventionellen Weinbau wird beginnend mit dem Zweiblattstadium in recht enger Folge mit Fungiziden gespritzt. Da die Schwarzfäule bislang kaum in Erscheinung trat, gibt es dagegen kaum Erfahrungen zu einer wirksamen Bekämpfung im ökologischen Weinbau außerhalb kombinierter Kupfer-Schwefelpräparate, die als Kombinationsanwendung keine Zulassung zur Bekämpfung der Schwarzfäule besitzen. Resistenzfaktoren gegen die Schwarzfäule finden sich vereinzelt bei amerikanischen und sibirischen Wildreben, sind aber bislang nur rudimentär bearbeitet worden.

II.2 Eigene Vorarbeiten

Im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebenseicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes in situ-Management“ wurde im Botanischen Garten des Karlsruhe Institute of Technology eine genetisch, physiologisch und morphologisch detailliert charakterisierte Sammlung der Stamm-Mutter unserer Kulturrebe, der vom Aussterben bedrohten Europäischen Wildrebe (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) aufgebaut, die nach derzeitigem Kenntnisstand die komplette in Deutschland noch vorhandene genetische Diversität für diese Art abbildet. In Zusammenarbeit der Partner KIT und DLR konnte dann gezeigt werden, dass es in dieser Sammlung Genotypen gibt, die nach Infektion mit dem Falschen und dem Echten Mehltau, aber auch mit der Schwarzfäule deutlich weniger befallen wurden als Kulturreben. Daraus entstand dann die Idee, das JKI als Partner mit einer langen Tradition auf dem Gebiet der Resistenzzüchtung einzubinden. Beispielsweise wurden, basierend auf einer genetischen Karte aus der Kreuzung Regent x Lemberger, ein Resistenz-Lokus für den Echten Mehltau (Ren3) und ein Resistenz-Lokus für den Falschen Mehltau (*Rpv3*) identifiziert.

II.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Alle drei Partner waren in das vom Interreg Oberrhein geförderte Verbundprojekt "Bacchus - Forschung für nachhaltigen Weinbau" mit eingebunden und so im ständigen Austausch mit allen relevanten Forschungseinrichtungen der Region. Dies bot für das Projekt sehr hilfreiche Technologien - beispielsweise konnte für die aufwendige Bestimmung der Stilben-Profile (s. Abschnitt 2) die Metabolomik-Plattform des INRA Colmar genutzt werden, um die Wildrebensammlung am KIT zu chemotypisieren. Umgekehrt wurden Akzessionen aus dieser Kollektion von der Université de Haute Alsace dazu genutzt, nach Resistenzen gegenüber holzerstörenden Pilzen (übrigens erfolgreich). Die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Otmar Spring von der Universität Hohenheim machte es

möglich, die dort etablierten Einzelsporangien-Linien von *P. viticola* zu nutzen, um Einblicke in die oben beschriebene Erosion der *Rpv3*-vermittelten Resistenz zu gewinnen.

III. Material und Methoden

III.1. Material: Wildrebensammlung des KIT

Im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebenssicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes in situ-Management“ wurde im Botanischen Garten des Karlsruhe Institute of Technology eine genetisch, physiologisch und morphologisch detailliert charakterisierte Sammlung der Stamm-Mutter unserer Kulturrebe, der vom Aussterben bedrohten Europäischen Wildrebe (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) aufgebaut. Diese umfasst unter anderem eine vollständige genetische Abbildung der größten deutschen Wildrebenpopulation auf der Halbinsel Ketsch. Momentan sind 107 Genotypen in der Sammlung repräsentiert, der Großteil von der Halbinsel Ketsch, daneben noch einzelne Wildreben von den sporadischen Oberrhein-Vorkommen außerhalb Ketsch, den Donau-Auen nahe Wien und dem Kaukasus. Die genetische Struktur dieser Kollektion wurde mithilfe von 8 sogenannten SSR-Markern analysiert, und mit den verfügbaren Daten von insgesamt >300 Genotypen aus Europa verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ketscher Population unter den in Europa noch verbliebenen Populationen die größte Diversität aufweist (Nick, 2014).

III.2. Material: Pathogenstämme

Schwarzfäule: hier wurde das Isolat „8088-2“ verwendet, das 2005 aus einer Driesche in Kesten an der Mosel gewonnen wurde. Die Kultivierung des Erregers erfolgt auf Hafermehl-Agar in Klimaschränken bei 25°C, 12 Stunden pro Tag beleuchtet mit Schwarzlicht (L18-73, Osram, München) und Weißlicht (L18W/840 Lumilux, Osram, München). Zur Vermehrung werden ca. 1 cm² große Mycelstücke aus zwei bis drei Wochen alten Kulturen auf neue mit Hafermehl-Agar gefüllte Petrischalen überführt.

Falscher Mehltau: hier werden vier verschiedene Isolate eingesetzt: „Zucht“, „GWH“, „8836“ und „8837“. Der Stamm „Zucht“ wurde 1990 in Niederhorbach isoliert und seither im DLR Rheinpfalz vermehrt. Er zeichnet sich durch eine Cymoxanil-Toleranz aus. Das Isolat „GWH“ ist benannt nach seinem Herkunftsort Geilweilerhof, dem Institut für Rebenzüchtung JKI Siebeldingen und stammt aus einer Anlage verschiedener mehltaresistenter Rebsorten aus dem Jahr 2009. Die Stämme „8836“ und „8837“ wurden in intensiv behandelten Weißweinanlagen nahe Neustadt an der Weinstraße isoliert. Die Erhaltung erfolgt getrennt voneinander an Topfpflanzen der Sorte Müller-Thurgau im Gewächshaus, die je nach Jahreszeit im Abstand von 7-12 Tagen mit entsprechender Sporensuspension inokuliert werden. Zusätzlich wurde am KIT im Herbst 2011 auf einer Wildrebe ein weiterer Stamm, Pvk36-3, isoliert. Die Stämme für den Falschen Mehltau sind in Form gefrorener Sporangien zwischen den Partnern des Netzwerks ausgetauscht worden, so dass alle mit demselben Pathogen-Material arbeiten können. Für die Untersuchungen zur Resistenzerosion wurden in der Verlängerungsphase des Projekts auch Einzelsporangien-Linien mit unterschiedlicher Virulenz eingesetzt: In Kooperation mit Dr. Javier Gomez und Prof. Dr. Otmar Spring (Universität Hohenheim) wurden hier der Stamm 1135-C20 (kann auf der PiWi-Sorte Regent zu wachsen, vermag also die durch den aus amerikanischen Wildreben stammenden Locus *Rpv3* vermittelte Resistenz zu brechen) und der Schwesterstamm 1137-F2 (kann nicht auf Regent wachsen, Referenzstamm) eingesetzt.

Echter Mehltau: Hier wird mit einem Stamm gearbeitet, der aus einer Rebanlage in Neustadt an der Weinstraße stammt und als Dauerkultur an ganzen Reben (Sorte Müller-Thurgau) im Gewächshaus des DLR Rheinpfalz weitergeführt wird.

III.3. Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Falschem Mehltau

Hier wurde eine minimal invasive Methode angewendet, die mit Blattscheiben auskommt. Da hier mehrere Isolate des Pathogens zur Verfügung stehen (s. III.2), wurden die Versuche parallel mit diesen Isolaten durchgeführt. Zum einen werden so etwaige Unterschiede zwischen den Stämmen sichtbar, zum anderen wird so die Repräsentanz der Ergebnisse verbreitert. Als Kontrolle dienen die anfälligen Rebsorten ‚Müller-Thurgau‘ und ‚Riesling‘ sowie die PiWi-Sorte ‚Regent‘. Pro Reben-Genotyp und *Plasmopara*-Isolat wurden sieben Blattscheiben aus dem 4. und 5. vollentwickelten Blatt (von der Spross-Spitze gezählt) ausgestochen. Diese wurden randomisiert mit der Blattunterseite nach oben in Petrischalen überführt, wo sie auf 5 ml autoklaviertem Leitungswasser flottieren, um die volle Turgeszenz des Gewebes zu gewährleisten. Jeweils 30 µl einer *P. viticola* Sporangien-Suspension (33000 Sporangien/ml) wurden zur Inokulation aufgebracht. Der Inokulations-Tropfen wurde 24 hpi (hours post inoculation) wieder abgenommen. Die Proben wurden bei 21 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden inkubiert. Nach sieben Tagen wurde für jeden Inokulationstropfen zunächst die Sporulations-Stärke visuell auf einer Skala von

0 bis 4 bonitiert. Um einen zweiten Messparameter zu bestimmen, wurden zusätzlich von jeder Blattscheibe die Sporangien mit 1 ml einer 0,1% v/v-Tween-20 Lösung abgespült und mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Sporangien-Konzentration dieser Suspension bestimmt. Die Ergebnisse wurden in sieben unabhängigen Testreihen validiert.

III.4. Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Echtem Mehltau

Echter Mehltau: Zur Überprüfung der Anfälligkeit der Wildrebenakzessionen gegenüber *E. necator* wurden ganze Pflanzen zwischen die bereits stark befallenen Pflanzen der Dauerkultur gestellt. Als Kontrolle und Vergleich wurden ebenso Pflanzen der anfälligen Rebsorte ‚Müller-Thurgau‘ und der pilzwiderstandsfähigen (PiWi) Rebsorte ‚Regent‘ mitgetestet. Nach drei Wochen wurden die Reben visuell bonitiert. Hierbei wurde die Befalls-Stärke der jüngsten acht Blätter prozentual geschätzt und anschließend gemittelt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Testreihen validiert.

III.5. Methoden: Quantifizierung der Anfälligkeit gegenüber Schwarzfäule

Aufgrund der langen Inkubationszeit, die mindestens 14 bis 21 Tage beträgt, sind Tests an abgetrennten Blättern oder Blattscheiben äußerst schwierig, da selbst nach Oberflächensterilisation häufig ubiquitäre Pathogene wie *Botrytis cinerea* das Gewebe befallen und falsch positive Befalls-Funde verursachen können. Zusätzlich konnten bisher noch keine für Schwarzfäule typischen Symptome an abgetrennten Blättern oder Blattscheiben bzw. -stücken beobachtet werden. Eine symptombezogene Testmethode an einzelnen Pflanzenteilen ist daher derzeit nicht durchführbar. Die Resistenztests wurden daher an ganzen Pflanzen durchgeführt. Als anfällige Vergleichssorte diente die Kulturrebsorte Müller-Thurgau. Die Unterlagsrebsorte Börner und die pilzwiderstandsfähige Rebsorte Solaris wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Zur Durchführung des Resistenztests wurden zunächst die Spitzen der Reben mit einem Draht markiert, um den Wachstumsstand zum Zeitpunkt der Inokulation zu dokumentieren. Die Inokulation erfolgte mit Hilfe eines Feinzerstäubers, der an Druckluft angeschlossen war und einer wässrigen Sporensuspension definierter Konzentration (25000 Sporen/ml). Direkt im Anschluss wurden die Pflanzen für 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 20°C inkubiert, um eine ausreichend lange Nässephase für eine erfolgreiche Infektion zu gewährleisten. Danach wurden sie im Gewächshaus kultiviert und nach drei Wochen bonitiert. Hierzu wurde die befallene Fläche der beiden Blätter oberhalb und der fünf Blätter unterhalb der Markierung prozentual geschätzt. Zusätzlich wurde die Ausbildung von Pyknidien auf den Symptommflecken und der Befall von Ranken, Trieb und Geiztrieben vermerkt. Zum Vergleich der Akzessionen wurden die Befalls-Werte der insgesamt sieben bonitierten Blätter gemittelt. Pro Akzession wurden drei Pflanzen in unabhängigen Versuchen getestet.

III.6. Methoden: Minimal invasiver Assay für Schwarzfäule

Alternativ zu den symptombezogenen Tests wurden mittels Fluoreszenzmikroskop die frühen Entwicklungsstadien des Erregers untersucht, um Ansatzpunkte für einen quantitativen Test zu gewinnen, der nach wenigen Tagen auswertbar ist und an Blattscheiben durchgeführt werden kann. Aufbauend auf den Ergebnissen der Resistenztests wurden drei Wildrebenakzessionen ausgewählt, die sehr geringe Befalls-Stärken aufwiesen. Zusätzlich wurden die schwarzfäule-resistenten Sorten Börner und Solaris und die anfällige Rebsorte Müller-Thurgau als Vergleich herangezogen. Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchungen wurde die Anheftungsrate der Sporen an die Blattoberfläche analysiert, ebenso wie die Fähigkeit der Sporen ein Appressorium auszubilden, welches eine Grundvoraussetzung zur Penetration der Pflanze ist. Erst dadurch besitzen die Sporen die Fähigkeit, Hyphen zu bilden, um sich im Gewebe auszubreiten. Zusätzlich wurde die Länge der Hyphen und ihr Verzweigungsgrad erfasst. Da sich der Verzweigungsgrad schon 5 Tage nach Inokulation auf Blattscheiben gut bestimmen lässt, kann er als sensibler Prädiktor für den minimal invasiven Test eingesetzt werden.

III.7. Methoden: Quantifizierung und Analyse morphologischer Parameter

Um die anatomischen Parameter zu erheben, wurden die Blattproben eingebettet und dann mikrotomiert. Details der recht langwierigen und aufwändigen Präparation sind in **Anhang 1** erläutert.

Für jeden Genotyp wurde Blattmaterial fixiert, eingebettet und über ein Ultramikrotom geschnitten. Durch Anfärbung mit Acridin Orange traten dann die Cuticularhörnchen auf Innen- und Außenseite der Stomata deutlich in Erscheinung. Als Referenzen dienten neben verschiedenen Kultursorten auch pathogen-resistente Wildreben aus Nordamerika. Diese feinstrukturellen Daten, ergänzt um weitere Parameter (minimale und maximale Zahl Epidermiszellen zwischen den Stomata, Ausprägung von peristomatären Cuticularstreifen, weitere Merkmale) wurden quantifiziert und in einem Datenblatt zusammengeführt. Neben den Stomata wurden auch andere

morphologische Merkmale erhoben und im Detail in den Datenblättern dokumentiert: Zellgrößen, Verzahnung epidermaler Zellen, Behaarung, Blattdicke ebenso wie Blattform und Wuchshabitus festgehalten. Um Korrelationen zwischen verschiedenen Parametern erkennen zu können, wurde für alle morphologischen und feinstrukturellen Parameter ein Quantifizierungssystem entwickelt, das mit einer eigens für dieses Projekt programmierten Software treegen über in der molekularen Phylogenie übliche Cluster-Algorithmen visualisiert werden konnte. Die Erstellung dieser Datenblätter und das Verfahren der Quantifizierung ist in **Anhang 2** erläutert.

Feinstruktur und Dichte der Spaltöffnung wurden detailliert untersucht und dokumentiert. Hierfür wurden Flächenschnitte der unteren Blattepidermis von mehreren Blättern lichtmikroskopisch ausgewertet und digitaloptisch dokumentiert. Als besonders hilfreich erwies sich ein Verfahren, das sonst in der pflanzlichen Entwicklungsbiologie eingesetzt wird. Dabei wird mit kommerziell erhältlichem Hartkleber ein Abdruck von der Blattunterseite hergestellt, so dass Stomatadichten und –größen auch an großen Probenzahlen schnell und sicher bestimmt werden können (**Abb. 1**). Dies erlaubte es, für die gesamte Population auch von mehreren Blättern pro Individuum zu erheben und sogar verschiedene Kultivierungsbedingungen zu prüfen.

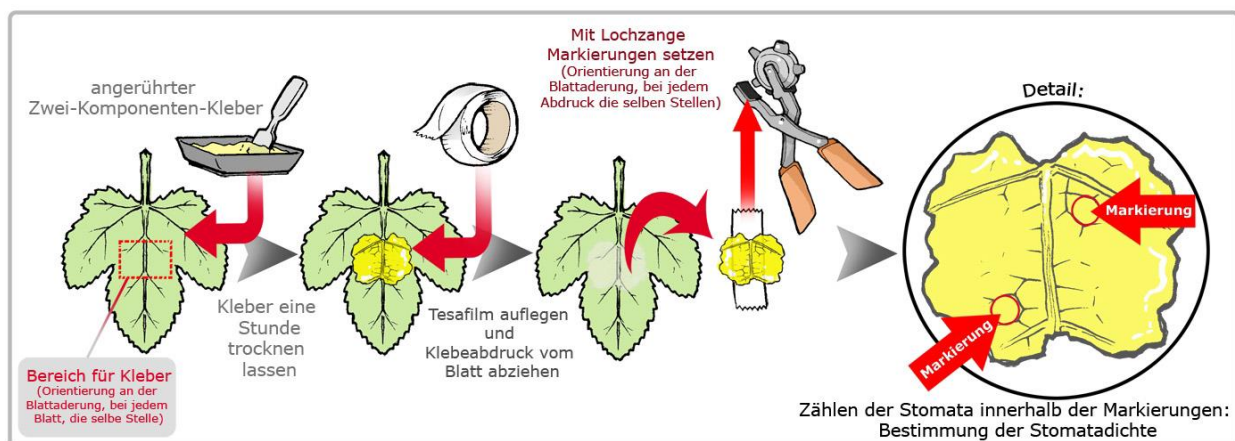


Abb. 1: Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Stomatadichten aus Blattabdrücken

III.8. Methoden: Stilbenanalytik

Neben Resveratrol standen auch sein (biologisch inaktives) Glykosid Piceid und die (biologisch hochaktiven) oxidativen Dimere, die Viniferine im Mittelpunkt des Interesses. Extraktion und Analytik war für Zellkulturen schon etabliert worden, musste aber hinsichtlich der Extraktionsmethode noch für Blattgewebe optimiert werden. Zur Validierung wurden verschiedene Kontrollen eingesetzt, z.B. Blattscheiben von ‚Müller-Thurgau‘ als Positivkontrolle, aber auch parallel mit derselben Sporensuspension inokulierte Blattscheiben, die nicht extrahiert werden, um nachträglich den Infektionserfolg bestimmen zu können. Nachdem die Extraktion angepasst war, konnte die Methode dann an die an der INRA Colmar etablierten Metabolomik-Plattform im Hochdurchsatz analysiert werden (Duan et al. 2015).

III.9. Methoden: Phenolanalytik

Die Phenolgehalte der oberen 9 Blättagen verschiedener Genotypen analysiert, um mögliche Unterschiede zwischen jungen und alten Blättern bzw. Blättern resistenter und anfälliger Genotypen aufzudecken und mit dem Resistenzverhalten zu korrelieren. Mithilfe des kolorimetrischen Folin-Ciocalteu-Tests wurden die gesamten freien sowie die gesamten gebundenen Phenole quantifiziert. Die gebundenen Phenole wurden anschließend mittels HPLC näher charakterisiert, da bei dieser Methode gezielt einzelne Polyphenole detektiert und quantifiziert werden können. Zur Methodenoptimierung wurden 5 Proben (jeweils Blatt vier der Genotypen M-Th, Börner, K16, K18 und K38) mit verschiedenen Methoden aufgearbeitet. Bei der klassischen Methode (M alt) wurden 100 mg gemörsertes Blattmaterial mit 5 ml 60% Methanol versetzt, 30 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde direkt mittels FC-Test und HPLC vermessen (M alt). Ein Aliquot des gleichen Überstandes wurde für die saure Hydrolyse (M alt + sH) mit HCl (1,7 ml Probe + 0,3 ml HCl 10,5 M) und ein weiteres Aliquot für die alkalische Hydrolyse (M alt + aH) mit NaOH (1,7 ml Probe + 0,3 ml NaOH 3,3 M) versetzt. Zur Umsetzung der Reaktion wurden zunächst beide Ansätze für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die flüssige Phase mit Hilfe einer Speedvac eingedampft und der Rückstand in 1,7 ml 60% Methanol aufgenommen und vermessen. Da bei der sauren Hydrolyse signifikant höhere Gehalte der einzelnen phenolischen Substanzen gemessen wurde, wurde dann diese Extraktionsmethode weiter eingesetzt.

III.10. Methoden: Typisierung Kohlenstoffquelle der Schwarzfäule

Um die Kohlenstoffquelle während der biotrophen Phase zu identifizieren, wurde ein Platten-Assay entwickelt, um die Bildung extrazellulärer Enzyme und den Abbau verschiedener möglicher Substrate nachzuweisen. Dieser Platten-Assay basiert auf einem Minimalmedium mit verschiedenen Salzen, jedoch ohne eine Kohlenstoffquelle. Diesem Minimalmedium wurden entweder Cellulose, Hemicellulose (Xylan) oder Pektin zugesetzt. Das pectinhaltige Medium wurde entweder auf pH 5 oder auf pH 7 eingestellt, um verschiedene pektinabbauende Enzyme (die sich in ihrer pH-Abhängigkeit unterscheiden) testen zu können. Die Medien wurden mit Myzel-Blöckchen von 3-4 Wochen alten Kulturen verschiedener Schwarzfäule-Isolate angeimpft. Nach 15 Tagen wurde das gewachsene Myzel vermessen und mit Hilfe von Substratfärbungen die Abbauzone bestimmt. In Ergänzung wurde ein Bavendamm-Test auf Ligninabbau durch Laccasen und Polyphenoloxidasen durchgeführt.

III.11. Methoden: Zeitverlaufsstudien von Abwehrgenen

Die Induktion von Abwehrgenen wurde im Zeitverlauf untersucht. Hierfür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (entweder einen UV-B Puls oder Infektion mit Falschem Mehltau oder Schwarzfäule) RNS isoliert, in cDNS umgeschrieben und mithilfe von semiquantitativer PCR mit spezifischen Oligonucleotidprimern einer PCR unterzogen, die Amplifikate gelelektrophoretisch getrennt und dann bezüglich des konstitutiv exprimierten EF1 α als internem Standard quantifiziert. Geprüft wurden die Transkriptmengen für Phenylammoniumlyase (Startpunkt des Sekundärstoffwechsels), Chalconsynthase (Schlüsselenzym der Flavonoidsynthese), Stilbensynthase (Schlüsselenzyme der Stilbensynthese) und Resveratrolsynthase (Schwesterenzym der Stilbensynthese mit derselben chemischen Funktion). Gleichzeitig wurden noch zwei spezifische MYB-Transkriptionsfaktoren untersucht, die als Genschalter für Stilbensynthase fungieren. Um die in der semiquantitativen PCR beobachteten Unterschiede quantitative abzusichern, wurden die Transkripte über real-time qPCR mithilfe von fluoreszent markierten Oligonucleotidprimern quantifiziert (Duan et al. 2015).

III.12. Methoden: Histochemischer Nachweis von frühen Abwehrreaktionen

Die histologische Färbung mittels Ethacridinlactat-Acridinorange ist eine neuartige Methode zur Detektion sehr früher Abwehrreaktionen der Pflanze. Es wird vermutet, dass Ethacridinlactat die Alkalinisierung des Apoplasten, als eine der ersten Reaktionen auf Pathogenbefall, sichtbar macht. Molekulare Grundlage für dieses Phänomen ist die Aktivierung von Calciumkanälen als derzeit frühester bekannter Schritt der basalen Immunität von Pflanzen. Diese Kanäle transportieren gemeinsam mit Calcium auch Protonen aus dem Apoplasten ins Zell-Innere, so dass der pH in der Zellwand ansteigt.

Zur Auswertung der Proben, wurden die Reaktionen um die Appressorien in drei Reaktionsklassen (fehlend, schwach und stark) unterschieden. Schwache Reaktionen zeichnen sich durch einen leichten gelben Schimmer um die Appressorien aus wohingegen bei starken Reaktionen ganze Epidermiszellen stark grün-gelblich fluoreszieren. Je Blattscheibe wurden 100 Appressorien ausgewertet. Pro Sorte und Zeitpunkt wurden 4 Blattscheiben des viertjüngsten Blattes verschiedener Pflanzen untersucht. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Superoxid (Singulett-Sauerstoff) gehört neben Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalen zu den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies, die man bei den meisten daraufhin untersuchten Wirt-Parasit-Interaktionen nachweisen konnte. Ihre Freisetzung ist eine schnelle Reaktion seitens der Pflanze und wird auch unter dem Begriff „oxidative burst“ zusammengefasst. Verantwortlich für diesen „oxidative burst“ ist eine NADPH-abhängige Oxidase in der pflanzlichen Zellmembran, die als zentraler Schalter für zahlreiche Stress-Reaktionen fungiert. Die gebildeten Superoxid-Anionen tragen zur Zellwandverstärkung bei und greifen auch das Pathogen im Apoplasten direkt an. Vor allem jedoch können sie durch die Membran ins Zell-Innere gelangen und dort als wichtiges Signal Abwehrreaktionen aktivieren. Beispielsweise sind sie für die Aktivierung von Stilbensynthase-Genen zentral (siehe 4.3) oder wirken bei der Steuerung des hypersensitiven Zelltodes mit. Mit Hilfe des Farbstoffes Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) kann im Blattgewebe die Bildung von Superoxidanionen nachgewiesen werden. Dafür wurden inokulierte Blattscheiben der verschiedenen Genotypen nach unterschiedlichen Zeitintervallen (24, 48, 72 und 96 h) mit einer 0,05% NBT-Lösung vakuumfiltriert und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben in einem Ethanol-Aceton-Gemisch (4:1) entfärbt. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung wurden Stärke und Häufigkeit der Blaufärbung und damit die Ausprägung der Superoxidanionenbildung in 5 Kategorien von '0' bis '4' eingestuft.

III.13. Methoden: Quantifizierung von Promotoraktivität

Hierfür wurde ein Duplex-Promotor-Reporter-Testsystem genutzt. Dabei wird der Promotor von Interesse so in einen Vektor inkloniert, dass er eine grün leuchtende Luciferase als Reporter antreibt. Man bringt dieses Konstrukt über biolistische Transformation in Pflanzenzellen (Zellkulturen von verschiedenen Rebengentypen) ein und misst dann die Lumineszenz als Maß für die Promotoraktivität. Um Unterschiede in der Transformations-Effizienz zu kalibrieren, wird gleichzeitig eine rot leuchtende Luciferase aus *Renilla* unter einem konstitutiven Promotor eingebracht, so dass man dann grüne versus rote Lumineszenz ins Verhältnis setzen kann.

III.14. Methoden: Genetische Grobkartierung

Die Kreuzungspopulationen aus Kulturreben und Wildreben (Augster Weiss x Hö29 und Weißburgunder x K83) wurden mit mindestens fünf informativen Markern kartiert. Die Zahl der Marker pro Chromosom schwankte zwischen fünf und elf. Von den insgesamt 254 getesteten SSR-Markern konnten in beiden Populationen etwas mehr als die Hälfte (54%) für die Erstellung einer genetischen Karte genutzt werden. Für die Erstellung einer groben genetischen Karte ist zwar die erreichte Markerdichte von etwa 140 informativen SSR-Markern für jede Kreuzungspopulation ausreichend, jedoch war der Populationsumfang (N= 60 für Augster Weiss x Hö29, N=74 für Augster Weiss x K83) für eine sinnvolle Verrechnung zu gering.

Daher wurde dann in der Verlängerungsphase ein alternativer Ansatz gewählt: mit Hilfe der „bulked segregant analysis“ (BSA) sollten merkmals- bzw. resistenzkorrelierte QTLs in der Wildrebenpopulation identifiziert werden. Dazu wurde die gesamte am KIT Karlsruhe vorhandene *V. sylvestris*-Population mit molekularen Markern genotypisiert. Danach wurden die vorhandenen Evaluierungsdaten zu Resistenzmerkmalen bzw. Merkmalen, die die Resistenzausprägung beeinflussen können (z.B. Stomatadichte, Stilbeninduktion, Stilbenprofile), entsprechend ihrer Ausprägung gruppiert und auf unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen den Gruppen (*bulks*) getestet. Die Anwesenheit eines bestimmten Allels z.B. nur in der Gruppe der resistenten Individuen lässt darauf schließen, dass dieses Allel mit der Resistenz korreliert ist.

IV. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

IV.1. Ausführliche Kartierung der *sylvestris* Sammlung

Im Laufe des Projekts wurde die *sylvestris* Sammlung ausführlich kartiert. Dabei entstanden detaillierte, quantitative Datensätze zu verschiedenen Parametern, wodurch die Sammlung auch für künftige Fragestellungen sehr gut erschlossen werden konnte:

- Blattanatomie und Morphologie
- Stomatadichte
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger des Falschen Mehltau
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger des Echten Mehltau
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule
- Muster und Pegel verschiedener Stilbene für Aktivierung durch einen UV-Puls
- Genetische Kartierung mithilfe hochauflösender Mikrosatelliten

Die hierbei entstandenen Datensätze werden im Folgenden im Überblick dargestellt. Die sehr umfangreichen Einzeldatensätze sind dem Bericht in elektronischer Form (USB-Stick) beigelegt.

IV.1.1. Kartierung blattanatomischer und morphologischer Parameter

Die morphologischen und feinstrukturellen Merkmale der Blätter wurden beschrieben, photographisch dokumentiert und mithilfe von histochemisch angefärbten Mikrotomschnitten detailliert analysiert. Diese Daten wurden für die Genotypen jeweils in einem Datenblatt zusammengetragen (**Abb. 1**). Diese Datenblätter sind in dem Ordner „**01_Morphologie**“ in elektronischer Form dem Bericht beigelegt. Die Quantifizierung berücksichtigte jeweils 63 Einzelparameter von zellulärer Ebene (etwa Zahl Epidermiszellen bis zum nächsten Stoma) bis zur Blattebene (etwa Haarigkeit). Dieser sehr umfangreiche Datensatz ist in der Excel-Tabelle „**02_Morphologie_Quantifizierung**“ aufgeführt.

Vitis vinifera sylvestris Individuenkennung: **K95**



Blattform: Rundlich bis dreieckig, teilweise leicht dreilappig, deutlich und breit gesägt (K95-A und K95-B)
 Blatt leicht wellig (K95-F, K95-G)
Blattfarbe: Mittelgrün bis dunkelgrün (oder rotbraun), matt, Oberseite etwas dunkler als Unterseite (K95-F, K95-G)
Blattstrukturen: Blattunterseite ohne Fasern (K95-C), aber mit kürzeren Borsten auf den Blattadern, Blatttrand mit deutlichen kürzeren und längeren Borsten (K95-D)

Flächenschnitte:
obere Epidermis: Leicht bis mittel verzahnte Zellen mit unregelmäßigen Cuticulastrahlen, (K95-H, K95-I und K95-J)
untere Epidermis: Mittel bis meist sehr deutlich verzahnte Zellen, ungleichmäßige Stomataverteilung, Stomata ca. 24 µm lang (17 - 33 µm) bei einer Stomatadichte von ca. 43 Stomata/mm² (K95-K, K95-L und K95-M), sichtbare meist kurze Cuticulastrahlen um einige wenige größere Stomata.

Blattquerschnitte: 3µm Dicke
Stomata: Meist erhoben präsentierende Lage (K95-N, K95-O, K95-P) deutliche und dicke äußere Cuticulahörnchen (K95-N bis K95-T), wenn vorhanden nur sehr kleine innere Cuticulahörnchen (K95-O, K95-P und K95-S)

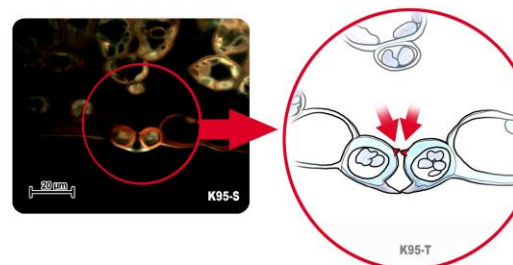
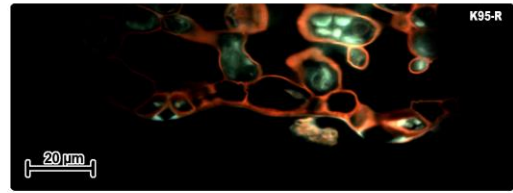
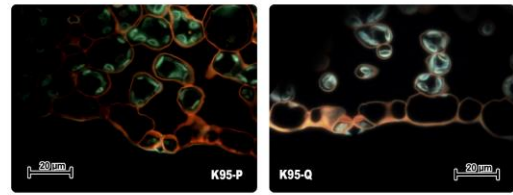
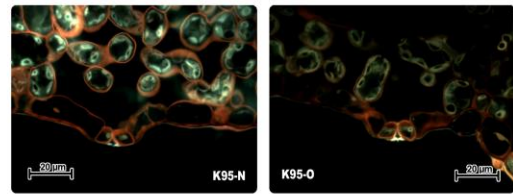
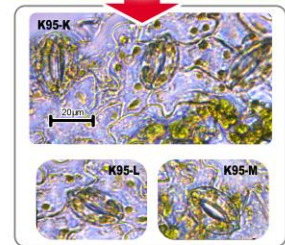
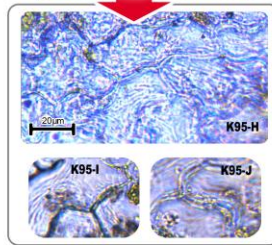
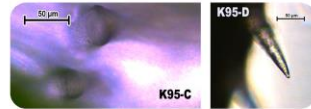
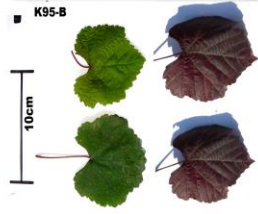
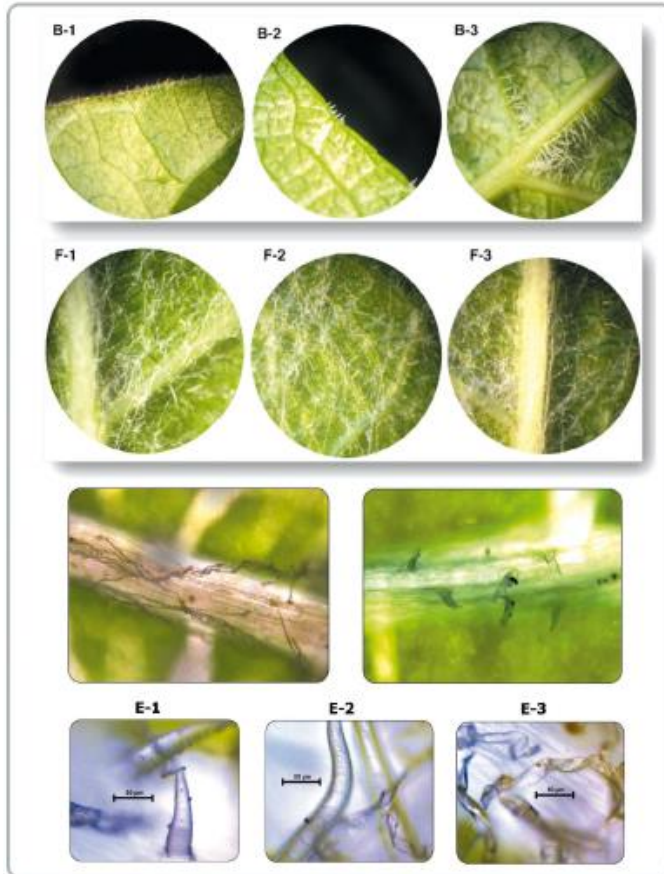


Abb. 1: Beispieldatenblatt mit feinstrukturellen und morphologischen Daten für den Wildrebenotyp K95.



