

**Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem
virusübertragenden Nematoden *Xiphinema index* und
verschiedenen Vitis-Spezies - Etablierung eines
Indikatorsystems**

D 386

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

vorgelegt von: Nina Feil

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 2. Oktober 2007

Referent: Prof. Dr. M. Hahn

Koreferent: PD. Dr. J. Kusch

Was wir wissen ist ein Tropfen, was wir nicht wissen ein Ozean.

I. Newton

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	CHEMIKALIEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN	14
2.2	MEDIEN, LÖSUNGEN, PUFFER	16
2.2.1	Kulturmedien und Lösungen für sterile <i>in-vitro</i> -Rebpflanzen und Nematoden	16
2.2.2	Molekularbiologie: RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)	17
2.2.3	Immunologisches Nachweisverfahren DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)	19
2.2.4	Färbereagenzien	20
2.3	PFLANZENMATERIAL	21
2.3.1	Versuchspflanzen <i>Vitis</i> spp und <i>Ficus carica</i>	21
2.3.2	Anzucht von Holzstecklingen und Topfreben von <i>Vitis spec.</i>	23
2.3.3	Sterilkultur von <i>in-vitro</i> -Grünstecklingen von <i>Vitis spec.</i>	23
2.3.4	Anzucht von sterilen Sämlingen von <i>Ficus carica</i> und <i>Vitis spec.</i>	24
2.4	DER NEMATODE <i>XIPHINEMA INDEX</i>	25
2.4.1	Zucht von <i>Xiphinema index</i> an <i>Ficus carica</i>	25
2.4.2	Extraktion von <i>Xiphinema index</i> aus Erdmaterial	26
2.4.3	Sterilwaschen von <i>Xiphinema index</i>	27
2.4.4	Gewinnung von GFLV- infizierten Nematoden	28
2.5	NACHWEIS DES GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)	28
2.5.1	Nachweis des GFLV in <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction)	29
2.5.1.1	Isolierung von RNA aus Wurzel- und Blattmaterial	29
2.5.1.2	Isolierung von RNA aus Rebenpollen	30
2.5.1.2.1	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA	31
2.5.1.3	RT-PCR	31

2.5.1.3.1	cDNA-Synthese	32
2.5.1.3.2	Nachweis des GFLV in <i>Vitis spec.</i> durch RT-PCR	32
2.5.1.3.3	Nachweis von Abwehrgenen bei <i>Vitis spec.</i> durch den Befall von <i>Xiphinema index</i>	33
2.5.1.3.4	Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA	35
2.5.2	Nachweis des GFLV mit DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)	35
2.6	FÄRBEMETHODEN	37
2.6.1	Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	37
2.6.2	Anilinblau-Färbung	38
2.7	BIOTESTS	38
2.7.1	Untersuchung der Ausbreitung von <i>Xiphinema index</i> auf einer Agarplatte	38
2.7.2	Wanderungstests	39
2.7.3	Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel	42
2.7.4	Attraktivität eines <i>Vitis rotundifolia</i> und eines <i>Vitis rotundifolia</i> -Hybrids gegenüber einer Standardunterlage Kober 5BB	43
2.7.5	Attraktivität von inaktivierten Wurzeln	44
2.7.6	Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat	44
2.8	PRAXISORIENTIERTE FREILAND- UND GEWÄCHSHAUS-VERSUCHE	45
2.8.1	Bonitur und Untersuchung der Virusinfektion mittels DAS-ELISA in Rebanlagen	45
2.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	ENTWICKLUNG EINES STERILEN <i>IN-VITRO</i> -TESTSYSTEMS ZUR BEOBACHTUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN <i>IN-VITRO</i> -SÄMLINGEN UND STECKLINGEN DER VERWENDETEN REBPFLANZEN UND <i>XIPHINEMA INDEX</i>	48

3.1.2	Verwendung eines semi-sterilen <i>in-vitro</i> -Testsystems zur Beobachtung der Interaktion zwischen Gewächshausreben und <i>Xiphinema index</i>	49
3.2	REAKTION VON <i>IN-VITRO</i> -STECKLINGEN UND SÄMLINGEN VON <i>VITIS SPEC.</i> AUF DIE BESAUGUNG DURCH <i>XIPHINEMA INDEX</i>	50
3.3	NACHWEIS DES GFLV IN <i>VITIS SPEC.</i> MIT RT-PCR	54
3.3.1	Nachweis des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen und in Pollen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	54
3.3.2	Nachweis des GFLV in <i>in-vitro</i> -Stecklingen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	56
3.3.3	Nachweis des GFLV in Gewächshauspflanzen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	58
3.3.4	Nachweis von Abwehrreaktionen bei <i>Vitis spec.</i> durch den Befall von <i>Xiphinema index</i>	59
3.3.4.1	Molekularer Nachweis von Abwehrgenen mit RT-PCR bei <i>Vitis spec.</i> durch den Befall von <i>X. index</i>	59
3.3.4.2	Cytologischer Nachweis von Abwehrreaktion mit Färbereagenzien verschiedener <i>Vitis</i> -Wurzeln durch den Befall von <i>X. index</i>	61
3.4	BIOTESTS	65
3.4.1	Untersuchung der Ausbreitung von <i>Xiphinema index</i> auf einer Agarplatte	65
3.4.2	Wanderungstests	67
3.4.3	Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel	75
3.4.4	Attraktivität eines <i>Vitis rotundifolia</i> und eines <i>Vitis rotundifolia</i> -Hybrids gegenüber einer Standardunterlage Kober 5BB	76
3.4.5	Attraktivität von inaktivierten Wurzeln	78
3.4.6	Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat	79
3.5	PRAXISORIENTIERTE FREILANDVERSUCHE	80

4	DISKUSSION	87
4.1	ENTWICKLUNG EINES STERILEN <i>IN-VITRO</i> -TESTSYSTEMS ZUR BEOBACHTUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN <i>IN-VITRO</i> -SÄMLINGEN UND STECKLINGEN DER VERWENDETEN REBPFLANZEN UND <i>XIPHINEMA INDEX</i>	87
4.2	CHARAKTERISIERUNG UND BEDEUTUNG DER REAKTION VON WURZELN DER VERSCHIEDENEN <i>VITIS</i> -SPEZIES AUF DIE BESAUGUNG DURCH <i>XIPHINEMA INDEX</i>	88
4.3	NACHWEIS DES GFLV IN <i>VITIS SPEC.</i> MIT RT-PCR	93
4.3.1	Nachweis des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen und in Pollen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	93
4.3.2	Nachweis des GFLV in <i>in-vitro</i> -Stecklingen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	94
4.3.3	Nachweis des GFLV in Gewächshauspflanzen von <i>Vitis spec.</i> mit RT-PCR	98
4.3.4	Nachweis von Abwehrreaktionen bei <i>Vitis spec.</i> durch den Befall von <i>Xiphinema index</i>	99
4.4	BIOTESTS	104
4.4.1	Untersuchung der Ausbreitung von <i>Xiphinema index</i> auf einer Agarplatte	104
4.4.2	Wanderungstests	105
4.4.3	Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel	107
4.4.4	Attraktivität eines <i>Vitis rotundifolia</i> und eines <i>Vitis rotundifolia</i> -Hybrids gegenüber einer Standard- unterlage Kober 5 BB	108
4.4.5	Attraktivität von inaktivierten Wurzeln	109
4.4.6	Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat	111
4.5	PRAXISORIENTIERTE FREILANDVERSUCHE	112

4.6	AUSBLICK: FÜR DIE WEINBAULICHE PRAXIS ERGIBT SICH AUS DEN VORGESTELLTEN ERGEBNISSEN WEITERHIN	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATUR	117

1 EINLEITUNG

Weinbau in Deutschland

Die ersten Beweise für Weinanbau in Deutschland stammen aus der römischen Besatzungszeit [Vogt & Schruft, 2000]. An Rhein, Mosel und Ahr wurde von den Römern ab dem Jahr 100 n. Chr. Weinbau betrieben. Nach deren Vertreibung führten die germanischen Völkerstämme der Alemannen, Burgunder und Franken den Weinbau weiter. Der Wein wurde in Deutschland immer beliebter, weshalb um 1500 n. Chr. die Anbaufläche auf mehr als 300.000 ha angewachsen war [Bassermann-Jordan, 1975]. Der Schwerpunkt des deutschen Weinbaus liegt im Nahbereich des Rheins und seiner Nebenflüsse Neckar, Nahe, Main, Mosel und Ahr, sowie deren Zuflüsse [Vogt & Schruft, 2000]. Kleinere Weinanbauggebiete findet man an den Flüssen Saale und Unstrut sowie in Sachsen [Deutscher Weinatlas, 1997]. Die einzelnen Weinbauregionen sind in Abb.1 farblich dargestellt.

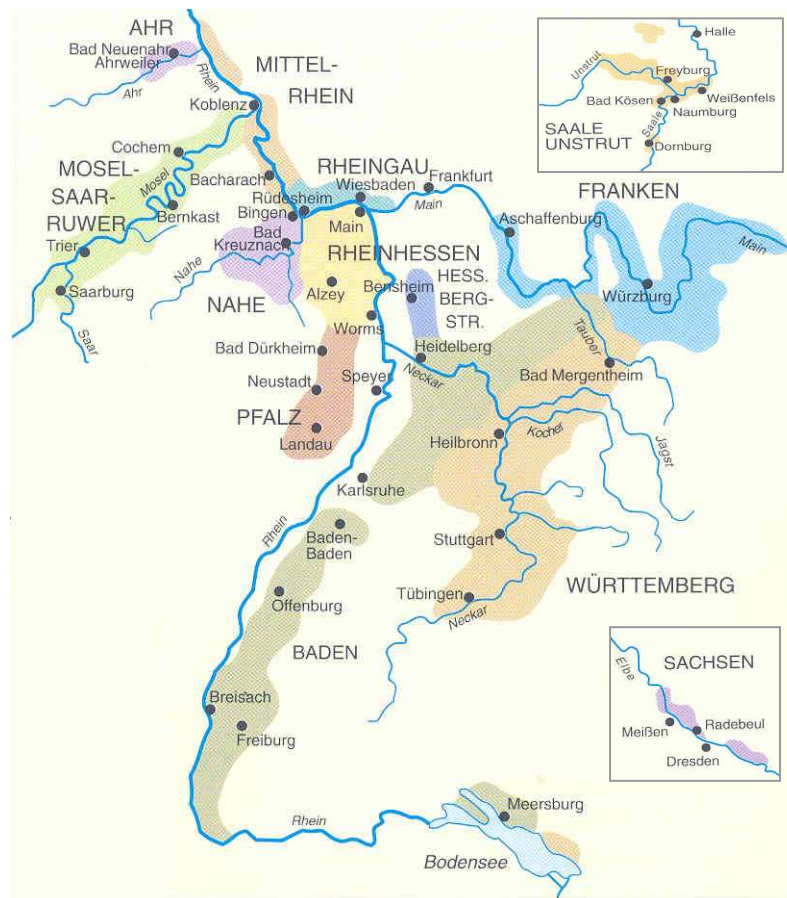


Abb.1: Übersicht über die Weinanbauggebiete Deutschlands [Quelle: Deutscher Weinatlas, 1997].

Das größte Anbaugebiet mit ca. 260 km² ist Rheinhessen. Es gehört zu Rheinland-Pfalz, dem Bundesland mit dem höchsten Weinertrag [Statistisches Bundesamt, 2006]. Insgesamt werden in Deutschland ungefähr 100 Rebsorten angebaut, die zu 65 % der Weißwein- und 35 % der Rotweinerzeugung dienen. Die Winzer bauen auf 102.037 ha Wein an und ernten dabei pro Jahrgang durchschnittlich 8 Mio. Hektoliter, wovon etwa ein Drittel exportiert werden [Statistisches Bundesamt, 2005]. Im Vergleich dazu werden ungefähr 12 Mio. Hektoliter eingeführt [Eurostat, BMVEL, 2002].

Die Weinrebe (*Vitis vinifera* L.)

Die botanische Familie der Rebengewächse (*Vitaceae*) schließt nicht nur unsere Kulturreben, sondern auch verwandte Pflanzen mit ein. Sie gliedert sich in 12 Gattungen, von denen nur eine, nämlich die Gattung *Vitis*, für die Rebkultur eine Bedeutung hat. Bei den übrigen 11 Gattungen handelt es sich um rebenähnliche Wild- bzw. Zierpflanzen (Abb.2).

Die Gattung *Vitis* ist in zwei Untergattungen gegliedert, nämlich *Euvitis* und die amerikanische Untergattung *Muscadinia*. Zu dieser Untergattung gehört u. a. die Art *Vitis rotundifolia*. Alle Reben der Untergattung *Euvitis* haben einen doppelten Chromosomensatz von $2n = 38$ und lassen sich miteinander kreuzen. *Muscadinia* hingegen hat $2n = 40$ Chromosomen.

Für den praktischen Weinbau von Interesse ist nur die Untergattung *Euvitis*. Zu ihr gehören alle Kulturreben, wie die Ertragssorten, als auch die Unterlagsreben. Die amerikanischen Rebsorten haben vor allem Bedeutung als Kreuzungseltern unserer Unterlagsreben erlangt. Die wichtigsten Kreuzungseltern sind *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* und *Vitis rupestris*. Unter den Arten des asiatischen Verbreitungsgebietes ist vor allem *Vitis amurensis* interessant. Durch diese Kreuzungspartner erhielten die Ertragsrebsorten Frostfestigkeit und Pilzresistenz.

Aus den europäischen und vorderasiatischen Wildreben entstanden durch jahrtausendelange Zuchtwahl des Menschen die Kultursorten mit der botanischen Bezeichnung *Vitis vinifera sativa*. Diese Kulturrebsorten gelangten mit der Kolonialisierung der Neuen Welt auf weitere Kontinente [Vogt & Schruft, 2000].

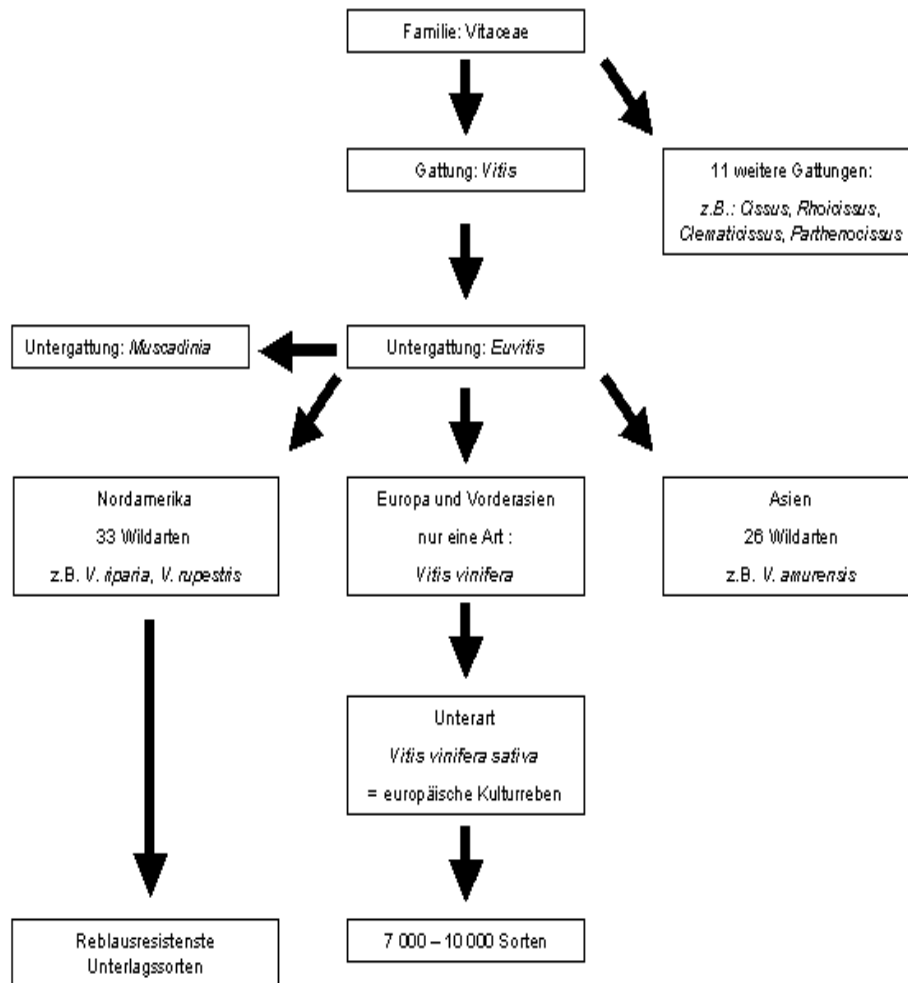


Abb.2: Die Stellung der Reben im botanischen System [verändert nach Vogt & Schruft, 2000].