Für diese morphologischen und feinstrukturellen Parameter fanden sich in der *sylvestris* Population ausgeprägte Variationsbreiten, die sich in aufeinanderfolgenden Vegetationsperioden bestätigen ließen, also vermutlich genetisch bedingt sind. Beispielsweise fanden sich Genotypen, bei denen die Blattunterseiten fast völlig nackt waren, andere, bei denen in den Verzweigungen der Blattadern deutliche Behaarung vorkam und dann wieder Genotypen, die flächendeckend wollig behaart waren (**Abb. 2**).

Abb. 2: Spektrum von Behaarungsmustern bei verschiedenen Genotypen der *sylvestris* Kollektion. Zusammenstellung aus Binokular-Photos und lichtmikroskopischen Aufnahmen. Dargestellt sind verschiedene exemplarische Ausprägungsvarianten der Behaarung der Wildrebe. B-1, B-2, B-3 zeigen Binokularaufnahmen von Borsten, wie sie an verschiedenen Stellen wie dem Blatttrand ausgebildet sein konnten. F-1, F-2, F-3 sind Binokularaufnahmen von wolligen Fasern auf der Blattunterseite. Die restlichen Photos zeigen Fasern und Borsten im Detail auf den Blattadern unter dem Lichtmikroskop. E1 zeigt kürzere Borsten und E2 länger Haare als Übergangsstadium zu den langen gewundenen Fasern in E3.

Um zu klären, inwieweit diese Parameter genetisch bestimmt waren, wurden Blätter verschiedener Entwicklungsphasen oder unter verschiedenen Lichtbedingungen (Pflanzen im Schatten versus Pflanzen in der Sonne) systematisch verglichen (**Abb. 3**). Dabei zeigte sich, dass Stomatadichte und Feinstruktur der Stomata von den Umweltbedingungen unabhängig waren. Hingegen zeigte die Ausprägung der Oberflächenwachse zwar ebenfalls große genotypische Unterschiede, war aber deutlich stärker durch die Lichtbedingungen und das Blattalter beeinflusst.

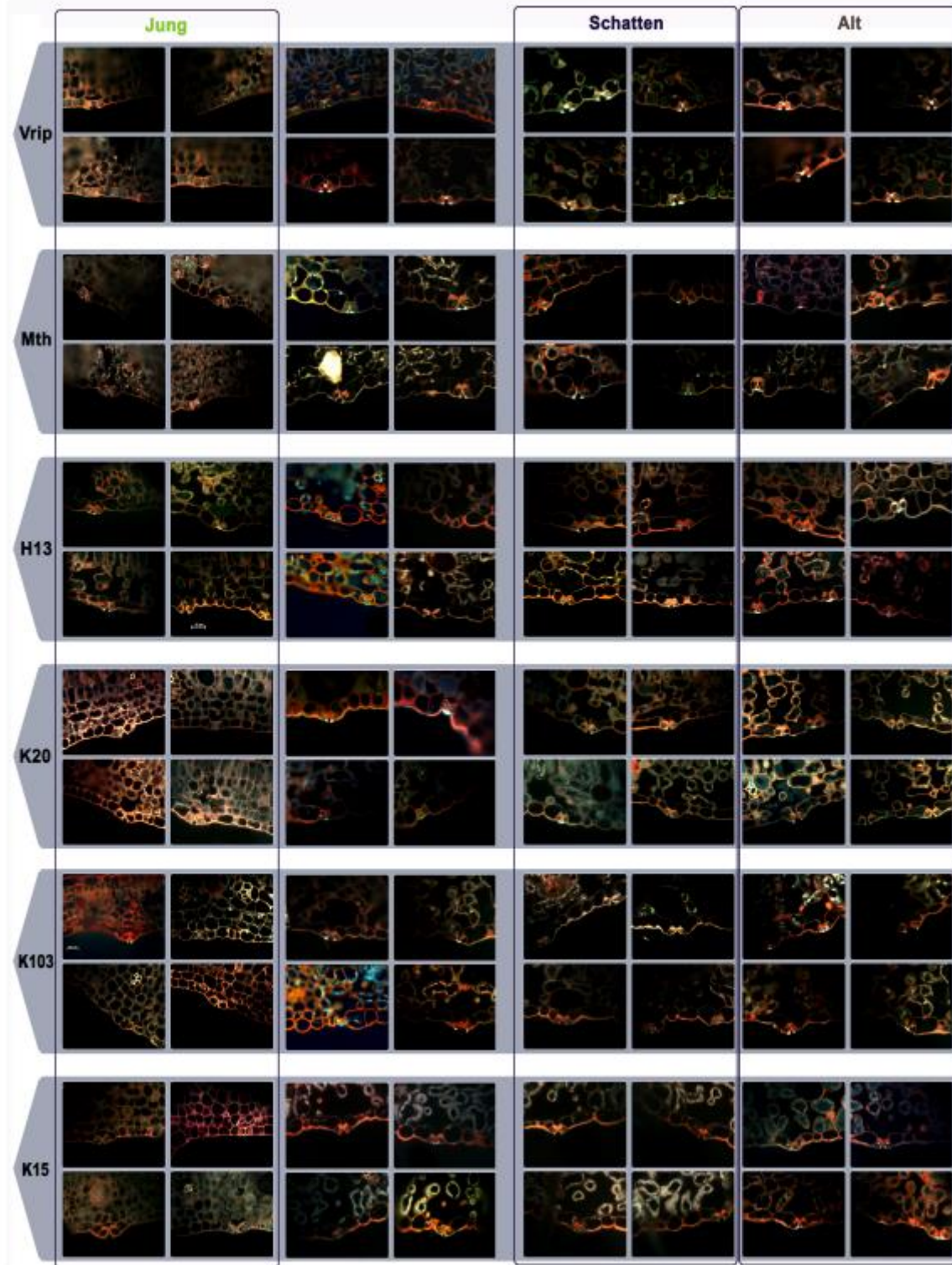


Abb. 3: Exemplarisch für Wachstum unter unterschiedlichen Bedingungen sind hier die Aufnahmen von 4 *V. sylvestris*-Genotypen (H13, K20, K103 und K15), der Kulturrebensorte „Müller-Thurgau“ (Mth) und der amerikanischen Wildrebe *V. riparia* (Vrip) gezeigt. Für jede Bedingung oder Altersstufe der Blätter wurden je 4 exemplarische Aufnahmen in einer Spalte zusammengefasst. In der ersten Spalte sind 4 Aufnahmen von Präparate, die auf junges Blattmaterial zurückgehen (Kasten: Jung). In der zweiten Spalte sind die Kontrollaufnahmen von Blättern in mittlerem Alter und Entwicklungsgrad von Pflanzen im Außenbeet. In der dritten Spalte sind Aufnahmen von Schattenblättern (Schatten) und in der letzten Spalte je 4 Aufnahmen von altem Blattmaterial (Alt).

Von besonderem Interesse war die Dichte der Spaltöffnungen, weil diese sowohl für das Infektionsgeschehen des Falschen Mehltau (der Keimschlauch dringt über die Spaltöffnung ein) als auch der Schwarzfäule (das Hyphenwachstum erfolgt entlang der periklinen Wände der Epidermiszellen, die nicht Teil des Spaltöffnungsapparats sind) von Bedeutung sind. Beim Vergleich von verschiedenen Vegetationsperioden und Licht- und Schattenblättern zeigte sich hierbei, dass die Dichte als Zahl von Spaltöffnungen pro Flächeneinheit abhängig von der unterschiedlichen Expansion der Blätter schwankte. Wenn man jedoch quantifiziert, welcher Anteil von Epidermiszellen zu Spaltöffnungen differenziert, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen, die von Vegetationsperiode und Lichtbedingungen weitgehend unabhängig sind. Die statistisch ausgewerteten Daten sind in der Tabelle **03_Stomata_Pathogene_Stilbene_Quantifizierung** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt.

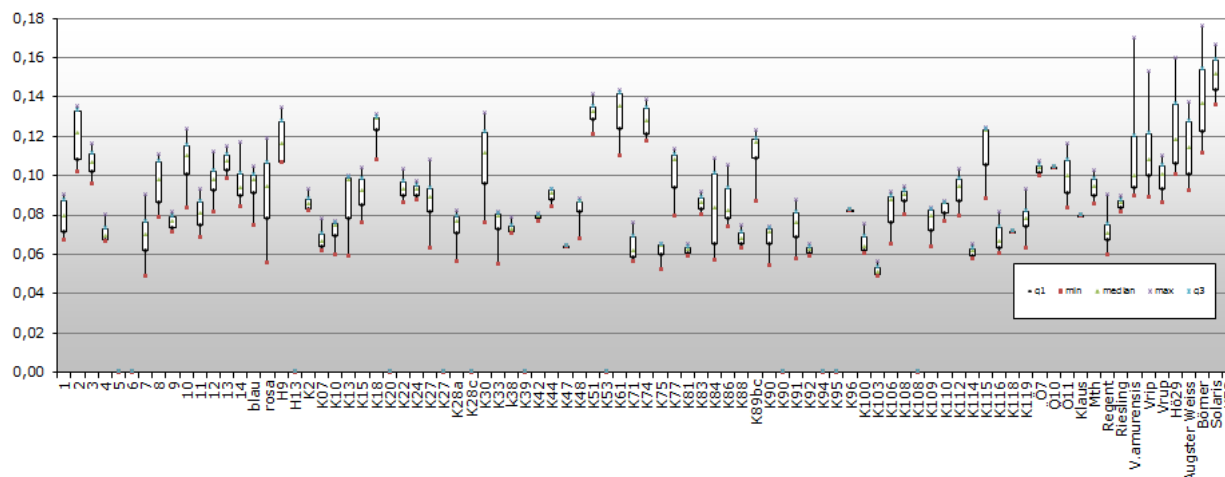


Abb. 4: Statistische Analyse der zellulären Spaltöffnungsichte in den verschiedenen Wildreben genotypen. Die Werte auf der Ordinate geben die relative Häufigkeit an, dass eine epidermale Zelle als Spaltöffnung ausgebildet ist. Die Daten repräsentieren eine Stichprobe von jeweils 200-600 Stomata aus zwei aufeinanderfolgenden Vegetationsperioden mit jeweils vier biologischen Replika.

Die Charakterisierung der Population hinsichtlich 63 morphologisch-anatomischen Einzelparametern führt zu einem vieldimensionalen Datenraum, der in seiner Komplexität nicht mehr ohne weitere Prozessierung zu bewältigen ist. Um mögliche Muster erkennen zu können, wurden daher die verschiedenen Genotypen mithilfe von aus der molekularen Phylogenie abgewandelten Clustermethoden und einem eigens entwickelten Computerprogramm prozessiert. Daraus erhält man eine farbkodierte Distanzmatrix, wobei der Farbcode, gemittelt über die 63 erhobenen Parameter angibt, welche Genotypen hinsichtlich ihrer morphologischen und anatomischen Parameter ähnlich sind (**Abb. 5**).

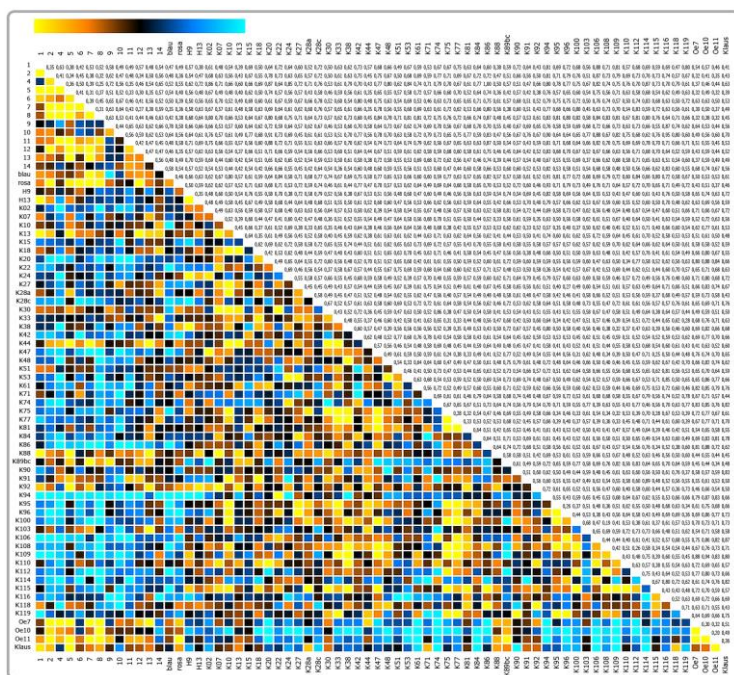


Abb.5: Visualisierung der morphologisch-anatomische Ähnlichkeit, ermittelt aus 63 erhobenen Einzelparametern für die *sylvestris* Population. Jeder Einzelpunkt steht für den Vergleich der beiden Genotypen für die Koordinaten dieses Datenpunkts. Je blauer, umso unterschiedlicher sind die beiden Genotypen, je gelber, umso ähnlicher sind sie. Die Matrix wurde mithilfe des eigens entwickelten Programms *treegen* erzeugt.

Im nächsten Schritt kann nun auf der Basis dieser Distanzmatrix mithilfe des sogenannten *neighbor-joining* Algorithmus ein Stammbaum berechnet werden, der die (morphologische) Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Genotypen darstellt (**Abb. 6**). Je näher die Äste, umso ähnlicher sind die jeweiligen Genotypen. Daraus werden nun Gruppen von Wildreben mit ähnlichen Blattparametern sichtbar.

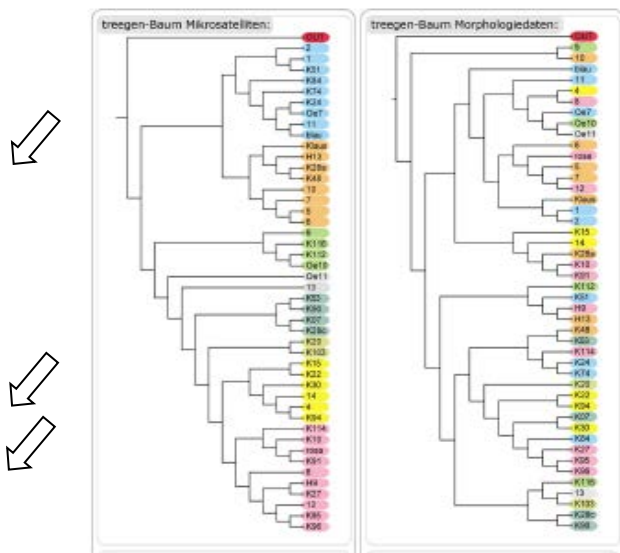


Abb. 6: Vergleichende Darstellung der genetischen (links) und morphologischen (rechts) Bäume, die mithilfe von treegen als Distanzmatrizen berechnet und dann über *neighbor joining* in einen Stammbaum übersetzt wurden. Genetisch definierte Sippen sind farblich herausgehoben, um die Auflösung in Untergruppen im morphologischen Baum deutlich zu machen. Pfeile zeigen auf Beispiele von genetisch ähnlichen Genotypen, die auch morphologisch ähnlich sind, also vermutlich morphologisch wirkende Allele aufweisen.

Diese Ähnlichkeitsbäume lassen sich nun mit Bäumen für die genetische Verwandtschaft vergleichen, die aus der Analyse von hochauflösenden Mikrosatellitenmarkern gewonnen wurden. Hierbei kann man erkennen, dass die genetischen Cluster (**Abb. 6**, links) hinsichtlich ihrer morphologischen Ähnlichkeit in verschiedene Untergruppen zerfallen (**Abb. 6**, rechts). Wenn man die Übereinstimmung zwischen genetischer Verwandtschaft und morphologischer Ähnlichkeit global betrachtet, erhält man daher einen Korrelationskoeffizienten von 10.5%, was letztlich nichts anderes bedeutet, als dass etwa 90% morphologischer Ähnlichkeit nicht auf genetischer Verwandtschaft, sondern auf Konvergenz beruhen, also auf Selektion durch ähnliche Umweltbedingungen (was letztlich auch nicht weiter überrascht, da fast alle Wildreben aus demselben Ökosystem, dem Auwald der Halbinsel Ketsch, herstammen). Beim zweiten Blick erkennt man jedoch, dass es innerhalb der genetischen Gruppen Untercluster gibt, die in beiden Bäumen gemeinsam auftreten (**Abb. 6**, rechts, Pfeile). Hier gibt es also auch Ähnlichkeit, die genetisch bedingt ist. Freilich ist die nicht monogen, sondern hängt von mehreren entkoppelten genetischen Loci ab (auch dieser Schluss ist nicht überraschend, bedeutet aber letztlich, dass man in einer Kreuzungsanalyse sehr große Populationsgrößen benötigt, um hier statistisch signifikante Korrelationen aufdecken zu können).

IV.1.2. Kartierung Anfälligkeit gegenüber Falschem Mehltau, Echem Mehltau und Schwarzfäule

Es wurden für alle drei Pathogene detaillierte Untersuchungen zum Infektionsverlauf nach kontrollierter Inokulation über die *sylvestris* Population erhoben, die über mehrere Vegetationsperioden validiert wurde.

Für *Plasmopara viticola*, den Erreger des Falschen Mehltau, wurden diese Untersuchungen sogar mit vier unterschiedlichen Isolaten durchgeführt (**Abb. 7**). Der Erfolg der Infektion wurde über zwei verschiedene Systeme (eine Bonitierung und eine Auszählung der Sporangien-dichte als direktes Maß für die Pathogen-Fitness) bestimmt, mit in der Summe ähnlichen Resultaten, wobei die Sporangienzählung eine genauere Differenzierung zuließ.

Während die Infektion bei der Kultursorte Müller-Thurgau sehr hoch war, war er bei vielen der *sylvestris* Akzessionen deutlich niedriger, wobei das bei den PiWi-Sorten Regent und Solaris beobachtete fast völlige Ausbleiben der Sporulation von keiner der Wildreben erreicht wurde. Dennoch war die Infektion bei mehr als der Hälfte der Wildrebenpopulation im Vergleich mit Müller-Thurgau um mehr als 50% unterdrückt. Es liegt hier also eine signifikante Teilresistenz vor. Bei 15 der *sylvestris* Genotypen war die Infektion sogar zu mehr als ¾ unterdrückt.

Die statistisch ausgewerteten Daten sind in der Tabelle **03_Stomata_Pathogene_Stilbene_Quantifizierung** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt.

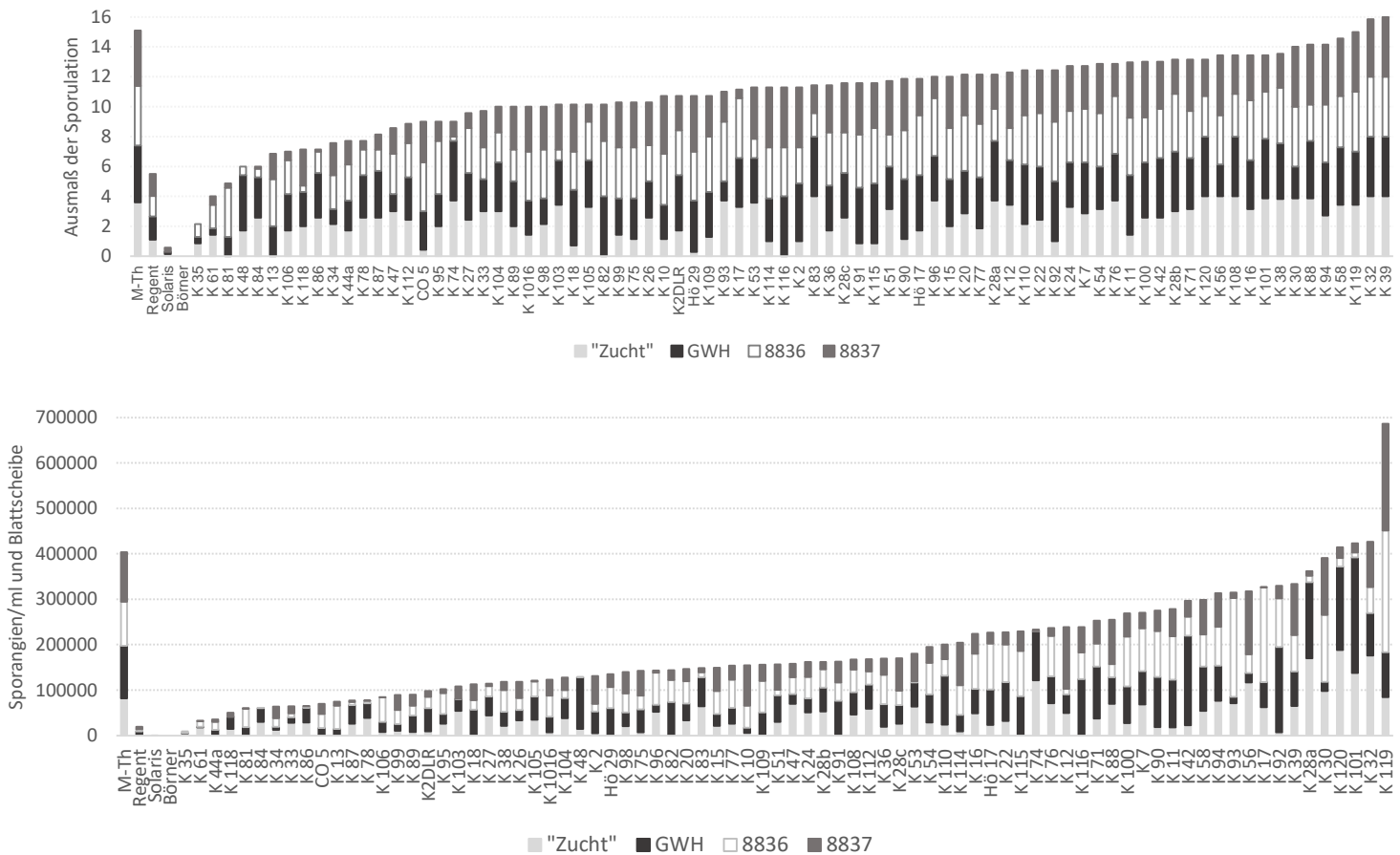


Abb. 7: Vergleich der Infektionsstärke nach kontrollierter Inokulation mit dem Erreger des Falschen Mehltau, einmal angegeben als Bonitierung der Sporulationsflecken in einem Klassifikationssystem (oben) und als Sporulationsintensität anhand neu gebildeter Sporangien pro ml und Blattscheibe (unten) bei Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichssorten ‘M-Th’ (anfällig), den PiWi-Sorten ‘Regent’ und ‘Solaris’ (resistent) und der Unterlagssorte ‘Börner’ (resistent). Versuche wurden anhand vier verschiedener Isolate des Falschen Mehltaus (“Zucht“, GWH, 8836 und 8837) durchgeführt, deren Ergebnisse als Summe dargestellt sind, die Evaluierung erfolgte 7 Tage nach Infektion.

Auch nach Infektion mit dem Erreger des Echten Mehltau wurde in zahlreichen sylvestris-Akzessionen eine partielle Resistenz beobachtet. Auch hier wurden wieder zwei Methoden zur Quantifizierung eingesetzt – zum einen wurde die Befallshäufigkeit erhoben, zum anderen die Befallsstärke (**Abb. 8**).

Die Auswertung nach Befallsstärke erlaubte eine bessere Auflösung, das Gesamtbild war jedoch für beide Methoden vergleichbar. Auch für den Echten Mehltau war der Befall bei der anfälligen Kultursorte Müller-Thurgau sehr stark, bei den PiWi-Sorten Regent und Solaris deutlich geringer. Im Gegensatz zum Falschen Mehltau gab es hier aber eine Gruppe von etwa 10 sylvestris Genotypen, die hinsichtlich Resistenz den beiden PiWi-Sorten gleichkamen.

Anzumerken wäre noch, dass Resistenz gegenüber Falschem Mehltau nicht mit einer Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau korreliert war und umgekehrt. Die *sylvestris* Akzessionen befanden sich oft an völlig unterschiedlichen Positionen im Befallsspektrum.

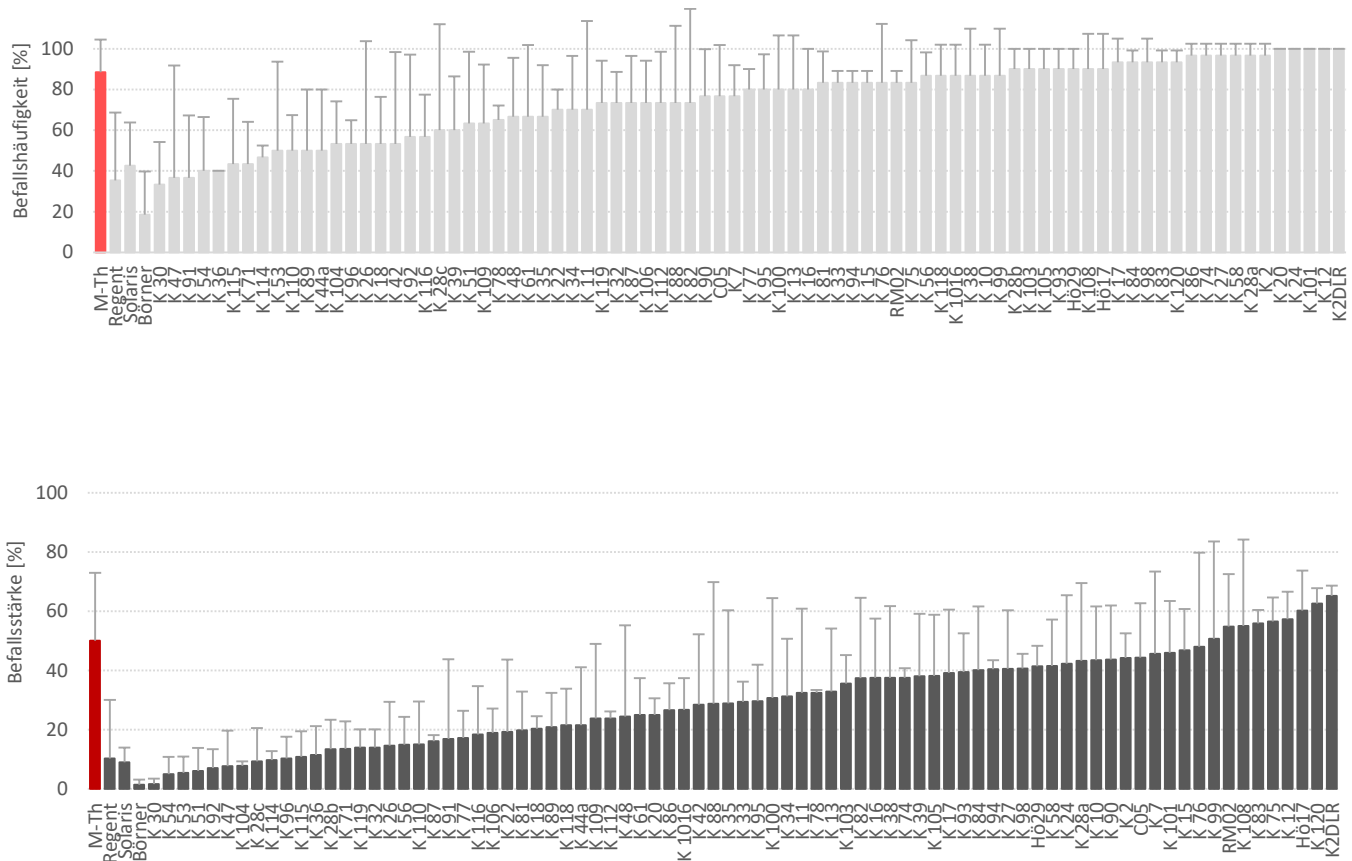


Abb. 8: Vergleich der Infektionsstärke nach kontrollierter Inokulation mit dem Erreger des Echten Mehltau, einmal angegeben Befallshäufigkeit (oben) oder als Befallsstärke (unten) bei Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichssorten 'M-Th' (anfällig), den PiWi-Sorten 'Regent' und 'Solaris' (resistent) und der Unterlagssorte 'Börner' (resistent). Die Auswertung erfolgte 21 Tage nach Infektion.

Als drittes Pathogen wurde schließlich noch die Schwarzfäule untersucht (**Abb. 9**):

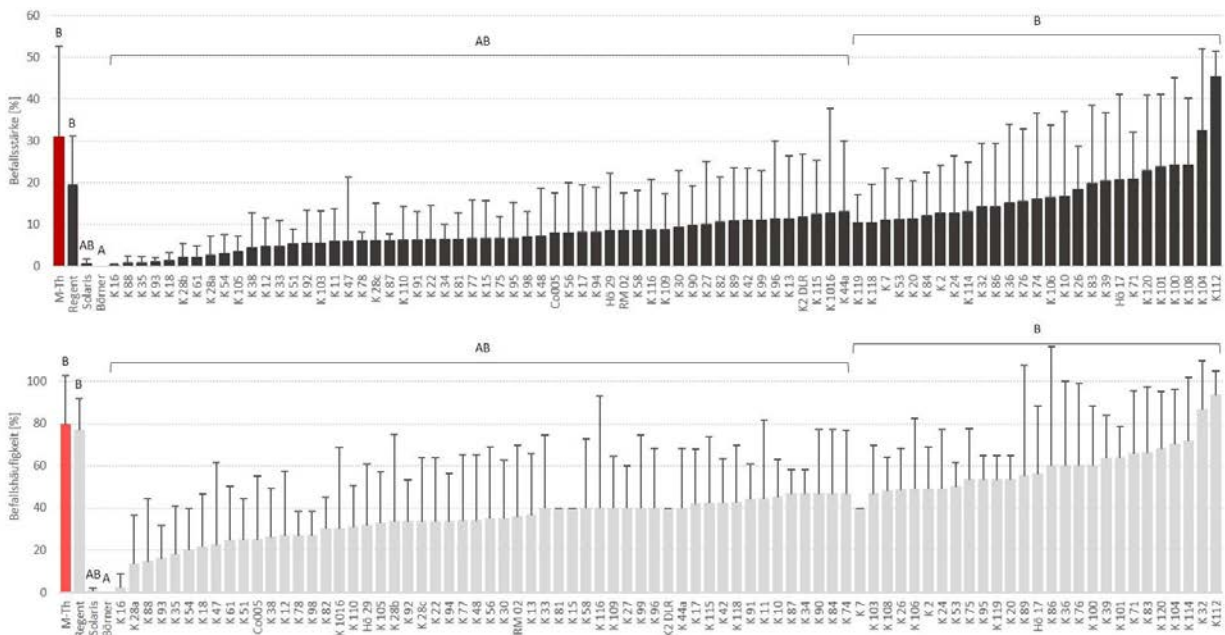


Abb. 9: Vergleich der Infektionsstärke nach kontrollierter Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule, einmal angegeben als Befallsstärke (oben) oder Befallshäufigkeit (unten). bei Europäischen Wildrebenakzessionen und den Vergleichssorten 'M-Th' (anfällig), den PiWi-Sorten 'Regent' und 'Solaris' (resistent) und der Unterlagssorte 'Börner' (resistent). Die Auswertung erfolgte 21 Tage nach Infektion. A, AB, B - Signifikanzgruppen nach Kruskal-Wallis (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner Prozedur): $\alpha = 0,05$.

Ähnlich wie beim Echten Mehltau wurden Befallsstärke und Befallshäufigkeit quantifiziert, mit insgesamt ähnlichen Ergebnissen. Da hier die PiWi-Rebe Regent ebenfalls anfällig war, schnitt ein großer Teil der sylvestris Akzessionen besser ab. Freilich waren nur eine kleine Gruppe von etwa 5 Genotypen so resistent wie die PiWi-Rebe Solaris. Weiterhin war bemerkenswert, dass der hinsichtlich der Schwarzfäule stark resistente *sylvestris* Genotyp K16 hinsichtlich Resistenz gegen Falschen und Echten Mehltau eher im unteren Mittelfeld angesiedelt war, also nur mäßig resistent war.

IV.1.3. Kartierung Stilbenakkumulation und –profil

Die Wildreben-Genotypen wurden mittels HPLC die Induktion der antimikrobiellen Stilbene nach Infektion genauer untersucht. Neben dem zentralen Stilben trans-Resveratrol, wurden auch die biologisch inaktive Speicherform trans-Piceid (ein Resveratrol-Glycosid) und das biologisch hochaktive oxidative Dimer ϵ -Viniferin untersucht. Durch methodische Fortschritte der Analyse konnten auch das ebenfalls hochaktive Pterostilben und die (biologisch inaktiven) cis-Formen von Resveratrol und Piceid untersucht werden. Bei einigen Genotypen von *V. sylvestris* lässt sich schon nach 6 Stunden ein deutlich erhöhter Pegel an Stilbenen beobachten, der nach 24 Stunden ein Niveau erreichte, das oft ein Vielfaches des Niveaus in Kultursorten beobachteten Niveaus erreichen konnten. Besonders die Kreuzungseltern Hö29, K53 und K83 wiesen unter den Wildrebenkadidaten die höchsten Stilbenpegel (**Abb. 10**). Ein Vergleich der induzierten Stilbenformen zeigte eine Dominanz der antimikrobiell aktiven Formen trans-Resveratrol und ϵ -Viniferin. Die Ruhepegel an Stilbenen sind demgegenüber vergleichbar. Die Wildreben sind also nicht konstitutiv „im Alarmzustand“, sondern schalten einfach schneller und kräftiger ihren Sekundärmetabolismus an. Dies deutet auf genetisch bedingte Unterschiede in der frühen Verarbeitung von Abwehrsignalen hin.