Einschleppung von Schädlingen

Weinbau kann nur in klimatisch günstigen Gebieten mit milden Wintern und genügend langer sowie ausreichend warmer Vegetationszeit betrieben werden. Mit der Intensivierung des Weinbaus haben jedoch gleichermaßen Krankheiten und Schädlinge zugenommen. Eine Reihe von Krankheiten und Schädlingen können Ertrag, Qualität der Beeren und Lebensdauer der Weinrebe in solchem Maße verringern, dass erhebliche wirtschaftliche Einbußen entstehen.

Pilzliche Krankheiten der Weinrebe wie beispielsweise die Rebenperonospora (*Plasmopara viticola*) oder der Echte Mehltau (*Uncinula necator*) führten in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts durch den Befall von Gescheinen und Beeren zu verheerenden Ertragsverlusten in ganz Europa. Diese Pilzkrankheiten müssen, um

den wirtschaftlichen Schaden zu vermindern, unter anderem durch Fungizide bekämpft werden, die mehrmals in der Vegetationsperiode ausgebracht werden.

Ein tierischer Schädling, die Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*), wurde 1867 mit Zierreben aus Washington (U.S.A.) eingeschleppt. Die rasche Ausbreitung der Reblaus war in Deutschland und in ganz Europa mit enormen wirtschaftlichen Verlusten verbunden, da sie die Wurzeln der Rebe schädigt. Heute werden daher reblaustolerante Amerikaner-Reben als Unterlagen verwendet, die einen schadhafte Befall der Wurzeln verhindern [Vogt & Schruft, 2000].

Die Weinrebe kann außerdem von einer Reihe von Viren befallen werden, die Auswirkungen auf Ertrag und Qualität haben können. Zu diesen Rebviren gehört das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV). Das GFLV und dessen Vektor, der Nematode *Xiphinema index*, stammen ursprünglich aus Kleinasien sowie der Region um das Schwarze und das Kaspische Meer. Von dort aus wurde das Virus und sein Vektor durch die Verbreitung von Weinreben nach Westeuropa und Kalifornien eingeschleppt. Im Jahre 1861 war das GFLV in vielen Weinbaugegenden Europas weit verbreitet [Taylor & Brown, 1997].

Das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)

Einer der ersten Berichte über eine bodengebundene Pflanzenkrankheit handelte davon, dass gesunde Rebpflanzen, die auf einer Fläche gepflanzt wurden, auf der zuvor erkrankte Reben standen, innerhalb kurzer Zeit ebenfalls erkrankten [Rathay, 1882]. Es dauerte schließlich bis zum Jahre 1958, in dem Hewitt *et al.* den Nematoden *X. index* als Überträger des GFLV entdeckten. In Deutschland wurde diese Viruskrankheit als Reisingkrankheit bezeichnet. Die Reisingkrankheit, die auch als Abbaukrankheit bezeichnet wird, führt zu einer stetig nachlassenden Wachstumsleistung erkrankter Weinreben [Vogt & Schruft, 2000].

Das GFLV gehört zum Stamm der Nepoviren in der Familie der Comoviren [Drews *et al.*, 2004]. Der Name Nepovirus leitet sich von „nematode-transmitted viruses with polyhedral particles“ ab [Cadman, 1963]. Die Gruppe der Nepoviren beinhaltet 37 Virenarten, deren Hülle aus isometrischen Partikeln mit 28 nm Durchmesser besteht und die ein zweiteiliges Genom besitzen [Taylor & Brown, 1997]. Es handelt sich um positiv-gerichtete, einzelsträngige RNA-Viren [Agrios, 1997].

Pflanzenpathogene Viren werden zu einem großen Teil von Vektoren übertragen, denn Viren können selbst die intakte Zellwand nicht passieren. Sie können deshalb

nur über Wunden oder über Pollenkörner in das Pflanzengewebe eindringen. [Meyer-Kahsnitz, 1993; Agrios, 1997]. Deshalb sind von Nematoden übertragene Viren hochspezialisiert [Ohnesorge, 1976]. Das Virus kommt weltweit überall dort vor, wo Weinreben kultiviert werden [Taylor & Brown, 1997]. Die Reisigkrankheit kann von mehreren Nepoviren verursacht werden. Am häufigsten treten das GFLV oder das Arabis Mosaic Virus (ArMV) auf, daneben sind auch Mischinfektionen dieser Viren möglich [Deutsches Weinbaujahrbuch, 2002].

Die Symptome der Reisigkrankheit sind sehr vielgestaltig und variieren je nach Sorte, Lage und Jahr. In der ersten Wachstumsperiode sind im Allgemeinen nach der Infektion keine Anzeichen eines Virusbefalls zu erkennen. Erst im darauf folgenden Jahr können erste Virussymptome erkennbar werden [Taylor & Brown, 1997]. Den Namen erhielt die Krankheit nach dem Wuchsverhalten infizierter Pflanzen, das im Laufe der Jahre auftritt. Ihre Triebe sind gestaucht und zeigen eine verminderte Wüchsigkeit. Teilweise treten vermehrt Geiztriebe auf, die der Pflanze ein buschiges Aussehen verleihen. Der größte Schaden entsteht aber durch die Verrieselung der Trauben, aufgrund einer mangelnden Fruchtstandbildung [Martelli & Savino, 1991]. Die Symptome durch das GFLV an Reben sind in Abbildung 3 dargestellt.

Durch Nematoden verbreitete Viruskrankheiten zeichnen sich durch sogenannte Herde in den Anbauflächen ab (Abb.4). In diesen Virusherden zeigen sich meist benachbarte Rebstöcke mit typischer Blattverfärbung. Der Krankheitsprozess kann sich über zehn Jahre hinweg erstrecken bis die Pflanze schließlich abstirbt [Vogt & Schruft, 2000]. In Folge dessen ist die Produktivität der infizierten Weinberge statt der üblichen 30-40 Jahre auf 15-20 Jahre reduziert [Andret-Link *et al.*, 2004].

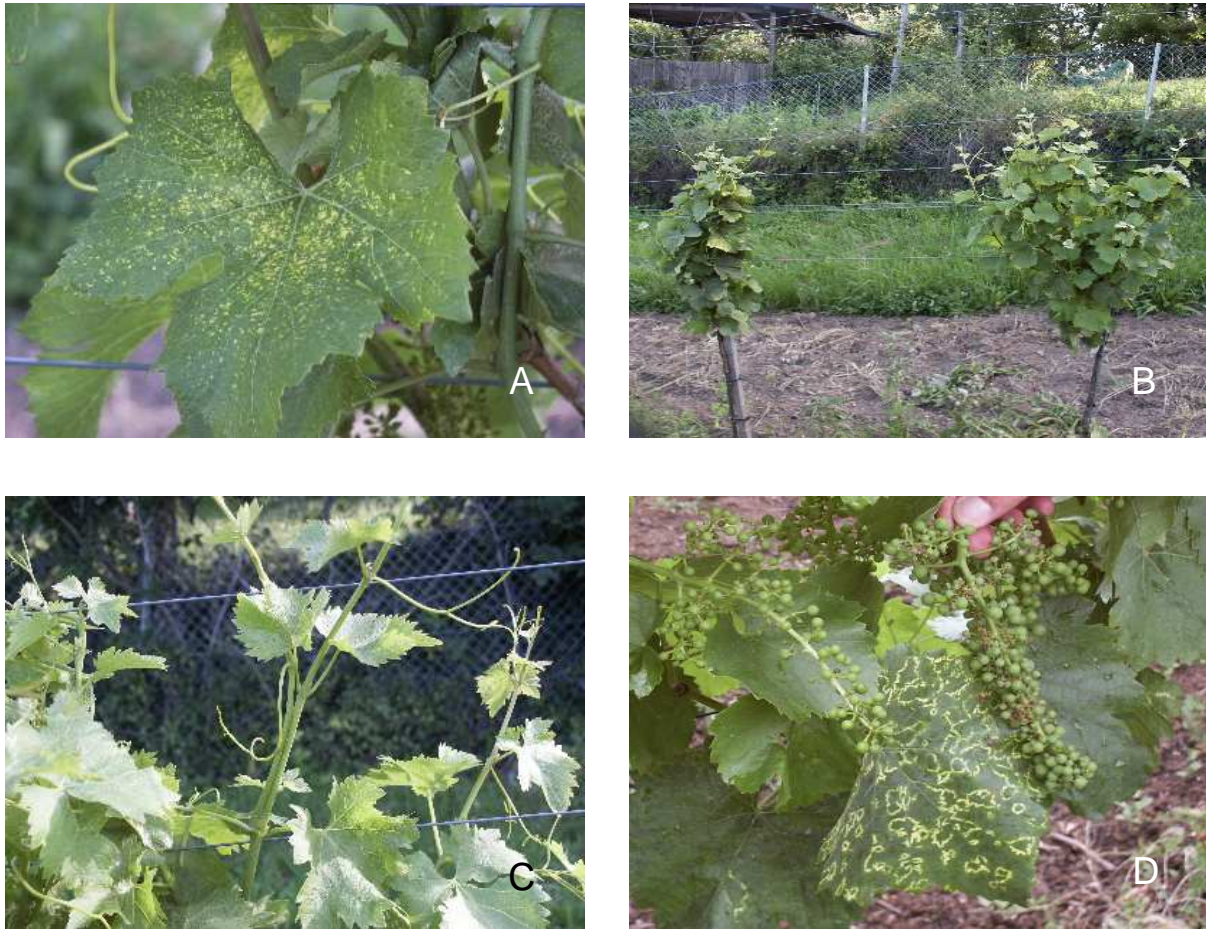


Abb.3: Symptome der durch das GFLV verursachten Reisigkrankheit an Reben. (A) Panaschüren (gelbe Sprenkelung) auf einem Blatt; (B) Kümmerwüchsigkeit von Reben; (C) Triebmissbildung (Doppeltriebe); (D) Verrieselung der Trauben durch mangelhafte Fruchtstandbildung.



Abb.4: Virusherde in einem Weinberg, sichtbar durch die gelbe Blattfärbung betroffener Reben

Der Virusvektor *Xiphinema index*

Phytoparasitäre Nematoden sind durchweg kleine, langgestreckte Tiere einfachster Organisation. Ihre Körperoberfläche besteht aus einer derben Kutikula, die im Verlauf der Entwicklung mehrmals gehäutet wird. Der Fortbewegung dienen Längsmuskeln, die in vier Strängen unter der Haut anliegen und nur eine Krümmung des Körpers erlauben [Ohnesorge, 1976]. Alle pflanzenparasitären Nematoden besitzen am vorderen Körperende einen Mundstachel. Dieser ausstreckbare Mundstachel, genannt Odontostylet, dient zum Besaugen von Wirtszellen [Decker, 1969; Sijmons, 1993].

Die Familie der Longidoridae beinhaltet die Gattungen *Xiphinema*, *Longidorus*, *Paralongidorus*, *Xiphidorus* und *Longidoroides*, von denen die ersten drei Überträger von Pflanzenviren sind [Taylor & Brown, 1997]. Nematoden der Gattung *Xiphinema* sind wandernde, ektoparasitische Nematoden [Sijmons, 1993]. Zum bevorzugten Wirtspflanzenkreis von *Xiphinema index* Thorne und Allen zählt die Feige (*Ficus carica*) und die Weinrebe (*Vitis vinifera*) [Coiro & Serino, 1991]. Die Wurzeln der Wirtspflanzen werden mit dem Odontostylet angestochen, wobei möglicherweise in die angestochene Zelle Verdauungssäfte aus der Oesophagusdrüse injiziert werden [Wyss, 1978]. Diese Sekrete bewirken zelluläre Veränderungen, wie synchrone Kernteilungen ohne Cytokinese, Zellwandeinstülpungen und Hypertrophie. Es entsteht durch die Penetration mit dem Stylet direkt am Nahrungskanal eine Wölbung, die mit modifiziertem Cytoplasma gefüllt ist [Sijmons, 1993]. Durch die anhaltende Saugtätigkeit werden so in der befallenen Wurzel der Wirtspflanze Riesenzellen induziert. Die Entstehung von Riesenzellen äußert sich mit der Ausbildung einer Wurzelgalle. Da die Nematoden bevorzugt direkt hinter der Wurzelspitze saugen, formt sich diese in kürzester Zeit in eine deformierte, endständige Galle um (Abb.5) Die genaue Induktion und Funktion dieser Zellen für diese Wirt-Parasit-Interaktion ist bei Longidoriden unsicher [Wyss,1978]. Denn es ist bis heute wenig bekannt über die Induktion Nahrungsstrukturen speziell von Longidoriden, die ein sogenanntes Saugzellen-System in der Pflanze entwickeln [Sijmons, 1993]. Parallel dienen bei Wurzelgallen-Nematoden wie *Meloidogyne incognita* die Riesenzellen oder auch bei Zystennematoden (*Heterodera schachtii*) Synzytien als Nahrungsquelle und werden zur Vollendung des Lebenszyklus benötigt [de Almeida Engler *et al.*, 1999].

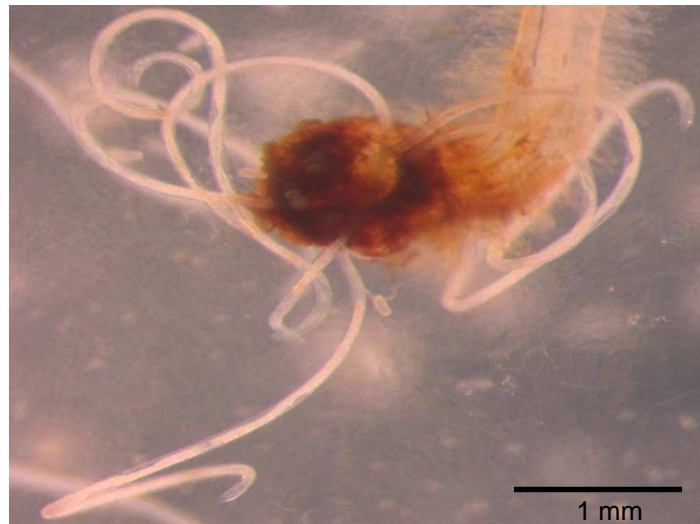


Abb.5: Eine Feigengalle mit *X. index*

Bei *X. index* handelt es sich um relativ große Nematoden mit durchschnittlich 2,8 - 3,0 mm Länge (Abb.6) [Vovlas & Larizza, 1994]. *X. index* vermehrt sich in der Regel parthenogenetisch, d.h. ein Weibchen legt auch Eier ab, wenn zuvor keine Befruchtung mit einem Männchen stattgefunden hat. Männliche Individuen sind bei dieser Art sehr rar [Siddiqi, 1974]. Nach dem Schlüpfen aus dem Ei durchläuft der Nematode vier Larvenstadien, zwischen denen jedes Mal eine Häutung stattfindet [Radewald & Raski, 1962a].