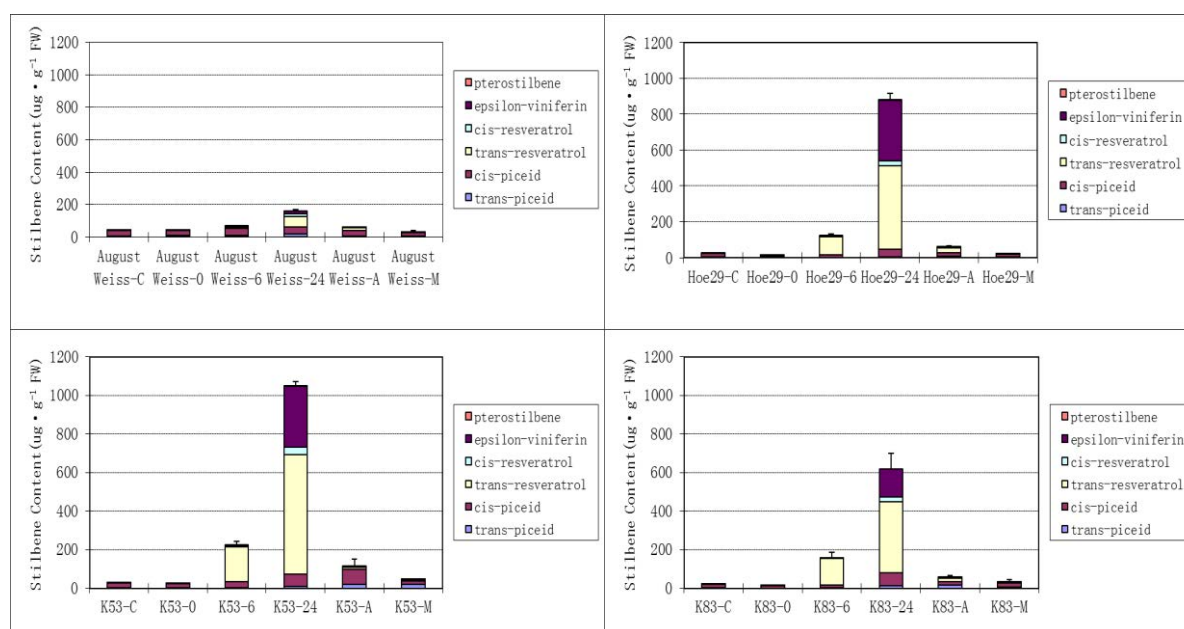


Abb. 10: Induktion von Stilbenen bei den Kreuzungseltern Augster Weiss, Hö29, K53 und K83 gegenüber der unbehandelten Kontrolle (C) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer induktiven Behandlung mit 10 min UV-B (0 = unmittelbar nach dem Lichtpuls, 6 = 6 h nach dem Lichtpuls, 24 = 24 h nach dem Lichtpuls) oder Induktion mit 1 % AlCl_3 (A) oder mit 100 μM MeJA (M). Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

Um die gesamte Population im Hochdurchsatz kartieren zu können, wurden für alle Wildreben-Genotypen systematisch zu definierten Zeitpunkten Extrakte gewonnen in Zusammenarbeit mit der Metabolomik-Plattform am INRA Colmar auch nach Unterschiede im Profil der gebildeten Stilbene gesucht und statistisch aufgearbeitet (Duan et al., 2015).

Dabei fanden sich ganz klar genetisch bedingte Unterschiede in der frühen Verarbeitung von Abwehrsignalen. In der Principle Component Analysis traten zwei Gruppen von Wildreben zutage – die eine Gruppe reagierte bevorzugt mit der Bildung des biologisch inaktiven Piceid (und dies in geringen Pegeln), während die andere Gruppe, darunter auch die Kreuzungseltern Hö29 und Ke83 mit der Bildung der biologisch hochpotenten Stilbenformen (Resveratrol, Viniferine und Pterostilbene) reagierten und dies in hohen Pegeln (**Abb. 11**). Damit ließen sich (ähnlich wie schon für die morphologischen Marker), hinsichtlich ihrer Stilbenprofile unterschiedene Gruppen abgrenzen. Wenn man diese in den über Mikrosatelliten generierten Baum der genetischen Verwandtschaft projizierte, zeigte sich, dass es hier verschiedene Gruppen gab, die in verschiedenen Ästen des Baums angesiedelt waren (**Abb. 11**). Es gibt also

genetische Faktoren, die in der *sylvestris* Population zu einer verstärkten Stilbenbildung führen, es gibt aber mehrere davon.

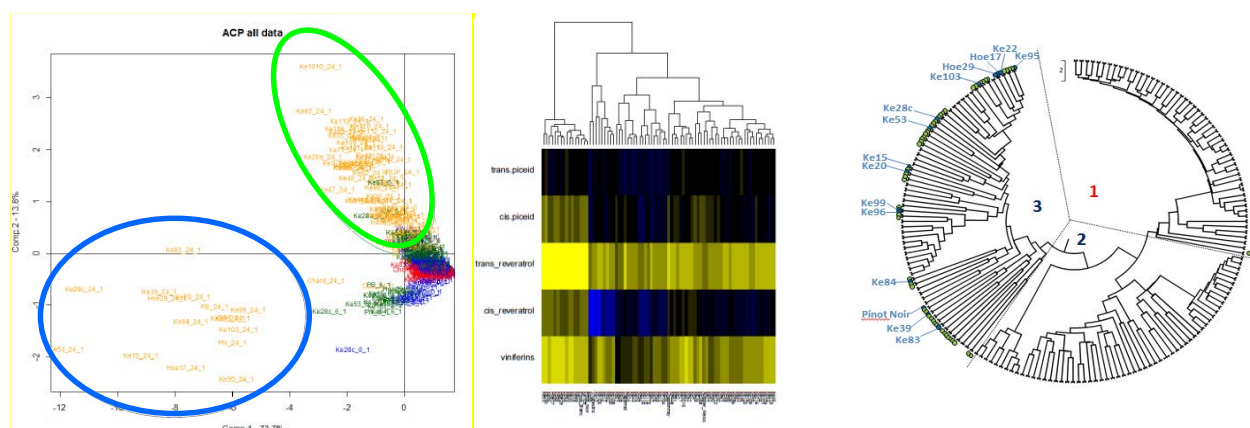


Abb. 11: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Analyse der Stilbenakkumulation in der *sylvestris* Population. Links: *Principal Component* Analyse der durch einen 10-minütigen UV-C Puls ausgelösten Stilbenbildung in der Wildrebenpopulation. Jeder Punkt entspricht einem Genotyp. Beispielhaft ist die Situation zum Zeitpunkt $t=24$ h dargestellt. Der grüne Kreis umschließt Genotypen, die mit der Bildung des biologisch inaktiven Glykosids Piceid reagieren, der blaue Kreis umschließt Genotypen, die mit der Bildung biologisch aktiver Stilbenformen reagieren. Die beiden Komponenten erklären 87.5% der beobachteten Variabilität. Mitte: Darstellung der Stilbenprofile über eine heat map. Jede vertikale Linie steht für einen *sylvestris* Genotyp. Blau bedeutet erhöhte Pegel. Das Dendrogramm zeigt Cluster von hinsichtlich ihrer Stilbenprofilierung ähnlichen Genotypen. Rechts: Projektion der Stilbenprofile auf einen über Mikrosatelliten erzeugten genetischen Baum von über 300 europäischen *sylvestris* Akzessionen. Die Gruppe der blauen Genotypen (erhöhte Stilbenakkumulation und Akkumulation in Form von Aglykonen) ist herausgehoben, um zu zeigen, dass es hier mehrere Sippen gibt, in denen dieser Chemotyp vorkommt (aus Duan et al., 2015).

Die statistisch ausgewerteten Daten sind in der Tabelle **03_Stomata_Pathogene_Stilbene_Quantifizierung** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt.

Ebenso wurden, zunächst für die Kreuzungen zwischen zwei ausgewählten *sylvestris* Genotypen mit zwei *vinifera* Kultivaren, über 250 Mikrosatellitenmarker getestet, woraus dann ein Satz von 140 informativen Markern hervorging, der über das ganze Genom verteilt war, so dass jedes Chromosom mit 5-10 informativen Markern kartiert werden konnte. Leider dauerte es aufgrund schwieriger Umstände (siehe Punkt 3) bis 2015, bis eine Kreuzungspopulation ausreichender Größe etabliert war. Eine Phänotypisierung dieser Population hinsichtlich einer Schwarzfäule-Resistenz wird daher erst in einigen Jahren möglich sein. Der Umfang der in den Vorjahren aufgebauten Kreuzungspopulation ist nicht ausreichend, um eine Korrelation zwischen genetischen und phänotypischen Daten aufzubauen. Dennoch bieten die in diesen Untersuchungen erarbeiteten Markerinformationen eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen sowohl für die Identifizierung von möglichen Resistenzgenorten im Genpool von *Vitis sylvestris* als auch für weitere weinbaulich wichtige Merkmale, wie z. B. Ertrags- und Qualitätsparameter oder phänologische Kenndaten (etwa Lockerbeerigkeit) darstellen.

Nachdem sich in der zweiten Hälfte der Projektlaufzeit abzeichnete, dass die Erstellung ausreichend großer Kreuzungspopulationen einschließlich der nachfolgenden Evaluierung dieses Materials in der Projektphase nicht mehr erreicht werden konnte, wurde als Alternativansatz die *Bulk Segregant Analyse* (BSA) gewählt. Hierzu wurde die beim Projektpartner KIT vorhandene Wildrebenpopulation ($N=110$) mit SSR-Markern genotypisiert. Analog zu den Kreuzungspopulationen wurde auch hier eine Markerdichte von ca. 5-10 SSR-Marker pro Chromosom erzielt. Die gewonnenen genetischen Daten wurden gemeinsam mit den von den Projektpartnern erarbeiteten Phänotypisierungsdaten (u.a. verschiedene Merkmale als Resistenzindikatoren für Echten und Falschen Mehltau, Schwarzfäule, Stomatadichte, Stilbenbildung) analysiert. Eine Zuordnung bestimmter Genomabschnitte (einzelne Chromosomen oder Chromosomenbereiche) zu den analysierten Merkmalen war allerdings nicht möglich (**Abb. 12**). Dies kann verschiedene Gründe haben - zum einen sind diese Merkmale vermutlich polygen (siehe Stilbenprofile, **Abb. 11**), so dass man großes Glück haben muss, um mit der im begrenzten Rahmen eines solchen Projekts überprüfbarer Zahl von etwa 5-10 Markern die relevanten Genorte zu treffen, zum anderen sind einige dieser Merkmale in einem hohen Maße umweltabhängig, so dass man große Populationsgrößen benötigt, um eine Beobachtung statistisch absichern zu können. Genau dies ist bei den gerade noch vor der Auslöschung geretteten Wildreben natürlich nicht möglich gewesen.

Die Mikrosatelliten- und die Korrelationsanalysen mit den verschiedenen phänotypischen Merkmalen sind in der Tabelle **04_Mikrosatelliten- und Korrelationsanalysen** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt.

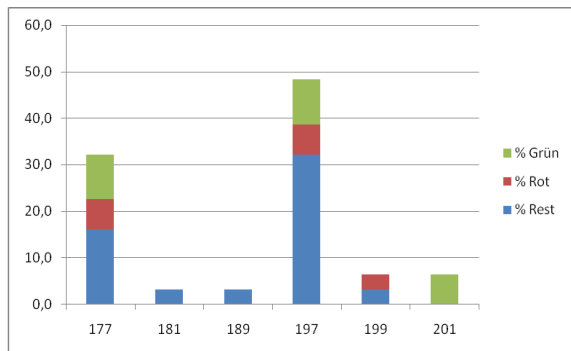


Abb. 12. Beispiel einer Korrelationsanalyse für Schwarzfäuleresistenz. Der hier gezeigte SSR-Marker VMC9D3 kommt in mehreren Allelen vor, die unterschiedlich lang sind (von 177-201 bp). Grün gibt die resistenten, rot die anfälligen Genotypen wieder, blau die keiner der Gruppen zugeordneten. Gesucht wird nach Markern, bei denen die grüne und die rote Gruppe sich verschiedenen Allelen eines Markers zuordnen lassen.

Fazit: Das Ziel einer detaillierten Phänotypisierung und Genotypisierung der *sylvestris* Population wurde erreicht und dies mit großer Qualität und Detailschärfe, das Ziel, Korrelationen zwischen Phänotyp und Genotyp dingfest zu machen, konnte aufgrund der kleinen Populationsgrößen nicht verwirklicht werden.

IV.2. Zelluläre Analyse der Infektion mit dem Erreger der Schwarzfäule

Hier konnten viele, vorher unbekannte Details zur Lebensweise des Pathogens und auch zu seiner Infektionsstrategie auf zellulärer Ebene aufgeklärt werden. Dies gelang nicht nur auf qualitativer Ebene, mithilfe von hochwertigen mikroskopischen Analysen, sondern auch auf quantitativer Ebene, wobei sich für unterschiedliche Genotypen zeigen ließ, dass die Resistenz an unterschiedlichen Stadien des Infektionsgeschehens zum Tragen kommt. Nach einer sehr langen biotrophen Phase, wobei die Hyphen zweidimensional unterhalb der Kutikula oberhalb der antiklinen Zellwänden wachsen, werden in einem dreidimensionalen Wachstumsprozess Pyknidien gebildet, während der Pilz gleichzeitig zu Nekrotrophie übergeht. Während der biotrophen Phase lassen sich weder Haustorien beobachten, noch dringt der Pilz in die Wirtszellen ein. Im Folgenden werden einzelne Aspekte dieses Phänomens detailliert geschildert.

IV.2.1. Zelluläre Analyse der biotrophen Phase von *Guignardia bidwelli*

Es wurden verschiedene Ansätze zur Etablierung einer minimal invasiven Bestimmung der Schwarzfäuleresistenz bezüglich einer zu bonitierenden Symptomausprägung verfolgt. Hierbei konnten viele neue Einblicke in die Details des Infektionsgeschehens gewonnen werden.

Aufgrund der langen Inkubationszeit, die mindestens 14 bis 21 Tage beträgt, sind Tests an abgetrennten Blättern oder Blattscheiben äußerst schwierig, da selbst nach Oberflächensterilisation häufig ubiquitäre Pathogene wie *Botrytis cinerea* das Gewebe befallen und falsch positive Befallsfunde verursachen können. Daher war es auch schwierig schwarzfäuletypischen Symptome an abgetrennten Blättern oder Blattscheiben bzw. -stücken beobachtet werden. Eine symptombezogene Testmethode an einzelnen Pflanzenteilen ist daher derzeit nicht durchführbar.

Alternativ zu den symptombezogenen Tests wurden mittels Fluoreszenzmikroskop die frühen Entwicklungsstadien des Erregers untersucht, um Ansatzpunkte für einen quantitativen Test zu gewinnen, der nach wenigen Tagen auswertbar ist und an Blattscheiben durchgeführt werden kann. Aufbauend auf den Ergebnissen der Resistenztests wurden drei Wildrebenakzessionen ausgewählt, die sehr geringe Befallsstärken aufwiesen. Zusätzlich wurden die schwarzfäuleresistenten Sorten Börner und Solaris und die anfällige Rebsorte Müller-Thurgau als Vergleich herangezogen. Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchungen wurde die Anheftungsrate der Sporen an die Blattoberfläche analysiert, ebenso wie die Fähigkeit der Sporen ein Appressorium auszubilden, welches eine Grundvoraussetzung zur Penetration der Pflanze ist. Erst dadurch besitzen die Sporen die Fähigkeit, Hyphen zu bilden, um sich im Gewebe auszubreiten. Zusätzlich wurde die Länge der Hyphen und ihr Verzweigungsgrad erfasst (**Abb. 13**).

Die Sporenanheftung und Appressorienbildung (**Abb. 13a-c**) war auf den getesteten Wildreben und den resistenten Sorten weniger stark ausgeprägt als auf der Sorte Müller-Thurgau. Jedoch waren die Unterschiede nicht groß, sodass sie für die Resistenz wahrscheinlich nicht ausschlaggebend sind. Wesentlich größere Unterschiede wurden bei der Hyphenbildung (**Abb. 13d, e**) beobachtet. Auf den getesteten Wildreben und den resistenten Sorten waren wesentlich weniger Sporen in der Lage Hyphen auszubilden (**Abb. 14, links**), vor allem waren die Hyphen kürzer und weniger stark verzweigt, als jene in Blättern der Sorte Müller-Thurgau (**Abb. 14, rechts**). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Anzahl und Ausprägung der Hyphen den Resistenzgrad der Pflanze widerspiegelt. Diese Parameter sind jedoch stark abhängig vom Blattalter und somit vom physiologischen Zustand der Blätter, die

relativen Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen sind bei älteren Blättern stärker ausgeprägt als bei jungen Blättern (**Abb. 14**).

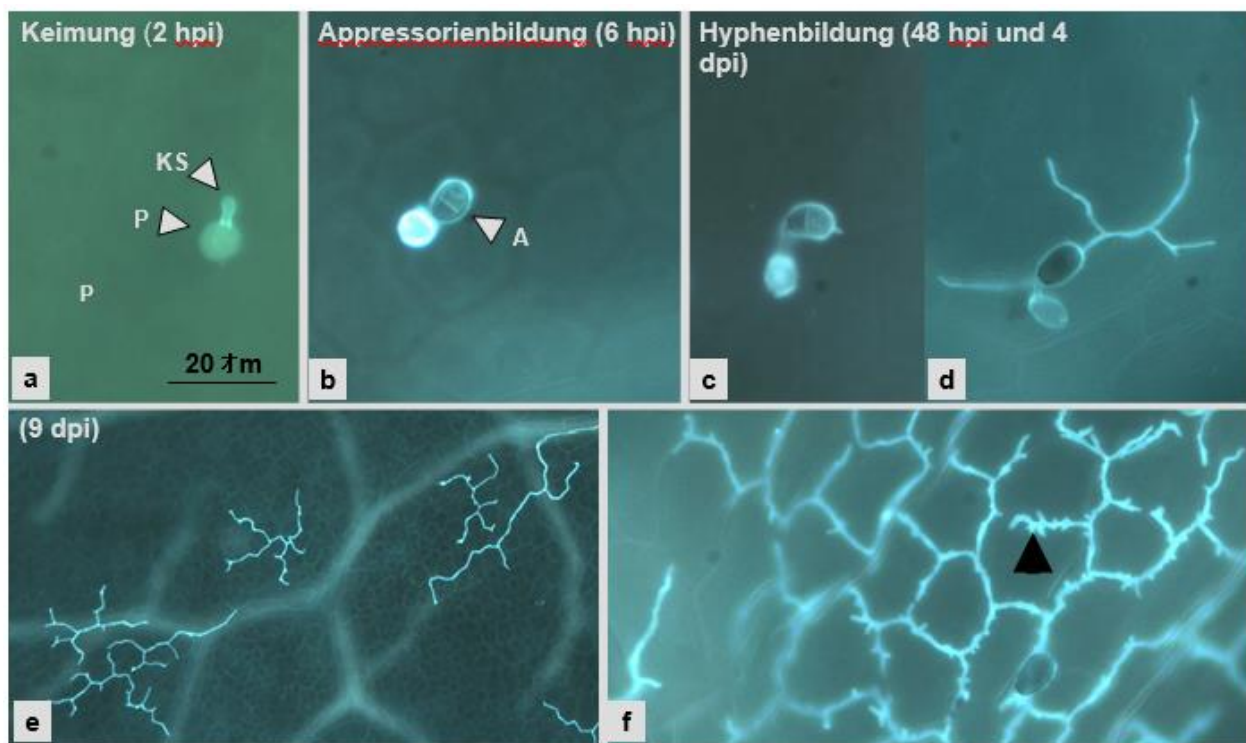
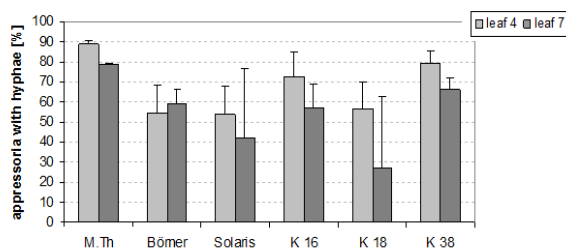


Abb. 13: Stadien des Infektionsprozesses für die Schwarzfäule. a Pyknospore (P) mit Keimschlauch (KS), b Bildung eines Appressoriums (A), c erste Hyphen nach 48 hpi, d Hyphenwachstum über den antiklinalen Zellwänden der Epidermis, e Bildung von Hyphennetzen und f Ausbildung von "Hyphenfingern" (Pfeil).

formation of hyphae 5 dpi:



size of hyphal net 5 dpi:

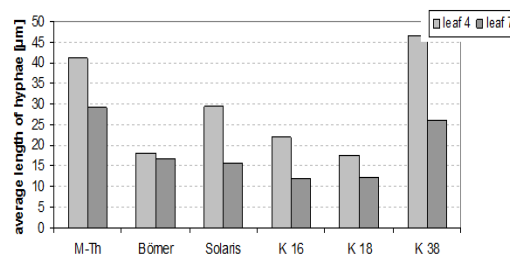


Abb. 14: Hyphenbildung (links) und Hyphenverzweigung (rechts) auf verschiedenen Wirts-Genotypen. M.Th. Müller-Thurgau (anfällig), Börner (Unterlagsrebe, gilt als resistent), Solaris (Hybridsorte, gilt als resistent), K16, K18, K38 drei *V. sylvestris* Genotypen von der Wildpopulation aus Ketsch.

IV.2.2. Zelluläre Analyse von später Infektionsphase und Symptomausprägung

Die frühen Stadien des Infektionsprozesses von *Phyllosticta ampellicida* (*P. ampellicida*), der asexuellen Form des Pilzes, auf Blättern der anfälligen Rebsorte Müller-Thurgau (M-Th) wurden in der vorangegangenen Berichtsperiode untersucht (siehe Zwischenbericht 2014). Mit Hilfe von Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie konnten nun auch spätere Stadien bis hin zur Symptomausprägung beobachtet und charakterisiert werden. Dabei konnten wichtige Erkenntnisse zur Biologie des Erregers erarbeitet und Wissenslücken geschlossen werden.

Für die Untersuchung des Infektionsprozesses wurden ganze getopfte Pflanzen der Rebsorte M-Th mit Hilfe eines Feinzerstäubers inokuliert, für 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert und danach im Gewächshaus weiter kultiviert. Vor Beginn der Inokulation wurde das viertjüngste Blatt markiert, welches dann 10 Tage später abgetrennt und für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 90%igem Ethanol entfärbt und konserviert wurde. Anschließend wurden die Blattscheiben in 1 M KOH überführt und für mindestens 4 h bei 80°C erhitzt. Die so transparent gemachten Blattscheiben wurden dann mit Anilinblau (0,05% in TRIS HCl pH10) gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovision 4, Zeiss) und dem Filterset 05 (BP 395-440, FT 460, LP 470) ausgewertet. Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahme wurden frische Blattstückchen durch eine Cryo-Präparation vakuumtauglich fixiert und anschließend mittels Rasterelektronenmikroskop untersucht.

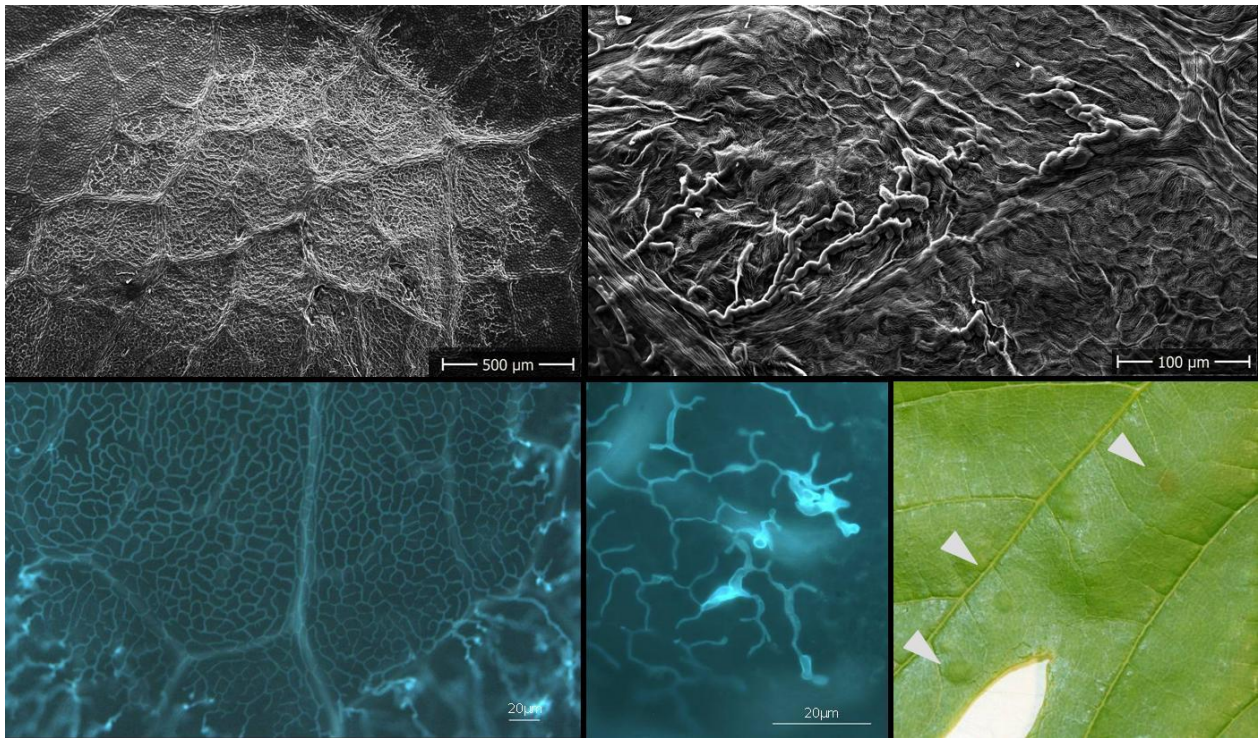


Abb. 15. Rasterelektronische (obere Reihe), fluoreszenzmikroskopische (untere Reihe links) und makroskopische (untere Reihe rechts) Aufnahmen der Entwicklung von *P. ampellicida* 10 dpi. Die Pfeilspitzen markieren eine beginnende Nekrosebildung.

Etwa 10 Tage nach Infektion (dpi) konnte erstmalig ein verändertes Hyphenwachstum am Rand des Myzels detektiert werden (**Abb. 15**). Die Hyphen erschienen an dieser Stelle verdickt und unregelmäßig gelappt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen deuten darauf hin, dass die Hyphen hier nicht länger nur zweidimensional sondern dreidimensional über mehrere Zellschichten hinweg wachsen, was in der Literatur so noch nie beschrieben wurde.

Um diese Hypothese zu validieren, wurde in einem weiteren Experiment (**Abb. 16**) jeweils das dritt- und viertjüngste Blatt auf der Blattunterseite mit jeweils 10 Tropfen einer Sporensuspension (20 µl, 25000 Sporen/ml) inokuliert. Die Pflanzen wurden 24 h kopfüber inkubiert, um ein Abrollen der Inokulationstropfen zu verhindern. Zusätzlich wurde die Triebspitze mit einer angefeuchteten Plastiktüte abgedeckt um die Verdunstung der Tropfen zu vermeiden. Etwa zwei Wochen später waren typische nekrotische Symptomflecken sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite zu sehen. Nach einer weiteren Woche bildeten sich Pyknidien innerhalb der Symptomflecken auf der Blattoberseite, welche das dreidimensionale bzw. translaminare Wachstum von *P. ampellicida* (der sexuellen Form des Schwarzfäule-Erregers) bestätigen.

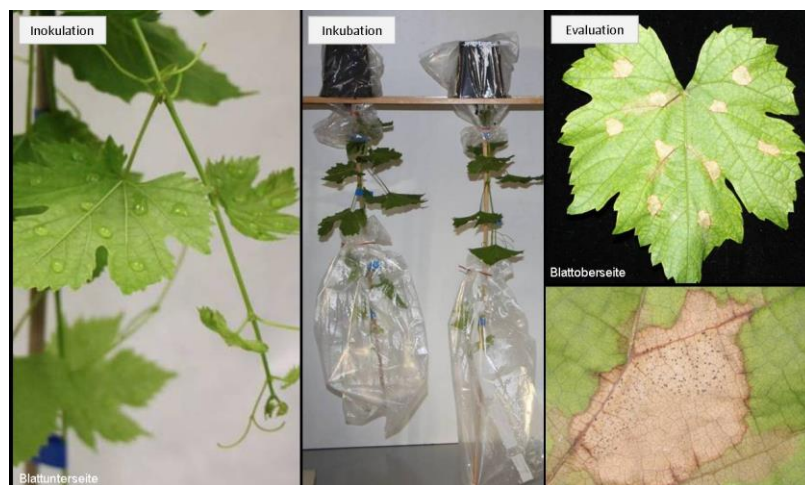


Abb. 16. Darstellung des Infektionsexperimentes zur Bestätigung des translaminaren Wachstums von *P. ampellicida*.

IV.2.3. Aufklärung der Kohlenstoffquelle während der biotrophen Phase von *Guignardia bidwelli*

Die teilweise großen Unterschiede der Hyphenentwicklung deuten darauf hin, dass es genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Reben geben muss, die auf die (stark energieabhängigen) Vorgänge des polaren Spitzenwachstums der Hyphe und der Neubildung von Zellpolarität einwirken. Die Art und Weise, wie sich der Erreger der Schwarzfäule von der Pflanze ernährt, war vorher nicht geklärt. Bisher wurden weder von uns noch von anderen Gruppen Ernährungsorgane, wie beispielsweise Haustorien nachgewiesen. Der Schwarzfäule-Erreger wächst zwar unterhalb der Cuticula, aber im Gegensatz zu Falschem und Echtem Mehltau außerhalb der Wirtszelle. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich der Pilz von degradierten Bausteinen der pflanzlichen Zellwand ernährt. Mit Hilfe extrazellulärer Enzyme könnten die entsprechenden Zellwandbestandteile aufgeschlossen werden. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde ein Platten-Assay entwickelt, um die Bildung extrazellulärer Enzyme und den Abbau verschiedener möglicher Substrate nachzuweisen. Dieser Platten-Assay basiert auf einem Minimalmedium mit verschiedenen Salzen, jedoch ohne eine Kohlenstoffquelle. Diesem Minimalmedium wurden entweder Cellulose, Hemicellulose (Xylan) oder Pektin zugesetzt. Das pectinhaltige Medium wurde entweder auf pH 5 oder auf pH 7 eingestellt, um verschiedene Pektin-abbauende Enzyme (die sich in ihrer pH-Abhängigkeit unterscheiden) testen zu können. Die Medien wurden mit Myzel-Blöckchen von 3-4 Wochen alten Kulturen verschiedener Schwarzfäule-Isolate angeimpft. Nach 15 Tagen wurde das gewachsene Myzel vermessen (**Abb. 17**) und mit Hilfe von Substratfärbungen die Abbauzone bestimmt. In Ergänzung wurde ein Bavendamm-Test auf Ligninabbau durch Laccasen und Polyphenoloxidasen durchgeführt.

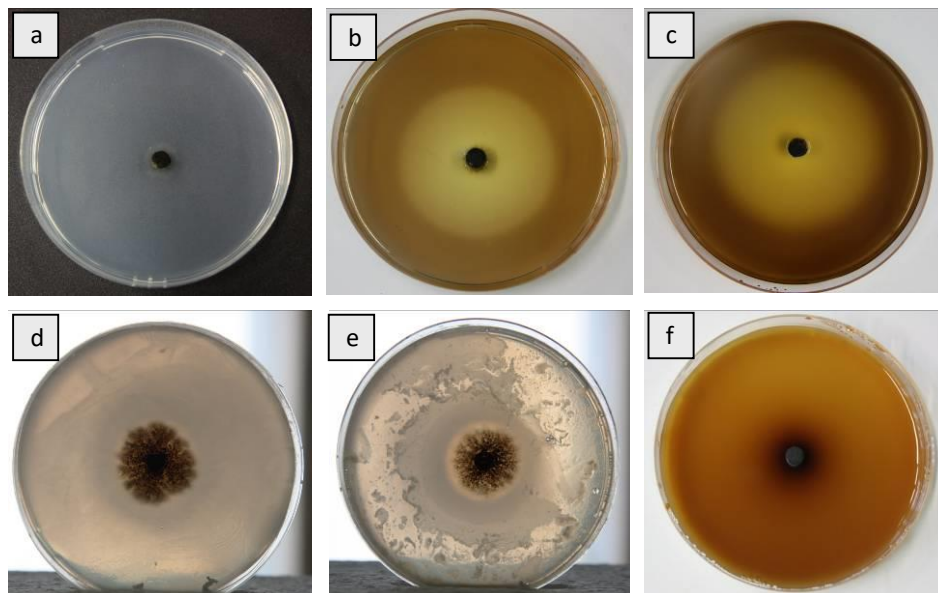


Abb. 17: Plattentest zur Bestimmung der Substrataktivität. Wachstum der Schwarzfäule und Substratabbau auf Minimalmedium (a) im Vergleich zu Minimalmedium mit Cellulose (b), Hemicellulose (c), Pectin pH 5 (d) und Pektin pH 7 (e) 15 Tage nach Inokulation. Farbumschlag des Bavendamm-Mediums 7 Tage nach Inokulation (f) zum Nachweis von Lignocellulose-Nutzung.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Erreger in der Lage ist, sowohl Cellulose und Hemicellulose abzubauen. Die Nutzung dieser C-Quellen erlauben jedoch offensichtlich nur ein langsames Myzelwachstum. Auf den pectinhaltigen Medien waren höhere Wachstumsraten zu beobachten, auch zeigte das Myzel ein für den Erreger typische schwarze Farbe. Ein Farbumschlag des Mediums im Bavendamm-Test zu dunkelbraun/schwarz bestätigte die Bildung von Laccasen und Polyphenoloxidasen und demnach das Potential Lignin, welches häufiger in altem Gewebe zu finden ist, abzubauen. Die Ergebnisse des Platten-Assays bestätigen grundsätzlich die Hypothese, dass der Schwarzfäule-Erreger Zellwandbestandteile abbauen und für die Ernährung nutzen kann.

Verschiedene Isolate der Schwarzfäule unterschieden sich hierbei in der Effizienz, mit der sie Pektine umsetzen konnten. Beispielsweise erzeugte das Isolat „8088“ einen deutlich größeren Hof als das Isolat „9494“, was darauf hindeutet, dass es Pektine weniger effizient umsetzen kann. Erste vergleichende Infektionsstudien mit diesen beiden Isolaten zeigen eine verstärkte Schwarzfäule-Symptomatik nach Inokulation mit dem pectin-effizienten „9494“ im Vergleich zu dem ineffizienteren „8088“.

Diese Studien zur Substrat-Spezifität weisen den Pektinen der Wirts-Zellwand eine wichtige Bedeutung für den Erfolg der Schwarzfäule-Infektion zu. Während der biotrophen Phase ist der Pilz offenbar fähig, nicht nur Zellwandkomponenten wie Cellulose und Hemicellulose abzubauen, sondern vor allem die Pektine (die zentralen Bestandteile der Mittellamelle) aufzuschließen.

Eine Analyse der Zellwand-Zusammensetzung förderte zutage, dass in der resistenten Unterlagsrebe Börner (ein komplexer Hybrid aus amerikanischen Wildreben) und der teilresistenten Wildrebe K16 der Pektingehalt herabgesetzt war, was mit dem reduzierten Hyphenwachstum auf diesen Genotypen in Zusammenhang gesehen werden muss. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es eine Altersresistenz der Blätter gibt, wobei die voll expandierten Blätter schlechter befallen werden. Bei den Wildreben entwickelt sich diese Altersresistenz früher und schneller, was mit einer weniger starken Expansion korreliert. Vor allem bei der Wildrebe K16 wurde ein größeres Verhältnis von verzweigten Arabinofuranosen zu den linearen Vorläufern beobachtet, solche stärker verzweigte, komplexeren Pektine sind enzymatisch schwerer abbaubar.

IV.2.4. Untersuchung der Abwehrreaktionen der Wirtspflanze

Um zu verstehen, ob der Wirt das biotroph wachsende, aber nicht in die Zelle eindringende Pathogen überhaupt wahrnimmt, wurden die Abwehrreaktionen vergleichend untersucht:

- Aktivierung eines Calcium-Influx-Kanals (gemessen über Ethacridinal-Acridinorange)
- Aktivierung der NADPH-Oxidase RboH (gemessen über Nitroblau-Tetrazolium)
- Aktivierung von Genen der basalen Immunität (gemessen über *real-time* qPCR)

Apoplastische Alkalinisierung. Die histologische Färbung mittels Ethacridinlactat-Acridinorange ist eine neuartige Methode zur Detektion sehr früher Abwehrreaktionen der Pflanze. Es wird vermutet, dass Ethacridinlactat die Alkalinisierung des Apoplasten, als eine der ersten Reaktionen auf Pathogenbefall, sichtbar macht. Molekulare Grundlage für dieses Phänomen ist die Aktivierung von Calciumkanälen als derzeit frühester bekannter Schritt der basalen Immunität von Pflanzen. Diese Kanäle transportieren gemeinsam mit Calcium auch Protonen aus dem Apoplasten ins Zell-Innere, so dass der pH in der Zellwand ansteigt.

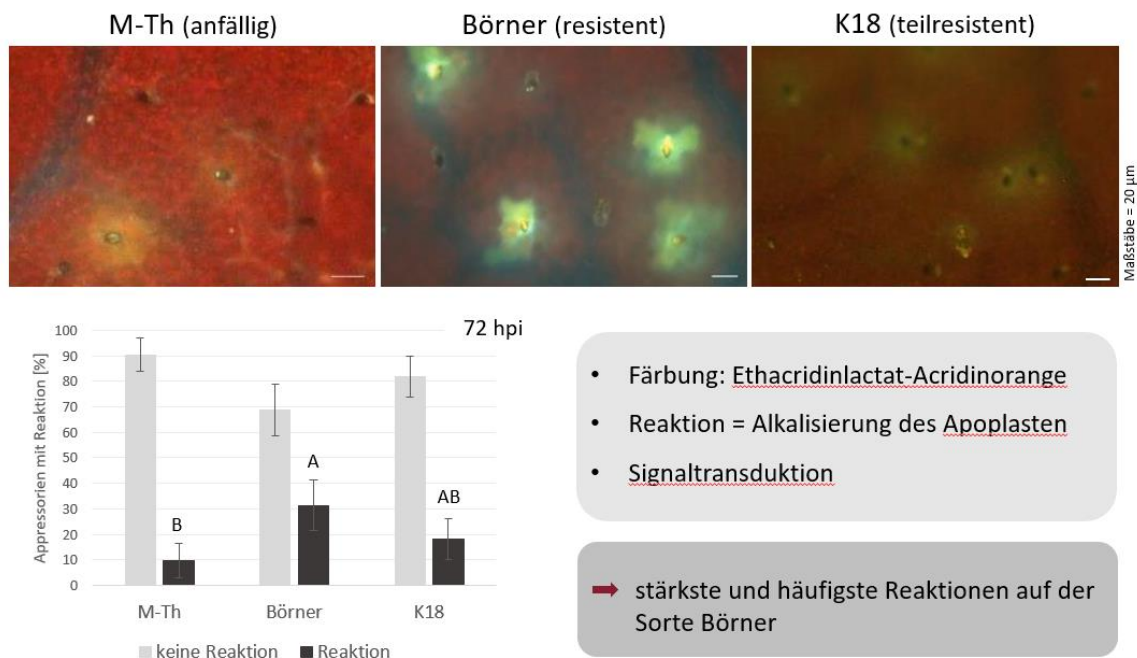


Abb. 18. Nachweis der apoplastischen Alkalinisierung im Vergleich. Die Reaktionen um die Appressorien bei 72 hpi wurden in drei Reaktionsklassen (fehlend, schwach und stark) unterschieden. Je Blattscheibe wurden 100 Appressorien ausgewertet. Pro Sorte und Zeitpunkt wurden 4 Blattscheiben des viertjüngsten Blattes verschiedener Pflanzen untersucht. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Die quantitative Auswertung der Reaktionsklassen (**Abb. 18**) zeigt, dass die anfällige Kultursorte Müller-Thurgau nur eine geringe apoplastische Alkalinisierung aufwies, während die resistente Unterlagsorte Börner signifikant stärker

reagierte, ebenso wie die teilresistente *sylvestris* Akzession K18. Dies spricht dafür, dass die Resistenz mit einer stärkeren Aktivierung der basalen Immunität einhergeht.

Aktivierung eines apoplastischen oxidative burst. Superoxid (Singulett-Sauerstoff) gehört neben Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalen zu den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies, die man bei den meisten daraufhin untersuchten Wirt-Parasit-Interaktionen nachweisen konnte. Ihre Freisetzung ist eine schnelle Reaktion seitens der Pflanze und wird auch unter dem Begriff „oxidative burst“ zusammengefasst. Verantwortlich für diesen „oxidative burst“ ist eine NADPH-abhängige Oxidase in der pflanzlichen Zellmembran, die als zentraler Schalter für zahlreiche Stress-Reaktionen fungiert. Die gebildeten Superoxid-Anionen tragen zur Zellwandverstärkung bei und greifen auch das Pathogen im Apoplasten direkt an. Vor allem jedoch können sie durch die Membran ins Zell-Innere gelangen und dort als wichtiges Signal Abwehrreaktionen aktivieren. Beispielsweise sind sie für die Aktivierung von Stilbensynthase-Genen zentral (siehe 4.3) oder wirken bei der Steuerung des hypersensitiven Zelltodes mit. Mit Hilfe des Farbstoffes Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) kann im Blattgewebe die Bildung von Superoxidanionen nachgewiesen werden. Dafür wurden inokulierte Blattscheiben der verschiedenen Genotypen nach unterschiedlichen Zeitintervallen (24, 48, 72 und 96 h) mit einer 0,05% NBT-Lösung vakuumfiltriert und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben in einem Ethanol-Aceton-Gemisch (4:1) entfärbt. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung wurden Stärke und Häufigkeit der Blaufärbung und damit die Ausprägung der Superoxidanionenbildung in 5 Kategorien von '0' bis '4' eingestuft (**Abb. 19**).

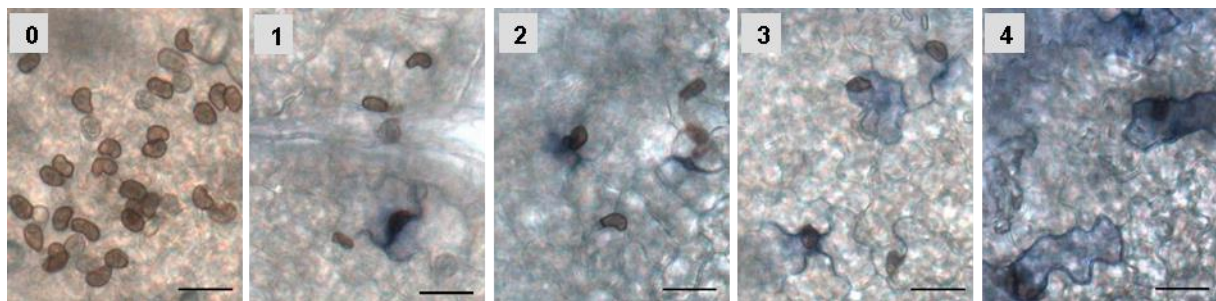


Abb. 19: Quantifizierung der Superoxidanionen-Bildung nach Anfärbung mit NBT über ein Klassifizierungssystem (0 bis 4).

Blaufärbungen und damit der Nachweis der Superoxidanionenbildung, wurden stets entlang der Zellwände der Epidermiszellen gefunden, die sich unterhalb der Appressorien von *P. ampellicida* befinden. Auf der teilresistenten Sorte Solaris und den Wilderben K16, K18 und K38 konnten erste Reaktionen schon 24 hpi beobachtet werden (**Abb. 20**). Die Stärke der Reaktionen nahm mit zunehmender Zeit nach Inokulation zu, wobei bei einigen Genotypen nach 72 hpi eine Stagnation oder gar Abnahme der Reaktionen eintrat. Daher wurde für den Vergleich weiterer Sorten der Zeitpunkt 72 hpi ausgewählt.

Bei der resistenten Sorte Börner wurde im Gegensatz dazu nur selten eine Bildung von Superoxidanionen nachgewiesen und wenn sie vorkam, dann nur in geringem Maße. Möglicherweise beruht die Resistenz von Börner nicht auf einer direkten Abwehrreaktion, sondern auf Mechanismen, die eine Aktivierung der Abwehr gar nicht erforderlich machen. Eine Möglichkeit wären Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung der Epidermis, die eine Nutzung als Kohlenstoffquelle erschweren, wodurch der Pilz in seiner Entwicklung eingeschränkt würde. Wie in der letzten Berichtsperiode schon aufgeklärt, sind hier vor allem Zellwand-Pektine von großem Interesse (s. unten). Ähnlich wie bei Börner wurde auch in den Sorten M-Th und Augster Weiss nur wenig Superoxid detektiert, was hier jedoch mit einer hohen Anfälligkeit verknüpft ist. Die teilresistente Sorte Solaris und die untersuchten Wildreben zeigten mittlere bis starke Reaktionen. Diese Befunde legen nahe, dass die Effizienz der Abwehr gegen Schwarzfäule mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase korreliert. Bei der Sorte Börner scheint die Entwicklung des Pathogens schon stromauf dieser Aktivierung geblockt zu werden, so dass es gar nicht erst zu einer Aktivierung der Signalleitung kommt. Freilich nimmt Börner den Pilz durchaus wahr, wie am Beispiel der apoplastischen Alkalinisierung gezeigt werden konnte. Da bei der basalen Immunität die NADPH-Oxidase über einen calciumabhängigen Weg aktiviert wird, könnte der Block zwischen diesen beiden Signalereignissen zu verorten sein.

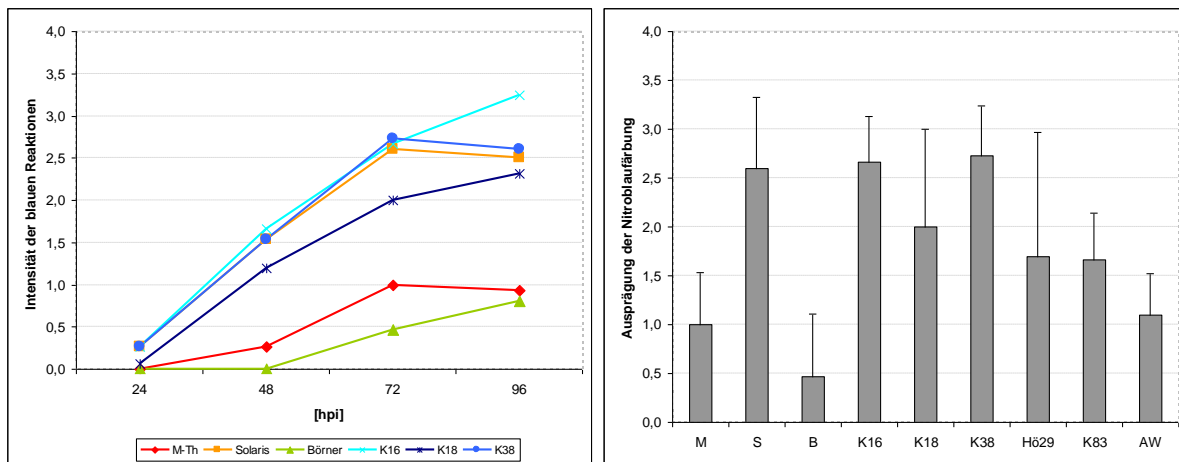


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Superoxidationenbildung nach Infektion mit *P. ampellicida* auf verschiedenen Genotypen (links). Vergleich der Superoxidationenbildung 72 hpi auf mehreren Genotypen (rechts).

Bildung von Kallosepapillen. Zur Beobachtung der fortgeschrittenen Entwicklungsstadien von *P. ampellicida* wurden Pflanzen der Rebsorten M-Th (anfällig), Solaris (teilresistent), Börner (resistent) und der Wildreben K16, K18 und K38 mit dem Erreger der Schwarzfäule infiziert. Acht dpi wurde das zum Zeitpunkt der Infektion viertjüngste Blatt entnommen, wie oben beschrieben konserviert, mit Anilinblau gefärbt und ausgewertet. Der Farbstoff Anilinblau färbt sowohl pilzliche Strukturen als auch Kallose im pflanzlichen Gewebe. *P. ampellicida* konnte auf Blättern der Sorte M-Th innerhalb von 8 Tagen bereits mehrere große Hyphennetze etablieren und es waren histologisch keine Abwehrreaktionen erkennbar. Die Proben der Sorte Solaris wiesen dagegen vergleichsweise weniger Hyphennetze auf, nur wenige Appressorien waren in der Lage ein Myzel zu bilden. Unterhalb einiger Appressorien, die kein Hyphenwachstum zeigten, wurden Kalloseablagerungen in den Zellwänden der Epidermiszellen beobachtet. Die Akkumulation von Kallose in den Zellwänden an der Eindringstelle von Pathogenen verstärkt die Zellwand und gilt als wichtiger struktureller Abwehrmechanismus von Pflanzen. Auch wenn vermehrte Kallosedeposition und eingeschränkte Kolonisierung durch den Pilz miteinander in Beziehung stehen, gibt es dennoch Fälle, bei denen trotz Kallosebildung Infektionen auftreten können (**Abb. 21**). Möglicherweise kommt es auf den Zeitfaktor an, so dass nur schnelle Papillenbildungen effektiv wären – diese Hypothese könnte über Zeitverlaufsstudien überprüft werden. Auf den Blättern der Wildreben ergab sich ein ähnliches Bild wie bei Solaris. Zwar konnten einige Appressorien auch größere Hyphennetze etablieren, in der Regel waren jedoch die Hyphennetze kleiner und teilweise schien auch hier das Hyphenwachstum durch punktuelle Kallosedepositionen eingeschränkt zu sein. Auf der resistenten Sorte Börner wurden nur wenige Hyphennetze beobachtet, die sehr klein und wenig verzweigt waren, *P. ampellicida* kann sich auf Blättern der Rebsorte Börner scheinbar nur schlecht entwickeln. Es wurden zwar auch hier Appressorien detektiert, die jedoch kein Myzel im Gewebe etablieren konnten.

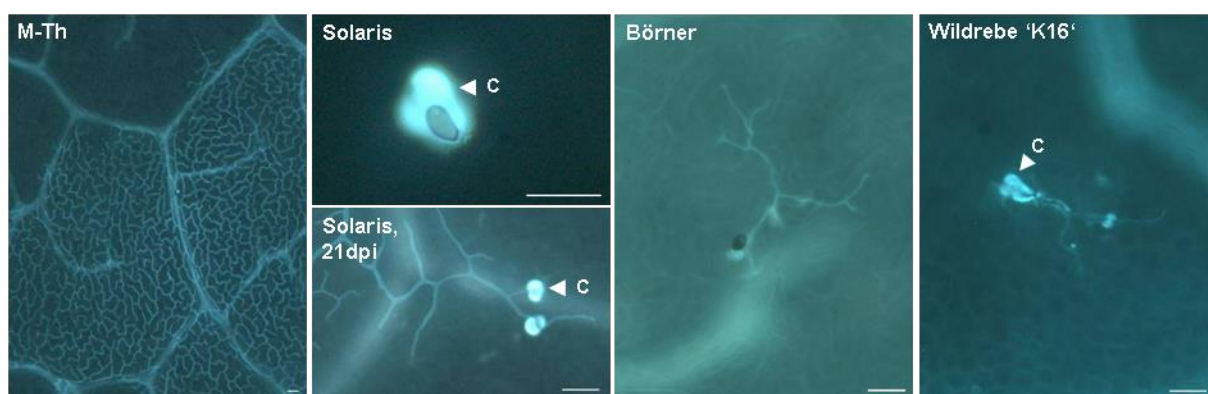


Abb. 21: Fortgeschrittene Entwicklung und Kallosedepositionen von *P. ampellicida* 8 dpi auf den Genotypen M-Th (anfällig), Börner (resistent) und der Wildrebe K18 (teilresistent).

Aktivierung von Abwehrgenen. Die Aktivierung der basalen Immunität kulminiert in der Aktivierung von Abwehrgenen, die für die Phytoalexin-Bildung wichtig sind. Hierbei wurden stellvertretend zwei Gene analysiert: Phenylammonium-Lyase als erster spezifischer Schritt des Phenylpropanoid-Stoffwechsels und die nachgeschaltete Stilbensynthase, die für die Abzweigung des Stilbenwegs vom Flavonoidweg verantwortlich ist. Die Transkriptpegel waren bei der teilresistenten 'Solaris' und vor allem beim voll-resistenten 'Börner' für beide Gene schon sehr früh

erhöht (**Abb. 22**). Bemerkenswert war, dass Stilbensynthese schon 6 Stunden nach Infektion deutlich induziert war, was bei der anfälligen Sorte 'Müller-Thurgau' nicht zu beobachten war.

Dies deutet daraufhin, dass bei 'Solaris' und 'Börner' die Abwehr schon während der biotrophen Phase deutlich und stark aktiviert wird. Ob diese bei den *sylvestris* Genotypen K16 und K18 ebenfalls so ist, muss noch geklärt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass sowohl 'Solaris' als auch 'Börner' aus komplexen Kreuzungsgängen, unter anderem mit nordamerikanischen Wildreben hervorgegangen sind und daher über entsprechende Rezeptorgene verfügen könnten.

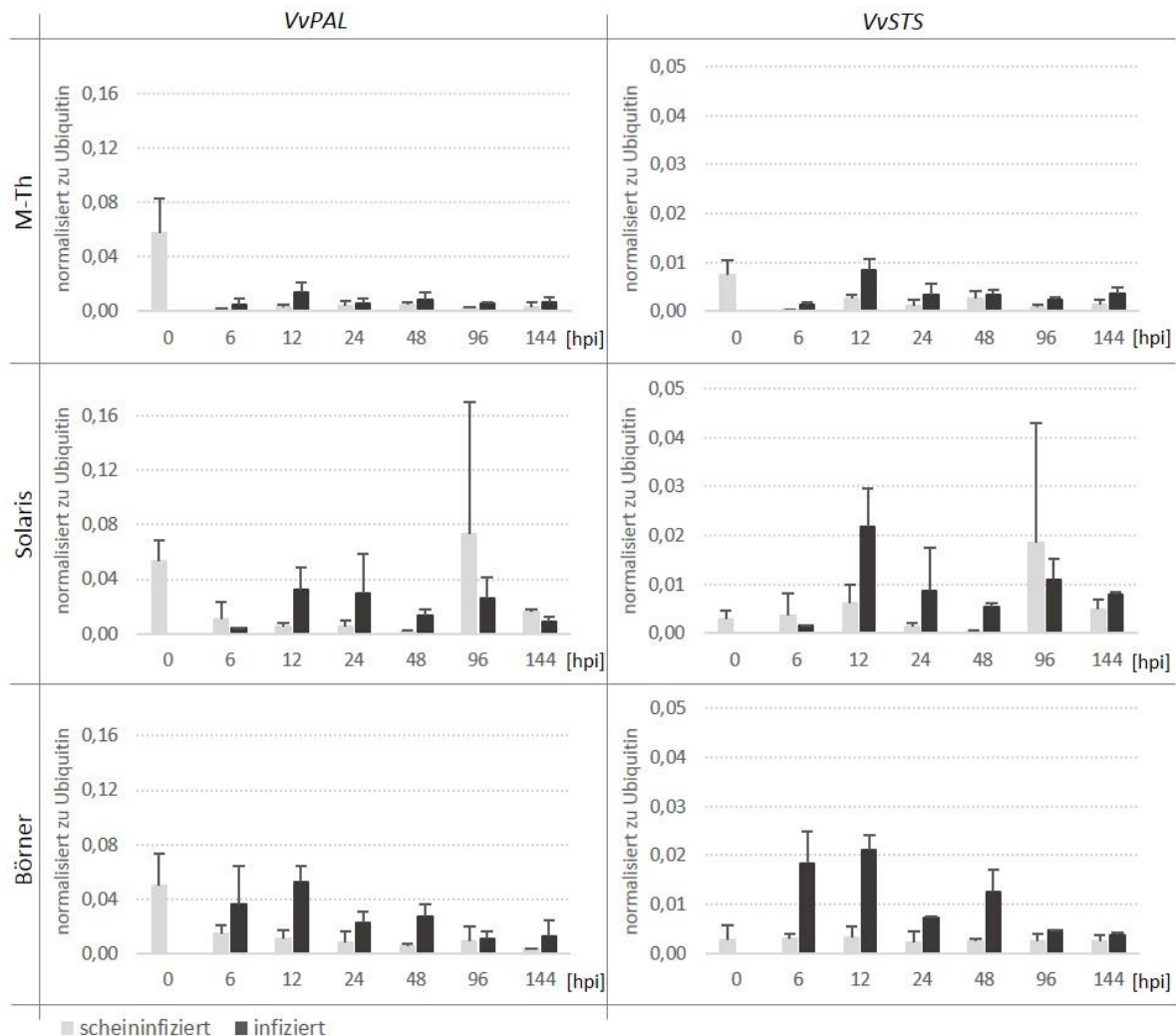


Abb. 22: Expression von VvPAL und VvSTS der Sorten 'M-Th', 'Solaris' und 'Börner' zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48, 96 und 144 h) nach Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule bestimmt mittels qPCR. Dargestellt sind scheininfizierte (hellgrau) und infizierte (dunkelgrau) Varianten. Die Expressionswerte wurden korrigiert durch das Haushaltsgen Ubiquitin. n = zwei biologisch unabhängige Versuche, die jeweils aus Blattscheiben verschiedener Reben gepoolt wurden.

IV.2.5. PeKtinmodifikation und Altersresistenz

Eine genauere Analyse der Infektionsstärke über die Blattfolge hinweg zeigte eine Abhängigkeit von der Blattetage – die Symptomausprägung war vor allem an jüngeren Blättern zu beobachten (**Abb. 23**). Selbst bei der anfälligen Kultursorte Müller-Thurgau sank der Infektionserfolg ab Blatt 6 deutlich ab. Bei der teilresistenten *sylvestris* Akzession K18 war schon ab Blatt 5 kaum noch eine Infektion feststellbar. Dies führte zur Hypothese, dass die Blätter nach Abschluss der Expansion nicht mehr befallen werden können (Altersresistenz) und dass die Wildreben aufgrund einer weniger lang andauernden Expansion schon früher diese Altersresistenz erreichen. Eine Implikation dieser Hypothese war die Vorhersage, dass die Blattlängenzunahme bei den Wildreben schneller zum Erliegen kommt als bei der anfälligen Sorte Müller-Thurgau. Diese Vorhersage konnte bestätigt werden (**Abb. 23**), wobei zu bemerken ist, dass bei der Unterlagssorte Börner die Blattlängenzunahme über ältere Blätter nur wenig sinkt, obwohl dieser Genotyp resistent ist. Aber das bedeutet nur, dass hier die Resistenz über einen anderen Mechanismus zustandekommt – das ist zu erwarten, da Börner aus Kreuzungen mit nordamerikanischen Wildreben entstanden ist, so dass hier also durch Koevolution mit dem Pathogen ganz andere Immunitätsmechanismen zu erwarten sind als bei den Europäischen Wildreben, die ja erst vor kurzem mit dem Pathogen in Berührung kamen.

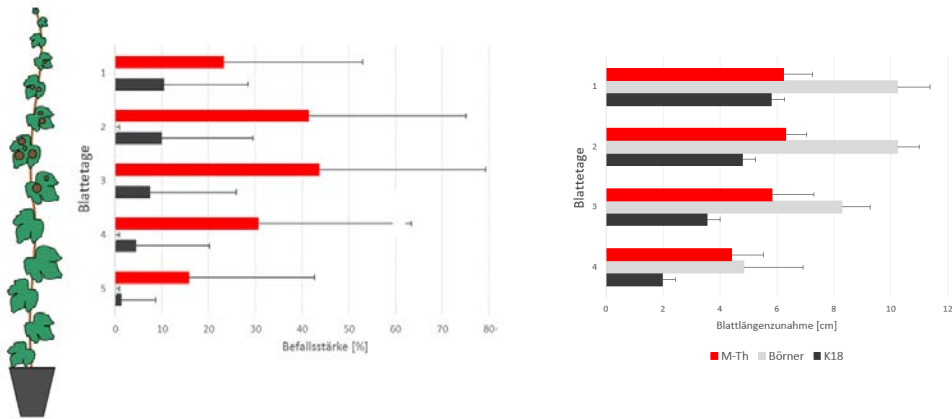


Abb. 23: Links: Abnahme der Befallsstärke mit zunehmendem Blattalter bei der anfälligen Kultursorte Müller-Thurgau (rot), der Unterlagssorte Börner (grau) und der teilresistenten *sylvestris*-Akzession K18 (schwarz). Rechts: Abnahme des Blattwachstums mit zunehmendem Blattalter bei denselben Akzessionen.

Da bei den vorangegangenen Versuchen die Zellwandpektine als Energiequelle für die Schwarzfäule nachgewiesen worden waren, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Bunzel, Lebensmittelchemie, KIT, Blätter der anfälligen Sorte Müller-Thurgau mit Blättern aus resistenten Genotypen (Börner, Solaris und die schwarzfäule-resistente Wildreben K18) verglichen. Hier zeigte sich, dass der Gehalt der dreifach methylierten 1,3,5-Arabinofuranose (dem Vorläufer für hochmethylierte Derivate) relativ konstant blieb, während die Pegel des nur zweifach methylierten Vorläufers 1,5-Arabinofuranose bei den resistenten Genotypen vermindert war. Die reduzierte Blattexpansion bei dem resistenten *sylvestris* Genotyp K18 korrelierte also mit einer Verschiebung der Pectinmodifikation zu stärker methylierten Formen.

Dies lässt sich sehr gut in den Entwicklungszyklus des Pathogens einordnen: Die Hyphen wachsen anfänglich subkutikulär auf den antiklinalen Zellwänden der Epidermis. Bisher konnte keine Haustorienbildung beobachtet werden, welche bei anderen Pilzen (z.B. Echter und Falscher Mehltau) zur Nahrungsaufnahme in pflanzliche Wirtszellen gestülpt werden. Freilich konnten ab 8 dpi kleine laterale Verzweigungen der Hyphen beobachtet werden, die eine Vergrößerung der pilzlichen Ober- und Kontaktfläche zum pflanzlichen Gewebe darstellen. Dies führt zur Vermutung, dass der Pilz die Zellwand der Epidermiszellen abbaut und sich von deren Komponenten ernährt. Wie oben dargestellt, kann das Pathogen vor allem pektinhaltige Medien als Kohlenstoffquelle nutzen. Auch das Wachstum entlang der Mittellamelle von Epidermiszellen, deutet darauf hin, dass der Erfolg der Infektion davon abhängt, wie gut die Pektine der Mittellamelle aufgeschlossen werden. Da nach Abschluss der Blattexpansion die Pektine zunehmend methyliert werden, könnte dies zur Folge haben, dass hier der Pilz weniger Nährstoffe zur Verfügung hat und daher weniger gut wachsen kann.

Fazit: Das Ziel, das Infektionsgeschehen für die Schwarzfäule qualitativ und quantitativ aufzudecken, wurde verwirklicht. Die über den Vergleich verschiedener Genotypen mögliche Identifizierung eines Zusammenhangs zwischen Pektinmodifikation und Nutzung von Zellwandpektinen während der biotrophen Lebensphase liefert einen konkreten molekularen Zielpunkt für die züchterische Bearbeitung. Damit wurde ein zentrales Projektziel - ein mechanistisches Verständnis des Infektionsgeschehens, erreicht.

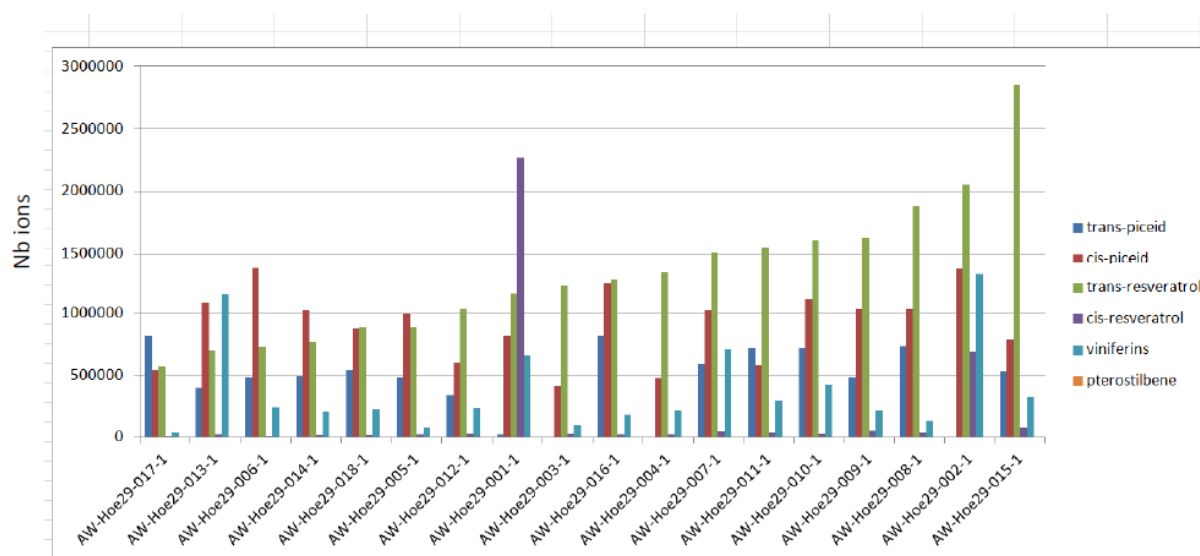
IV.3. Etablierung einer Kreuzungspopulation

Hier handelte es sich um züchterische Pionierarbeit unter schwierigsten Bedingungen, da die Wildreben zum einen zweihäusig sind, zum anderen erst sehr junges Material zur Verfügung stand und zum dritten die Kreuzungskampagnen der ersten beiden Jahre durch Witterungseinbrüche während der Blütezeit weitgehend zunichtegemacht wurden. Erst im dritten Jahr gelang es, Kreuzungspopulationen zu etablieren, mit denen man die Arbeit beginnen konnte. Da die Entwicklungsdauer von Reben mit dem engen Zeitrahmen eines solchen Projekts in Konflikt steht, war diese Verzögerung nicht mehr aufzuholen. Basierend auf den Vorarbeiten wurden aufgrund guter Resistenzeigenschaften die beiden Akzessionen *Vitis sylvestris* Hö29 und *Vitis sylvestris* Ke83 für die Erstellung von Kreuzungspopulationen ausgewählt. Die beiden Akzessionen wurden mit der pilzanfälligen Rebsorte Augster Weiss (männlich steril) gekreuzt. Die zu Projektbeginn vorhandenen Sämlingspopulationen erlaubten zwar den Einstieg in die genetische Kartierung, allerdings waren die Populationsgrößen für eine spätere solide QTL-Verrechnung zu gering. Trotz intensiver Bemühungen waren in den Folgejahren 2012 – 2014, bedingt durch die Akkumulation widriger Umstände (s. oben) die diesbezüglichen Kreuzungen wenig erfolgreich und die Zahl der Sämlinge konnte nur

geringfügig gesteigert werden. Erst im Jahr 2015 waren die Kreuzungen außerordentlich erfolgreich und führten zu Samenzahlen von jeweils >1500.

Die Individuen aus der ersten Kreuzungskampagne sind inzwischen schon so weit herangewachsen, dass ausreichend Blattmaterial für die Bestimmung der Stilbengehalte zur Verfügung steht. Dies wurde nun für die Kreuzungspopulation aus Augster Weiss x Hö29 und Augster Weiss x Hö29 begonnen (**Abb. 24**). Die Induktion erfolgte über einen UV-Puls in derselben Weise wie für die Stilbencharakterisierung der Wildreben. Im Vergleich zu dem nur niedrig induzierbaren Eltern Augster Weiss liefern die Kreuzungsprodukte deutlich höhere Stilbengehalte. Für die Kreuzung mit Hö29 erreichen die manche Kreuzungsprodukte in etwa 50% des Wildelternvaters, für die Kreuzung mit Ke83 erreichen manche Kreuzungsprodukte fast den Pegel des Wildelternvaters.