Abb.6: Nematode *X. index*

Nematoden der Art *X. index* sind Überträger des GFLV [Hewitt *et al.*, 1958]. Da nur diese Nematoden als Überträger dieses Virus bekannt sind, spricht dies für eine spezifische Assoziation zwischen Vektor und Virus [Spiegel & Robertson, 1983;

Robertson & Henry, 1986; Bleyer & Kassemeyer, 1992]. Diese Nematoden sind aufgrund ihrer phytoparasitären Lebensweise gut für eine Virusaufnahme geeignet. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 7 der Nahrungsapparat von *X. index* dargestellt. Die durch den Mundstachel aufgenommenen Viruspartikel heften sich an spezifische Rezeptoren im Nahrungsapparat [Andret-Link *et al.*, 2004]. Es bilden sich sogenannte Monolayer an der kutikulären Auskleidung des Oesophagus aus. Daher ist das Virus bei den Larvenstadien von *X. index* nicht persistent, sondern wird durch die Häutung mit der Kutikula abgestoßen [Taylor & Robertson, 1970]. Die Viruspartikel werden mit der Injektion von Speichelsekreten in die Pflanzenzellen übertragen. Alfaro und Goheen [1974] fanden heraus, dass die Transmissionszeit des GFLV durch *X. index* auf eine Wirtspflanze nur 15 Minuten dauert.

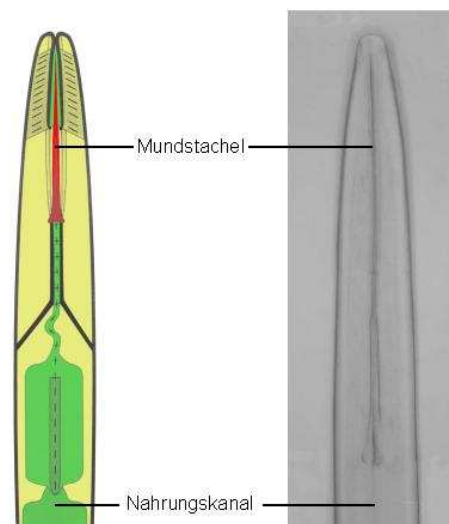


Abb.7: Nahrungsapparat von *X. index* schematisch und mikroskopisch dargestellt [verändert nach Taylor & Brown, 1997].

Nematoden der Art *X. index* findet man weltweit meist überall dort, wo Weinbau betrieben wird [Radewald & Raski, 1962b]. In Weinbergen Baden- Württembergs wurde die Verbreitung von sechs *Xiphinema*- Arten festgestellt. Das Auftreten einiger Arten ist eng an Bodenverhältnisse gebunden, während andere gleichmäßig im gesamten Untersuchungsgebiet verbreitet sind. Von den als Virusvektoren bekannten Arten standen *X. index* als Überträger des GFLV und *X. diversicaudatum* als Überträger des Arabis Mosaik Virus (ArMV) in engem Zusammenhang mit viruskranken Reben [Bleyer & Kassemeyer, 1992].

Bekämpfung der Nematoden

Da für virusinfizierte Rebpflanzen nur noch deren Rodung in Frage kommt, wurden in früheren Jahren vor Neupflanzungen vorbeugende Bekämpfungsmaßnahmen wie Bodenumlagerungen und vor allem der Einsatz von Nematiziden angewandt. Verschiedene systemische Nematizide, hauptsächlich Organophosphate und Carbamate zeigten eine gute Wirkung [Taylor & Brown, 1997]. Doch Nematizide, wie Aldicarb, Shell D-D, Methylbromid, Trapex oder Dazomet wirkten nicht nur gegen Nematoden, sondern töteten auch andere Bodenorganismen wie Insekten, Pilze und Bakterien ab [Agrios, 1997]. Die Mehrzahl der organischen Phosphorverbindungen wirkt in Gasform und besitzt dadurch in konzentrierter Form eine hohe, akute Toxizität. Die Effektivität dieser Mittel hängt daher von den herrschenden Umweltbedingungen ab (Temperatur/ Feuchtigkeit/ Bodenart).

Die meisten Bodenentseuchungsmittel wiesen auch herbizide Eigenschaften auf. Deshalb musste nach der Behandlung eine bestimmte Wartezeit (Karenzzeit) zu Neupflanzungen eingehalten werden. Der Einsatz chemischer Bodenentseuchungsmittel befreite den Boden nur vorübergehend von den Parasiten. Nach einiger Zeit bauten sich wieder Populationen der phytoparasitären Nematodenarten auf. Diese begrenzte Wirkungsdauer kann man damit erklären, dass nicht alle Nematoden abgetötet werden [Decker, 1969]. Ein geringer Teil übersteht die Behandlung durch die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit, bzw. es erfolgt eine Zuwanderung aus den tieferen Bodenschichten (1-2m), die nur ungenügend entseucht wurden [Taylor & Brown, 1997].

Aufgrund der hohen Toxizität dieser Nematizide und ihrem letztendlich unzureichenden Behandlungserfolg wurden fast alle Nematizide verboten. Zur Zeit ist nur noch ein Präparat, das Nemathorin, erhältlich [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2006].

Für die Eliminierung von virusinfizierten Rebflächen wird zur Zeit als einzige Alternative eine Langezeitbrache von mindestens 5 Jahren empfohlen, deren Erfolg aber sehr unsicher ist, da Überträger und Virus lange Zeit überdauern können [Brückebauer, 1978]. Nach neuesten Erkenntnissen überlebt *X. index* mindestens 4 Jahre in gerodeten Flächen und ist nach dieser Zeit immer noch infektiös [Demangeat *et al.*, 2005]. Der Erfolg einer Brache ist vor allem dann unsicher, wenn auch in benachbarten Flächen virusübertragende Nematoden vorkommen. Aus diesen Flächen können die Überträger innerhalb weniger Jahre wieder in die Neu-

pflanzung einwandern [Vogt & Schruft, 2000]. Außerdem ist die Langzeitbrache in führenden Weinbergsgenden nicht rentabel [Bouquet & Boursiquot, 1998].

Resistenz von Kulturpflanzen gegen tierische Schaderreger

Krankheiten und Schädlinge sind alte Begleiterscheinungen der Rebe. Obwohl ihre Ursachen zunächst nicht bekannt waren, wurden zu ihrer Unterdrückung immer wieder verschiedene Verfahren entwickelt. Dazu gehören sowohl chemische als auch biologische Methoden. Da künftig mehr und mehr auf chemische Anwendungen, zu denen der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zählt, verzichtet werden soll, ist die Weiterentwicklung von biologischen Verfahren nötig. Eine biologische Methode ist im weitesten Sinne der Anbau von widerstandsfähigen Pflanzen. Durch diese Pflanzen sollen ungünstige Bedingungen für die Ansiedlung und Ausbreitung von Schadorganismen erreicht werden. Bestimmte Pflanzen können eine Reihe von Abwehrmechanismen besitzen. Einige dieser Mechanismen sind bereits vorgebildet und gehören zum typischen Erscheinungsbild der Pflanzenart wie Wachsauflagerungen oder eine Behaarung. Eine sogenannte Resistenz kann auch mechanische Barrieren, wie eine Kutikula, verdickte Zellwände oder Lignineinlagerungen beeinhalt. Dem gegenüber stehen induzierte Abwehrreaktionen, die von der Pflanze bei Kontakt mit einem Parasit oder Krankheitserreger eingeleitet werden. Dies zeigt sich auch bei dem Befall der Rebwurzeln durch Nematoden. In den Fällen, in denen die Abwehrreaktionen der Pflanze schneller sind als der Erreger, wird dessen weitere Entwicklung unterdrückt und die Krankheit kommt nicht oder nur schwach zum Ausbruch. Solche Pflanzen sind resistent gegenüber dem Erreger [Vogt & Schruft, 2000]. Als Resistenz wird demnach eine geringe Anfälligkeit bis zur Befallsfreiheit bezeichnet [Fritzsche *et al.*, 1987]. Eine totale Befallsfreiheit ist die Immunität der Pflanze. Diese Immunität bezeichnet eine absolute Nichteignung der Pflanze als Wirt für einen Schaderreger. Eine Rebenwurzel könnte vielleicht so beschaffen sein, dass die Nematoden keine Saugversuche unternehmen und wegwandern. Eine immune Pflanze (Nichtwirtspflanze) wird unter keinen Umständen anfällig. Der Pflanzenzüchtung wird oft das Ziel gesetzt einen möglichst hohen Grad der Resistenz gegen einen Schaderreger zu erreichen, im Idealfall eine Immunität.

Eine Pflanze oder Sorte mit geringer Wirtsempfindlichkeit ist tolerant, wenn sie im Gegensatz zur Resistenz, die Entwicklung von Schaderregern duldet, ohne selbst deutlich Schaden zu nehmen. Sie erleidet bei geringem Befall weniger Schaden als

eine anfällige, die sich durch eine höhere Wirtsempfindlichkeit mit hohem Schaden, genannt Intoleranz, auszeichnet. Nematodenanfällige Reben haben selbst nur durch die Saugtätigkeit der Nematoden keine Nachteile, daher sind sie tolerant gegenüber den Nematoden.

Die Pflanzenreaktionen auf Schädlingsbefall, die als Toleranz bezeichnet werden, müssen daher nicht notwendigerweise zu einer Beeinträchtigung des Schaderregers führen (Entwicklung toleranter Rebsorten, an denen sich die Reblaus entwickelt, ohne nennenswerten Schaden zu verursachen). Ein besonderes Problem stellen in dieser Hinsicht Pflanzen mit Toleranz gegen bestimmte Viren dar. Sie bilden Infektionsquellen, von denen ausgehend die Vektoren, z. Bsp. Nematoden andere Bestände verseuchen können. Aufgrund dieser Tatsache werden speziell im Fall von Rebviren resistente oder sogar immune Pflanzen benötigt, um die nachteilige Wirkung phytopathogener Viren zu unterbinden.

Ziel dieser Dissertation

Zur Zeit erweist sich als einzige Möglichkeit, der Problematik des Virus und dessen Überträger in Weingärten entgegenzutreten, die Pflanzung von wurzelresistenten oder besser auch immunen Reben, die keine Wirte der vorhandenen Nematoden darstellen [Vogt & Schruft, 2000]. Vor einiger Zeit wurden Gewächshausversuche mit sogenannten Feindpflanzen als potentielle Maßnahme zur Nematodenbekämpfung durchgeführt. Doch deren Effektivität konnte sich in Feldversuchen nicht bestätigen [Rüdel *et al.*, 1992]. Als einzige Alternative müssten daher für den Weinbau *Vitis*-Arten zur Verfügung stehen, die eine Resistenz gegenüber der Virusübertragung durch Nematoden besitzen. Die Gattung *Muscadinia* besitzt eine natürliche Resistenz gegenüber dem GFLV, doch aufgrund ihres abweichenden Chromosomensatzes ließen sich ihre Resistenzeigenschaften in Kreuzungsexperimenten bisher schwierig weitervererben [Boulbas & Pistre, 1978; Bouquet, 1981; Staudt & Weischer, 1992]. *Vitis rotundifolia*, die in diese Gattung gehört, ist neben dem unterschiedlichen Chromosomensatz schwer zu bewurzeln und sehr frostempfindlich [Kunde *et al.*, 1968]. Dennoch konnten *Vitis rotundifolia*- und *Vitis rotundifolia*-Kreuzungen mit *Vitis vinifera* erzeugt werden, die im Rebensortiment des Staatlichen Weinbauinstituts in Freiburg stehen.

1. Aufgrund dieser Voraussetzungen wurde im Jahr 2004 am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg ein Projekt begonnen, das der Thematik dieser Dissertation zugrunde liegt. Aus den am Weinbauinstitut vorhandenen Ressourcen, wurden eine Reihe von *Vitis*- Genotypen auf die Anfälligkeit gegenüber dem virusübertragenden Nematoden *X. index* und dem GFLV getestet. Es wurde nach natürlich vorhandenen Resistenzeigenschaften der verwendeten Genotypen gesucht, unter denen sich auch *Vitis rotundifolia*-Kreuzungen befanden. Kann unter den getesteten Genotypen Pflanzen eine Resistenz nachgewiesen werden, soll diese Eigenschaft in Zukunft durch die klassische Kreuzungszüchtung gezielt weitervererbt werden. Auf diesem Weg könnte eine Unterlags-Rebsorte erschaffen werden, die sich in virusbefallenen Gebieten behauptet.
2. In früheren Versuchen wurde die Virustestung mit der DAS-ELISA-Methode durchgeführt [Clark & Adams, 1977]. Diese Methode war nicht sehr sensitiv und erlaubte eine sichere Detektion der Viruspartikel erst nach einer Zeitdauer von ungefähr 21 Monaten [Staudt, 1991]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden praktische Versuchsansätze zur Resistenzprüfung erarbeitet, die zusätzlich durch molekularbiologische Nachweismethoden unterstützt wurden [Demangeat *et al.*, 2004; Wetzel *et al.*, 2002]. Um diese Untersuchung der Pflanzen im Labor zu erreichen, wurde ein *in-vitro*- Testsystem für die Resistenzprüfung von Reben gegenüber *X. index* und dem GFLV entwickelt.
3. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Prozesse bei der Interaktion zwischen Nematoden und Wurzel. Dazu mußte ein genauere Einblick in das Wurzel- Nematoden-System ermöglicht werden. Mit Hilfe des *in-vitro*- Testsystems war es möglich, das Verhalten der Nematoden an den Rebwurzeln und die Reaktion der Rebwurzeln quantitativ zu studieren. Die Abwehrreaktion der Wurzeln wurden auf den Befall mit Nematoden anhand von Färbemethoden charakterisiert und zusätzlich auch auf die Expression von Abwehrgenen untersucht. Da das Zusammenspiel von Wurzelausscheidungen und die Anlockung der Nematoden noch weitgehend unerforscht ist, wurden entsprechende Biotests durchgeführt.
4. Um eine genaue Vorstellung der Problematik des GFLV in der Weinbaupraxis zu bekommen, wurden zwei befallene Rebflächen im Weinanbaugebiet Kaiserstuhl kartiert und über 3 Jahre die Entwicklung der charakteristischen Symptome beobachtet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN

Chemikalien

Name	Hersteller
Anilinblau	Merck, Darmstadt
Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Borsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumhypochlorid 33-35%, Chlorkalk	Grüssing GmbH, Filsum
Calciumnitrat p.a.	Merck, Darmstadt
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Eisen (II)-sulfat-Heptahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Eisen (III)-citrat-Monohydrat p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol p.a. 98,8%, unvergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoamylalkohol	Fluka, Sneeze
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumnitrat p.a.	Merck, Darmstadt
Linsmaier & Skoog-Medium	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande
Lithiumchlorid	Biometra, Göttingen
Magnesiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Mangandichlorid p.a.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyljasmonat	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande

Magnesiumsulfat-Heptahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat , p.a. wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochloritlösung (15%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriummolybdat p.a.	Merck, Darmstadt
Nitroblue-Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Nitrophenylphosphat	Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach
Pentan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol 6000 purum (PEG)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon MW 2400 (PVP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS 2×krist. 99% p.a.	Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach
TopVision™ LE GQ Agarose	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Trichloressigsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-Cl	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat	Merck, Darmstadt
<u>Molekularbiologische Reagenzien alle</u>	<u>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</u>
Oligo(dT) ₁₈ -Primer, 0,5 µg/µl	
10 mM dNTPMix	
100 µM Random Hexamer Primer	
5 × Reaction buffer for M-MuLV RT	
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase	
10×PCR buffer	
Taq-DNA-Polymerase	
6 × Loading dye solution	
Gene Ruler™ 100 bp DNA-Ladder Plus	
Primer, hergestellt von MWG Biotech	

2.2 MEDIEN, LÖSUNGEN, PUFFER

2.2.1 Kulturmedien und Lösungen für sterile *in-vitro*-Rebpflanzen und Nematoden

Kulturmedium für *in-vitro*-Rebenstecklinge

3,17 g	Linsmaier & Skoog-Medium
10 g	Bacto™ Agar
20 g	D-(+)-Glucose
ad 1 l	Aqua dest.

pH 6,2 – 6,4

Wasseragar (0,8 %)

8 g	Bacto™ Agar
ad 1 l	Aqua dest.