AW x Hoe29



AW x Ke83

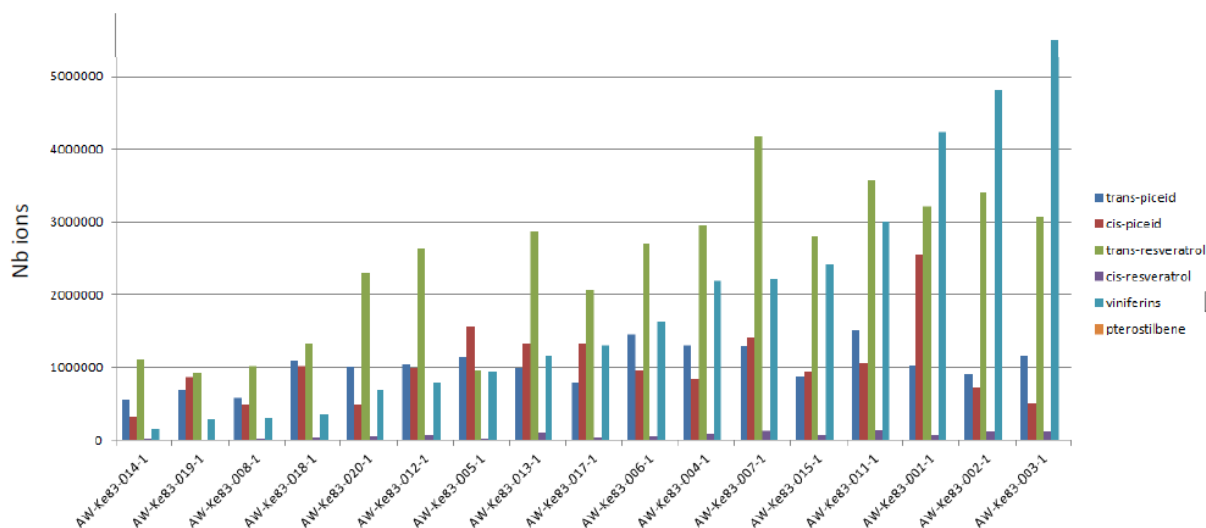


Abb. 24: Stilbenpegel und –profile in den Kreuzungsprodukten aus Augster Weiss x Hö29 (oben) und Augster Weiß x Ke83 (unten). Unter identischen Bedingungen gewonnene Blattscheiben wurden parallel unter denselben Bedingungen mit 10 min UV-C bestrahlt, 6 h inkubiert und extrahiert. Die Extrakte wurden dann über eine GC-MS-MS basierte Metabolomik analysiert. Die Kreuzungsprodukte sind gegenüber Augster Weiss deutlich erhöht und zeigen deutliche Variationen zwischen den Individuen.

Da die Population der Individuen, für die eine Phänotypisierung schon möglich ist, noch sehr klein ist, war eine ungerichtete Korrelation mit den Mikrosatellitendaten nicht sinnvoll. Da aber für einen der Kreuzungseltern, HÖ29 mit einem besonderen Allel des Transkriptionsfaktors *MYB14* (s. nächster Abschnitt) identifiziert worden war, wurde untersucht, ob hier eine Korrelation vorliegen könnte. Die entsprechende Analyse ist in den Tabellen **05_Kreuzung_Mikrosatellitendaten_myb** und **06_Kreuzung_Korrelation_Stilbengehalte** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt. Innerhalb der Kreuzungspopulation korrelierte das Wildrebenallel von *MYB14* korrelierte jedoch nicht mit den erhöhten Stilbengehalten, was darauf hindeutet, dass hier noch weitere genetische Faktoren eine Rolle spielen müssen. Wenn die Ergebnisse der erfolgreichen Kreuzungskampagne von 2015 zur Verfügung stehen, gibt es jedoch weit bessere Chancen, diese Faktoren über eine Mikrosatellitenanalyse in Verbindung mit einer quantitativen Phänotypisierung dingfest zu machen.

Fazit: Das Ziel, eine für quantitative Genetik ausreichend große Kreuzungspopulation zu etablieren, konnte nicht zum geplanten Zeitpunkt erreicht werden, sondern erst im dritten Projektjahr. Diese Kreuzungspopulation konnte im Rahmen dieses Projektes zwar leider nicht mehr genutzt werden, bietet aber nun wertvolles und umfangreiches Material für künftige Projekte.

IV.4. Steuerung der basalen Immunität

Für die Züchtung von Rebsorten, die gegen Falschen und Echten Mehltau resistent sind, werden Resistenzfaktoren aus nordamerikanischen Wildreben genutzt, die im Laufe einer lange Koevolution zwischen diesen Wildarten und diesen Pathogenen entstanden sind. Diese Abwehrmechanismen sind sehr spezifisch und beruht vermutlich auf der Erkennung von Pathogenfaktoren.

Für die Schwarzfäule sind derzeit solche spezifischen Resistenzfaktoren nur für die Wurzelstockrebe Börner bekannt (Rex et al. 2014). In unserem Projekt beschäftigen wir uns vornehmlich mit der sogenannte basalen Immunität, die zwar weniger spezifisch, aber dafür recht breit wirksam ist. Bei der Weinrebe spielt vor allem die Bildung von antimikrobiellen Stilbenen eine wichtige Rolle. In Zusammenarbeit mit Dr. Philippe Huguene (INRA, Colmar), wurde die Wildrebenpopulation hinsichtlich der Induktion und des Profils von Stilbenen untersucht (Duan et al. 2015).

Dabei zeigten sich große Unterschiede bezüglich der Induzierbarkeit von Stilbenen in Antwort auf einen auslösenden UV-C Puls. Diese Unterschiede konnten nun über mehrere Vegetationsperioden und Anzuchtbedingungen hinweg reproduziert werden und sind daher genetisch bedingt. Durch Hochdurchsatz-Metabolomik konnten wir zwei Stilben-Chemovare identifizieren. Der eine akkumulierte Stilbene schnell und sehr stark und bildete vor allem die nicht-glykosylierten Stilbenspezies Resveratrol und Viniferin, während der andere Chemovar generell weniger Stilbene akkumulierte und diese vor allem in den wenig bioaktiven Formen Piceatannol und dem Glycosid Piceid. Für alle 86 untersuchten Genotypen zeigte sich eine Zeitabhängigkeit des Stilbenmusters: Piceid, Resveratrol und Piceatannol akkumulierten früher, während die Viniferine deutlich später gebildet wurden.

Diesen genotypischen Unterschiede in der Stilbenakkumulation gingen entsprechende Unterschiede in der Aktivierung von Stilbensynthese und Resveratrolsynthese voraus (**Abb. 25**). Ebenso wurde das erste Enzym des Phenylpropanwegs, Phenylammonium Lyase unterschiedlich aktiviert und das Schlüsselenzym Chalconsynthase, das den mit der Stilbenbildung konkurrierenden Flavonoidzweig initiiert wurde in gehemmt.

Diese Unterschiede in der Induktion durch UV-Strahlung fanden sich in der Antwort auf Infektion mit *Plasmopara viticola* wieder. Es gab also unabhängig vom auslösenden Faktor (UV oder Falscher Mehltau) Wildreben mit einer generell erhöhten Aktivierung der Stilbenbildung, während andere generell schwächer reagierten. Eine vergleichende Analyse der Infektion zeigte, dass die zum Viniferin-Chemovar zählenden Genotypen eine bessere Resistenz gegen Falschen Mehltau aufwiesen als die Genotypen des Piceid-Chemovars.

Neben der Stilbenbildung wurde noch die Stomatadichte untersucht. Auch hier gab es von Umwelt und Entwicklung unabhängige, also genetisch bedingte Unterschiede im relativen Anteil von Spaltöffnungsapparaten an der Gesamtpopulation von Epidermiszellen. Einige Genotypen des Piceid-Chemovars wiesen eine geringe Spaltöffnungsichte auf und wurden trotz eher mäßiger Stilbeninduktion weniger stark befallen, vermutlich weil den Zoosporen weniger Eintrittspforten offenstanden.

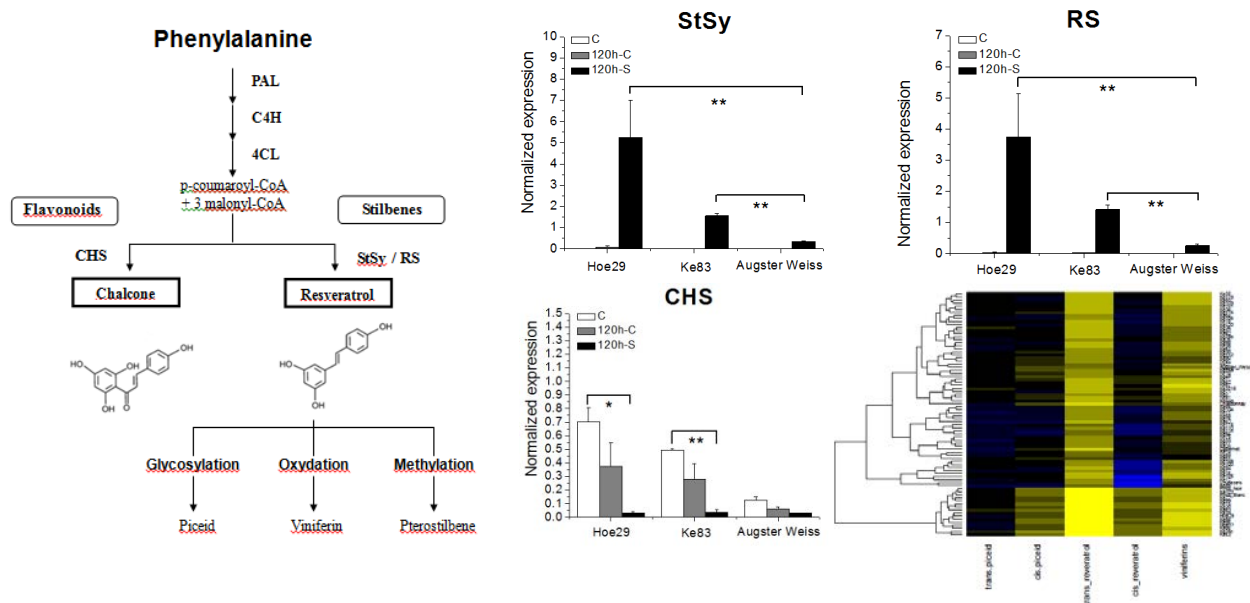


Abb. 25: Über qPCR gemessene Änderungen im Transkriptpegel für Stilbensynthese (StSy), Resveratrolsynthese (RS) und Chalconsynthese in den Wildreben Hö29 und Ke83 im Vergleich zur Sorte Augster Weiss. * signifikant auf 95%, ** signifikant auf 99%. Links ist der Stoffwechselweg skizziert – CHS und StSy/RS sind Schlüsselenzyme für konkurrierende Zweige des Phenylpropanwegs. Diese Konkurrenz spiegelt sich in einer antagonistischen Regulation (CHS wird bei Induktion von StSy reprimiert) wider. Rechts unten: Clusterdarstellung der Stilbenprofile für die *V. sylvestris* Population als sogenannte heatmap. Blau geringe, gelb starke Abundanz der jeweiligen Stilbenspezies auf einer logarithmischen Skala (gelb entspricht dem 1000-fachen Wert von blau). Das unterste Cluster umfasst die Genotypen des Viniferin-Chemovars. (aus Duan et al. 2015).

Die starke Stilbeninduktion in Hö29 und Ke83 korreliert mit einer starken Induktion des Schlüsselenzyms Stilbensynthese. Inzwischen wurde der Transkriptionsfaktor *myb14* durch Arbeiten der Arbeitsgruppe Bogs am DLR als Aktivator des Stilbensynthesegens identifiziert (Höll et al. 2013). Durch *Next-Generation Sequencing* von Hö29 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmidt, Universität Mainz konnte gezeigt werden, dass im Promotor von *myb14* ein längeres Motiv vorhanden ist, das bei Augster Weiß fehlt. Daraufhin wurden die *myb14* Promotoren aus Hö29, Ke83 und Augster Weiss kloniert und sequenziert. Die Alinierung zeigte, dass es längere Motive gibt, die bei den beiden Wildreben vorhanden sind, aber sowohl bei Augster Weiss als auch der *vinifera* Referenzsequenz (Pinot Noir) fehlt. Zusätzlich finden sich bei Hö29 zwei weitere Motive, die bei Ke83 fehlen.

In der Tat ließ sich zeigen, dass der *myb14* Promotor durch UV und durch Infektion mit *Plasmopara viticola* sehr stark induziert werden kann (Abb. 26)

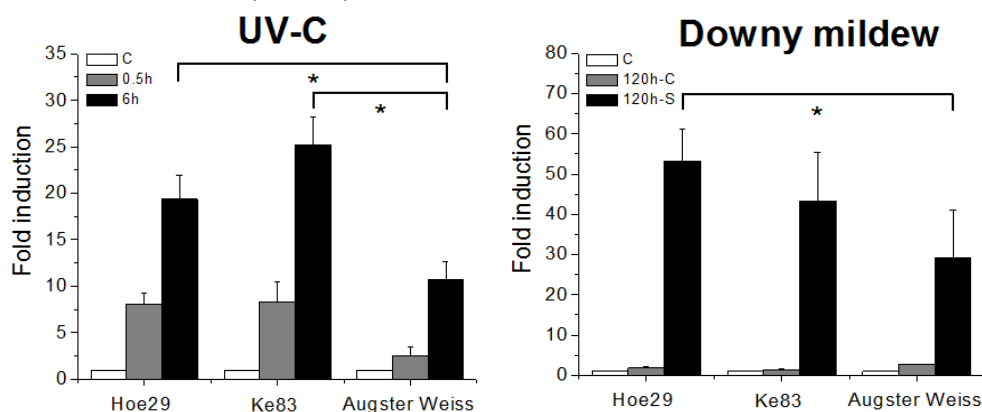


Abb. 26: Über qPCR gemessene Transkriptpegel für den Transkriptionsfaktors *myb14*, der Stilbensynthese steuert, in den Wildreben Hö29 und Ke83 im Vergleich zur Sorte Augster Weiss. * signifikant auf 95%.

Im nächsten Schritt wurden diese Unterschiede auf ihren funktionellen Kontext hin getestet. Dazu wurde ein von der Arbeitsgruppe Bogs entwickeltes Promotor-Reporter-System am KIT etabliert. Der Promotor von Interesse wird vor einen Luciferase-Promotor kloniert und über Partikelbombardement in Suspensionskulturen von *Vitis* eintransformiert. Um Unterschiede in der Transformationseffizienz zu kalibrieren, wird als interner Standard eine rot lumineszierende Renilla-Luciferase unter einem konstitutiven Promotor mit eintransformiert. Durch Messung der grünen Luciferase Lumineszenz im Verhältnis zur roten Renilla-Luciferase Lumineszenz lassen sich so Änderungen in der Aktivität des jeweiligen Promotors quantitativ messen.

Dieses System erwies sich als überaus effizient (**Abb. 27**). Damit wurde zunächst gezeigt, dass die Promotoren der aus Hö29 und Ke83 myb14 Varianten durch UV viel stärker induziert werden können als die aus Augster Weiss klonierte Variante und dass diese Induktion durch Diphenyl-Iodonium (DPI), einen spezifischen Hemmstoff der NADPH-Oxidase, gehemmt wird. Die myb14 Variante aus Hö29 wird auch durch flagellin 22 (einen Induktor der basalen Immunität) und auch durch Jasmonsäure (ein zentrales Signal der basalen Immunität) aktiviert, die myb14 Variante aus Ke83 jedoch nicht. Die myb14 Variante aus Augster Weiss lässt sich weder durch UV, noch durch flagellin 22, noch durch Jasmonsäure aktivieren.

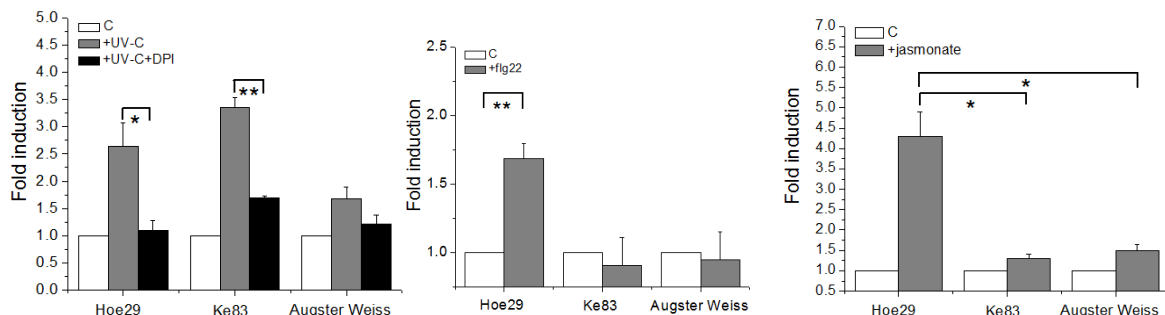


Abb. 27: Ergebnisse des Promotor-Reportersystems für die aus Hö29, Ke83 und Augster Weiss klonierten Allele des *MYB14* Promotors. UV Licht induziert die Allele aus Hö29 und aus Ke83, während flagellin 22 und Jasmonsäure als Signale der basalen Immunität nur das Allel aus Hö29 aktivieren. Die Induktion ist abhängig von der Bildung von Superoxid-Anionen durch die NADPH Oxidase RboH, weil die Induktion durch den spezifischen Inhibitor DPI gehemmt werden kann.

Dieses System wurde dann mit weiteren Inhibitoren und Aktivatoren kartiert. Die Signalwege für die basale Immunität und für die Effektor-aktivierte Immunität sind für *Vitis* Zellen in unserer Arbeitsgruppe in einer Reihe von Arbeiten recht detailliert charakterisiert worden, so dass die Unterschiede zwischen den *MYB14* Allelen durch entsprechende Inhibitorversuche eingeordnet werden konnten. Diese Studie führte zu einem Modell für die frühe Signaltransduktion (**Abb. 28**): Es gibt zwei Eingangssignale – ein Calciumeinstrom und die Bildung von Superoxid-Anionen durch die NADPH Oxidase RboH. Der Calciumeinstrom aktiviert eine MAP-Kinasekaskade und parallel dazu über die Aktivierung von Lipoxxygenase (LOX) die Bildung von Jasmonsäure. Beide Signale konvergieren und aktivieren den myb14 Promotor, dessen Genprodukt dann wiederum den Stilbensynthase-Promotor anschaltet. Die Superoxid-Anionen können über Aquaporine ins Cytoplasma gelangen und werden in den Peroxisomen zu Wasserstoff-Peroxid umgewandelt, das dann wiederum in die Plastiden einwandert und dort ebenfalls über Aktivierung der Lipoxxygenase den Jasmonatweg aktiviert.

Wir vermuten, dass der Jasmonsäure-vermittelte Signalweg sowohl das Hö29 als auch das Ke83 Allel von myb14 effizient aktiviert (im Gegensatz zu dem Allel aus Kulturreben). Hingegen kann das vom MAP-Kinase abhängigen Weg generierte Signal nur vom Hö29 Allel des myb14 Promotors effizient gebunden werden. Da UV zwar RboH aktiviert, aber nicht den Calcium-Einstrom, gibt es für UV Induktion keinen Unterschied zwischen den beiden sylvestris Allelen, wohl aber in Antwort auf flagellin 22. Externe Jasmonsäure kann ebenfalls einen starken Calciumeinstrom induzieren, weshalb hier wiederum vor allem das Hö29, aber nicht das Ke83 Allel reagiert (**Abb. 15**).

Diese Arbeiten wurden in einer hochrangigen internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht (Duan et al. 2016).

Die Arbeiten zur Pathogenresistenz und zur Resistenzzüchtung sind momentan durch Resistenzquellen aus nordamerikanischen Wildreben dominiert. Diese Resistenzen sind in einem koevolutiven Prozess mit den jeweiligen Pathogenen entstanden und nutzen sogenannte effektor-vermittelte Immunität, die in der Regel in einem hypersensitiven Zelltod der befallenen Wirtszelle resultiert. Die alternative Strategie, die basale Immunität als Resistenzquelle zu nutzen, ist dagegen erst ansatzweise verfolgt worden. Seit kurzem beobachtet man jedoch ein verstärktes Interesse an Resistenzfaktoren aus chinesischen Wildreben, die ähnlich wie *sylvestris* keine Koevolution mit den aus Nordamerika stammenden Pathogenen durchlaufen haben. Die züchterische Nutzung dieser Resistenzquellen, vor allem gegen den Echten Mehltau, ist zwar schon in Vorbereitung, die Mechanismen sind aber fast alle noch weitgehend unbekannt. Wir haben uns in der abschließenden Projektphase einen dieser Fälle genauer angeschaut und dabei eine ähnliche Strategie verfolgt wie für die Identifizierung von *MYB14*.

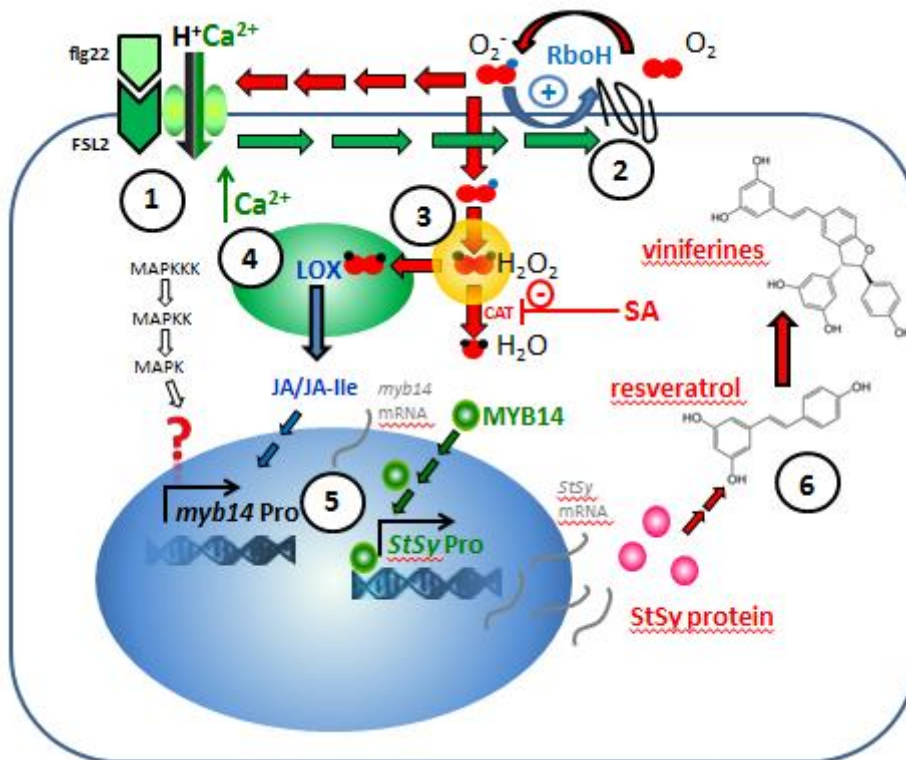


Abb. 28: Modell der Signalwege, die bei der Weinrebe die basale Immunität aktivieren. Das myb14 Allel aus der Wildrebe Hö29 wird sowohl durch Weg 1, als auch durch Weg 2 aktiviert, das myb14 Allel aus der Wildrebe Ke83 nur durch den Weg 2.

Für eine gegen den Echten Mehltau resistente Wildrebe aus China, *Vitis pseudoreticulata*, konnten wir genetisch bedingte Unterschiede in der Induzierbarkeit von Stilbenen gezeigt dingfest machen. Hier war es jedoch kein besonders aktives Allel von MYB14, also einem Transkriptionsfaktor, der Stilbensynthese (ein Schlüsselenzym des Stilbenwegs) aktiviert. Vielmehr war hier die basale Immunität dadurch gesteigert, dass ein neuer Signalwege (der Salicylsäure-Weg) für die basale Immunität rekrutiert wurde (**Abb. 29**). Salicylsäure spielt sonst bei der hypersensitiven Reaktion eine wichtige Rolle, trägt aber nicht zur basalen Immunität bei. Bei der chinesischen Wildrebe aktiviert Salicylsäure jedoch alle Schritte der basalen Immunität wie Aktivierung eines Calciumeinstroms, gefolgt von einer Aktivierung der NADPH Oxidase RboH, einer MAP-Kinasekaskade und Aktivierung des Stilbensynthasepromotors. Interessanterweise war hier Jasmonsäure nur peripher (im Gegensatz zu *MYB14*). Die Natur hat also mehrere Wege entwickelt, um basale Immunität zu steigern – bei der chinesischen Wildrebe über eine Veränderung im Promotor des Schlüsselenzyms Stilbensynthase, bei sylvestris Genotyp Hö29 über eine Veränderung im Promotor des Transkriptionsfaktors *MYB14*, der Stilbensynthase aktiviert. Auch diese Arbeit ist inzwischen hochrangig publiziert worden (Jiao et al. 2017).

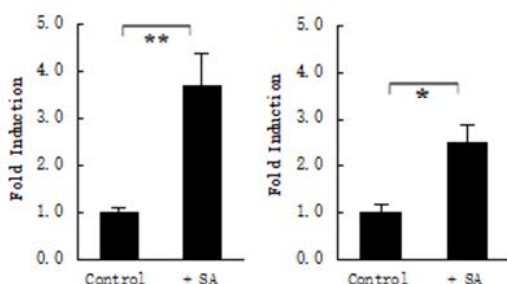


Abb. 29. Aktivierung des Stilbensynthasepromotors durch Salicylsäure (50 μ M). Messung der Promotor-Aktivität erfolgte mithilfe eines doppelten Luciferase-Reportersystems. Links ist das Muster für das Promotor-Allel aus Wildreben gezeigt, rechts das Muster für das Allel aus Kulturreben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei biologischen Replika mit jeweils drei technischen Replika. * signifikant für $P = 0.05$, ** signifikant für $P = 0.01$ (aus Jiao *et al.*, Manuskript eingereicht).

Fazit: Das Ziel, die Mechanismen der basalen Immunität zu verstehen, um sie künftig als Alternativen für Effektor-getriebener Immunität einsetzen zu können, wurde an zwei eurasischen Wildreben auf molekularer Ebene entschlüsselt (und hochrangig publiziert). Diese Untersuchungen zeigen also, dass es im Bereich der basalen Immunität noch viel zu entdecken gibt, was man züchterisch nutzen kann und zeigt damit gleichzeitig, wie wichtig die Grundidee des gesamten Projekts ist.

IV.5. Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau

Pilzwidstandsfähige Rebsorten wie „Regent“ (sogenannte PiWi-Reben) sind für den ökologischen Weinbau einem wichtigen Werkzeug geworden. Die Resistenz beruht auf Resistenzfaktoren, die über jahrzehntelange

Züchtungsbemühungen aus amerikanischen (zum Teil auch aus der in Sibirien beheimateten *Vitis amurensis*) eingekreuzt wurden. Inzwischen gibt es zunehmend Berichte, wonach die durch den Faktor *Rpv3* vermittelte Resistenz gegenüber *Plasmopara viticola* durch das Auftreten virulenterer *Plasmopara*-Stämme gemindert wird. Diese Resistenz des *Rpv3*-Locus beruht auf der abgeleiteten Ebene der Immunität (*effector triggered immunity*). In dem Maße, wie der Anbau mit PiWi-Reben, die auf diesen Resistenzfaktor zurückgreifen (und dazu zählen die meisten ökonomisch relevanten neuen PiWi-Rebsorten), steigt der Selektionsdruck auf das Pathogen und dies sollte Pathogenstämme befördern, die in der Lage sind, *Rpv3*-vermittelte Resistenz zu brechen. Man muss also ernsthaft über sogenanntes Resistenz-Management nachdenken, um die ökonomischen Erfolge des ökologischen Weinbaus auch langfristig und nachhaltig zu sichern. Aus diesem Grund untersuchen wir auch die Mechanismen, die es neu aufgetretenen Pathogenstämmen ermöglichen, die *Rpv3*-vermittelte Resistenz zu überwinden.

In einem Schritt wurden daher drei am JKI und am DLR gesammelte neue Stämme in die Untersuchung miteinbezogen. Der Stamm GWH wurde auf pilzwiderstandsfähigen Neuzüchtungen gesammelt, ist also offensichtlich in der Lage, die *Rpv3*-vermittelte Resistenz zu brechen, die Stämme 8836 und 8837 weisen eine multiple Fungizidresistenz auf und sind daher ebenfalls schwer einzudämmen. Für diese Stämme wurden Infektionsserien auf Blattscheiben für die gesamte Wildrebenpopulation durchgeführt und der Infektionserfolg sowohl mithilfe des üblichen Bonitierungssystems quantifiziert und zusätzlich noch durch Auszählen der Sporangien präzise vermessen. Die statistische Auswertung dieser Infektionsserien wird in wenigen Wochen abgeschlossen sein. Dabei zeigte sich, dass der Stamm GWH deutlich virulenter ist als die klassischen Isolate.

Die statistisch ausgewerteten Daten sind in der Tabelle **03_Stomata_Pathogene_Stilbene_Quantifizierung** dem Bericht in elektronischer Form beigelegt.

Parallel zu unserem Projekt gelang es der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Spring an der Universität Hohenheim, aus von ‚Regent‘ gewonnenen Isolaten Einzelsporangien-Linien zu erzeugen. Diese stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit genetisch einheitliche Linien (Klone) dar, so dass dadurch Einblicke in die genetischen Faktoren möglich werden, die für das Brechen der Resistenz nötig sind. Mehrere dieser Linien, wie der Stamm B15, sind in der Lage auf ‚Regent‘ zu sporulieren (**Abb. 30**), während auf Hö29 und Ke83 keine Sporulation beobachtet wird und im Gegensatz zu ‚Regent‘ auch keine Nekrosen (die möglicherweise auf hypersensitiven Zelltod zurückgehen) beobachtet werden, was mit der Hypothese in Einklang steht, dass diese Wildreben eine starke basale Immunität aufweisen, aber keine Effektor-aktivierte Immunität auslösen (die ja eine Koevolution mit dem Pathogen voraussetzen würde).

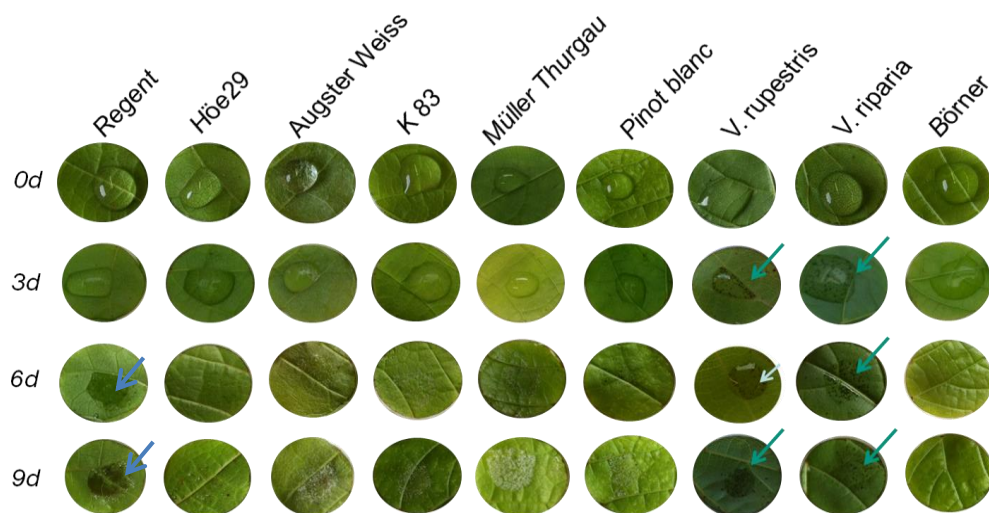


Abb. 30: Repräsentative Infektionsserie mit dem Stamm B15. Auf Regent beobachtet man zwar eine nekrotische Reaktion, aber auch partielle Sporulationen. Im Gegensatz kann dieser Stamm auf Hö29 oder Ke83 weder Nekrosen, noch Sporulationen auslösen.

Mithilfe von Einzelsporangien-Linien von *P. viticola*, die aus der PIWI-Sorte Regent isoliert wurden, ließ sich zeigen, dass das Brechen der durch den Locus *Rpv3* vermittelten Resistenz mit einer schnelleren und stärkeren Bildung von Effektoren (RFLX1, crinkler) auf der Seite des Pathogens korreliert, was auf der Wirtsseite eine verzögerte Aktivierung von Metacaspase 2 und 5 zur Folge hat, wodurch die hypersensitive Reaktion nicht zeitig genug erfolgen kann. Die Ursache für die schnellere Effektorbildung dieser virulenten Stämme ist nicht bekannt, aber geht vermutlich auf (evolutionär sehr leicht zu bewirkende) Änderungen in den jeweiligen Promotoren zurück. Das Brechen der Resistenz der derzeit kommerziell genutzten PIWI Reben, die auf einem genetischen Faktor beruht, ist also vermutlich eine

recht einfache Angelegenheit, was noch einmal unterstreicht, wie wichtig es wird, alternative Resistenzquellen zur Verfügung zu haben und wie wichtig es außerdem ist, mit Pyramidisierungen zu arbeiten.

Fazit: Das Ziel, Mechanismen für die Resistenzerosion von PiWi-Reben zu finden, wurde erreicht.

V. Diskussion

Problemstellung. Für den ökologischen Weinbau stellt die Kontrolle von mikrobiellen Pathogenen eine große Herausforderung dar, weil die in Europa domestizierte Kulturrebe evolutionär nicht an die erst im 19. Jahrhundert eingeschleppten Pathogene (Phylloxera, Falscher Mehltau, Echter Mehltau, Schwarzfäule, um nur einige zu nennen) angepasst ist. Im Grunde kann man *Vitis vinifera* als frühes Opfer der Globalisierung betrachten. Da konventionelle Fungizide als Werkzeug nicht zur Verfügung stehen, wird derzeit stark mit Kupferpräparaten gearbeitet (gerade auch im Vorjahr zu beobachten). Dies ist alles andere als ökologisch und nachhaltig, weil Kupfer als Schwermetall sich in den Böden anreichert und dort die Bodenflora und -fauna (etwa die Regenwürmer) stark beeinträchtigt. Als Alternative haben sich beginnend mit den 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts sogenannte PiWi-Reben als wirksamer Ansatz etabliert. Hier wurden in einem langwierigen Kreuzungs- und Rückkreuzungsprogramm, das sich über viele Jahrzehnte erstreckte, Resistenzfaktoren aus nordamerikanischen Wildreben über Introgression in *vinifera* eingeführt, um natürliche Resistenz und gute Weinqualität miteinander zu verbinden. Dies ist im Grunde eine Erfolgsgeschichte und erlaubt eine substantielle Reduktion des chemischen Pflanzenschutzes. Freilich hat diese Erfolgsgeschichte ein Verfallsdatum, weil inzwischen neue Pathogenstämme beobachtet werden, die diese Resistenz zu überwinden vermögen. Aus evolutionärer Sicht ist dies keine Überraschung, da man mit einer sehr begrenzten Zahl von Resistenzfaktoren gearbeitet hat – im Wesentlichen sind es bei den kommerziell relevanten PiWi-Reben jeweils ein Locus für den Falschen und den Echten Mehltau. Wenn der Selektionsdruck auf das Pathogen erhöht wird, weil die Anbauflächen zunehmen, steigt damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass sich neue Stämme etablieren, die über verstärkte oder beschleunigte Bildung von Effektoren die Resistenz des Wirts überwinden. Für die seit einigen Jahren neu aufgetretene Schwarzfäule sieht das nicht viel anders aus (auch hier kennt man bislang nur einen Locus, der freilich noch nicht in kommerziellen *vinifera* Sorten zur Verfügung steht). Vor allem von biodynamisch arbeitenden Winzern wird durchaus auch kritisch gesehen, dass man bei der Züchtung der PiWi-Reben mehrfach natürliche Artbarrieren überschritten hat, weil die Resistenzloki aus (amerikanischen) Wildreben stammen und in *vinifera* eingeführt wurden.

Ansatz. Um für die oben dargestellten Limitierungen der gängigen PiWi Reben neue Alternativen zu entwickeln, stellten wir in unserem Projekt die Europäische Wildrebe (*V. vinifera sylvestris*) in den Mittelpunkt. Durch ein vorangegangenes, von der BLE gefördertes Projekt, war im Botanischen Garten des KIT eine einmalige Sammlung von *sylvestris* entstanden, die nach heutigem Kenntnisstand die komplette in Deutschland noch vorhandene genetische Diversität für diese Art abbildet. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass einige dieser Wildreben eine Teilresistenz gegen Falschen und Echten Mehltau, aber auch gegen Schwarzfäule aufwiesen. Da diese Art, ebenso wie unsere Kulturrebe, keine koevolutionäre Geschichte mit diesen in Nordamerika beheimateten Pathogenen aufweisen konnte, musste diese Teilresistenz auf anderen Mechanismen beruhen als die Resistenzen, die man bei den PiWi-Reben bisher nutzt. Gleichzeitig handelt es sich bei der Europäischen Wildrebe um die Stamm-Mutter unserer Kulturrebe, man würde also bei der Introgression von Resistenzfaktoren innerhalb der Artbarriere bleiben. Dadurch, dass man andersartige Resistenzfaktoren nutzt, könnte man eine sogenannte Pyramidisierung durchführen – vor allem eine Pyramidisierung, wo jeder Faktor für sich allein keinen allzu stringenten Selektionsdruck aufbaut (der erst in der Kombination), sollte evolutionär stabiler sein, weil das Pathogen keine einheitliche Anpassungs-Richtung aufbauen kann.

Ziele. Im Rahmen des Projekts sollte die in Deutschland noch vorhandene genetische Diversität der Europäischen Wildrebe für eine Nutzung erschlossen werden. Für interessante Genotypen sollten Kreuzungspopulationen generiert werden, die dann über hochauflösenden Mikrosatelliten-Markern kartiert wurden. Durch die Korrelation mit Merkmalen von Interesse sollte versucht werden, eine Zuordnung von genetischen Regionen zum jeweiligen Merkmal zu erreichen. Bei der Auswahl der Pathogene stand die Schwarzfäule im Mittelpunkt, weil über diese in Europa noch neue Krankheit viele Aspekte noch unbekannt sind. Hier ging es auch darum, relevante Merkmale zu identifizieren, die als Ansatzpunkt für eine Kontrolle der Schwarzfäule eingesetzt werden können. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Mechanismen einer gesteigerten basalen Resistenz zugrundeliegen und mit welchen Mechanismen neue Pathogenstämme in der Lage sind, die Resistenz der kommerziell bedeutsamen PiWi-Reben zu überwinden.

Im Folgenden wird der Beitrag der Ergebnisse zu diesen Zielen kurz diskutiert.

V.1. Charakterisierung der *sylvestris* Population

Dieses Ziel war aufgrund der etwa 100 untersuchten Genotypen mit einer sehr umfangreichen Arbeitsleistung verbunden. Hier entstanden im Laufe mehrerer Jahre sehr umfangreiche und über biologische Replika abgesicherte Datensätze, die qualitativ sehr hochwertig und sehr detailliert sind:

- Blattanatomie und Morphologie
- Stomatadichte
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger des Falschen Mehltau
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger des Echten Mehltau
- Infektionserfolg für kontrollierte Inokulation mit dem Erreger der Schwarzfäule
- Muster und Pegel verschiedener Stilbene für Aktivierung durch einen UV-Puls
- Genetische Kartierung mithilfe hochauflösender Mikrosatelliten

Der Wert einer genetischen Ressource steigt mit dem Wissen, was über diese Ressource zur Verfügung steht.

Natürlich gibt es auf der Welt zahlreiche Sammlungen von *vinifera* Sorten, aber auch *Vitis*-Wildarten, aber mir ist keine andere Sammlung bekannt, die in dieser Detailschärfe und vor allem vergleichend durchcharakterisiert wurde. Die Tatsache, dass man an ein und derselben Pflanze verschiedene Parameter erhoben hat, erlaubt es, diese Parameter miteinander in Beziehung zu setzen.

Für alle betrachteten Parameter fanden sich innerhalb der Population relativ große Variationsbreiten, was bei einer vom Aussterben bedrohten Art alles andere als selbstverständlich ist. Ein Vergleich der in dieser Population vorhandenen Mikrosatelliten-Allele mit publizierten Daten anderer europäischer Populationen zeigt, dass die Ketscher Population sowohl „typisch westliche“ als auch „typisch östliche“ Allele beherbergt, was möglicherweise damit zu tun hat, dass die Ausbreitung in Europa nach der letzten Eiszeit von zwei Refugien (einem im Rhônedelta und einem in der Kaukasusregion) entlang der großen Flüsse erfolgte, so dass sich diese genetischen Stränge in Mitteleuropa, wo die großen Wasserscheiden liegen, mischen konnten (Nick 2014).

Da bei der Datenerhebung großer Wert auf eine quantitative Darstellung gelegt wurde, sind die oben gelisteten Datensätze nicht nur qualitativer Natur, sondern erlauben auch einen statistischen Zugang, z.B. mit genetischen Informationen (Mikrosatelliten). Damit ließen sich genetische Verwandtschaft und (morphologische oder chemische) Ähnlichkeit in Beziehung setzen. Dabei zeigte sich jedoch, dass dies auf der Ebene der Gesamtpopulation nur relativ locker verknüpft ist – es wäre also naiv, „das Gen für Stomatadichte“ oder „das Gen für Schwarzfäuleresistenz“ zu finden, die betrachteten Merkmale sind sämtlich polygen. Eine Korrelation ließ sich allenfalls auf der Ebene einzelner Sippen nachweisen oder dann, wenn man Merkmalskombinationen anschaut. Beispielsweise waren Stomatadichte und Resistenz gegen Falschen Mehltau (dieses Pathogen dringt über die Stomata ein) nicht signifikant korreliert, wenn man die Gesamtpopulation im Pool betrachtete. Wenn man jedoch Stilbengehalt und Stomatadichte in zwei Gruppen (jeweils hoch und niedrig) miteinander in Beziehung setzte, zeigte sich, dass für die Genotypen, die nicht durch einen hohen Stilbengehalt ohnehin schon teil-resistent waren, eine geringere Stomatadichte durchaus zu einer signifikant verringerten Anfälligkeit führte (Duan et al. 2015). Genau solche Merkmalskombinationen sind ja für eine Pyramidisierungsstrategie interessant.

Man muss freilich auch ganz offen sagen, dass eine genetische Kartierung solcher Merkmalskombinationen nur dann zum Ziel führt, wenn man große Populationszahlen zur Verfügung hat. Dies ist bei einer Wildart, die vom Aussterben bedroht ist, natürlich nicht der Fall. Alternativ könnte man dies mithilfe von Kreuzungspopulationen angehen. Dies wurde versucht, war aber aufgrund von witterungsbedingten Widrigkeiten in den ersten Projektjahren nicht erfolgreich. Das Ziel, eine für quantitative Genetik ausreichend große Kreuzungspopulation zu etablieren, konnte nicht zum geplanten Zeitpunkt erreicht werden, sondern erst im dritten Projektjahr. Diese Kreuzungspopulation konnte im Rahmen dieses Projektes zwar leider nicht mehr genutzt werden, bietet aber nun wertvolles und umfangreiches Material für künftige Projekte.

V.2. Aufklärung von Zielstrukturen für die Kontrolle der Schwarzfäule

Auch dieser Projektteil nahm einen großen Teil der Aktivitäten ein. Da sich dieses Pathogen über einen relativ langen Zeitraum entwickelte, standen bei Projektbeginn keine minimal invasiven Testsysteme zur Verfügung, wie sie etwa für den Falschen Mehltau (hier wird in der Regel mit ausgestanzten Blattscheiben gearbeitet) üblich sind. Die Quantifizierung der Anfälligkeit war daher ein sehr arbeitsintensives Unterfangen, was dann aber mit validierten Daten über die gesamte Wildrebenpopulation hinweg abgeschlossen werden konnte.

Gleichzeitig konnten in einer Kombination aus mikroskopischen Analysen, verschiedenen histochemischen Tests und *in-vitro* Versuchen neue und detaillierte Einblicke in die Biologie dieses noch recht unbekanntes Erregers gewonnen werden:

Besonders wichtig ist hier der Befund, dass während der biotrophen Phase Pectine aus der Zellwand des Wirts als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Da diese Pectine im Laufe der Blattentwicklung zunehmend modifiziert werden, sind sie für den Pilz immer weniger aufschließbar und dies bildet unserer Ansicht nach den Mechanismus für die beobachtete ausgeprägte Altersresistenz des Schwarzfäulebefalls.

Hier zeigt sich bei den Wildreben außerdem ein interessanter Zusammenhang mit dem Blattwachstum. Die Blätter der untersuchten Wildreben expandieren über einen kürzeren Zeitraum als etwa die Blätter der Kultursorte Müller-Thurgau (in der Tat sind die Blätter fast aller *sylvestris* Akzessionen deutlich kleiner als die Blätter von Kulturreben), was mit einer früheren Modifizierung der Pektine korreliert (modifizierte Pektine führen zu einer reduzierten Expansibilität der Zellwand, also zu einer Arretierung des Wachstums). Die Teilresistenz mancher Wildreben könnte also einfach mit einem veränderten Zeitmuster des Blattwachstums in Verbindung stehen. Umgekehrt wäre zu fragen, ob man Kultursorten mit geringerer Blattpansion hinsichtlich einer etwaigen besseren Resistenz gegen Schwarzfäule untersuchen sollte.

Neben diesem quasi präformierten Resistenzmechanismus ließen sich aber auch die Aktivierung von Ereignissen der basalen Immunität nachweisen, etwa eine Alkalinisierung der Zellwand (was die Aktivierung eines Calcium-Influx-Kanals anzeigt, der Protonen kotransportiert und als frühester Schritt der basalen Immunität gilt), die Aktivierung von Superoxid (vermutlich über die NADPH-Oxidase RboH) und die Aktivierung von Genen des Stilbenwegs (wichtigen Phytoalexinen der Rebe) und die Bildung von Kallose um die Apressorien.

Es gibt also auch hier verschiedene Mechanismen, die zur Resistenz beitragen und genutzt werden könnten.

Im Zuge dieser Untersuchungen gelang es auch noch, einen minimal-invasiven Test für Schwarzfäule-Anfälligkeit oder –Resistenz zu entwickeln. Dabei wurde das Hyphenwachstum zu einem bestimmten Zeitpunkt der biotrophen Phase über Anilinblau sichtbar gemacht und vermessen. Dies lässt sich in Blattscheiben durchführen und stellt für die weitere Untersuchung dieses Pathogens eine große methodische Erleichterung dar.

V.3. Basale Immunität als Züchtungsziel

Die pflanzliche Immunität ist aus (mindestens) zwei Schichten aufgebaut. Die basale Immunität wirkt oft gegen eine ganze Klasse von Pathogenen und ist im Grunde bei allen Pflanzen ausgebildet, während die effektorvermittelte Immunität (ETI) oft nur gegen ein bestimmtes Pathogen wirkt und auf einer langen, koevolutiven Geschichte von Wirt und Pathogen beruht (die Gen-für-Gen-Hypothese der klassischen Phytopathologie wird inzwischen als ETI beschrieben). Da Abwehr und Wachstum miteinander um Energieressourcen in Konkurrenz stehen, führte die Domestizierung durch den Menschen bei vielen Kulturpflanzen zu einem fortschreitenden Verlust dieser basalen Immunität, weil zu einseitig (unbewusst) auf schnelles Wachstum, große Früchte, Zuckerakkumulation in den Früchten und ähnliche Merkmale hin selektiert wurde. Wilde Verwandte unserer Kulturpflanzen, sogenannte *Crop Wild Relatives*, sind daher als Resistenzquellen interessant, weil hier die ursprünglichen Mechanismen der basalen Immunität noch wirksam sind.

Wir konnten im Laufe des Projekts an zwei Beispielen eine solche bessere basale Immunität bis in die molekularen Mechanismen hinein darstellen. In beiden Fällen handelte es sich um eurasische Wildreben, die keine koevolute Geschichte mit dem jeweiligen Pathogen aufwiesen, aber dennoch eine Teilresistenz zeigten. In beiden Fällen wurden höhere Pegel von Stilbenen gebildet und dies bildet vermutlich die Ursache für die Resistenz. Interessanterweise kam diese verbesserte Aktivierung der Stilbenbildung auf völlig unterschiedlichen Wegen zustande:

Bei der *sylvestris* Akzession HÖ29 konnte die stärkere Induktion von Stilbenen auf ein Fragment im Promotor des Transkriptionsfaktors *MYB14* zurückgeführt werden, das in *vinifera* fehlt. Das Wildrebenallel dieses Promotors vermittelt eine Verdopplung der Aktivierung. Gesteuert wird diese Aktivierung über einen Signalweg, der über einen Calciumeinstrom, die Aktivierung der NADPH-Oxidase RboH, eine MAP-Kinasekaskade und die Akkumulation von Jasmonsäure verläuft, also über die Schritte, die für die basale Immunität charakteristisch sind. Hingegen ist Salicylsäure (ein zentrales Element bei der hypersensitiven Reaktion, wie sie bei ETI beobachtet wird) wirkungslos. Die verstärkte Aktivierung von *MYB14* resultiert dann in einer verstärkten Aktivierung der Stilbensynthese und der Akkumulation von bioaktiven Stilben-Aglykonen wie Resveratrol und Viniferinen (Duan et al. 2016).

Bei der chinesischen Wildrebe *V. pseudoreticulata* ist es hingegen der Promotor der Stilbensynthese selbst, der ein bei *vinifera* fehlendes Motiv aufweist. Auch hier sind es die Schritte der basalen Immunität, die aktivierend wirken.

Im Gegensatz zu Hö29 wurde hier aber die Aktivierung durch Jasmonsäure durch eine Aktivierung über Salicylsäure ersetzt, der Eingang ins System ist also ausgetauscht worden (Jiao et al. 2017).

Die Evolution war hier also erfinderisch, es führen viele Wege nach Rom und es gibt daher auch viele Möglichkeiten, solche Mechanismen züchterisch in Form einer Pyramidisierung zu nutzen.

Die Notwendigkeit für neue Resistenzquellen, selbst für Pathogene, die durch die gängigen PiWi-Reben schon adressiert werden, ergibt sich durch die inzwischen schon zu beobachtende Erosion der Resistenz gegen den Falschen Mehltau. Diese Resistenz wird durch den genetischen Faktor *Rpv3* (*Resistance against Plasmopara viticola* 3) hervorgerufen und wir untersuchten das Verhalten von Einzelsporangien-Linien, die auf der PiWi-Rebe ‚Regent‘ isoliert worden war. Wir konnten zeigen, dass dieser Stamm tatsächlich die Resistenz zu brechen vermag. Dies korreliert mit einer mit einer schnelleren und stärkeren Bildung von Effektoren (RFLX1, crinkler) auf der Seite des Pathogens, was auf der Wirtseite eine verzögerte Aktivierung von Metacaspase 2 und 5 zur Folge hat, wodurch die hypersensitive Reaktion nicht effizient ausgelöst werden kann. Es ist zu erwarten, dass solche Stämme sich ausbreiten werden, da die derzeit zugelassenen PiWi-Reben alle diesen Resistenzfaktor nutzen.

VI. Nutzen und Verwertbarkeit

Im Wesentlichen hat das Projekt zu vier Ergebnissen geführt:

Ergebnis 1: eine detaillierte phänotypische und genotypische Kartierung der in Deutschland noch vorhandenen *sylvestris* Diversität. Diese Sammlung gewinnt dadurch an Wert auch für die Kartierung weiterer Merkmale (holzerstörende Pilze, Oberflächenwachse, Lockerbeerigkeit, um nur einige zu nennen). Generell ist zu bemerken, dass es weltweit keine *sylvestris* Sammlung gibt, die hinsichtlich Umfang und Untersuchungstiefe auch nur annähernd vergleichbar wäre. Inspiriert durch unsere Arbeiten haben inzwischen Kollegen in Tunesien damit begonnen, dortige *sylvestris* Genotypen hinsichtlich von Nutzungsmöglichkeiten zu untersuchen (bilaterales BMBF Projekt mit dem Partner KIT).

Ergebnis 2: eine inzwischen ausreichend große Kreuzungspopulation für zwei *sylvestris* Genotypen mit den *vinifera* Sorten ‚Augster Weiss‘ bzw. ‚Weißburgunder‘. Diese Kreuzungspopulation kann nun für genauere genetische Kartierungen der in dieser Studie untersuchten Merkmale (aber auch weiterer Merkmale) eingesetzt werden, um so interessante Loci bei *sylvestris* einzugrenzen.

Ergebnis 3: eine detaillierte Analyse des Infektionsgeschehens bei der Schwarzfäule und der Identifizierung eines wichtigen Schlüsselfaktors (Modifizierung von Zellwandpektinen), der genetisch (also züchterisch) beeinflussbar ist.

Ergebnis 4: einen Einblick in die Mechanismen der Resistenzerosion für *Rpv3* als zentralem Faktor bei den PIWI-Reben, aus dem sich klare Schlussfolgerungen für Resistenzmanagement und strategische Entscheidungen für die Resistenzzüchtung einer neuen Generation von PIWI-Reben ableiten lassen.

Zu einer möglichen Verwertbarkeit dieser Ergebnisse lässt sich momentan folgendes sagen:

Im Rahmen eines nur wenige Jahre dauernden Projekts ist das langfristige Ziel, eine biologische Kontrolle der Schwarzfäule als Alternative zum Einsatz von Kupfer, nicht zu erreichen, da schon die Dauer einer Generation die Dauer dieses Projekts übersteigt. Dennoch sind einige Ziele erreicht worden, die mittelfristig verwertbar sind:

Für zwei der Wildreben, Hö29 und Ke83, liegen nun inzwischen umfangreiche Kreuzungspopulationen vor und werden am JKI hochgezogen. Hier kann man, wenn die 2015 etablierte Kreuzungspopulation herangewachsen ist, nun die genetischen Faktoren hinter der erhöhten Stilbeninduktin kartieren und später in einen *vinifera* Rezeptor rückkreuzen.

Die im Laufe dieses Projekts gewonnenen Erkenntnisse zu Pathogenese und Biologie der Schwarzfäule lassen sich dagegen schon zeitnah verwerten: Der gefundene Zusammenhang zwischen Pektinmodifikation, Zeitmuster der Blattexpansion und Schwarzfäule-Teilresistenz kann dazu eingesetzt werden, Kultursorten zu screenen, um hier Empfehlungen für Gebiete auszusprechen, in denen die Schwarzfäule ein Problem darstellt. Weiterhin lässt sich der im Projektverlauf entwickelte minimal invasive Test dazu einsetzen, die Vorhersagekraft der ersten web-basierten Modelle für die Schwarzfäule (<http://www.vitimeteo.de/blackrot/>) zu verbessern.

Generell gilt, dass neue Resistenzfaktoren ein hohes Marktpotential besitzen, weil die Reduktion des Aufwands für chemischen Pflanzenschutz und die Suche nach Alternativen für den Einsatz von Kupfer im ökologischen Weinbau auch mittelfristig von großer Bedeutung sein werden. Die bei den derzeit auf dem Markt befindlichen PiWi Sorten zu

beobachtende Resistenzerosion durch neue Pathogenstämme erhöht gleichzeitig den Druck, neue Resistenzfaktoren zu finden und züchterisch zu nutzen. Aufgrund der langen Generationsdauer der Weinrebe, ist es jedoch schwierig, einen Zeithorizont konkret zu beziffern. Von der Entdeckung des der *Peronospora*-Resistenz in amerikanischen Reben bis zur Zulassung der ersten PIWI-Sorten vergingen mehrere Jahrzehnte. Die praktische Verwertung in Form von neuen Qualitätssorten mit hoher Resistenz wird durch die Anwendung der marker-assistierten Züchtung jedoch enorm beschleunigt.

VII. Gegenüberstellung geplante und erreichte Ziele, weiterführende Fragen

Das Vorhaben hatte folgende Ziele

1. Ausführliche Kartierung der *sylvestris* Sammlung hinsichtlich Resistenzen gegenüber den Erregern von Schwarzfäule, Falschem Mehltau und Echtem Mehltau, aber auch hinsichtlich von morphologischen und chemischen Merkmalen mit genetischen Markern, die mit diesen Resistenzen in Zusammenhang stehen, um dies später züchterisch nutzen zu können (markergestützte Kreuzung).
2. Zelluläre Analyse des Infektionsgeschehens bei *Guignardia bidwelli*, dem Erreger der Schwarzfäule, um so Zielstrukturen für die Entwicklung von Resistenzen gegen Schwarzfäule zu identifizieren.
3. Etablierung einer Kreuzungspopulation aus interessanten *sylvestris* Kandidaten und Kulturreben
4. Einblick in die Steuerung der basalen Immunität bei nichtamerikanischen Wildreben, um die momentan in PIWI-Reben genutzten Resistenzen auf Effektor-getriebener Immunität ergänzen zu können.
5. Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau, um Einblicke in die gerade auch im letzten Jahr beobachtete Resistenzerosion von PIWI-Reben zu gewinnen.

Von diesen Zielen konnten erreicht werden:

1. Ausführliche Kartierung der *sylvestris* Sammlung, wobei aufgrund der geringen Populationsgrößen die Korrelation zwischen Merkmal und genetischen Markern im Projektrahmen nicht etabliert werden konnte.
2. Zelluläre Analyse des Infektionsgeschehens bei *Guignardia bidwelli*, dem Erreger der Schwarzfäule bis hin zur Identifizierung molekularer Züchtungsziele (Pektinmodifikationen)
3. Etablierung einer Kreuzungspopulation aus interessanten *sylvestris* Kandidaten und Kulturreben wurde aufgrund widriger Witterung erst verspätet (2015) möglich, damit ist dieses Ziel im Projektrahmen nicht mehr nutzbringend einsetzbar, bildet aber für künftige Untersuchungen eine wertvolle Ressource.
4. Einblick in die Steuerung der basalen Immunität konnte an zwei Beispielen für nicht-amerikanische Wildreben bis in die molekularen Mechanismen hinein erreicht und hochrangig publiziert werden.
5. Untersuchung der Resistenzerosion von PIWI-Reben gegen Falschen Mehltau mithilfe von Einzelsporangienlinien identifizierte die Expressionspegel von Effektoren der RXLR und crinkler Klasse als Zielstruktur für die Resistenzerosion.

Fazit:

Trotz des begrenzten Zeitrahmens dieses Projekts, konnten vier der fünf selbstgesteckten Ziele erreicht werden. Aufgrund der langen Entwicklungsdauer der Weinrebe wäre eine züchterische Vorbereitung im Rahmen der Projektlaufzeit nur unter optimalen Bedingungen und selbst dann nur im Ansatz möglich gewesen. Da das Kreuzen von *sylvestris* nicht trivial ist und auch witterungsbedingte Widrigkeiten in den ersten zwei Projektjahren den Erfolg zunichtemachten, war Block 3 nicht erfolgreich. Dafür konnten Block 2 und 4 erfolgreicher entwickelt werden als zunächst zu vermuten war. Insgesamt hat das Projekt zwei große Erfolge gezeitigt:

A. Die in Deutschland vorhandene genetische Diversität der Europäischen Wildrebe wurde hinsichtlich der Resistenz gegen drei wichtige Rebkrankheiten, der Bildung von Abwehrstoffen und informativer Mikrosatellitenmarker in großer Detailtiefe erschlossen.

B. Mit qualitativ hochwertigen Daten konnten wichtige Einblicke in das Infektionsgeschehen der Schwarzfäule gewonnen werden. Damit gelang es, Pektinmodifikationen in der Zellwand des Wirts als molekularen Schlüssel für die Resistenz gegen Schwarzfäule zu identifizieren.

Weiterführende Fragen:

Derzeit wird die *sylvestris* Population in großem Umfang über Next Generation Sequencing durchsequenziert. Hierfür hat die Chinesische Akademie der Wissenschaften mehrere Millionen € zur Verfügung gestellt. Die Daten aus dieser Sequenzierung werden den Wert dieser Sammlung stark erhöhen, weil damit auch andere Fragestellungen zugänglich werden. Derzeit wird im Rahmen einer Promotion (Xinhuang Ge) die Bildung von Oberflächenwachsen untersucht, weil diese den Infektionserfolg von Falschem und Echem Mehltau stark beeinflusst, aber auch für das Abtrocknen von Blättern und Beeren (zum Beispiel in Hinblick auf *Botrytis*) wichtig ist.

Für die Teilresistenz mancher Wildreben gegen Schwarzfäule scheint das zeitliche Muster der Pektinmodifikation wichtig zu sein. Die hier involvierten Enzyme sind teilweise identifiziert und aufgrund des Rebengenom-Projekts auch molekular zugänglich. Es bietet sich daher an, die Expressionsmuster dieser Enzyme zu charakterisieren und zu untersuchen, ob bei den Wildreben hier, ähnlich wie es im Falle von Hö29 und *V. pseudoreticulata* beobachtet wurde, unterschiedliche Promotorstrukturen vorliegen. Daraus ließen sich unter Umständen Sonden entwickeln, womit man bei Wildreben, aber auch bei Kultursorten nach Genotypen mit einer günstigeren Pektinmodifikation suchen könnte.

VIII. Zusammenfassung

Zur Bekämpfung der Schwarzfäule werden im ökologischen Weinbau nach wie Kupfer- oder Schwefelpräparate eingesetzt. Als Alternative sollte das Potential der Europäischen Wildrebe (*Vitis sylvestris*) für die Resistenzzüchtung untersucht werden. Damit würde zum einen die natürliche Artbarriere respektiert und neue Resistenzquellen für eine nachhaltige Pyramidisierung erschlossen. Grundlage war eine im Rahmen des BLE-Projekts „Überlebendensicherung der Wildrebe in den Rheinauen durch gezieltes *in-situ* Management“ im Botanischen Garten des KIT etablierte Sammlung von *V. sylvestris*, die nach derzeitigem Kenntnisstand die in Deutschland für diese Art noch vorhandene genetische Diversität vollständig abbildet. In dieser Sammlung waren Hinweise auf Resistenzen gegen die Rebenkrankheiten Falscher Mehltau, Echter Mehltau und Schwarzfäule entdeckt worden.

Diese Population wurde sehr detailliert in Bezug auf Resistenz gegenüber Schwarzfäule, Falschem Mehltau, Echem Mehltau, anatomischen (zum Beispiel Stomatadichte) und chemischen Merkmalen (Stilbenpegel und -profile), aber auch genetisch mit 5-10 hochauflösenden Mikrosatellitenmarkern je Chromosom kartiert.

Weiterhin wurden für die Schwarzfäule viele Aspekte der Infektion aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass während der biotrophen Phase der Pilz unterhalb der Cuticula entlang der Zellwände wächst, ohne in die Zellen einzudringen. Während dieser Phase werden Pektine aus der Zellwand des Wirts als Nahrungsquelle genutzt. Erst nach zehn Tagen beendet er diese Phase und wächst dann dreidimensional durch das Blatt hindurch, um sexuelle Formen zu bilden. Einige *sylvestris* Genotypen wiesen eine Teilresistenz auf, die mit einer beschleunigten Ausprägung der Altersresistenz zusammenhängt. Hier konnte eine Korrelation mit Modifikationen der Pektine gezeigt werden, die zeitgleich mit der Verlangsamung der Blattexpansion mit Monolignolen (Feroyl-Reste) verknüpft werden, wodurch diese als Kohlenstoffquelle nicht mehr gut aufgeschlossen werden können. Diese Altersresistenz stellt ein interessantes Ziel für die Resistenzzüchtung dar. Weiterhin wurde ein minimal invasives Testsystem entwickelt, mit dem die Anfälligkeit verschiedener Reben in einem frühen Stadium anhand der Hyphenverzweigung quantifiziert werden kann.

Für zwei interessante (stilbenreiche) *sylvestris* Genotypen konnten nach anfänglichen, witterungsbedingten Schwierigkeiten, umfangreiche Kreuzungspopulationen mit *vinifera* erzeugt werden. Diese konnten schon teilweise hinsichtlich der Segregation von Stilbengehalten charakterisiert werden.

Für eine dieser Wildrebeneltern, konnte ein bei Kulturreben fehlendes Stück im Promotor des Transkriptionsfaktors MYB14 entdeckt werden. Mithilfe von Promotor-Reporter-Tests konnte gezeigt werden, dass das Wildreben-Allel von MYB14 durch Signale der basalen Immunität doppelt so stark aktiviert wird wie das Kulturreben-Allel. Da MYB14 Stilbensynthese, das Schlüsselenzym der Stilbenbildung, aktiviert, konnte so eine Arbeitshypothese für die erhöhten Stilbenpegel und die erhöhte Pathogenresistenz dieses Genotyps entwickelt werden. Dies zeigt, dass eine wirkungsvollere basale Immunität alternativ oder (über eine Pyramidisierung) ergänzend mit den aus amerikanischen Wildreben in sogenannte PiWi-Reben eingekreuzten Resistenzfaktoren nutzbringend eingesetzt werden könnten. Ein weiterer genetischer Faktor, der die basale Immunität (in diesem Fall gegen den Echten

Mehltau) stimulieren kann, wurde in einem Allel des Stilben-Synthase-Promotors selbst entdeckt und funktionell analysiert. Dieses Allel stammt aus einer chinesischen Wildrebe.

In einem weiteren Projektteil wurde die seit einigen Jahren zu beobachtende Erosion der Resistenz von PiWi-Reben gegen den Falschen Mehltau untersucht. Mithilfe eines genetisch definierten Einzelsporangien-Stamms von *P. viticola*, der auf PiWi-Reben wachsen kann, konnte nachgewiesen werden, dass eine schnelle und starke Hochregulation der Pathogen-Effektoren RXLR1 und crinkler mit einer Umgehung der durch den aus amerikanischen Wildreben stammenden Locus Rpv3 (der für die Resistenz fast aller gängigen PiWi-Reben ursächlich ist) umgangen werden kann. Diese Befunde machen noch einmal deutlich, dass weitere und neue Resistenzfaktoren nötig sind, um den Erfolg der PiWi-Reben für den ökologischen Weinbau auch nachhaltig sichern zu können.

Das Projekt legt damit die Grundlage für die Erschließung unserer heimischen Wildrebe *V. sylvestris* als genetische Ressource für den nachhaltigen Weinbau der Zukunft.

IX. Literaturverzeichnis

- Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon AF, Testolin R (2007) Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theor Appl Genet* 114, 1249-1263
- Duan D, Halter D, Baltenweck R, Tisch C, Tröster V, Kortekamp A, Hugueney P, Nick P (2015) Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J Exp Bot* 66, 3243-3257
- Duan D, Fischer S, Merz PR, Bogs J, Riemann M, Nick P (2016) An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence. *J Exp Bot* 67, 1795-1804
- Eibach R, Zyprian E, Welter L, Töpfer R (2007) The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46, 120-124
- Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Töpfer R, Zyprian E (2004) Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet* 108, 501-515
- Höll J, Vannozzi A, Czermel S, D'Onofrio C, Walker AR, Rausch T, Lucchin M, Boss PK, Dry IB, Bogs J. 2013. The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell* 25, 4135-4149
- Jiao Y, Xu W, Duan D, Wang Y, Nick P (2016) A stilbene synthase allele from a Chinese wild grapevine recruits salicylic acid signalling for efficient defence, *J. Exp. Bot.* 67, 5841-5856
- Rex F, Fechter I, Hausmann L, Töpfer R (2014) QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock 'Börner' (*V. riparia Gm183* x *V. cinerea* Arnold). *Theor. Appl. Genetics* 127, 1667-1677

X. Öffentliche Darstellung des Projekts

Fachpublikationen

- Tisch C, Nick P, Kortekamp A (2013) Von wilden Reben lernen – Natürliche Resistenzen gegen die Schwarzfäule. *Dtsch Weinbau Jb* 65, 118-122
- Tisch, C.; Kortekamp, A.; 2013: Wilde Reben zähmen – Neue Quellen der Schwarzfäule-Resistenz. *Das Deutsche Weinmagazin* 26/2013, S. 22-23.
- Nick, P.; Martens, A.; 2014: Die Wilde Weinrebe eine bedrohte Wildform als Retter des Weinbaus. *PdN Biologie in der Schule* 63, S. 13-17.
- Jiao Y, Xu W, Duan D, Wang Y, Nick P (2016) A stilbene synthase allele from a Chinese wild grapevine recruits salicylic acid signalling for efficient defence, *J. Exp. Bot.* 67, 5841-5856
- Duan D, Fischer S, Merz PR, Bogs J, Riemann M, Nick P (2016) An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence. *J Exp Bot* 67, 1795-1804
- Duan D, Halter D, Baltenweck R, Tisch C, Tröster V, Kortekamp A, Hugueney P, Nick P (2015) Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J Exp Bot* 66, 3243-3257
- Tröster V, Setzer T, Hirth T, Pecina A, Kortekamp A, Nick P (2017). Probing the Achilles' Heel of the Biotrophic Grapevine Pathogen *Plasmopara viticola*. *Protoplasma* DOI: 10.1007/s00709-017-1123-y

Kurz vor der Einreichung ist eine weitere gemeinsame Fachpublikation, wo die zellulären Details der Schwarzfäule-Infektion dargestellt werden.