Knop-Spurenelementlösung [Knop, 1860]

250 mg	KH_2PO_4
250 mg	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
250 mg	KCl
1 g	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
12,5 mg	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
ad 1 l	Aqua dest.

pH 5,8

Hoagland Spurenelementlösung No.2 verändert nach Wyss [1999]

Stammlösung	Verbindung	Konzentration (g/l)	ml für 1 l Lösung
I	KH_2PO_4	136,09	0,1
II	KNO_3	101,11	0,5
III	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	0,5
IV	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	0,2
V	H_3BO_3	2,86	0,1
	$\text{Mn}(\text{II})\text{Cl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,81	
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,22	
	$\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,08	
	Na_2MoO_4	0,09	
VI	Fe(III)citrat	6,61	0,1

Von den verschiedenen Elementen wurden zuerst Stammlösungen angefertigt, die anschließend in der angegebenen Menge zur Endlösung zusammengestellt wurden.

2.2.2 Molekularbiologie: RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

DEPC-Wasser (0,1%):

1 ml (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat)
ad 1 l Aqua dest

RNA-Isolierung aus Wurzel- und Blattmaterial

NetS-Puffer:

200 mM NaCl
2 mM EDTA
20 mM Tris-Cl
1% SDS

pH 7,5

RNA-Isolierung aus Rebenpollen:

Extraktionspuffer:

50 mM Tris-HCl

300 mM NaCl

5 mM EDTA

2% SDS

pH 8,0

10 mM β - Mercaptoethanol frisch zusetzenElektrophoretische Auftrennung der RNA

10 x MOPS:

42 g MOPS (Morpholino propane sulfonic acid)

6,8 g Natriumacetat

20 ml 0,5 M EDTA

ad 1 l DEPC-Wasser

pH 7,0

1% Agarosegel für RNA:

0,8 g Agarose

59 ml Aqua dest.

8 ml 10 x MOPS

13 ml Formaldehyd (Zugabe nach Aufkochen)

Elektrophoretische Auftrennung der DNA

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris

57,1 ml Eisessig (Essigsäure)

100 ml EDTA

ad 1l Aqua dest.

pH 8,0

1,2% Agarosegel für DNA:

1 g	Agarose
80 ml	1 × TAE
4 µl	Ethidiumbromid-Lösung (Zugabe nach Aufkochen)

2.2.3 Immunologisches Nachweisverfahren DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)Beschichtungspuffer:

1,59 g	Na ₂ CO ₃
2,93 g	NaHCO ₃
ad 1 l	Aqua dest.

pH 9,6 (einstellen mit HCl)

Konjugatpuffer:

8,0 g	NaCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,15 g	NaH ₂ PO ₄ × 12 H ₂ O
0,2 g	KCl
20,0 g	PVP
0,2 g	MgCl ₂
2,0 g	BSA
0,5 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 7,4 (einstellen mit HCl)

Extraktionspuffer:

60,5 g	Tris
8,0 g	NaCl
20,0 g	PVP
10,0 g	PEG 6000
0,5 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 8,2 (einstellen mit HCl)

Waschpuffer (50 fach):

400 g	NaCl
10 g	KH ₂ PO ₄
145 g	NaH ₂ PO ₄ × 12 H ₂ O
10 g	KCl
25 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 7,4 (einstellen mit HCl)

Substratpuffer:

97 ml	Diethanolamin
ad 1 l	Aqua dest.

pH 9,6 (einstellen mit HCl)

2.2.4 Färbereagenzien

NBT-Färbung [Adam *et al.*, 1989]

Färbelösung:

0,1 % NBT (w/v) in 10 mM NaN₃ und 10 mM KH₂PO₄

pH 7,8

Entfärbelösung:

0,15 % Trichloressigsäure (w/v) in Ethanol:Chloroform (4:1; v/v)

Anillinblau-Färbung [nach Hood & Shew, 1996]0,05 % Anillinblau (w/v) in 67 mM K₂HPO₄

pH 9,8

2.3 PFLANZENMATERIAL**2.3.1 Versuchspflanzen *Vitis* spp und *Ficus carica***

Es wurden Pflanzen von *Vitis* spp (Weinrebe) und *Ficus carica* (Feige) verwendet, weil der Nematode *Xiphinema index* nur ein sehr begrenztes Wirtsspektrum aufweist (Wyss, 1980). Da er an seiner Hauptwirtspflanze, der Feige, die größte Vermehrungsrate hat [Brown und Coiro, 1985], wurde diese für die Zucht der Nematoden verwendet. Für die Durchführung der Versuche wurden hauptsächlich Pflanzen der Gattung *Vitis* aus der Familie der Vitaceen verwendet (Tab. 1 u. 2).

Die verwendeten Versuchspflanzen stammen aus einem am Staatlichen Weinbauinstitut vorhandenen Sortiment an Unterlagsrebsorten und *Vitis* spec.. Neben Stecklingspflanzen wurden auch Samen von den wildbestäubten Freilandpflanzen verwendet (Tab. 3). Mit diesen Pflanzen und deren Samen wurden Versuche zur Resistenzprüfung gegenüber *X. index* und dem GFLV durchgeführt.

Tab. 1. Verwendete Unterlagsrebsorten, im Weinbau als Standardunterlagen eingesetzt.

Unterlagsrebsorten	Kreuzung
Kober 5 BB	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
Kober 125 AA	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>

Tab. 2. Verwendete Pflanzen aus dem Sortiment des Weinbauinstituts Freiburg.

Testpflanze ^a	Kreuzung
10	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i>
16	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i>
35	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i>
42	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i>
46	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i>
91	<i>V. solonis</i>
136	<i>V. cinerea</i>
140	<i>V. rufotomentosa</i> × <i>V. vinifera</i>
141	<i>V. rufotomentosa</i> × <i>V. vinifera</i>
173	<i>C.v. Ramsey</i>
<i>Muscadinia dulcet</i>	
<i>Muscadinia regale</i>	

^a die Nummerierung entspricht der internen Standortnummer des Weinbauinstitutes

Tab.3: Verwendete Samen von den wildbestäubten Testpflanzen

Testpflanze ^a	Samen aus den Jahrgängen
10	keine Samen vorhanden
16	2003
35	keine Samen vorhanden
42	2004; 2005; 2006
46	keine Samen vorhanden
91	2003; 2004; 2005
136	2003
140	2003; 2004; 2005
141	2003; 2004; 2005
173	2003
<i>Muscadinia dulcet</i>	keine Samen vorhanden
<i>Muscadinia regale</i>	keine Samen vorhanden
Kober 5 BB	2005; 2006
Kober 125 AA	2005; 2006

^a die Nummerierung entspricht der internen Standortnummer des Weinbauinstitutes

2.3.2 Anzucht von Holzstecklingen und Topfreben von *Vitis spec.*

Für die Anzucht und den Aufbau eines Pflanzenreservoirs im Gewächshaus wurden von den in 2.2.1 genannten *Vitis*-Pflanzen im Winter Ruten geschnitten. Diese wurden im Frühjahr als Zwei-Augen-Holzstecklinge in Tontöpfchen mit $\frac{1}{3}$ Sand und $\frac{2}{3}$ Pflanzerde zum Austreiben gebracht. Die Holzstecklinge und Topfreben wurden in einem beheizten Gewächshaus kultiviert. Bis die Pflanzen für die Versuche verwendet werden konnten, wurden sie für sechs Monate zur Bewurzelung in mit Torf gefüllte Wannen gestellt. Im Winter wurden die Pflanzen zusätzlich mit Natrium-Dampflampen (Osram, Valox, NAV T 400 W, München) bestrahlt, um eine Tageslänge von 16 h zu erreichen.

2.3.3 Sterilkultur von *in-vitro*-Grünstecklingen von *Vitis spec.*

Das Anlegen von Sterilkulturen der Rebe diente zur Erstellung eines Pflanzenreservoirs unabhängig von der jahreszeitlichen Vegetationsperiode. Alle Arbeiten wurden unter keimfreien Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt.

Zu Beginn des Frühjahrs und im Laufe des Sommers wurden von jungen Trieben der in Tab.1 und Tab.2 erwähnten Gewächshaus- und Freilandreben aus dem Sortiment des Weinbauinstitutes Grünstecklinge gewonnen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die verwendeten jungen Triebe nicht zu weich und nicht verholzt waren, um ein optimales Anwachsen zu garantieren. Die Herstellung der *in-vitro*-Grünstecklinge erfolgte modifiziert nach Brendel [1988].

Von den jungen Trieben wurden ca. 2 cm große Ein-Augen-Stecklinge geschnitten, von denen Blätter und Ranken entfernt wurden. Die Stecklinge wurden zuerst 20 min mit einer Lösung des Fungizids Switch (Syngenta, Basel; 0,6 g/l) behandelt. Anschließend wurden sie kurz in 70 %iges Ethanol getaucht und 30 Minuten in einer 1,5 %igen Natrium-hypochlorid-Lösung oberflächendesinfiziert. Im Anschluss daran wurden die Stecklinge dreimal mit 100 ml Aqua dest. gewaschen. Mit einer Pinzette wurden je drei bis vier Stecklinge in einen lichtdurchlässigen 500 ml großen Lebensmittelbecher überführt, der 100 ml des erkalteten Kulturmediums für *in-vitro*-Stecklinge enthielt (s. 2.2.1). Anschließend wurden die Becher luftdicht mit einem

lichtdurchlässigen Deckel verschlossen. Die Stecklinge wurden in einer Klimakammer bei 25 °C und einer Photoperiode von 16 h kultiviert (Abb.8). Nach ungefähr 6-8 Wochen konnten sie für die Versuche verwendet werden.

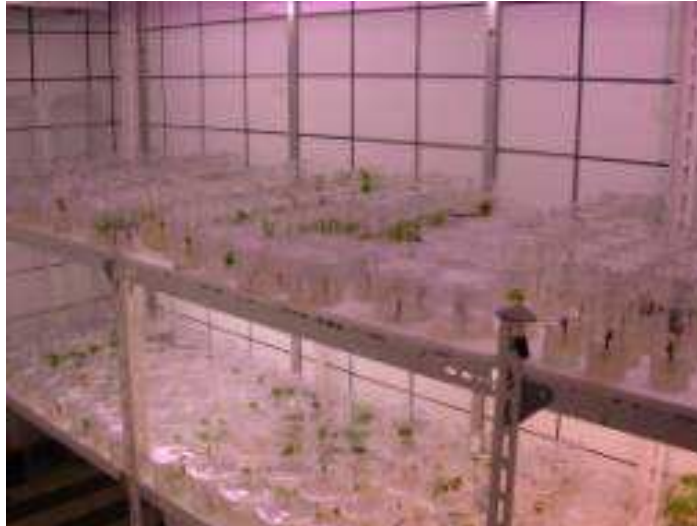


Abb.8: Klimakammer mit *in-vitro*-Stecklingen.

2.3.4 Anzucht von sterilen Sämlingen von *Ficus carica* und *Vitis spec.*

Die Feigensamen wurden aus frischen Früchten gewonnen. Das Fruchtfleisch wurde mit Wasser entfernt und die Samen auf einem Sieb aufgefangen. Die so gewonnenen Samen wurden mit 70%igem Ethanol oberflächendesinfiziert und anschließend getrocknet. Bei den verwendeten Rebsamen handelt es sich um wildbestäubte Exemplare der Testpflanzen aus dem Sortiment des Weinbauinstituts Freiburg (Tab.3).

Um sterile Sämlinge von Feigen und Reben anzuziehen wurden die Samen über Nacht zum Quellen in destilliertem Wasser eingeweicht und am nächsten Tag 20 Minuten in einer gefilterten 4%igen Calciumhypochlorid-Lösung unter Rühren oberflächensterilisiert. Danach wurden die Samen mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und für eine Stunde in Wasser aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die Samen in Petrischalen auf 0,8%igem Wasseragar, der vor dem Erkalten mit Quarzsand berieselt worden war, aufgesetzt. Anschließend wurden die Petrischalen luftdicht verschlossen und in eine Klimakammer bei 25 °C und 16 h Photoperiode zum Auskeimen deponiert (Abb.9 u. 10; Wyss, 1978). Um die Samenruhe zu

brechen wurden die Rebsamen vor der Keimung 14 Tage bei 4 °C kälteinduziert (Vernalisation). Die Petrischalen mit den gekeimten Sämlingen wurden alle zwei Wochen mit 600 µl Spurenelementlösung No.2 [Hoagland und Arnon, 1938] bewässert.



Abb.9: *in-vitro*-Feigensämlinge



Abb.10: *in-vitro*-Rebensämlinge

2.4 DER NEMATODE *XIPHINEMA INDEX*

2.4.1 Zucht von *Xiphinema index* an *Ficus carica*

Die Nematodenzucht des Weinbauinstituts wurde für frühere Versuche am Weinbauinstitut angelegt und nun weitergeführt. Es handelt sich hierbei um eine Mischpopulation aus Nematoden des Instituts für Nematologie und Wirbeltierkunde in Münster und der INRA in Colmar, Frankreich [Staudt und Weischer 1992], sowie aus dem Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum in Neustadt/Weinstraße. Die virus-freien Nematoden wurden an Feigenpflanzen angezogen. Da diese keinen Wirt für das Grapevine Fanleaf Virus darstellen, konnte sichergestellt werden, dass die Nematoden virusfrei blieben [Staudt und Weischer, 1992]. Die Feigenpflanzen wurden in 5l- und 10l-Töpfen mit einem Gemisch aus $\frac{1}{3}$ Sand und $\frac{2}{3}$ Pflanzerde bei ausreichender Feuchtigkeit im Gewächshaus bei 25 °C und einem 16 h Lichttag kultiviert [Demangeat *et al.*, 2005].

2.4.2 Extraktion von *Xiphinema index* aus Erdmaterial

Die Gewinnung von *X. index* aus Erde wurde anhand einer modifizierten Siebmethode nach Flegg [1967] durchgeführt (Abb. 11). Ungefähr 200 ml Erde wurden in einem 1 l - Becher gegeben und mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Erde wurde je nach Bodenart bis zu zwei Stunden eingeweicht. Danach wurde die aufgeweichte Erde über ein Sieb mit 2 mm Porengröße gegossen, wobei der Siebdurchlauf in einem 5 l Eimer aufgefangen wurde. Der Siebrückstand wurde solange mit Leitungswasser ausgewaschen, bis der Eimer komplett gefüllt war. Nach 25 Sekunden Sedimentationszeit wurde der wässrige Überstand des Eimers über drei übereinander liegende Siebe mit einer jeweiligen Porengröße von 150 µm dekantiert. Nun wurde der feste Bodensatz des Eimers noch einmal mit Leitungswasser aufgewirbelt bis der Eimer erneut komplett gefüllt war. Danach erfolgte ein zweites Dekantieren über die 150 µm Siebe. Die Erdrückstände mit den enthaltenen Nematoden aus diesen drei Sieben wurden in einen 100 ml Becher überführt und auf ein Nylonsieb (Maschenweite 150 µm) in einem Baermann Trichter gegossen. Nun wurde der Baermann Trichter mit Wasser aufgefüllt. Die sich in den Erdrückständen befindlichen Nematoden wanderten durch das Sieb und setzten sich im unteren Teil des Trichters ab. Nach 20 Stunden wurden ca. 50 ml aus dem Trichter abgelassen und anschließend die Nematoden unter dem Binokular ausgezählt. Wurden die Nematoden in Wanderungsversuchen oder zum Aufsetzen auf Sämlingsplatten verwendet, betrug die Sedimentationszeit 72 Stunden, um eine optimale Vitalität der Nematoden zu gewährleisten.