Tagungsbeiträge

- Tisch, C.; Rühle, M.; Eibach, R.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2012: Mikroskopische Untersuchungen zum frühen Infektionsprozess von *Guignardia bidwellii* auf verschiedenen resistenten Rebsorten und Europäischen Wildreben. Julius-Kühn-Archiv 438, 368-369.
- Tisch, C.; Eibach, R.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2012: Microscopical investigation of early infection events of *Guignardia bidwellii* on grape varieties with different levels of resistance and European wild grapes. Proceedings of the Second International Conference Patholux on the Impact of Plant Pathogens on the Quality of Crops and Wine, 22.-23.10.2012, Mondorf-les-Bains/Luxembourg, S. 83 (Abstract).
- Nick P (2012) Von der Ex-situ-Erhaltung bis zur Nutzung in der nachhaltigen Landwirtschaft: Das Beispiel der Europäischen Wildrebe. Ber. Ges. Pflanzenbauwiss. 6, 36-38
- Tisch, C.; Eibach, R.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2013: Microscopical investigation of early infection events of *Guignardia bidwellii* on grape varieties with different levels of resistance and European wild grapes. Journal of Plant Pathology (1, Supplement), S1.82-83.
- Tisch, C.; Kortekamp, A.; Black rot: Fungal development and putative resistance mechanisms. Proceedings of the IOBC-WPRS European meeting of the working group „Integrated protection and production in viticulture“, p. 51; 13.-17.
- Tisch, C.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2014: Rescue to be rescued: European wild grape as genetic resources of resistance towards fungal diseases? Proceedings of the 7th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew, p. 61-62.
- Tisch, C.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2014: Retten, um gerettet zu werden? Sind vom Aussterben bedrohte Europäische Wildreben eine neue Quelle der Resistenz gegenüber Schwarzfäule? Julius-Kühn-Archiv 447, 435-436.
- Tisch, C.; Nick, P.; Kortekamp, A.; 2015: White spots of black rot: Undiscovered areas of pathogen biology and potential resistance mechanisms of its host (*Vitis* sp.). Proceedings of the International Workshop on Fungal Grapevine Diseases, p. 19.

Vorstellungen des Projekts in Vorträgen:

- 10.01.2012 Peter Nick „Was wir vom Wilden Wein lernen können“, Geilweilerhof, Siebeldingen
- 01.04.2012 Peter Nick „Was wir vom Wilden Wein lernen können“, Freunde des Botanischen Gartens, Tübingen
- 01.03.2012 Peter Nick „What we can learn from Wild Wines“, North-West Agricultural and Forestry University, Yangling, Shanxi, China
- 03.03.2012 Peter Nick „What we can learn from Wild Wines“, Wuhan Agricultural and Horticultural University, Wuhan, China
- 27.03.2012 Michael Rühle, Gabi Jürges, Benedikt Müller, Peter Nick, Christine Tisch, Andreas Kortekamp „*Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris* – unzüchtete Rebe mit Potential. 52. Arbeitstagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaus bei der DLG, Bernkastel-Kues/Mosel
- 03.05.2012 Peter Nick „How we can profit from evolution“, 7. Rhein-Wein-Symposium, KIT
- 04.05.2012 Christine Tisch „Early events in Black Rot infection“, 7. Rhein-Wein-Symposium, KIT
- 15.01.2013 Rudolf Eibach „Resistenzzüchtung – Entwicklung, Stand und Perspektiven“ 66. Pfälzische Weinbautage, Neustadt, Wstr.
- 14.02.2013 Peter Nick „Von der *Ex-situ*-Erhaltung bis zur Nutzung in der nachhaltigen Landwirtschaft: Das Beispiel der Europäischen Wildrebe. Deutsche Saatguttagung, Osnabrück
- 13.03.2013 Christine Tisch, Peter Nick, Andreas Kortekamp „Entwicklung der Schwarzfäule auf Kultursorten und Wildreben“ 53. Arbeitstagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der DLG, Veitshöchheim.
- 22.03.2013 Christine Tisch, Peter Nick, Andreas Kortekamp „Black rot on grape vine infection structures and development on different grape genotypes“ Tagung der DPG Arbeitskreise „Mykologie“ und „Wirt-Parasit-Beziehungen“, Göttingen.
- 26.04.2013 Rudolf Eibach „Pilzwiderstandsfähige Rebsorten – wo kommen wir her, wo wollen wir hin?“ 61. Deutscher Weinbaukongress Stuttgart
- 15.10.2013 Christine Tisch, Andreas Kortekamp „Black rot: Fungal development and putative resistance mechanisms“ IOBC/WPRS-OILB/SROP European meeting of the working group „Integrated protection and production in viticulture“, Ascona (Schweiz).

- 20.11.2013 Christine Tisch, Andreas Kortekamp „Schwarzfäule – Pilzentwicklung und mögliche Resistenzmechanismen“ Rebschutzreferententagung, DLR Rheinpfalz, Neustadt/Weinstrasse.
- 16.05.2014 Peter Nick „Resveratrol – Signal for Life and Death“ – 8. Rhein-Wein-Symposium “Forschung für nachhaltigen Weinbau”.
- 30.09.2014 Peter Nick “Basal Immunity of the European Wild Grapevine” – Bacchus Symposium, Uni Basel
- 06.03.2014 Peter Nick „Genetische Ressourcen von Wildpflanzen“ – Auftaktveranstaltung des Netzwerks WIPs-De - Wildpflanzen in besonderer Verantwortung Deutschlands, Osnabrück
- 29.04.2014 Peter Nick „Artenschutz zwischen Erhaltung und Nutzung – das Beispiel Wildrebe. Abschlußtagung der Deutschen Genbank für Wildpflanzen mit Nutzungspotential, Regensburg
- 30.06.2014 Peter Nick „*Vitis sylvestris* as genetical resource?“ – 7th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew. Vitoria-Gasteiz
- 30.06.2014 „Christine Tisch, Peter Nick, Andreas Kortekamp „Rescue to be rescued: European wild grape as genetic resources of resistance towards fungal diseases?“ Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew, Vitoria/Gasteiz, Spanien.
- 15.07.2014 Christine Tisch, Andreas Kortekamp „Forschungsprojekt Schwarzfäule – Nutzung genetischer Ressourcen“ Tagung der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP)e.V., Neustadt an der Weinstrasse.
- 19.11.2014 Christine Tisch, Andreas Kortekamp „Biologie der Schwarzfäule und Abwehr durch die Rebe“ Rebschutzreferententagung, Neustadt an der Weinstrasse.
- 29.03-02.04.2015 Christine Tisch, Peter Nick, Andreas Kortekamp „White spots of Black Rot: Undiscovered areas of pathogen biology and potential resistance mechanisms of its host (*Vitis* sp.)“ International Workshop on Fungal Grapevine Diseases, Eger, Ungarn.
- 06.03.2017 Peter Nick „Immunitätsschalter bei den Wildreben“. EcoVin Fachseminar "Neue Wege im ökologischen Weinbau“, St. Ulrich
- 06.03.2017 Rudolf Eibach „Neue Verfahren in der Rebenzüchtung“. EcoVin Fachseminar "Neue Wege im ökologischen Weinbau“, St. Ulrich

Vorstellungen des Projekts auf Postern:

- 10.-14.09.2012 Christine Tisch, Rudolf Eibach, Peter Nick, Andreas Kortekamp „Mikroskopische Studien zum frühen Infektionsprozess von *Guignardia bidwellii* auf verschiedenen resistenten Rebsorten und Europäischen Wildreben“ Deutsche Pflanzenschutztagung, Braunschweig.
- 23.10.2012 Christine Tisch, Rudolf Eibach, Peter Nick, Andreas Kortekamp “Microscopical investigation of early infection events of *Guignardia bidwellii* on grapevine varieties with different levels of resistance and European wild grapes” Patholux, Luxembourg.
- 23.-26.09.2024 Christine Tisch, Peter Nick, Andreas Kortekamp “Retten um gerettet zu werden? Sind vom Aussterben bedrohte Europäische Wildreben eine neue Quelle der Resistenz gegenüber der Schwarzfäule?“ Deutsche Pflanzenschutztagung, Freiburg.

Öffentliche Führungen:

- 03.05.2012 Peter Nick „Genetische Ressourcen der Weinrebe“, öffentliche Führung im Verbund mit dem 7. Rhein-Wein-Symposium, KIT
- 18.05.2012 Peter Nick „Faszination Pflanze“ – Europaweiter Tag der Pflanzenwissenschaften, Botanischer Garten des KIT, 18.05.2012
- 18.05.2013 Peter Nick „Faszination Pflanze“ – Europaweiter Tag der Pflanzenwissenschaften, Botanischer Garten des KIT, 18.05.2013

Lehre

Das Projekt ist auch in Lehrveranstaltungen des KIT eingebunden (Master Biologie F2-Modul Plant Evolution, Bachelor Angewandte Biologie Modul Nutzpflanzen). Im Rahmen des Mastermoduls führen Studierende kleine Forschungsprojekte (Umfang 4 Wochen) durch. Über das Projekt wird im Rahmen der Vorlesung „Pilzkrankheiten im Weinbau“ im Dualen Studiengang Weinbau/Oenologie berichtet.

Zeitungsberichte

- „Biologe kämpft gegen amoklaufende Alge“ BNN 27.09.2011
- „Pilzabwehr durch Mundgeruch - KIT-Forscher bekämpfen Parasiten der Weinrebe“ LookIT 02/11
- „Die Welt“ online-Ausgabe: <http://www.welt.de/wissenschaft/umwelt/article13592380/Urmutter-des-Weines-soll-amoklaufende-Alge-stoppen.html>
- „Die Morgenpost“ online-Ausgabe <http://www.morgenpost.de/web-wissen/article1757574/Urmutter-des-Weines-soll-amoklaufende-Alge-stoppen.html>
- aid-PressInfo Nr. 41 vom 12. Oktober 2011 „Hoffen auf die Europäische Wildrebe Forschungsprojekt zur Züchtung resistenter Weinsorten gestartet“
- „Pilzabwehr mit Mundgeruch“ Boulevard Baden-Baden (07.10.2012)
- „Forschung für reinen, feinen Wein“ LookIT (28.09.2013)
- „Schädlinge kennen keine Grenzen“ Rheinpfalz (29.11.2014)
- "Experte des Monats - Ökologischer Weinbau" Presse, Kommunikation, Medien (05.03.2015)

Rundfunkbeiträge

- SWR2 26.09.2011 Interview
- Deutschlandfunk 10.08.2011 „Nonanal als Biowaffe gegen Schädlinge“ in Mraseks Molekülmosaik <http://www.dradio.de/dlf/sendungen/forschak/1526080/>
- Radio Fri 19.04.2012 gegen 17 „Wildreben und nachhaltiger Weinbau“
- „Tickende Uhr für den Ökowein“ Radio KIT (19.04.2012)
- „Resistente Reben“ Landesschau Baden-Württemberg Aktuell (15.08.2012)
- „Forschung für Nachhaltigen Weinbau“ BW Land und Leute (21.01.2013)

2.4. Versuchsdurchführungen: Morphologie-Analyse

2.4.1. Fluoreszenzmikroskopie Präparatherstellung

Ein Herstellungsdurchlauf umfasste meist 30 Fixieransätze, zu je 1,2 ml, weshalb meist 40 ml Fixierlösung hergestellt werden musste. Die Fixierlösung wurde nach folgendem Schema jeweils mehrmals frisch zubereitet.

(Alle verwendeten Chemikalien sind im Anhang unter 6.4.1. Materialauflistung erfasst)

Abwiegen der folgenden Reagenzien für 40ml End-Lösung:

- 1,6 g Paraformaldehyd (= 4 % in der fertigen Lösung)
- 45,65 mg EGTA (= 3 mmol/l in der der fertigen Lösung)
- 60,47 mg PIPES (= 50 mmol/l der fertigen Lösung)

Es wurden 20 ml destilliertes Wasser zugegeben. Die Lösung wurde langsam unter ständigem Rühren auf 70 °C erwärmt. Der pH-Wert wurde mit 1M Natriumhydroxid-Lösung auf pH = 6,9 eingestellt, so lösten sich die eingewogenen Chemikalien und die Lösung wurde klar. Danach wurde jeweils auf das Endvolumen von 40 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Zusätzlich wurden 120ml PIPES-Waschlösung wie folgt hergestellt:

- Abwiegen von 181,41 mg PIPES (= 50 mmol/l in der Waschlösung)

Es wurde mit destilliertem Wasser auf 120 ml aufgefüllt; durch leichtes Rühren und Erwärmen löste sich das eingewogene PIPES. Für den Erwärmungsschritt konnte jeweils die Restwärme der Heizplatte von der Herstellung der Fixierlösung ausgenutzt werden.

Von den Versuchsblättern wurden jeweils ca. 15, etwa 0,5 cm lange und 2 mm breite Rechtecke, auf einer Wachsplatte mit ein paar Tropfen Fixierlösung beträufelt, ausgeschnitten und in passend beschriftete 1,5ml-Eppendorfgefäße gegeben. In jedem Gefäß war 1,2 ml Fixierlösung vorgelegt. Die Gefäße wurden geschlossen alle 10 min vorsichtig invertiert. Nach 40 min Einwirkungszeit der Fixierlösung auf die Blattstückchen wurde die Lösung abgenommen und sofort durch 1 ml der Waschlösung ersetzt. Die Waschlösung wurde jeweils pro Ansatz dreimal ersetzt, bei einer Waschzeit von je 10 min und mehrmaligem Invertieren.

Zur Entwässerung, wurden die Blattstückchen wie folgt inkubiert:

Je ca. 1 ml pro Gefäß:

- 30 % Ethanol für 30 min
- 50 % Ethanol für 30 min
- 70 % Ethanol für 30 min
- 90 % Ethanol für 30 min
- 100 % Ethanol für 30 min

Die Blattstückchen wurden an das Einbettungsmedium gewöhnt und deshalb wie folgt behandelt: Je 1 ml pro Gefäß:

- 25 % LR White in Ethanol über Nacht
- 50 % LR White in Ethanol für 4 Stunden
- 75 % LR White in Ethanol für 4 Stunden
- 100 % LR White über Nacht
- 100 % LR White für 4 Stunden

Die Eppendorfgefäße wurden während der Gewöhnungsschritte auf einem Probenrotator befestigt, um zu gewährleisten, dass die Blattstückchen gleichmäßig und vollständig mit dem Einbettungsmedium infiltriert werden.

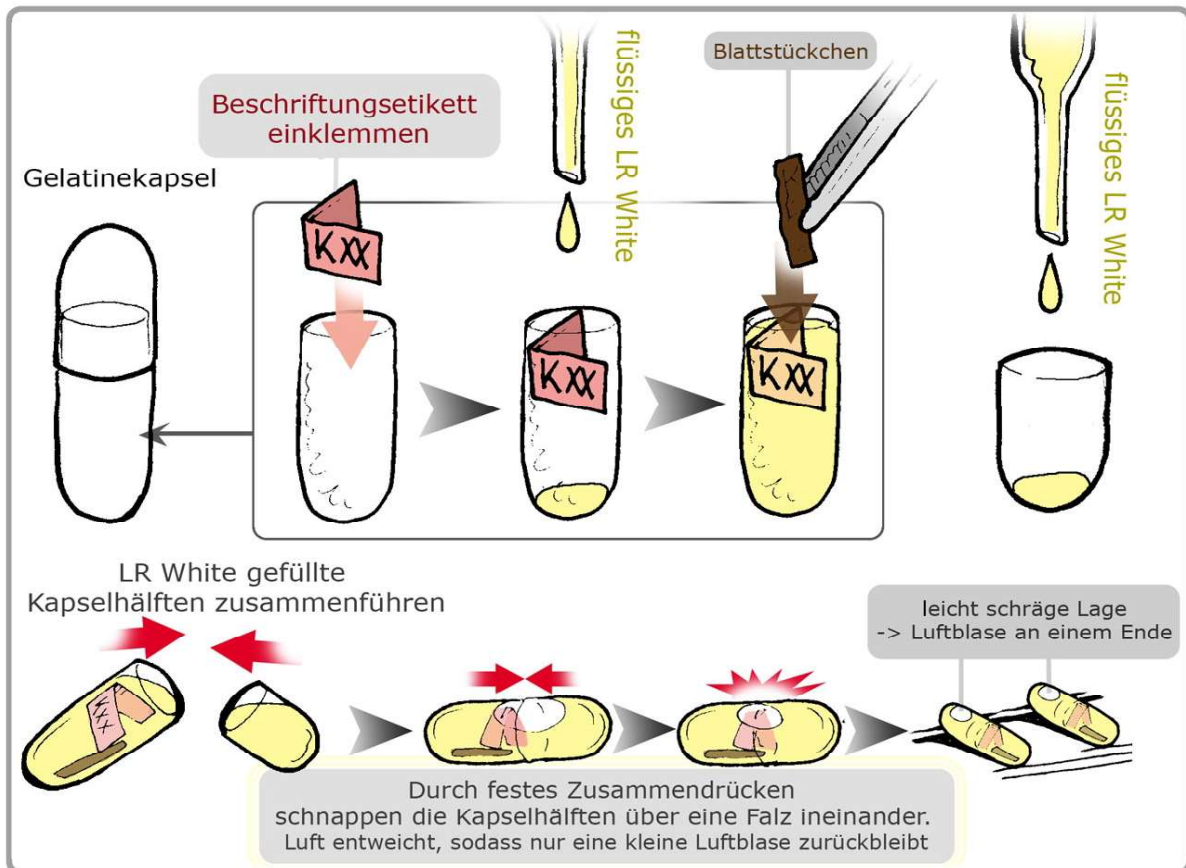


Abbildung 11: Schema zur Herstellung der Präparatkapseln

Im Einbettungsschritt wurden die Blattstückchen in das Festmedium LR White eingegossen. Hierzu wurden von jedem Untersuchungsindividuum anfangs 6, später 5 Blattstückchen jeweils einzeln in die eine Hälfte einer mit LR White gefüllten Gelatinekapselform gegeben. In jede Kapsel wurde ein kleines Kartonstückchen, welches mit der entsprechenden *Vitis*-Kennung beschriftet war, geklemmt. Jede Kapsel wurde mit dem ebenfalls mit LR White gefüllten Oberteil verschlossen, sodass die Kapsel möglichst wenig Luft enthielt. Die verschlossenen Kapseln wurden so lange bewegt, bis das Blattstückchen der Länge nach in der Kapsel zu liegen kam. Anschließend wurden sie auf einem Gitter platziert, so dass ein Ende der Kapsel leicht erhöht war (siehe **Abb.11**).

Das Gitter mit den Kapseln wurde für die Dauer von 40 Stunden bei 60 °C in einem kleinen Heizofen aufbewahrt; so konnte das LR White polymerisieren.

Diese Versuchsschritte mussten mehrfach durchgeführt werden, da insgesamt 74 Pflanzen zu untersuchen waren. Zusätzlich wurden von einigen Pflanzen weitere Präparate gemacht, wenn sie unter anderen Bedingungen aufwuchsen (z.B. Schatten). Auch alte und junge Blätter sowie Ansätze mit hormoneller Behandlung, wurden zu separaten Präparaten verarbeitet. Die Menge der verwendeten Chemikalien blieb dabei immer gleich, da stets pro Herstellungsdurchlauf zwischen 25 und 30 Pflanzenansätze bearbeitet wurden.

Es wurden Objektträger mit Chromgelatine beschichtet. Hierfür wurden 110 mg Gelatinepulver und 10 mg Kaliumchrom-(III)-sulfoxid in ein Becherglas gegeben, mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung anschließend im Mikrowellengerät aufgeköcht. Danach wurden 50 Objektträger zu 2/3 in die heiße Chromgelatine-Lösung eingetaucht und zum Trocknen hochkant aufgestellt. Die getrockneten Objektträger wurden in einem Objektträgerständer aufbewahrt. Hier mussten im Laufe der Versuchszeit mehrmals neue Objektträger beschichtet werden, da diese nicht lange haltbar sind und über 150 Stk. benötigt wurden.

Für die Semi-Dünnschnitte der Blätter mit dem Mikrotom wurden die fertig in LR White eingebetteten Blattstückchen zuerst von ihrer Gelatinekapsel-Hülle befreit. Anschließend wurden die Kapseln mit einer scharfen Rasierklinge unter Zuhilfenahme eines Binokulars an einem Ende getrimmt, so dass die später erzeugten Schnitte neben einem Blattquerschnitt möglichst wenig umgebendes LR White aufwiesen.

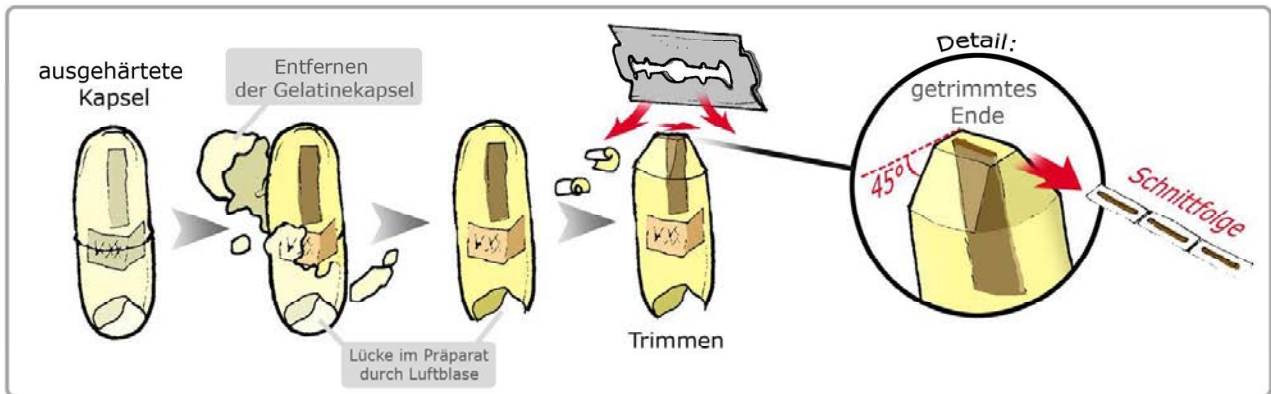


Abbildung 12: Schema zur Bearbeitung der ausgehärteten Kapseln - Trimmungsanleitung

Weiterhin wurden mit dem Messerbrechgerät (*knife maker*), gemäß Bedienungsanleitung und Einstellungsvorschrift aus einem Ultramikrotomie-Glasstab dreieckige scharfkantige Glasstücke gebrochen. Die mit Wachs am Glasmesser angebrachten LKB-Trufs (siehe **Abb. 13**) wurden mit Wasser befüllt, in diesem sammelten sich später die erzeugten Semi-Dünnschnitte.



Abbildung 13: Schema eines fertigen Glasmessers

Von je drei bis fünf ausgewählten LR White-Kapseln jeder zu untersuchenden *Vitis*-Pflanze wurden Schnitte mit dem Glasmesser bzw. dem Diamantmesser nach folgendem Schema gewonnen:

- 10 Schnitte zu 6 µm Dicke zur Erzeugung einer planen Schnittfläche mit den hergestellten Glasmesse; diese wurden verworfen
- 15 Schnitte mit 3 µm Dicke mit dem Diamantmesser, diese wurden gefischt und weiter behandelt (siehe unten)
- 10 Schnitte zu 6 µm Dicke; diese wurden erneut verworfen - Versatzschritt um neue Stomata zu schneiden.
- 15 Schnitte zu 3 µm Dicke; diese wurden wiederum gefischt
- Wiederholung der Schritte

Die 3µm-Schnitte wurden jeweils mit einem Glasstab mit wachsbefestigter Wimper vorsichtig von der Schnittkante des Messers weggezogen und danach mit einer Drahtöse auf einen mit Chromgelatine beschichteten Objektträger gegeben. Es wurde versucht, Schnittfolgen zu erzeugen, indem die geschnittenen Scheibchen, als Band aneinander hängend, auf den Objektträger übertragen wurden.

Um sicher zu gehen, mehrere verschiedene Stomata zu treffen, wurde jeweils der oben aufgeführte Versatzschritt durchgeführt, um im Präparat voranzukommen und neue Stellen im Blatt zu erreichen.

Die Schnitte wurden, vorsichtig schwenkend über der Flamme einer Öllampe, auf dem beschichteten Objektträger langsam eingetrocknet und durch die Gelatine darauf fixiert. Durch die zugeführte Wärme entspannten sich einzelne, zuvor beim Schneiden gerollte Schnitte und kamen plan auf dem Objektträger zu liegen.

Für die Färbung wurden die mit einem Diamantpen beschrifteten Objektträger jeweils mit Acridinorange Lösung beträufelt. Nach einer Einwirkungszeit von 22 min wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und die Objektträger vorsichtig trockengeklopft. Zudem wurden diese über der Öllampe langsam und vorsichtig getrocknet. Zuletzt wurden die Schnitte in Entellan® eingebettet. Dazu wurden mit einem Zahnstocher, ein bis zwei kleine Tropfen Entellan® direkt auf die Schnitte gegeben und jeweils ein Deckglas darüber gelegt. Dieses wurde mit jeweils zwei kleinen Metallgewichten zu etwa 15 g beschwert, damit sich das Entellan® gleichmäßig und ohne Lufteinschluss unter dem Deckglas verteilte.

Vor der mikroskopischen Untersuchung ist es nötig, dass das aufgebrauchte Entellan® vollständig erhärtet ist. Die Präparate wurden, um nicht verfrüht auszubleichen, mit einer Styropor-Box abgedeckt und meist über Nacht oder zumindest für 5h stehen gelassen.

2.4.2. Mikroskopie

Alle Präparatschnitte wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (siehe **6.4.2**) auf die Morphologie der Stomata hin untersucht, wobei die Anregung des Acridinorange durch nahes UV-Licht erfolgte. Von jedem zu untersuchenden Individuum wurden mindestens 15 Stomata identifiziert und von ca. 10 charakteristischen Stomata mit der angeschlossenen Kamera Bilder aufgenommen.



Abbildung 14: Photo des Epifluoreszenzmikroskops, mit dem hauptsächlich gearbeitet wurde, um die erstellten Fluoreszenzpräparate zu untersuchen

2.4.9. Auswertung der Daten: Morphologie basierte Phylogenie

Alle Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Charakteristika, denen keine konkret gemessenen Größen zugewiesen werden konnten, wurden mit einem Zahlencode bewertet. Für die Spalten, die die Blattform oder die Stomatamorphologie beschreiben, wurden verschiedene Aussagen als Überschriften ausgewählt und eine Zahl dafür eingetragen, wie zutreffend die Aussage war. Zum Beispiel wurde bei einer Pflanze, die einen deutlichen runden Blattumriss aufweist, in der Spalte „rundliches Blatt“ eine 0 eingesetzt. Null steht dabei für: Aussage trifft voll und ganz zu. Es wurde umgekehrt eine 4 eingesetzt, wenn die Aussage nicht zutrifft, das heißt, die phänotypische Ausprägung, die in der beschreibenden Aussage erwähnt wird, konnte nicht für diese bestimmte Pflanze beobachtet werden.

Liste der Wertungen:

- „0“ bedeutet: Aussage trifft voll und ganz zu (Mehr als 50% der Blätter/Stomata zeigen diese Ausprägung)
- „1“ bedeutet: Aussage trifft teilweise zu und kann öfters beobachtet werden, ist aber nicht die repräsentative Form der Merkmalsausprägung (ca. 20 – 50 % der Blätter/Stomata zeigen diese Ausprägung)
- „2“ bedeutet: Aussage trifft nur in Ausnahmefällen zu (weniger als 20% der Blätter/Stomata zeigen diese Ausprägung)
- „4“ bedeutet: Aussage trifft auf keine Beobachtung zu (keine der untersuchten Blätter/Stomata zeigt diese Ausprägung)

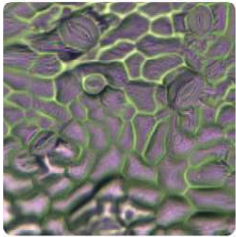
Für die letzte Wertung wurde eine 4 statt einer 3 gewählt, weil eine größere Wertungsdistanz zwischen „selten“ und „keine“ zutreffende Beobachtung gemacht werden sollte. Es wurde stets quantitativ gearbeitet und viele Blätter untersucht, somit ist es wahrscheinlich, dass eine Pflanze, die eine bestimmte phänotypische Ausprägung bei meinen Beobachtungen nicht zeigte, auch nie zeigen wird. Es wird angenommen, dass der Pflanze gänzlich die Möglichkeit fehlt diese Ausprägung zu bilden; sie sollte damit deutlicher von den anderen Pflanzen abgegrenzt sein, die dies können, egal wie häufig dies beobachtet werden konnte.

Dies ist vor allem wichtig, da die beobachtete Variabilität der Merkmalsausprägungen bei *Vitis vinifera sylvestris* sehr groß ist und damit auch sehr unterschiedlich ausfallen kann.

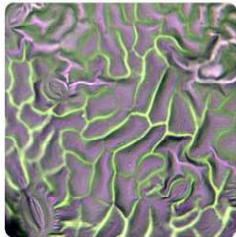
Neben dieser Bewertungsform für nicht mathematisch erfassbare Größen wurden Messungen rund um Dichte und Größe in konkreten Werten wie Durchschnitt, Median, Quartilen, Maximum und Minimum eingegeben.

Zur Epidermisbeschreibung wurden neue Parameter eingeführt und Wertungszahlen gesetzt. Für die Verzahnung der unteren Epidermis und das Vorhandensein von Cuticulastrifen auf der Blattunterseite wurden folgende Tafeln zur Bewertung herangezogen. Jede untersuchte Pflanze wurde von ihrem Klebeabdruck nach diesen Tafeln bewertet (**Abb. 16**).

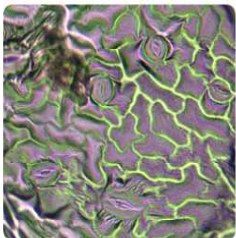
Verzahnungskategorien für die Zellen der unteren Epidermis: Beispiele



Wertung: 1
Definition(en): „unverzahnt“



Wertung: 2
Definition(en): „leicht verzahnt“
„schwach verzahnt“
„minimal verzahnt“



Wertung: 3
Definition(en): „verzahnt“
„(gut) sichtbar verzahnt“
„mittel verzahnt“

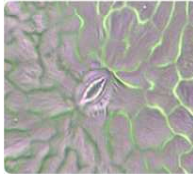


Wertung: 4
Definition(en): „stark verzahnt“
„sehr deutlich verzahnt“

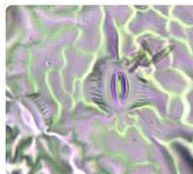


Wertung: 5
Definition(en): „sehr stark verzahnt“

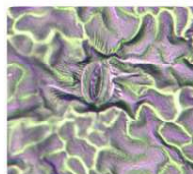
Bewertungskategorien für Cuticulastreifen der unteren Epidermis: Beispiele



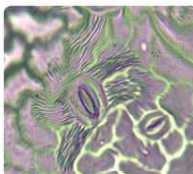
Wertung: 0
Definition(en): „sehr kurze kaum sichtbare Cuticulastreifen - fast streifenfrei“



Wertung: 1
Definition(en): „sichtbare, kürzere Cuticulastreifen“



Wertung: 2
Definition(en): „sichtbare, längere und deutliche Cuticulastreifen“



Wertung: 3
Definition(en): „sehr gut sichtbare, längere und sehr deutliche Cuticulastreifen“

Abbildung 16: Bewertungskategorien für Stomataverzahnung und Cuticulastreifen der unteren Epidermis

Auswertung der Morphologie-Tabelle

Um aus der Excel-Tabelle eine Übersicht der Ähnlichkeit und Distanzen der untersuchten Pflanzen zu erhalten, wurde eine Distanzmatrix erzeugt. Aus dieser Distanzmatrix wurde anschließend ein Stammbaum mit der Methode des *Neighbor Joinings*, erstellt.

Zusätzlich wurde eine Form der Distanzmatrix-Visualisierung entwickelt, um sich schnell einen Überblick über bestimmte Distanzen der Untersuchungspflanzen zu verschaffen.

In Zusammenarbeit mit **Benedikt Müller** (Informatik-Student am KIT), konnte ein Programm entwickelt werden: *treegen*, welches aus einer, als csv-Datei (= kommagetrennte Werte) abgespeicherten Excel-Tabelle, eine Distanzmatrix sowie eine Visualisierung dieser erzeugt. Darüber hinaus ist das Programm in der Lage, einen Textoutput zu generieren, der als nwk abgespeichert, in dem Phylogenie-Programm MEGA 5 einen Baum erzeugt.