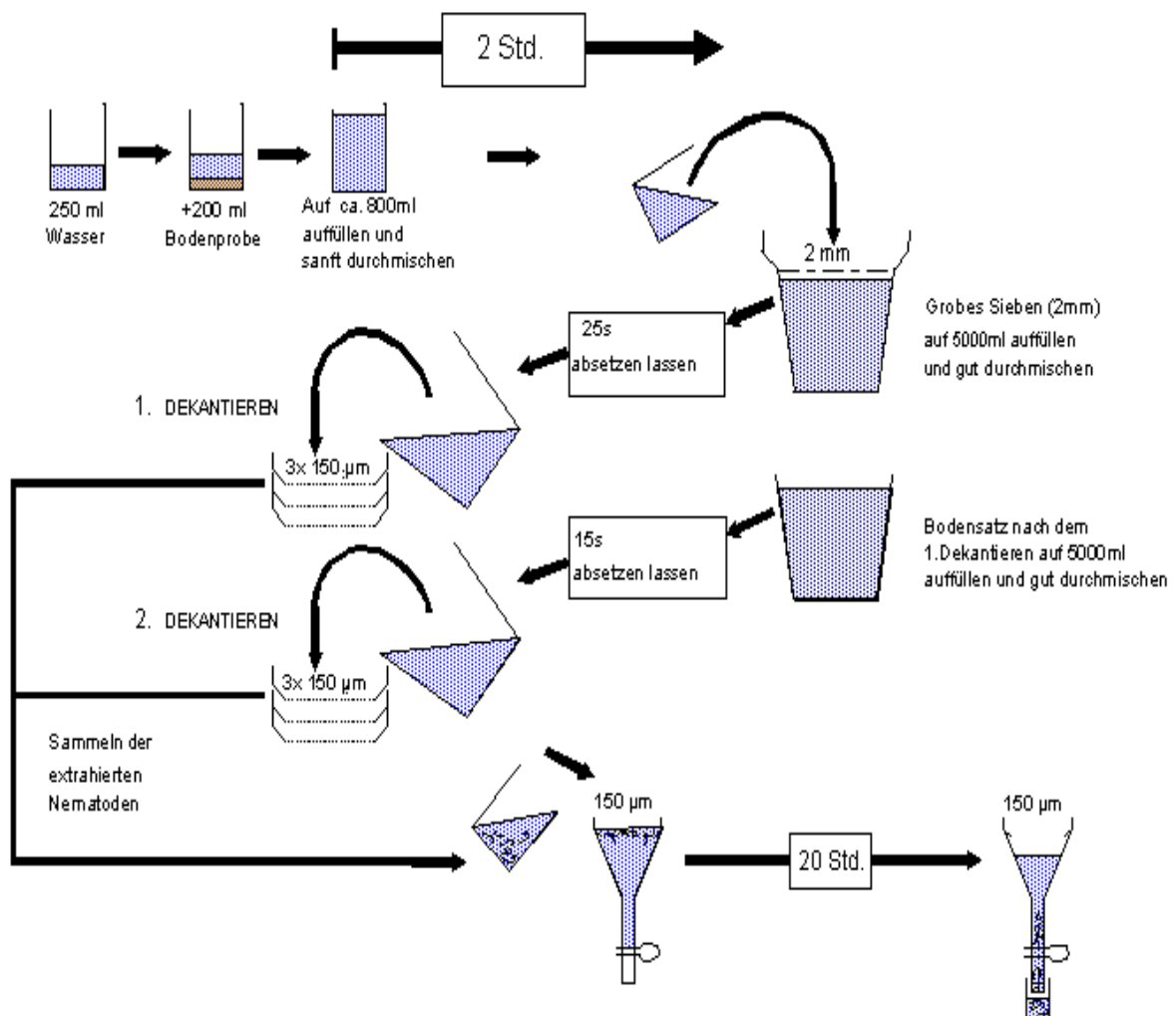


Abb.11: Extraktionsschema von *Xiphinema index* aus Erdmaterial [verändert nach Bleyer, 2001].

2.4.3 Sterilwaschen von *Xiphinema index*

Zur Verwendung von *X. index* in Sterilkulturen mit *in-vitro*-Testpflanzen erfolgte zuvor eine Oberflächensterilisation [modifiziert nach Aumann, 1997]. Nach der Gewinnung von *X. index* aus Erdmaterial wurden die Nematoden unter dem Binokular ausgezählt und mit einem feinen Metallhaken in Gläschen mit Leitungswasser überführt.

Die Nematoden wurden in der Sterilbank über einem Sieb mit einer Porenweite von 30 µm mit 20 ml 0,1%iger Natriumhypochlorid-Lösung oberflächensterilisiert. Anschließend wurden sie mit ca. 200 ml destilliertem Wasser gewaschen und in ein Falconröhrchen mit 2,5 ml Knopflösung gegeben. Diese Nematodensuspension

wurde mit einer gekappten Pipettenspitze auf eine Petrischale mit 0,8 %igem Wasseragar aufpipettiert. Um eine Darmentleerung der Nematoden zu gewährleisten, wurden die luftdicht verschlossenen Platten über Nacht in einem Klimaschrank bei 27-29 °C inkubiert. Zur weiteren Verwendung in den verschiedenen Tests wurden die oberflächensterilen Nematoden aus diesen Agarplatten mit dem Nematodenhaken herausgesammelt.

2.4.4 Gewinnung von GFLV- infizierten Nematoden

Für die Virusübertragung von Nematoden auf die Testpflanzen, waren GFLV-tragende Nematoden notwendig. Virusfreie *Xiphinema index* wurden aus der Feigenzucht ausgewaschen (wie in 2.4.2 beschrieben) und ausgezählt. Die Nematodensuspension wurde in Erdlöcher von bekanntlich GFLV- tragenden Rebpflanzen gegossen und die Löcher anschließend mit Erde verschlossen. Die Inokulationszeit der Nematoden an den Viruspflanzen betrug drei Monate, ehe sie für Transmissions-versuche verwendet wurden.

2.5 NACHWEIS DES GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)

Der Nachweis des GFLV in der Rebe erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden, der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction) und dem DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay).

Hierbei wurde sowohl Pflanzenmaterial von virusfreien Kontrollpflanzen verwendet, als auch Material von Pflanzen, die bekanntermaßen virustragend waren. Der Virusnachweis wurde mit Material von Rebwurzeln, Stängeln, Blättern, Beeren und Pollen durchgeführt.

2.5.1 Nachweis des GFLV in *Vitis spec.* mit RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction)

2.5.1.1 Isolierung von RNA aus Wurzel- und Blattmaterial

Die RNA-Isolierung aus Wurzel- und Blattmaterial wurde mit der Hot-Phenol-Methode nach Thomas und Schiefelbein [2002] durchgeführt.

Hierzu wurden von jeder Probe 0,2 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff in einem gekühlten Mörser zerkleinert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurde je 1 ml einer auf 80°C erhitzten Phenol/NetS-Puffer-Lösung (1:1) gegeben. Die Proben wurden sofort gut suspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Nun wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zur Fällung der Proteine wurde 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1) zugegeben. Dieser Ansatz wurde zweimal je 30 Sekunden intensiv geschüttelt und anschließend fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die wässrige Oberphase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2; in DEPC-behandeltem Aqua dest.) und dem doppelten Volumen Ethanol (99 %) versetzt. Die Volumenangaben beziehen sich jeweils auf die Menge der transferierten Oberphase. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden im Gefrierschrank bei -20 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz bei 11.000 rpm 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen und zum Fällen der RNA 200 µl 5 M Lithiumchlorid (in DEPC-behandeltem Aqua dest.) zugegeben. Hierbei war es wichtig, dass sich das Pellet vor Zugabe des Lithiumchlorids gelöst hatte. Die Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 11.000 rpm pelletiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 100 µl absolutes Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde mindestens eine Stunde bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde nochmals 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol

gewaschen und erneut 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.1.2 Isolierung von RNA aus Rebenpollen

Die Isolierung von RNA aus Rebenpollen wurde nach der Methode von Bijli *et al.* (2001) durchgeführt.

Da der Pollen auf der Innenseite von Pergamenttütchen, die vor der Blüte auf die Gescheine angebracht wurden, haftet, war eine Zerkleinerung der gesamten Pergamenttütchen in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mikrodismembrators (B. Braun, Melsungen) notwendig. Die so pulverisierte Probe wurde dann in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß eingefüllt. Anschließend wurde 1 ml Extraktionspuffer mit β -Mercaptoethanol zu der Probe gegeben. Die Probe wurde dann bei 50 °C in einem Eppendorf-Thermomixer für 20 Minuten geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 150 µl 3 M KCl zugegeben und die Probe für 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 10.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und die gleiche Menge an Lithiumchlorid zugegeben. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl DEPC-Wasser gelöst und dann das gleiche Volumen an Chloroform-Isoamyl-Alkohol zugegeben. Das Gefäß wurde kurz geschüttelt und danach 10 Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase mit der RNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 5 µl Natriumacetat und 2 Volumen 99 % Ethanol zugegeben und für 2 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde nochmals 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Erneut erfolgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.1.2.1 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde die Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (UV VIS Spektralphotometer, SPECORD® 50, Analytik Jena AG, Jena; Software: WinASPECT) ermittelt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der RNA-Lösung mit DEPC-Wasser gemessen. Mit folgender Formel wurde die RNA-Konzentration in µg RNA/ml berechnet.

$$c \text{ (RNA) } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * 40 * f_{\text{Verdünnung}}$$

c: Konzentration

OD: optische Dichte

f: Verdünnungsfaktor

Zur Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion wurde 1 µg RNA mit 9 µl DEPC-Wasser und 1,1 µl Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend zum Abkühlen auf Eis gestellt. Das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die RNA, so dass diese bei Anregung mit UV-Licht im Gel detektiert werden kann. Da RNA eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist, muss sie unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V ca. eine Stunde in 1xMOPS durchgeführt. Anschließend konnten die RNA-Banden im Gel mit Hilfe eines Dokumentationsgerätes (ImageMaster® VDS, PharmaciaBiotech, San Francisco, USA) sichtbar gemacht werden.

2.5.1.3 RT-PCR

Bei einer RT-PCR dient die RNA als Matrize für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Die RNA-Moleküle werden im ersten Schritt der RT-PCR mit dem Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert.

Nach der Isolierung der RNA wurde zunächst eine cDNA-Synthese nach folgender Weise durchgeführt:

2.5.1.3.1 cDNA-Synthese

1 µg	RNA
2 µl	Oligo(dT) ₁₈ -Primer (2 mM)
1 µl	Random Hexamer Primer (10 mM)
ad 10 µl	DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde zur Denaturierung für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Danach wurden folgende Komponenten hinzupipettiert:

5 µl	Reaktionspuffer
2 µl	dNTPMix
3 µl	DEPC-Wasser
1 µl	Reverse Transkriptase

Die cDNA-Synthese wurde eine Stunde bei 42 °C ausgeführt und anschließend zum Abstoppen der Reaktion 10 Minuten auf 70 °C erhitzt.

2.5.1.3.2 Nachweis des GFLV in *Vitis spec.* durch RT-PCR

Die synthetisierte cDNA konnte nun mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert werden. Die cDNA-Proben wurden jeweils mit Kontrollprimern und mit Primern für das GFLV versetzt. Zur Überprüfung der erfolgten Amplifizierung der cDNA wurden Primer für die 18S-rRNA verwendet, da diese ribosomale RNA in großen Mengen in den Pflanzenzellen vorkommt. Für den Nachweis des Virus wurden spezifische Primer für das coat-Protein des Grapevine Fanleaf Virus verwendet [Andret-Link *et al.*, 2004]. Um das Vorhandensein von viraler RNA, die von den Nematoden stammt auszuschließen, wurden zusätzlich Kontrollprimer,

spezifisch für das nematodeneigene Protein Actin, eingesetzt. Die spezifischen Sequenzen der einzelnen Primer wurden in dieser Arbeit selbst ermittelt und sind im Folgenden aufgelistet:

Tab.4: Verwendete Primer für den Virus-Nachweis.

Primer	Sequenz 5'→ 3'	Verwendung
5'Vitis18S	5'-CCC CGA CTT CTG GAA GGG A-3'	Primer der 18S-rRNA
3'Vitis18S	5'-CGG AGG CAC GAC CCG GC-3'	Primer der 18S-rRNA
FVforward	5'-TAG TGA GTG GAA CGG GAC-3'	Primer des GFLV
FVreverse	5'-GCA ATC ATT GCA GCA AAC G-3'	Primer des GFLV
5' Actin	5'GCC AAT CTA CGA AGG TTA CG-3'	Primer von Actin (<i>X. index</i>)
3' Actin	5'TAC AGG TCC TTA CGG ATG TC-3'	Primer von Actin (<i>X. index</i>)

Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl eingesetzt.

2.5.1.3.3 Nachweis von Abwehrgenen bei *Vitis spec.* durch den Befall von *Xiphinema index*

Bei den getesteten Genotypen sollte eine Abwehrreaktion der Pflanze in Folge des Nematodenbefalls auf genetischer Ebene untersucht werden. Dazu wurden spezifische Primer für die Callosesynthase und die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) verwendet, um die Aktivität dieser beiden Enzyme anzuzeigen [Yun *et al.*, 2006; Dunn *et al.*, 1998]. Die Sequenzen der spezifischen Primer sind im Folgenden aufgelistet:

Tab.5: Verwendete Primer für den Nachweis von Abwehrgenen.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
5'Callolesyn	5'-TGAAGGAAAACCTGAAAATCAAAA-3'	Primer der Callose-synthase
3'Callolesyn	5'-AGG CCT TGC TGA TAC CAC C-3'	Primer der Callose-synthase
PALforward	5'-TGA AGC ACC ACC CTG GCC-3'	Primer der PAL
PALreverse	5'-CAA GAT CCT TCT CGC AGA ATC T-3'	Primer der PAL

Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/μl eingesetzt.

Folgendes Pipettierschema wurde für alle PCR-Ansätze verwendet:

- 2 μl cDNA
- 5 μl *Taq*-Puffer
- 1 μl Forward-Primer
- 1 μl Reverse-Primer
- 1 μl dNTP-Mix
- 39 μl DEPC-Wasser

Die Ansätze wurde im Thermocycler (Biometra, Tpersonal) auf 99 °C erhitzt und schließlich 1 µl *Taq*-Polymerase zugegeben.

PCR-Programm:

Start	99°C	50 s
Denaturierung	95°C	45 s
Annealing	56°C*	45 s
DNA-Synthese	73°C	1,30 min
Schluss-Synthese	70°C	10 s
Lagertemperatur	4°C	∞

*primerabhängige Annealing-Temperatur

Die PCR wurde mit 40 Zyklen durchgeführt.

2.5.1.3.4 Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA

Nach der PCR wurde in einem 1,2%igen Agarosegel überprüft, ob die gewünschten DNA-Fragmente amplifiziert worden waren. Hierzu wurden je 10 µl Probe mit 3 µl loading dye versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V in 1 × TAE-Puffer durchgeführt. Anhand einer DNA-Leiter (DNA-Ladder-Plus, Fermentas, St.Leon-Rot) konnte die Größe des Fragmentes unter UV-Licht bestimmt werden. Auf diese Weise konnte man nachweisen, ob in der Probe entsprechende Fragmente des GFLV enthalten waren.

2.5.2 Nachweis des GFLV mit DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)

Das Grapevine Fanleaf Virus lässt sich ebenso mit Hilfe des ELISA-Tests serologisch nachweisen [Clark und Adams, 1977]. Hier wurde die DAS-ELISA Technik (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) angewandt, in der zwei Antikörper verwendet werden. Diese binden spezifisch an unterschiedliche Stellen des zu detektierenden Antigens, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entsteht. Der zweite Antikörper ist mit einer alkalischen

Phosphatase konjugiert, wodurch bei Zugabe des entsprechenden Substrats eine Farbreaktion hervorgerufen wird.

Durchführung des DAS-ELISA

1) Aufarbeitung der Proben

Es wurde jeweils 1 g Pflanzenmaterial eingewogen und in spezielle Extraktionsbeutel (12x14 cm mit Innenwand, Bioreba AG, Reinach, Schweiz) gegeben. Den Proben wurde Extraktionspuffer zugegeben, so dass sie 1:10 verdünnt waren. Danach wurden sie mit einem Probenaufbereitungsgerät (Homex 6, 110W, 230V, Bioreba AG, Reinach, Schweiz) homogenisiert.

2) Beschichtung der Microtiterplatten

Der Beschichtungsantikörper (Polyklonaler Antikörper, IgG anti-rabbit, Bioreba AG, Reinach) wurde im Beschichtungspuffer 1:1000 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 200 µl pro Probe in die Microtiterplatten pipettiert und die Platten vier Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer waren die Platten gebrauchsfertig. Hier stellte der ELISA Plate Washer (Easy Wash 2000, Bioreba AG, Reinach, Schweiz) automatisch eine 1:2 Verdünnung des 50 x Waschpuffers mit der entsprechenden Menge Wasser her.

3) Probenzugabe

Von der mit Extraktionspuffer behandelten Probensuspension wurden jeweils 200 µl Probe in die wells pipettiert und die Platten über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Für jede Probe erfolgte ein Doppelansatz.

4) Konjugatzugabe

Nach dreimaligem Waschen der Microtiterplatten wurden 200 µl des konjugierten IgG (monoklonales IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, Bioreba-AG, Reinach, Schweiz) in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Proben gegeben und vier Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5) Substratzugabe

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe des Substrats 4-Nitrophenylphosphat, gelöst in Substratpuffer (1:1000). Die Platten wurden im Dunkeln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubation spaltet die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers den Phosphatrest vom farblosen Substrat ab, so dass eine gelbe Farbreaktion (Nitrophenol) sichtbar wird. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Platten an einem Photometer (GENios Plus, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim; Software: Magellan Standard V.5) bei 450 nm vermessen, wobei die Farbintensität proportional ist zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

2.6 FÄRBEMETHODEN

Um die Reaktion der Wurzel auf die Besaugung durch *Xiphinema index* zu untersuchen, wurden zwei Färbemethoden verwendet. Mit der NBT-Färbung (Nitroblau-Tetrazolium) sollte die Bildung von Superoxidradikalen, die bei einer aktiven Abwehrreaktion der Pflanze entstehen, untersucht werden. Die Anillinblau-Färbung wurde verwendet, um Calloseeinlagerungen in die Zellwände der Pflanzenzelle nachzuweisen.

2.6.1 Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT)

Um die Bildung von Superoxidanion-Radikalen in der Wurzel zu untersuchen, wurden diese, wie bei Hückelhoven und Kogel [1998] und bei Trujillo *et al.* [2004] beschrieben, mit NBT angefärbt. Das Nitroblau-Tetrazolium reagiert im Wurzelgewebe mit Sauerstoffradikalen. An dieser Stelle wird eine Blaufärbung sichtbar.

Es wurden sowohl frisch besaugte als auch unbesaugte Wurzeln in einer 0,1 %igen NBT-Lösung inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Wurzeln in eine Lösung aus 0,15 % Trichloressigsäure in 4:1 Ethanol/Chloroform eingelegt, um die Färbereaktion

zu stoppen. Anschließend wurden die Wurzeln unter dem Mikroskop betrachtet

2.6.2 Anilinblau-Färbung

Die Färbung wurde, wie bei Hood & Shew [1996] beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden die Wurzeln mit einer Anilinblau-Färbelösung 5-10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. von der überflüssigen Färbelösung befreit und unter dem Mikroskop (Axiophot mit differentiellm Interferenzkontrast (DIK), Epifluoreszenz (HBO 100W) und Plan-Neoluar-Objektiven/AxioVision 3.1.2.1 Release 3.1 Bild-bearbeitungssoftware) untersucht.

2.7 BIOTESTS

In unterschiedlichen Biotests wurden die Reaktionen von Wurzeln verschiedener Rebpflanzen auf die Besaugung von *X. index* untersucht. Dazu wurde ein *in-vitro*-Testsystem für die sterilen Rebenstecklinge und für die dementsprechenden Gewächshauspflanzen entwickelt. Es wurde besonders auf Unterschiede im Reaktionsverhalten der Wurzeln innerhalb der verwendeten *Vitis rotundifolia*- und *Vitis rotifomentosa*-Hybride geachtet. Zusätzlich wurden Versuche zum Wanderungsverhalten von *X. index* durchgeführt und Unterschiede bezüglich der Wirtswahl dokumentiert. Dafür wurden frisch gekeimte Rebensämlinge oder gesäubertes Wurzelmaterial verwendet. Des Weiteren wurde die Resistenzinduktion von Rebenstecklingen durch ein Phytohormon überprüft.

2.7.1 Untersuchung der Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte

Auf den Boden einer Petrischale wurden von der Mitte ausgehend konzentrische Kreise im Abstand von je 1 cm voneinander aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Aufsetzung von 25 Nematoden in die Mitte des innersten Kreises (Abb. 12). Nach jeweils 2, 4, 8 min usw. bis 256 min wurde die Anzahl der einzelnen Nematoden in

den jeweiligen Ringen (1 - 4) protokolliert. In der Versuchsauswertung wurde die Anzahl der Nematoden pro cm^2 ermittelt. Dieser Versuch wurde fünfmal wiederholt. Um festzustellen, wie sich *X. index* auf einer Agarplatte ausbreitet, wenn ihm kein Stimulus angeboten wird, wurde folgender Test durchgeführt.

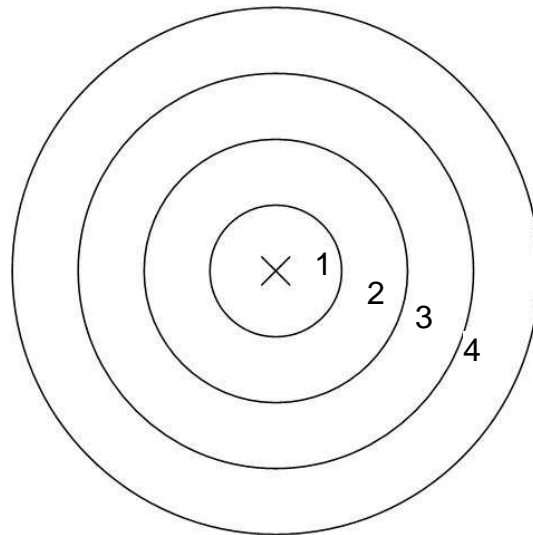


Abb. 12. Versuchsaufbau zur Ausbreitung von Nematoden: Agarplatte mit konzentrischen Ringen (1-4). Im Zentrum (X) wurden die Nematoden aufgesetzt.

2.7.2 Wanderungstests

In diesen Tests sollte durch unterschiedliche Versuchsansätze untersucht werden, ob es sich bei der Auffindung der Nahrungsquelle um eine gerichtete Bewegung der Nematoden handelt. Den Nematoden wurden Stimuli in jeweils zwei Sektoren auf einer Agarplatte angeboten. Die Versuche wurden pro Variante mindestens zehnmal durchgeführt.

Dazu wurden Rebsamen von *Vitis spec.*, wie in 2.3.4 beschrieben, auf 0,8 %igem Wasseragar kultiviert. Die Petrischale wurde durch eine Linie halbiert, wovon eine Hälfte wiederum in zwei Sektoren aufgeteilt wurde. Die Samen wurden auf dem Agar so platziert, dass sie sich in den Vierteln der oberen Hälfte der Petrischale befanden (Abb. 13).



Abb.13: Versuchsansatz zum Wanderungstest
(rechts: Loch;links: vakante Stelle des Sämlings).

Eine bestimmte Anzahl von *X. index* wurde in die Mitte der sich gegenüberliegenden Seiten der Sektoren auf den Agar aufgesetzt. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und während des Versuches im Labor im Dunkeln aufbewahrt. Alle 30 Minuten wurden die Nematoden in den einzelnen Sektoren ausgezählt. Die jeweiligen Versuchsansätze sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6. Versuchsansätze des Wanderungsversuches

Versuch 1 (V 1)	Rebsame gekeimt	Rebsame ungekeimt
Versuch 2 (V 2)	Rebsame gekeimt	Stein
Versuch 4 (V 3)	Rebsame gekeimt	Rebsame gekeimt, entfernt

Um auszuschließen, dass *X. index* doch von eventuell abgegebenen Stoffen des ungekeimten Samens (Versuch 1) angelockt wird, wurde dieser in einem zweiten Versuchsansatz durch einen Stein ersetzt (Versuch 2). Außerdem sollte untersucht werden, ob *X. index* auch noch gezielt die Stelle des gekeimten Samens aufsucht, wenn dieser nach der Keimung entfernt wurde. In einem entsprechenden Versuch wurde daher getestet, wie sich die Nematoden verhalten, wenn ihnen ein gekeimter Same und der Keimbereich eines entfernten Sämlings angeboten werden (Versuch 3).

Die in Tabelle 6 beschriebenen Versuchsansätze wurden verwendet, sobald die Sämlinge die ersten Wurzeln gebildet hatten. In dem Versuchsansatz V 3 wurde der Sämling direkt vor Versuchsbeginn entfernt.

Für jeden Versuchsansatz wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden in dem jeweiligen Sektor bestimmt. Anschließend wurde die Präferenz der gewanderten Nematoden mit Hilfe des Präferenzwertes P ermittelt (Gl. 1). Hier wurde überprüft, um wie viel größer die Anzahl an gewanderten Nematoden am gekeimten Samen ist, und deren prozentualer Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt.

$$P [\%] = \frac{\text{Anzahl Nematoden (Samen gekeimt)} - \text{Anzahl Nematoden (v)}}{\sum \text{gewanderte Nematoden gesamt}} \times 100$$

(Gl. 1)

Die Anzahl Nematoden (v) entspricht der Anzahl der gewanderten Nematoden in die jeweilige Alternativvariante zum gekeimten Samen auf der gleichen Agarplatte.

Darüberhinaus sollte getestet werden, ob der Nematode auf in das Agarmedium abgegebene Wurzelexudate reagiert. Die Versuche wurden in unterschiedlichen Zeitabständen durchgeführt, um die Attraktivität und Stabilität abgebener Wurzelexudate nach dem Entfernen der Pflanze zu überprüfen.

Es wurde damit auch untersucht, ob *X. index* auch noch gezielt die Stelle des gekeimten Samens aufsucht, wenn dieser nach der Keimung entfernt wurde. Da an der Stelle des entfernten Samens ein Loch entstanden war, wurde dem Nematoden im zweiten Sektor auf der Agarplatte ebenfalls eine Vertiefung angeboten. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass der Nematode allein auf eine strukturelle Veränderung im Agar reagiert.

Für diesen Versuchsansatz V4 wurde ein Nematode von *X. index* in die Mitte der sich gegenüberliegenden Seiten der Sektoren auf den Agar aufgesetzt. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und während des Versuches im Labor im Dunkeln aufbewahrt. Im Abstand von je 15 min wurde der Sektor notiert, in dem sich der Nematode aufhielt.

2.7.3 Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel

Es wurden Versuche mit verschiedenen Wurzelabschnitten von *Vitis vinifera* cv. Spätburgunder durchgeführt. Die Gewächshausreben wurden aus den Töpfen herausgenommen und pro Pflanze jeweils eine langgewachsene Wurzel vorsichtig aus der Erde entfernt, ohne sie von der Pflanze abzutrennen und mit Wasser gereinigt. Die Rebe mit dem übrigen Wurzelwerk wurde in eine Tüte gepackt, um eine Austrocknung zu verhindern. Die jeweiligen Wurzeln wurden von den Wurzelspitzen ausgehend bis zum verholzten Teil nach Messung des Durchmessers in Kategorien (Wurzeln 1-4. Ordnung s. Abb.14-17) eingeteilt [Bleyer, 1991]:

- 1.Ordnung: Wurzelspitzen: Ø 0,2 mm - 0,4 mm
- 2.Ordnung: hinter Streckungszone: Ø 0,9 mm - 1,2 mm
- 3.Ordnung: leicht verholzter Teil :Ø 1,3 mm - 1,5 mm
- 4.Ordnung: verholzter Teil: Ø 1,6 mm - 1,7 mm

Die so eingeteilten Wurzeln wurden jeweils in Petrischalen (Ø 9 cm), die mit einer Öffnung versehen waren, eingeleitet. Dann wurde Agarmedium (0,8 %) in die Schalen eingegossen, so dass die Wurzeln vollständig bedeckt waren [Wyss, 1999]. Nach Erkalten des Mediums wurden 50 *Xiphinema index* am Rand jeder Petrischale aufgesetzt. Nach 3, 6, 9 und 12 Tagen wurden die Nematoden, die sich an und in direkter Nähe der Wurzel befanden mit Hilfe eines Binokulars (Leica, Wetzlar) ausgezählt.



Abb.14: Wurzel 1.Ordnung mit Haarwurzeln (Pfeil).



Abb.15:Wurzel 2.Ordnung (ohne Haarwurzeln).



Abb.16: Wurzel 3.Ordnung, leicht verholzt.



Abb.17: Wurzel 4.Ordnung, verholzt.

2.7.4 Attraktivität eines *Vitis rotundifolia* und eines *Vitis rufotomentosa*-Hybrids gegenüber der Standardunterlage Kober 5BB

Abgetrennte Wurzelteile von *Vitis rotundifolia* und *Vitis rufotomentosa*-Hybriden wurden von der Erde befreit und mit Wasser gewaschen. Als Kontrolle dienten die Wurzeln der Standard-Unterlage Kober 5BB. Alle Wurzelteile wurden jeweils in Petrischalen (\varnothing 9 cm) mit Agarmedium (0,8 % / 35°C) eingegeben. Nach Erkalten wurden anschließend 40 *X. index* am Rand der Petrischale aufgesetzt (Abb.18). Die Anzahl der Nematoden an und in direkter Nähe der Wurzeln wurde täglich über einen Zeitraum von 12 Tagen mit Hilfe eines Binokulars (Leica, Wetzlar) bestimmt. In einem Teilversuch wurden Sämlinge der Testpflanzen Kober 5 BB und des *V. rotundifolia*-Hybrids 16 in einem Gefäß zusammen ausgekeimt und getestet.



Abb.18: Wurzelstücke in Agarmedium eingegossen.

2.7.5 Attraktivität von inaktivierten Wurzeln

Da bei dem vorherigen Versuch mit lebenden Wurzeln gearbeitet wurde, sollte in diesem Versuch die Attraktivität von toten Wurzelteilen getestet werden. Dazu wurden abgetrennte Wurzelteile von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau von der Erde befreit und mit Wasser gewaschen. Die Wurzelteile, die als Kontrolle dienten, wurden dann in Petrischalen (\varnothing 9cm) mit Agarmedium (0,8% / 35°C) eingegossen. Die Inaktivierung von Wurzelteilen erfolgte durch fünfminütiges Kochen in Wasser. Danach wurden auch diese Wurzeln sofort in Agarmedium eingegossen. Nach Erkalten des Mediums wurden anschließend 40 *Xiphinema index* am Rand der Petrischale aufgesetzt (Abb.18). Die Anzahl der Nematoden an und neben den Wurzeln wurde täglich über einen Zeitraum von 12 Tagen mit Hilfe eines Binokulars (Leica, Wetzlar) bestimmt.

2.7.6 Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat

Mit diesem Versuch sollte durch das Pflanzenhormon Methyljasmonat eine induzierte Abwehrreaktion der Rebwurzeln gegenüber *Xiphinema index* erzielt werden. Dieser Versuch wurde bereits in ähnlicher Weise mit Hafer (*Avena sativa*) und dem Zystennematoden *Heterodera avenae* durchgeführt [Soriano *et al.*, 2004].