Hier folgen nun Schematafeln, welche illustrativ zeigen, wie die Daten ausgewertet wurden. Das Programm *treegen* von Benedikt Müller sowie eine weitere Anwendung zur Visualisierung bereits errechneter Distanzmatrices ist auf der beigefügten Daten-DVD enthalten (DVD: Phylogenie, Datentabellenauswertung → Programme von Benedikt Müller → *treegen.html* bzw. *visualizer.html*).

no	A	ZMin	ZDurch	verzmed	verzmin	verzmax	verzdurch	Cstrwertungu	Cstrmengeu	Spmmdz	spstanz
1	1 5r	2,00	3,10	2,00	1,00	3,00	2,30	2,00	1,00	0,00	5,52
2	2 5z	1,00	2,90	2,00	1,00	3,00	2,10	1,00	1,00	0,00	7,53
3	3 5a	1,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,45	1,50	1,00	1,00	7,79
4	4 5b	2,00	3,70	2,00	1,00	3,00	2,45	1,00	1,00	1,00	5,85
5	5 5c	2,00	3,90	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	5,75
6	6 5d	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	6,90
7	7 5e	1,00	3,10	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	7,23
8	8 5f	2,00	3,30	3,00	2,00	3,00	2,45	2,50	2,00	2,00	5,25
9	9 5g	1,00	2,90	3,00	4,00	3,00	2,75	2,00	2,00	2,00	6,19
10	10 5h	2,00	3,60	2,00	1,00	2,00	1,90	2,00	1,00	1,00	5,29
11	11 5i	2,00	2,40	2,00	2,00	3,00	4,00	0,00	0,00	0,00	6,66
12	12 5j	2,00	3,40	3,00	2,00	3,00	2,55	2,00	1,00	1,00	5,33
13	13 5k	0,00	1,40	3,00	2,00	4,00	3,20	2,00	0,00	0,00	3,88
14	14 5l	1,00	2,90	2,00	1,00	3,00	1,95	2,00	1,00	1,00	6,59
15	15 5m	0,00	2,10	3,00	2,00	3,00	2,60	2,00	1,00	1,00	5,97
16	16 5n	2,00	2,90	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	7,67
17	17 5o	2,00	3,90	2,00	1,00	3,00	2,50	1,00	1,00	1,00	6,00
18	18 5p	1,00	2,20	2,00	1,00	3,00	2,00	1,50	0,00	0,00	4,80
19	19 5q	1,00	3,20	4,00	3,00	5,00	4,90	1,00	0,00	0,00	5,27
20	20 5r	2,00	2,80	4,00	3,00	5,00	4,20	1,00	1,00	1,00	4,04
21	21 5s	1,00	2,80	3,00	2,00	5,00	3,50	0,00	0,00	0,00	6,21
22	22 5t	0,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,50	2,00	1,00	1,00	4,46
23	23 5u	1,00	2,30	5,00	4,00	5,00	4,75	1,00	1,00	1,00	4,82
24	24 5v	2,00	4,70	4,00	3,00	5,00	4,10	1,00	1,00	1,00	3,46
25	25 5w	1,00	3,70	5,00	3,00	5,00	4,55	1,50	0,00	0,00	5,11
26	26 5x	2,00	4,00	1,00	1,00	3,00	2,00	0,00	0,00	0,00	5,51
27	27 5y	2,00	3,10	4,00	3,00	5,00	4,00	1,00	1,00	1,00	4,48
28	28 5z	1,00	2,50	4,00	3,00	5,00	4,10	1,00	1,00	1,00	3,80
29	29 5aa	1,00	3,50	4,00	3,00	5,00	4,10	1,00	1,00	1,00	3,80
30	30 5ab	1,00	3,50	4,00	3,00	5,00	4,10	1,00	1,00	1,00	3,80

Screenshot 001: Aufbau der Exceltabelle

Die Excel-Tabelle, von der ausgegangen wird, muss folgendes Format haben:

A - In der ersten Spalte muss eine Durchnummerierung eingefügt werden. (beginnend bei 1 bis zu der Zahl, die der Menge an aufgeführten Individuen entspricht)

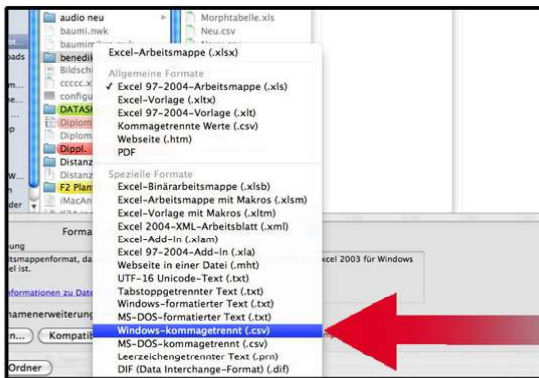
B - In der zweiten Spalte stehen die Individuen-Kürzel bzw. Kennungen der Testpflanzen

D, E, F, G, ... - Nun folgen in den Spalten die untersuchten Merkmalsausprägungen. Die Merkmalsausprägungen sind mit Kürzeln in der ersten Zeile angegeben, sollten nicht länger als 15 Zeichen sein und keine Zahlen enthalten.

Die Zahlenwerte für jedes Individuum stammen aus einer Bewertungstabelle und stehen dann für eine Qualität der Ausprägung, oder sind echte Zahlenwerte aus Messungen.

Beispiel: In Spalte **I** steht: Cstrwertungu = Cuticulastreifenwertung der unteren Epidermis: In Abgleich mit den zugehörigen Bewertungs-Kategorien, bedeutet der hier angegebene Wert, wie deutlich die Cuticulastreifen auf der untern Epidermis zu erkennen waren: Wertung 0 - keine bis Wertung 3 - sehr deutlich.

In Spalte **K** steht: Spmmdz = Stomata pro mm² geteilt durch den Wert 10. Hier handelt es sich um den Druckschnittswert der ausgezählten Stomata, pro mm², geteilt durch den Wert 10, zur Angleichung auf eine Stelle vor dem Komma - wichtig für eine gleichmäßige Distanzberechnung, über die Merkmalsausprägungen hinweg. Dieser Wert geht auf echte Messung bzw. Auszählung zurück und ist damit keine Kategorisierung



Die Excel-Tabelle muss als .csv-Datei gespeichert werden (d.h. Komma-getrennte Werte) Unter Mac OS oder Linux ist es nötig, als „Windows-kommagetrennt csv“ zu speichern.

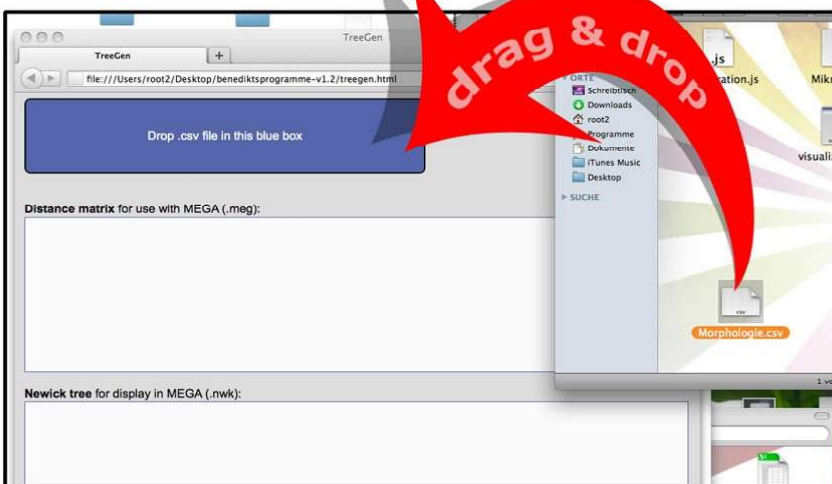
Screenshot 002: Speicherungsformat .csv



Wichtig: Das Programm treegen (Benedikt Müller 2011) funktioniert mit den neueren Versionen von Mozilla Firefox (R): ab Version 3.6.17 auch kompatibel mit Mac-Version Firefox, Version 4.0 ff

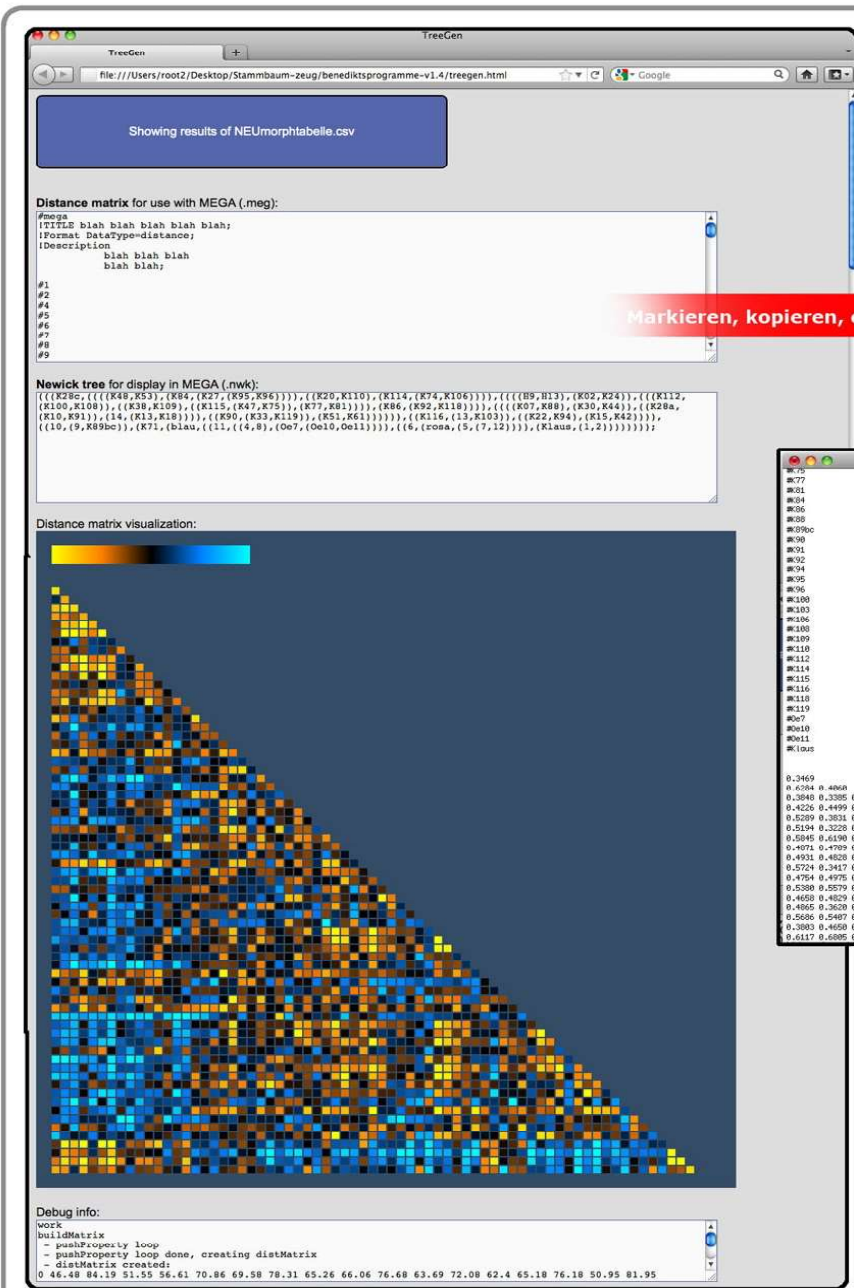
nicht aber mit anderen Webbrowsern wie Safari 5.0.X

Screenshot 003: Die treegen.html öffnen mit Mozilla Firefox (R) Webbrowser



Nach Öffnen des Programms kann einfach durch Auswahl mit der Maus und Ziehen der erstellten .csv-Datei in das blaue Startfeld der Berechnungsprozess für das .meg und .nwk-Textformat gestartet werden. Dies kann, je nach Umfang der zu Grunde liegenden Excel-Tabelle und Rechenleistung des Computers, einige Sekunden dauern. Gleichzeitig wird ebenfalls das Visualisierungsprogramm für eine grafische Interpretation der Distanz-Matrix (siehe .meg) ausgeführt.

Screenshot 004: Drag & Drop der cvs-Datei in treegen

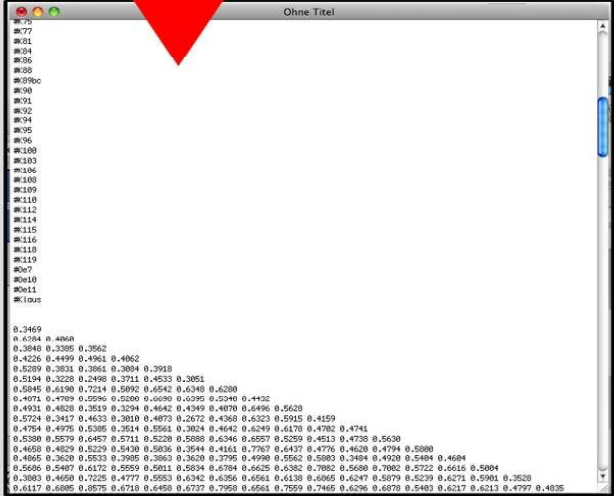


Markieren, kopieren, einfügen

Der errechnete Output von treegen besteht aus zwei Textfeldern sowie einer Grafik und der Debug.info-Box:

- Distance matrix:** Distanzmatrix, als Text im Formatierungsschema, um damit in MEGA^(R) zu arbeiten
- Newick tree:** Eine Bauminterpretation der Distanzmatrix, basierend auf Neighbor-Joining im Formatierungsschema, um als nwk-Datei von MEGA angezeigt werden zu können
- Distance matrix visualization:** Farbinterpretationsgrafik der Distanzmatrix
- Debug-Info:** Protokoll der errechneten Schritte

Die Distanzmatrix wird in Form von Text im ersten Feld wiedergegeben. Dieser Text muss als Ganzes markiert, kopiert und in ein leeres Text-Dokument des Texteditors eingefügt werden.



Screenshot 006: Distanzmatrix im Texteditor als txt-Datei.

Die txt-Datei muss als meg-Datei gespeichert werden, um später von MEGA 5 richtig interpretiert zu werden

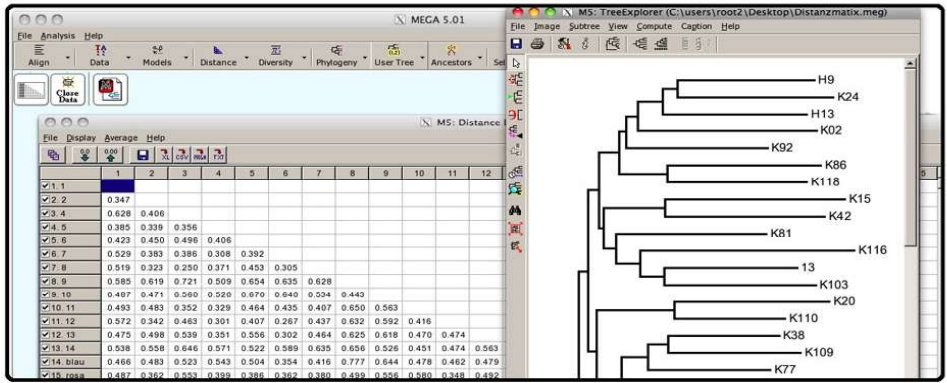


Screenshot 007: Speicherform der Distanzmatrix

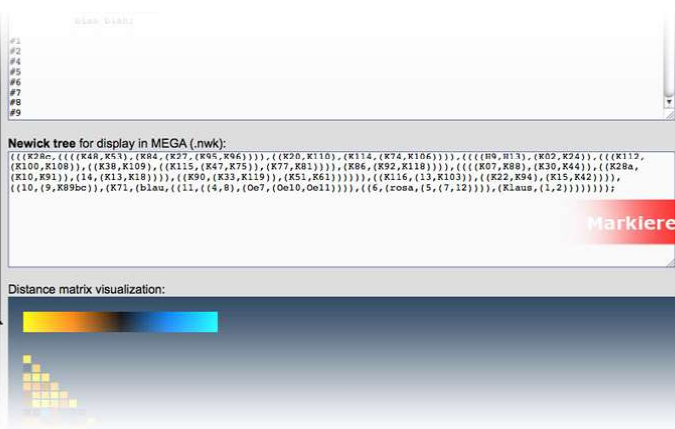


Screenshot 005: Übersicht über die von treegen errechneten Ergebnisse aus der csv-Datei

Die erstellte meg-Datei kann in MEGA 5^(R) geöffnet werden und durch Wählen der Option „Phylogeny“, „Neighbor-Joining“ als Stammbaum interpretiert und dargestellt werden. Der so errechnete Baum entspricht den MEGA 5^(R) zugrunde liegenden Algorithmen zur Erstellung von distanzbasierten Stammbäumen.



Screenshot 008: Darstellung der Distanzmatrix in Mega 5^(R) und Interpretation als Stammbaum durch Neighbor-Joining




Screenshot 005-Ausschnitt: Detail des Newick tree-Textfeldes, nach Verarbeitung der csv-Datei.

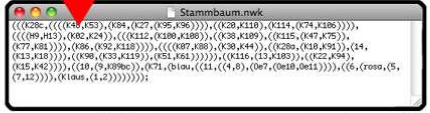
Der errechnete Output von *treegen* beinhaltet im zweiten Textfeld einen fertigen *Neighbor-Joining*-Stammbaum in Textform. Dieser Text kann grafisch verarbeitet und aussagekräftig dargestellt werden.

Der Stammbaum wird in Form von Text im zweiten Feld wiedergegeben. Dieser Text muss wie zuvor als Ganzes markiert, kopiert und in ein leeres Text-Dokument des Texteditors eingefügt werden.


Markieren, kopieren, einfügen



Die txt-Datei muss dieses Mal als nwk-Datei gespeichert sein, um später von MEGA 5^(R) richtig interpretiert zu werden.



Screenshot 009: Stammbaum im Texteditor als txt-Datei im Formatierungsschema für eine nwk-Datei.

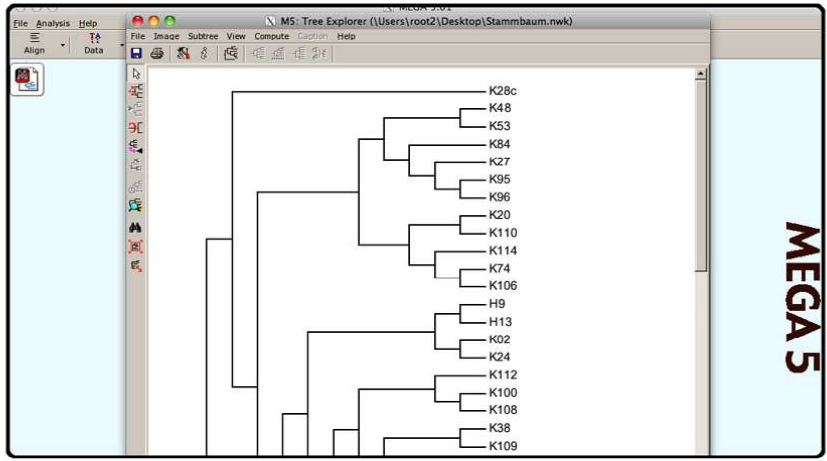


Screenshot 007: Speicherform des Stammbaums

Die erstellte nkw-Datei kann in MEGA 5^(R) geöffnet werden und wird sofort als fertig errechneter Stammbaum wiedergegeben

Der dargestellte Baum entspricht der reinen *Neighbor-Joining*-Regel, nach der bei jedem Vergleichsschritt, die beiden ähnlichsten Testkandidaten zusammengefasst werden. Zu Grunde liegt die von *treegen* erzeugte Distanzmatrix.

MEGA^(R) ist hier nur Darstellungs-Programm. Das nwk-Dateiformat ist der fertige Baum und kann auch als Text gelesen, oder von anderen Programmen dargestellt werden.



Screenshot 010: Darstellung des Stammbaums in Mega 5^(R)

Abbildung 17: Anleitung zur Auswertung der Morphologietabelle: Output *treegen* und Interpretation mit MEGA. Anleitungstafeln für den Umgang mit diesen Programmen.

Mit Hilfe der errechneten Distanzen konnten so Cluster der Ähnlichkeit (Morphologische Distanzen) ausgemacht werden und mit den genetischen Daten der Pflanzen, einer Mikrosatelliten-Analyse, abgeglichen und Korrelationen errechnet werden.

Die Mikrosatelliten-Analyse der Pflanzen wurde von **Ioana Valea** in ihrer Bachelorarbeit 2010 durchgeführt (siehe Daten-DVD: Diplomarbeit → Bachelorarbeit_Ioana_Valea.pdf). Sie gibt Aufschluss über die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Testpflanzen.

2.4.10. Erstellung der Datenblätter

Die erhobenen Daten wurden in Form von Datenblättern zusammengefasst und mit repräsentativem Bildmaterial anschaulich arrangiert.

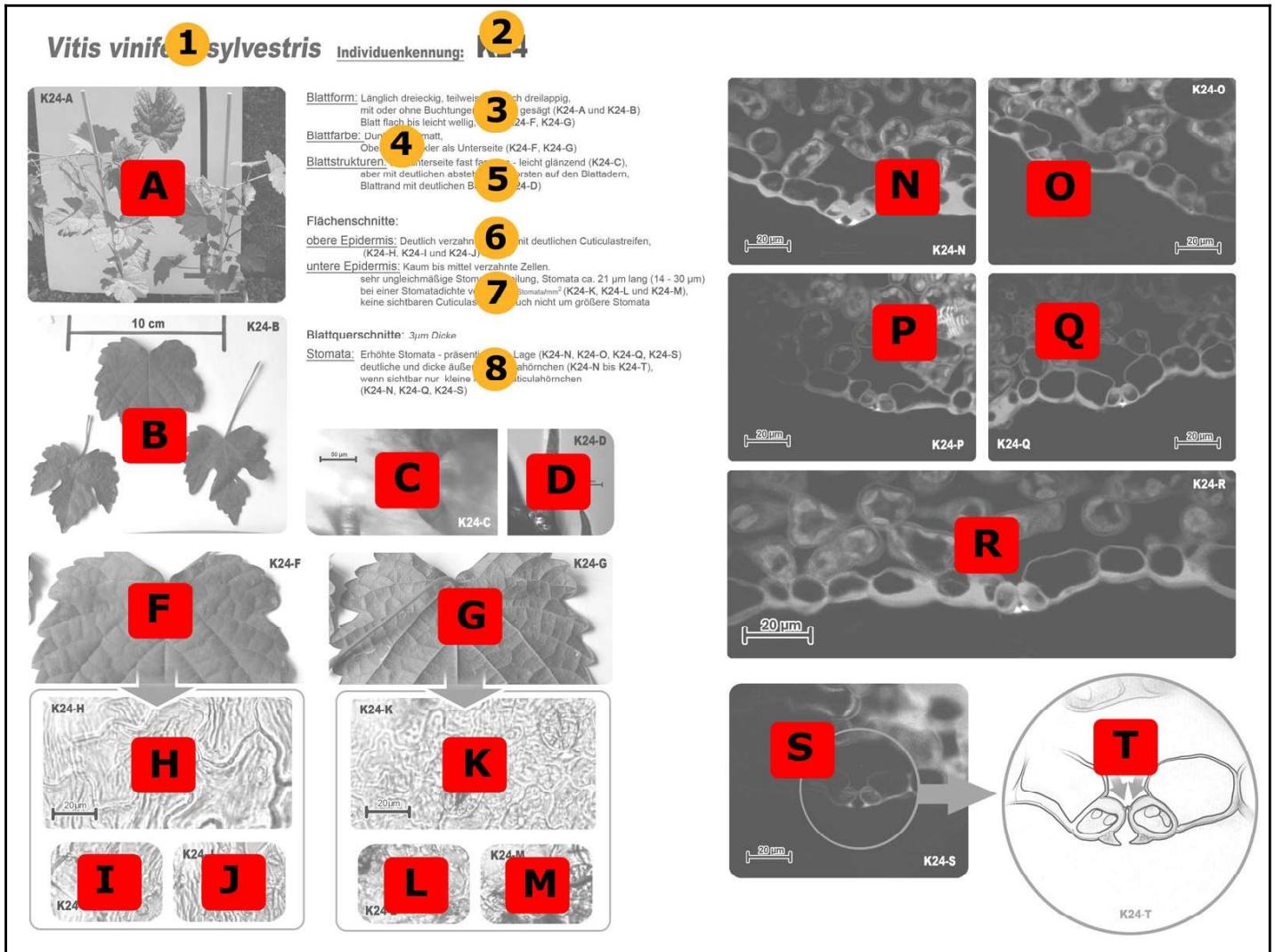


Abbildung 18: Schema eines Datenblattes. Bild und Text-Anordnung in der Übersicht. Die Buchstaben A-T stehen für die verschiedenen Bilder, die ausgewählt wurden. Die Zahlen 1-8 stehen für die beschreibenden Textpassagen. Insgesamt charakterisiert das Datenblatt so eine einzelne *Vitis*-Pflanze in allen untersuchten Details.

Erklärung der Datenblattzusammenstellung

Textpassagen:

- 1 : Artbezeichnung: Die meisten Datenblätter behandeln die unterschiedlichen Individuen der *Vitis vinifera sylvestris*-Sammlung des Botanischen Gartens der Universität Karlsruhe und beschreiben damit eine bestimmte Pflanze und nach Möglichkeit alle ihre Klone/Stecklinge. Dennoch sind auch andere *Vitis*-Pflanzen ebenfalls in Datenblättern erfasst worden. Darunter einige Kulturweinsorten oder aber auch andere *Vitis*-Arten wie *Vitis riparia* oder *Vitis rupestris*.

- 2: Jede *Vitis*-Pflanze im Botanischen Garten besitzt eine bestimmte Individuen-Kennung, die genauestens eine einzelne Pflanze und alle ihre durch vegetative Vermehrung gewonnen Klone benennt. Hier wurde auf die alte Kennung und Kürzelverwendung zurückgegriffen, wie sie in der genetischen Identifizierung mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse durch Ioana Valea verwendet wurde. Offiziell sind inzwischen die Individuen „H“ zu „Hö“ umbenannt, außerdem wurden die früher nur nummerierten Pflanzen 01 – 13 inzwischen mit VsyLK-01 bis VsyLK-13 neu betitelt. Eine genaue Auflistung, welche Kürzel für welche Pflanze stehen, findet sich im Anhang unter **6.3**. Pflanzenliste.
- 3: Unter „Blattform“ wurde grob der Umriss der Blätter beschrieben und ob die Blätter der untersuchten Pflanze eher einen flächigen oder welligen Habitus aufwiesen. Wenn mehrere Blattformen an der selben Pflanze beobachtet werden konnten, wurden die häufigsten und deutlichsten Ausprägungen der jeweiligen Formen dokumentiert. Stets wurde auf eine repräsentative Dokumentation Wert gelegt und mehrere Blätter von mehreren Klonen unter verschiedenen Bedingungen herangezogen, um einen guten Überblick der Merkmalsvariabilität zu bekommen. Der Text wird durch die Bilder A und B gestützt.

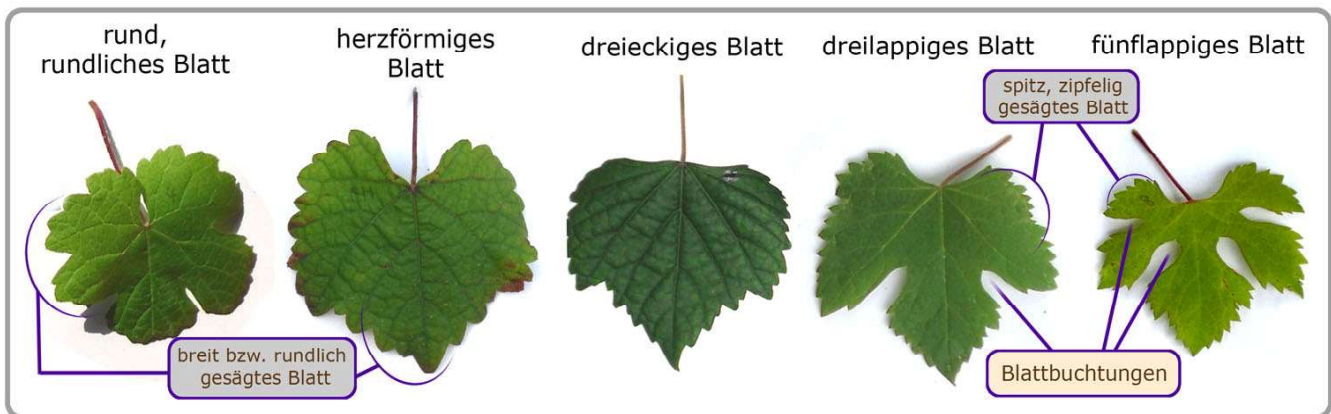


Abbildung 19: Beispielfotos von dokumentierten Blattformen bei *V.v.sylvestris* und und ihren auf den Datenblättern verwendeten Beschreibungen.

- 4: Unter „Blattfarbe“ wurden die häufigsten beobachteten Blattfärbungen zusammenfassend festgehalten. Dabei wurden stets gut entwickelte Blätter mittleren Alters ausgewählt, um den Farbton zu bestimmen. Wenn andere besondere Blattfärbungen auftraten, die an jungen oder alten Blättern vorkamen, wurden diese hier gesondert vermerkt. Ebenfalls wurde festgehalten, ob die Blätter einen matten oder einen glänzenden (leicht spiegelnden) Eindruck erweckten und ein Vergleich der Farbunterschiede von Blattunterseite zu Blattoberseite notiert. Dabei sind alle Angaben auf die beobachteten *Vitis*-Pflanzen bezogen und können nicht auf Pflanzen anderer Gattungen übertragen werden. Ein hier als „dunkelgrün“ beschriebenes Blatt steht für einen dunkleren Farbton im Verhältnis zu den Blättern anderer *Vitis*-Individuen und nicht zwangsläufig für einen absoluten Farbwert. Die Bewertung ist ausschließlich von mir selbst, durch Augenmaß und bei guten Lichtverhältnissen vorgenommen worden. Da ich alle Pflanzen selbst bewertet habe, ist ein Vergleich möglich – dabei ist das Empfinden, welcher Farbton nun als „dunkel-“ oder „hellgrün“ betitelt wird, zwar sehr subjektiv, aber hier nicht ausschlaggebend. Der Text wird durch die Bilder A, B, F und G gestützt.

- 5: Unter „Blattstrukturen“ wurden Haare, Borsten und Fasern, die sich am Blatt befanden, beschrieben. Dabei wurde vor allem die Situation auf der Blattunterseite festgehalten. Auch Borsten am Blattrand wurden separat dokumentiert, da hier Unterschiede zwischen den Individuen bestanden. Oftmals wird hier die Mattigkeit der Blätter nochmals erwähnt, da die Farbgebung stark von der Ausprägung der Haare auf dem Blatt bestimmt wird. Der Text wird durch die Bildern C, D und teilweise F und G gestützt.
- 6: Hier wird die obere Epidermis in Hinblick auf Verzahnung und Cuticulastrifen beschrieben. Die Beobachtungen gehen auf Flächenschnitte von frischem Blattmaterial zurück und sind nur ein grober Anhaltswert, welche Epidermisausprägungen zu sehen waren. Der Text wird durch die Bilder H, I und J gestützt.
- 7: Auf die Beschreibung der unteren Epidermis wurde besonders Wert gelegt. Das Datenblatt beinhaltet an dieser Stelle, neben der Beschreibung von Verzahnung der Epidermiszellen, vor allem Informationen über die Stomata. Wie die durchschnittliche Stomatadichte (bestimmt über die Auszählung der Stomata auf den Markierungen der Klebeabdrücke), die Stomatagröße im Durchschnitt sowie in Klammer () den Spielraum, in dem sich die Messungen bewegten, um abzuschätzen, welche Größen für dieses Individuum möglich sind. Bestimmt wurden diese Werte über Mikroskop-Photos der Klebeabdrücke und Vermessungen der Stomata mit Zeiss AxioVison®. Der Text hier stützt sich also auf die Auswertung der Klebeabdrücke. Die Bilder K, L und M sind lediglich exemplarische Aufnahmen der Flächenschnitte von frischem Blattmaterial und geben nur grob die beschriebenen Beobachtungen wieder.
- 8: Die Beschreibung der Stomata im Querschnitt stützt sich auf die Aufnahmen der Semi-Dünnschnittpräparation am Fluoreszenzmikroskop. Besonderes Augenmerk wurde auf die Situation der inneren Cuticulahörnchen gelegt. Daneben wurde auch die Stomatalage beschrieben und festgehalten. Der Text wird durch die Bilder N, O, Q, R, S und die Schemazeichnung T (abgeleitete von Bild S) gestützt.

Für die Datenblätter wurden Bilder ausgewählt, die repräsentativ waren und den Charakter der jeweiligen Pflanze bestimmten:

- A: Ein Pflanzenbild in der Übersicht zeigt eine Pflanze, die für die weitere Analyse herangezogen wurde. Meist wurden mehrere Klone untersucht, die hier abgebildete Pflanze war aber stets der Kandidat, von dem die meisten Blätter stammten, die später genauer für dieses Datenblatt dokumentiert wurden. Das Bild zeigt den Entwicklungsstatus und das Gesamterscheinungsbild der jeweiligen Pflanze.
- B: Zeigt ein Photo mit den für dieses Individuum typischen Blattformen. Dabei wurden nur Blätter ausgewählt, deren Formen mehrmals an der Pflanze vertreten waren und insgesamt einen guten Überblick über die Vielfalt der möglichen Blattmorphologien gaben. Bild gehört zu Text 3.
- C: Zeigt eine Mikroskop-Aufnahme von der Blattunterseite und zeigt, wenn vorhanden, Fasern und/oder Borsten im Detail. Bild gehört zu Text 5.

- D: Zeigt eine Mikroskop-Aufnahme des Blattrandes. Fokus lag hier darauf, den eventuell durch Borsten bewimperten Blattrand für das im Datenblatt beschriebene Individuum festzuhalten. Bild gehört ebenfalls zu Text 5.
- F: Makroaufnahme der Blattoberseite des Individuums. Hierfür wurde ein Blatt ausgewählt, das die häufigste an dieser Pflanze vorkommende Blattform repräsentiert. Im Detail sind gut die Blattadern zu erkennen.
- E: Nur auf wenigen Datenblättern enthaltene, zusätzliche Aufnahmen der Blattunterseite, wenn es nicht möglich war, Fasern, Haare oder Borsten in einem Detailbild (F) zu erfassen.
- F: Makroaufnahme der Blattoberseite eines repräsentativen Blattes. Im Detail sind oft sogar Haare und Borsten auszumachen.
- G: Makroaufnahme der Blattunterseite des selben repräsentativen Blattes. Im Detail sind oft sogar Haare und Borsten auszumachen.
- H, I, J: Drei Mikroskop-Aufnahmen der oberen Epidermis von verschiedenen Stellen. Die Aufnahmen sind so repräsentativ gewählt, wie es für die Flächenschnitt-Präparation möglich ist. Dabei ist stets das größere Bild H die häufiger beobachtete Epidermis-Struktur. Das Bild gehört zu Text 6
- K, L, M: Drei Mikroskop-Aufnahmen der unteren Epidermis von verschiedenen Stellen und Blättern. Die Aufnahmen wurden auch hier so repräsentativ wie möglich gewählt. Das Bild gehört zu Text 6, auch wenn den Ausführungen und Daten in Text 6 die genauere Untersuchung der Klebeabdrücke zugrunde liegt.
- N, O, P, Q, R, S: Mehrere repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Schnittpräparate des Individuums am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden hier typische Photos ausgewählt, die ein gutes Spektrum über die Variabilität der Stomata im Blattquerschnitt geben. Dabei wurde vor allem auf die Stomatalage und die Ausprägung der inneren Cuticulahörnchen geachtet.
- T: Schematische Zeichnung eines repräsentativen Stoma im Querschnitt (abgeleitet von Bild S) zur Veranschaulichung der Stomatamorphologie im Querschnitt.