Gut bewurzelte *in-vitro*-Grünstecklinge der Standardunterlage Kober 5BB, in LS-Medium angezogen, wurden in einer Sterilbank vorsichtig aus dem Medium herausgezogen. Die Stecklinge wurden samt Wurzeln in ein steriles Deckelglas, gefüllt mit 25 ml Aqua dest., überführt. Zu den 25 ml Aqua dest. wurde vor der Zugabe der Pflanze das Pflanzenhormon Methyljasmonat (5 µM) appliziert. Die Kontrollen waren unbehandelt. Die Deckelgläser mit den Pflanzen wurden luftdicht verschlossen und für 3 Tage in eine Klimakammer bei 25 °C und 16 h Photoperiode gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Pflanzen in Lebensmittelbecher mit Agarmedium (0,8 % / 35°C) eingegossen. Nach Erkalten des Mediums wurden pro Becher 40 Nematoden aufgesetzt. Die Ansätze wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und täglich die Anzahl der Nematoden an und bei den Wurzeln bestimmt.

2.8 PRAXISORIENTIERTE FREILAND- UND GEWÄCHSHAUSVERSUCHE

2.8.1 Bonitur und Untersuchung der Virusinfektion mittels DAS-ELISA in Rebanlagen

Um das Vorkommen des GFLV im Freiland zu dokumentieren, wurden zwei Reblflächen ausgewählt, von denen ersichtlich war, dass sie Rebstöcke mit Virussympomen enthalten. Die Flächen befanden sich in Sasbach und in Bahlingen, im Weinanbaugebiet Kaiserstuhl. In diesen Flächen wurden von 2004 bis 2006, jährlich zu Beginn des Sommers visuelle Bonituren auf die Symptom-ausprägung durchgeführt. Vor der Bonitur wurden sowohl die Zeilen als auch die einzelnen Rebstöcke der Fläche nummeriert. In der visuellen Bonitur wurden die einzelnen Stöcke begutachtet und auffällige Reben auf einem Pflanzplan markiert. Dabei wurden die Pflanzen in folgende Kategorien eingeteilt:

verdächtig	auffällige Blattform, verkürzte Internodien, Durchrieseln der Gescheine und/oder auffälliger Wuchs
eindeutig virös	Panaschüren auf den Blättern, kümmerlicher Wuchs
potenziell virös	Petersilienblättrigkeit

Anschließend wurden an den Stellen, die vermehrt auffällige oder kranke Reben zeigten, von mehreren Stöcken Blattproben entnommen. Diese wurden anhand eines ELISA-Tests auf GFLV hin untersucht. Bei der Entnahme der Blattproben wurde an einem Stock von verschiedenen Stellen der Laubwand ca. 1 g Blattmasse gesammelt und in Extraktionsbeuteln für den ELISA-Test (Extraktionsbeutel 12×14 cm mit Innenwand, Bioreba AG, Reinach, Schweiz) aufbewahrt. Die Blattproben wurden noch am selben Tag, wie in 2.5.2 beschrieben, aufbereitet.

Aus den beiden Flächen wurden zudem Bodenproben gesammelt. Mit Hilfe eines Bohrstocks wurden an neun Stellen, gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt, jeweils zwischen den Rebstöcken in 30 cm Tiefe Proben entnommen und einzeln in Plastiktüten verpackt. Die Bodenproben wurden gekühlt aufbewahrt, mit der in 2.4.2 beschriebenen Methode ausgewaschen und auf Individuen von *X. index* untersucht.

2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Berechnungen wurden zum größten Teil mit Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Die Darstellung der Mittelwerte erfolgte in den Tabellen, Abbildungen und im Text in der Regel unter Angabe der Standardabweichung (SD). In einigen Abbildungen wurde aus Übersichtlichkeitsgründen auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet. Je nach Notwendigkeit wurde mittels des Newman-Keuls-Tests (ANOVA) auf Signifikanz der Ergebnisse getestet.

Bei der Auswertung der Wanderungsversuche wurde eine Regressionsgerade durch die Mittelwerte der gewanderten Nematoden gelegt und der Regressionskoeffizient gegen Null geprüft. In der Auswertung eines Wanderungsversuchs (Versuch 3) wurde die Zeitreihe auf Trendänderung überprüft. Hierzu wurde der Vorzeichen-Trendtest von Cox und Stuart verwendet [Sachs, 1984]. In den Wanderungsversuchen V1–V3 wurden die Regressionskoeffizienten b_{xy} der jeweiligen Regressionsgeraden anhand des entsprechenden t-Tests gegen Null geprüft [Sachs, 1984].

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Versuche, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden gliedern sich in folgende Themenbereiche:

1. Zunächst wurden unterschiedliche Kreuzungen von Testreben auf deren Eignung als Wirtspflanze gegenüber *X. index* untersucht. Mit Hilfe des entwickelten *in-vitro*-Testsystems war es möglich detaillierte Einblicke in das Wurzel-Nematoden-System zu gewinnen. Dabei konnten die Wurzelreaktionen der Testreben beobachtet werden.
2. Daraufhin wurden die verwendeten Testreben auf deren Resistenzeigenschaften gegenüber der Transmission des GFLV durch *X. index* geprüft. Neben der visuellen Beobachtung der Saugtätigkeit der Nematoden durch das *in-vitro*-Testsystem wurde die Übertragung des GFLV anhand einer RT-PCR überprüft. Des Weiteren wurden Abwehrreaktionen der befallenen Rebwurzeln durch den Nachweis von Abwehrgen-Transkripten und durch spezifische Farbreaktionen im Gewebe charakterisiert.
3. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Biotests, die über das Wanderungsverhalten und die Wirtswahl von *X. index* Aufschluss geben sollen. Dabei wurde die Zeitdauer und die genaue Lokalisierung von Nahrungsquellen durch die Nematoden getestet. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Attraktivität von Rebwurzeln für *X. index* durch Wurzelinaktivierung oder Phytohormonzugabe veränderte.
4. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Symptomatik des GFLV an Reben im Freiland untersucht. Dazu wurden zwei befallene Rebflächen kartiert und über mehrere Jahre auf Virussymptome bonitiert sowie ELISA-Proben entnommen, um ein mögliche Infektion durch virusübertragende Nematoden zu überprüfen.

3.1 ENTWICKLUNG EINES STERILEN *IN-VITRO*-TESTSYSTEMS ZUR BEOBACHTUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN *IN-VITRO*-SÄMLINGEN UND STECKLINGEN DER VERWENDETEN REBPFLANZEN UND *XIPHINEMA INDEX*

Um ein gemeinsames System für Nematoden und Rebpflanzen zu entwickeln, war es notwendig, als ersten Schritt ein geeignetes Medium für beide Organismen zu finden. Da das für die *in-vitro*- Rebenstecklinge verwendete Medium nicht transparent genug für Beobachtungen und vor allem nicht als Substrat für die Nematoden geeignet war, mussten die Pflanzen in anderes Medium eingebettet werden. Daher wurden in einem weiteren Schritt verschiedene Konzentrationen des Agarmediums ausprobiert, um die optimalen Bedingungen für *X. index* zu bestimmen.

Am geeignetsten erwies sich 0,8 % Bacto-Agar, bei dem die Gallenbildung an Feigenwurzeln im Gegensatz zu Plant-Agar schon zwei Tage nach dem Aufsetzen der Nematoden einsetzte (Abb.19).

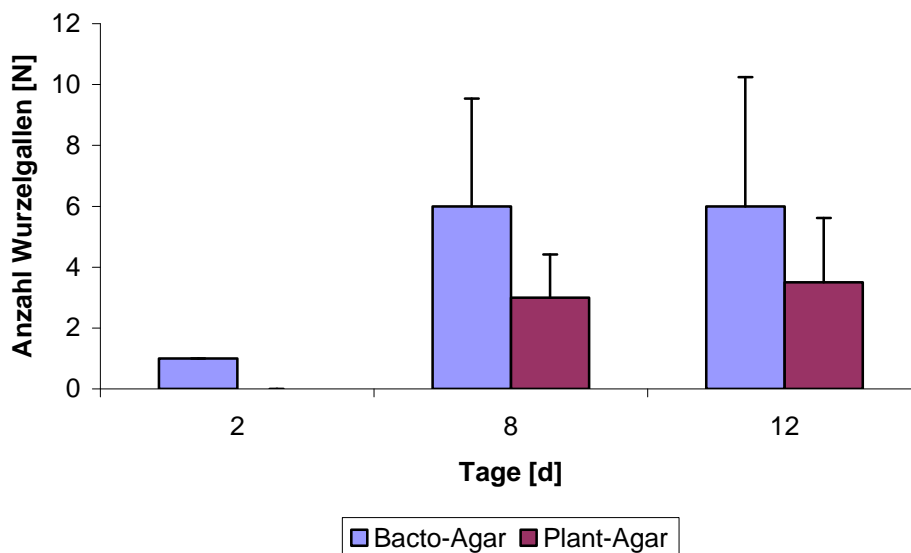


Abb.19: Bildung von Wurzelgallen an Feigensämlingen (*Ficus carica*) durch die Saugtätigkeit von *X. index* in zwei unterschiedlichen Agarmedien

Um nun die Reaktion der unterschiedlichen *Vitis*-Unterarten zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Sämlinge und *in-vitro*-Stecklinge von verschiedenen Testpflanzen (Tabelle 1

und 2), die bereits Wurzeln gebildet hatten, mit *X. index* inokuliert. Die *in-vitro*-Sämlinge wurden direkt mit Nematoden beimpft, da sie zuvor auf 0,8%igem Wasseragar (s. 2.3.4.) ausgekeimt waren. Die Grünstecklinge wurden für die Testung aus dem LS-Medium in der Sterilbank vorsichtig herausgezogen und anschließend die Wurzeln in 0,8%igen Wasseragar (35 °C) eingegossen. Nach Erkalten des Mediums wurden die Nematoden aufgesetzt (Abb.20). In bestimmten Zeitabständen wurden die sichtbaren Reaktionen der Wurzeln und das Verhalten der Nematoden beobachtet. Die Inokulation mit virustragenden Nematoden wurde nach 3-4 Wochen abgebrochen und die Pflanzen molekularbiologisch auf die Übertragung des GFLV getestet (s.2.5.1.1.).



Abb.20: *in-vitro*-Steckling mit Nematoden.

3.1.2 Verwendung eines semi-sterilen *in-vitro*-Testsystems zur Beobachtung der Interaktion zwischen Gewächshausreben und *Xiphinema index*

Für die Testung der Versuchspflanzen wurden gut bewurzelte Holzstecklinge aus dem Gewächshaus verwendet. Für diese Art der Untersuchung war es notwendig, die jeweilige Wurzel der zu testenden Pflanze in ein transparentes Medium zu überführen, da nur so detaillierte Beobachtungen möglich waren. Dazu wurde ein Wurzelzweig der zu untersuchenden Pflanze von der Erde befreit und mit Wasser gewaschen. Dieses Wurzelstück wurde in eine Petrischale eingeleitet, die mit einer Öffnung versehen war. Danach wurde 0,8 % Agarmedium (35 °C) eingefüllt

[Weischer & Wyss, 1976]. Nach Erkalten des Mediums wurden die Nematoden aufgesetzt (Abb.21).



Abb.21: Topfrebe mit in eine Petrischale eingeleiteter Wurzel.

3.2 REAKTION VON *IN-VITRO*-STECKLINGEN UND SÄMLINGEN VON *VITIS SPEC.* AUF DIE BESAUGUNG DURCH *XIPHINEMA INDEX*

In diesem Versuch wurden die Reaktionen verschiedener Testpflanzen aus dem Sortiment des Weinbauinstituts Freiburg nach der Besaugung des Nematoden *X. index* untersucht. Die ausgewählten Pflanzen wurden ehemals von Dr. G. Staudt am Staatlichen Weinbauinstitut angepflanzt. Einige Testnummern dieser Pflanzen wurden anhand früherer Resistenzkriterien nach Dr. G. Staudt für die Resistenzprüfung in dieser Arbeit verwendet (Tab.7). Die Resistenzprüfung auf die Transmission des GFLV wurde in früheren Versuchen am Weinbauinstitut ausschließlich mit Gewächshaus-Pflanzen in Erde durchgeführt. Anhand der ELISA-Testung wurden die Pflanzen auf eine Infektion mit dem GFLV untersucht. Der prozentuale Anteil an virusinfizierten Pflanzen nach der Resistenzprüfung von Staudt ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Es wurden *in-vitro*-Stecklinge und wildbestäubte Sämlinge der verschiedenen Testpflanzen verwendet. Es wurden mindestens fünf Pflanzen pro Testrebe überprüft.

Sowohl die *in-vitro*-Stecklinge (Tab.7) als auch die Sämlinge (Tab.8) innerhalb einer Kreuzung zeigten identische Wurzelreaktionen. Es handelte sich aber um unterschiedliche Genotypen bei den einzelnen Kreuzungen, die zum Teil aus Davis (U.S.A.) oder Südfrankreich stammten. Nach der Besaugung der Wurzeln durch die Nematoden waren entweder Gallen oder Nekrosen sichtbar. Dies wurde als ein Kriterium für die Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber *X. index* bewertet (McKenry *et al.* [2001]).

Tab.7: Übersicht von Wurzelreaktionen der *in-vitro*-Stecklinge auf die Besaugung durch *X. index*.

Testpflanze ^a (Anzahl der Pflanzen)	Kreuzung	Wurzelreaktion	Transmission des GFLV nach Staudt (%) [*]
10 (5)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i> ¹	Nekrosen	0
16 (8)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i> ¹	Nekrosen/k. Reak.	0
35 (6)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i> ¹	Gallen	0
42 (12)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i> ¹	Nekrosen	0
46 (15)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. rotundifolia</i> ¹	Nekrosen	0
91 (8)	<i>V. solonis</i> ²	Gallen	0
136 (5)	<i>V. cinerea</i> ³	Gallen	0
140 (16)	<i>V. rotundifolia</i> × <i>V. vinifera</i> ⁴	Nekrosen	0
141 (15)	<i>V. rotundifolia</i> × <i>V. vinifera</i> ⁴	Nekrosen	0
173 (11)	<i>C.v. Ramsey</i> ³	Gallen	22
<i>Muscadinia dulcet</i> (1)	<i>Muscadinia dulcet</i> ⁵	keine Reaktion	nicht getestet
<i>Muscadinia regale</i> (1)	<i>Muscadinia regale</i> ⁵	keine Reaktion	nicht getestet
Kober 5 BB (25)	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> ⁶	Gallen	100
Kober 125 AA (23)	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> ⁶	Gallen	92

* es wurden von Staudt jeweils 100 Pflanzen pro Genotyp getestet

^a Die Nummerierung entspricht der internen Standortnummer des Weinbauinstitutes.

¹ *V. rotundifolia*-Elternteil resistent gegenüber dem GFLV [Staudt & Weischer, 1992]

² Resistenz gegenüber dem GFLV [Kunde *et al.*, 1968]

³ Resistenz gegenüber dem GFLV [Staudt, nicht veröffentlicht]

⁴ *V. rotundifolia*-Elternteil resistent gegenüber dem GFLV [Kunde *et al.*, 1968]

⁵ Resistenz gegenüber dem GFLV [Walker, *et al.*, 1989]

⁶ Anfällig gegenüber dem GFLV [Sopp *et al.*, 1998; Staudt, nicht veröffentlicht]

Tab.8: Übersicht über die Wurzelreaktionen der Sämlinge auf die Besaugung durch *X. index*.

Testpflanze^a	Samen 2003 (Anzahl der Pflanzen)	Samen 2004 (Anzahl der Pflanzen)	Samen 2005 (Anzahl der Pflanzen)	Samen 2006 (Anzahl der Pflanzen)
10	--	--	--	--
16	Gallen/Nekr. (25)	--	--	--
35	--	--	--	--
42	--	Nekrosen (5)	Nekrosen (4)	Nekrosen (4)
46	--	--	--	--
91	--	--	Gallen (8)	Gallen (3)
136	Gallen (6)	--	--	--
140	Nekrosen (12)	--	Nekrosen (10)	Nekrosen (8)
141	Nekrosen (14)	--	Nekrosen (10)	Nekrosen (9)
173	Gallen (11)	--	--	--
<i>M. dulcet</i>	--	--	--	--
<i>M. regale</i>	--	--	--	--
Kober 5 BB	Gallen (15)	Gallen (22)	Gallen (25)	Gallen (28)
Kober 125 AA	Gallen (12)	Gallen (21)	Gallen (25)	Gallen (19)

^a Die Nummerierung entspricht der internen Standortnummer des Weinbauinstitutes.

-- = Keine Samen vorhanden oder nicht gekeimt.

Bei den *in-vitro*-Stecklingen der Standard-Unterlagen Kober 125 AA und Kober 5 BB war bereits innerhalb von 24 Stunden nach der Inokulation eine Saugtätigkeit der Nematoden an den Wurzeln sichtbar. Während die Nematoden Wurzeln innerhalb der Agarschicht (0,8%) besaugten, waren die auf der Oberfläche des Agarmediums liegenden Wurzeln unattraktiv. Die Saugtätigkeit fand bevorzugt an den Wurzelspitzen oder im Bereich der Streckungszone statt. Die Wurzeln wurden zuerst abgetastet bevor das Stylet in die Wurzelzellen eingeführt wurde. Danach war sogleich das Pulsieren des oesopagischen Bulbus erkennbar. Durch die Saugtätigkeit immer mehr zugewanderter Nematoden entstand innerhalb weniger Tage an der Wurzelspitze eine endständige Galle. An diesen Gallen war in den meisten Fällen eine Akkumulation von mehreren Nematoden zu sehen. Die Nematoden hatten an den Wurzelgallen eine Verweildauer von mehreren Minuten bis zu einigen Tagen. Wurden die Gallen verlassen, so konnte immer wieder eine Rückkehr zu diesen Stellen beobachtet werden. Mit der fortwährenden Saugtätigkeit war eine

Braunfärbung der Wurzelgallen feststellbar (Abb.22). Außerdem konnte bei stark besaugten Wurzelgallen nach 2-3 Tagen zusätzlich eine Eiablage der Weibchen beobachtet werden. Die Eier wurden in unmittelbarer Nähe der Wurzelgalle platziert. Das Schlüpfen der Larven erfolgte innerhalb weniger Tage. Einige der getesteten *in-vitro*-Stecklinge der Reben reagierten mit typischer Wurzelgallenbildung, andere dagegen mit der Ausbildung von Nekrosen (Tab.7). Bei den nekrosenbildenden Testpflanzen trat aufgrund der späteren, erst nach 1-2 Tagen beobachteten Saugtätigkeit der Nematoden eine sichtbare Abwehrreaktion an den Wurzeln auf. Durch die Saugtätigkeit waren lokal begrenzte, braune Bereiche, sogenannte Nekrosen entstanden. Diese waren in unmittelbarer Nähe oder direkt an der Wurzelspitze aufgetreten (Abb.23). Bei der Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) war in den meisten Fällen keine Reaktion der Wurzeln, mit Ausnahme einer einmaligen Nekrosenbildung, feststellbar. Es dauerte mehrere Tage bis hier eine Saugtätigkeit zu sehen war. Zuvor waren die Nematoden willkürlich im Agarmedium umhergewandert. Bei den Wildarten *Muscadinia dulcet* und *Muscadinia regale* war keine Saugtätigkeit der Nematoden und somit keine Reaktion der Wurzeln sichtbar. Allerdings konnte die Testung nur an jeweils einer Pflanze durchgeführt werden. Nachdem alle Testpflanzen auf deren Reaktion der Wurzeln untersucht waren, wurden einige der Testpflanzen für die Transmissionsversuche mit dem GFLV ausgewählt.

Die angezogenen Sämlinge der Testpflanzen aus aufeinanderfolgenden Jahren zeigten bis auf eine Ausnahme durchweg identische Wurzelreaktionen wie die Elternpflanzen auf die Besaugung durch *X. index*. Nur die Samen der Testpflanze 16 aus dem Jahr 2003 zeigten bei manchen Sämlingen eine Gallenbildung und bei wieder anderen Sämlingen eine Nekrosenbildung. Leider waren nicht von allen Jahrgängen Samen vorhanden oder keimfähig. Die Wildarten *Muscadinia dulcet* und *Muscadinia regale* bildeten in keinem Jahr Blütenstände und somit auch keine Samen (Tab.8).



Abb.22: Wurzelgalle mit Nematoden und Eiern (E) an der Standard-Unterlage Kober 125 AA.



Abb.23: Nekrosenbildung (braune Bereiche) bei der Testpflanze 42.

3.3 NACHWEIS DES GFLV IN *VITIS SPEC.* MIT RT-PCR

3.3.1 Nachweis des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen und in Pollen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Vorkommen von viraler RNA in verschiedenen Teilen von virustragenden Rebpfanzen des Weinbauinstitutes, die als Positivkontrollen für die ELISA-Testung dienen, untersucht. Diese Pflanzen zeigten eindeutige Virussympptome und waren in der ELISA-Testung positiv. Mit diesen Untersuchungen sollte die Eignung der PCR-Methode überprüft werden, die einen viel empfindlicheren Nachweis von GFLV ermöglicht. Neben Wurzeln, Stängel, Blättern und Beeren wurde auch eine RNA-Extraktion aus Pollen von infizierten Rebpfanzen durchgeführt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Amplifizierung wurden Primer für die 18S-rRNA verwendet. Der Nachweis des GFLV in infizierten Rebpfanzen diente somit als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Detektion. Der Nachweis der GFLV in allen Pflanzenteilen wurde mindestens dreimal durchgeführt.

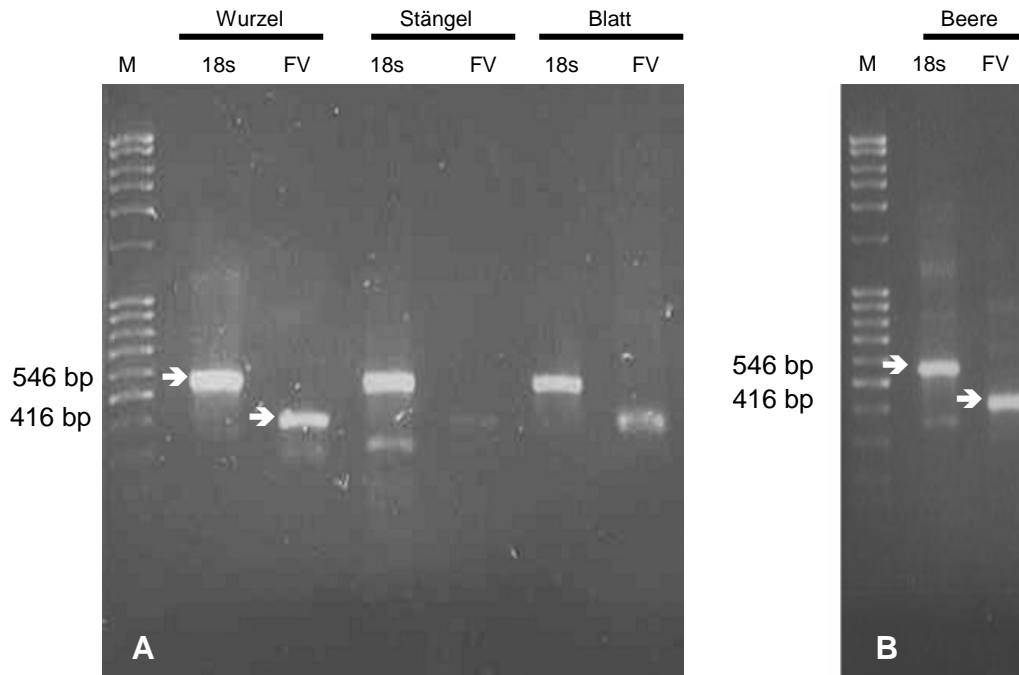


Abb.26: Nachweis von Virus-RNA in Wurzel-, Stängel, Blatt (A) und Beerenmaterial (B) von GFLV-infizierten Rebpfanzen. Die Amplifikation der Fragmente 18s rRNA (546bp) und FV (416 bp) erfolgte mit spezifischen Primern; M=Marker.

Die virale RNA des GFLV war in allen Pflanzenteilen wie Wurzeln, Stängel, Blatt und Beeren von infizierten Reben nachweisbar. Die spezifischen Primer wurden so gewählt, dass sie ein PCR-Produkt für die 18srRNA von 546 bp und für das GFLV von 416 bp aus dem konservierten Bereich des Coat-Proteins lieferten [Andret-Link *et al.*, 2004]. Eine erfolgreiche Amplifizierung des GFLV-Fragments ist in der Abbildung 26 ersichtlich. In dieser Abbildung ist das jeweilige GFLV-Fragment (416 bp) der getesteten Pflanzenteile dargestellt. Die Bande des Expressions-Produktes der Stängelprobe war bei dreimaliger Wiederholung immer nur schwach erkennbar (Abb.26 Spur 5). Die virale RNA des GFLV ist auch im Pollen von infizierten Rebpfanzen nachweisbar (Abb.27). Außerdem konnte das GFLV in Sämlingen von infizierten Pflanzen gefunden werden (ohne Abbildung).

Aufgrund der unterschiedlichen Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer (18s-rRNA 61 °C; FV-Primer 55 °C) sind zum Teil Doppelbanden sowie mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Banden sichtbar. Aufgrund des geringen RNA-Gehaltes in der Stängelprobe von Rebpfanzen, war es außerdem erforderlich die

Zyklenzahl der PCR anzuheben, um das amplifizierte Fragment ausreichend darzustellen.



Abb.27: Nachweis von Virus-RNA in Pollen von GFLV-infizierten und nicht-infizierten (Kontrolle) *Vitis spec*-Pflanzen. Die Amplifikation der Fragmente 18s rRNA (546bp) und FV (416 bp) erfolgte mit spezifischen Primern; M=Marker.

3.3.2 Nachweis des GFLV in *in-vitro*-Stecklingen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

Nachdem die Wurzelreaktionen der Testpflanzen auf die Besaugung durch *X. index* untersucht wurden, fanden mit ausgewählten Pflanzen Virus-Transmissionsversuche statt. Dazu wurden virusinfizierte *X. index*, die zuvor mindestens drei Monate an virushaltigem Pflanzenmaterial inokuliert wurden, steril gewaschen und in die Plastikbecher zu virusfreien Test-Stecklingen gesetzt (s.2.7.1). Nach vier Wochen wurden die Wurzeln der *in-vitro*-Stecklinge aus dem Medium entfernt und für die RNA-Extraktion (s.2.5.5.1) verarbeitet. Die Virustransmission wurde an drei Pflanzen pro Testrebe durchgeführt.

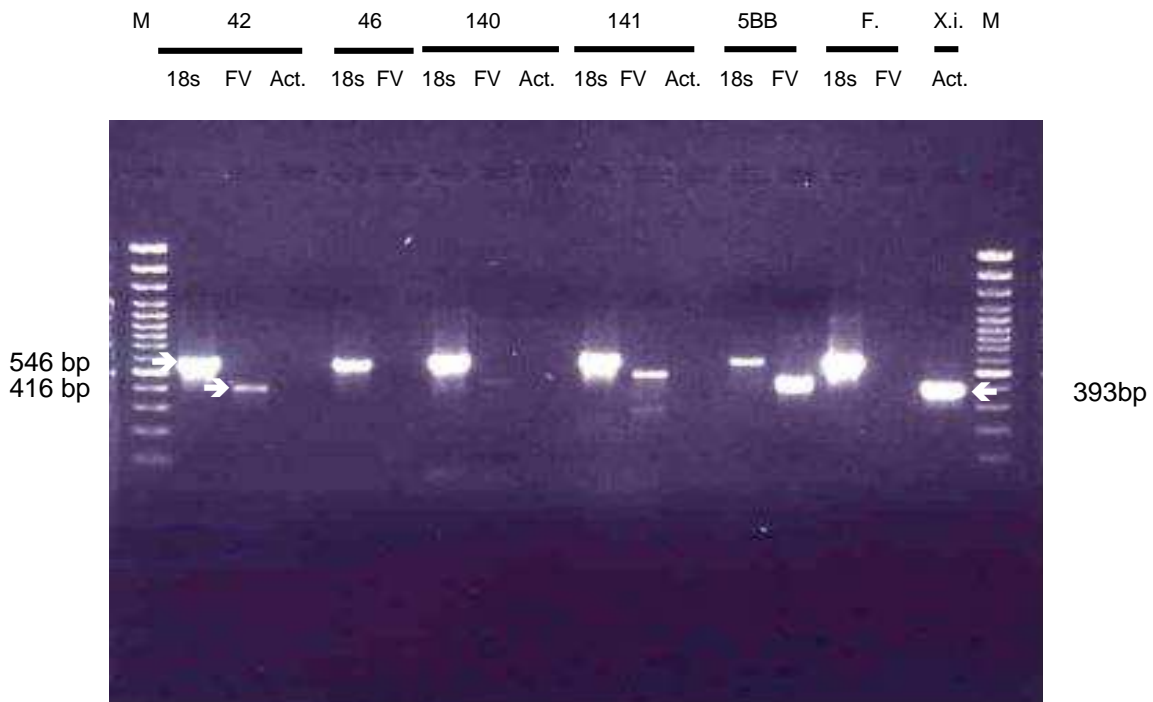


Abb.28: Nachweis von Virus-RNA aus Wurzelmaterial der verschiedenen *in-vitro*-Stecklinge von *Vitis spec.* (42-5BB) und Feige (*F. Ficus carica*) inokuliert mit virusinfizierten Nematoden. Die Amplifikation der Fragmente 18s rRNA (546bp) und FV (416 bp) , sowie nematodenspezifisches Actin (X.i.; 393 bp) erfolgte mit spezifischen Primern; M=Marker.

Bei Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) hatte eine Übertragung des GFLV stattgefunden und das entsprechende Fragment wurde sichtbar (Abb.28, Spur 3). In Testpflanze 46, die auch eine *V. vinifera* x *V. rotundifolia*-Kreuzung ist, befand sich keine virale RNA des GFLV (Spur 6). Die *V. vinifera* x *V. rufotomentosa*-Kreuzung 140 war für eine Übertragung des GFLV möglicherweise sensitiv, denn die sehr schwach ausgeprägte FV-Bande könnte eine geringe Menge viraler RNA nahe der Nachweisgrenze sein (Spur 8+11). Da aber das Fragment bei Testpflanze 140 nicht klar sichtbar war, könnte es sich vielleicht auch um eine resistente Pflanze handeln. Bei Testpflanze 141 liegt die Bande des amplifizierten GFLV-Fragmentes höher, so dass hier keine Virus-Detektion möglich war. Eine Detektion des GFLV war bei Kober 5 BB möglich (Spur 14). Ein Nachweis des GFLV in Feige (*Ficus carica*) war nicht möglich (Spur 16). Die Amplifizierung der 18srRNA in den jeweiligen Versuchsansätzen stellte den erfolgreichen Ablauf der RT-PCR sicher. Der Nachweis von nematodenspezifischem Actin aus *X. index* diente als Kontrolle, um sicher zu gehen,

dass die detektierte RNA des GFLV von beispielsweise Speichelsekreten des Nematoden stammen könnte. In den getesteten Pflanzen 42, 140 und 141 konnte in keinem Fall das nematoden-spezifische Actin nachgewiesen werden (Spur 4+9+12).

3.3.3 Nachweis des GFLV in Gewächshauspflanzen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

Mit ausgewählten Gewächshauspflanzen der Testreben, einem *Vitis rotundifolia*-Hybrid Nr. 16 und der Standardunterlage Kober 125 AA, wurden Virus-Transmissionsversuche im Labor durchgeführt. Dazu wurden virusinfizierte *X. index*, die zuvor mindestens drei Monate an virushaltigem Pflanzenmaterial inokuliert wurden, steril gewaschen und in die Petrischalen zu der eingegossenen Wurzel der Testpflanzen gesetzt (s.2.7.2). Nach vier Wochen Inokulationszeit wurde die Wurzel von der Pflanze abgetrennt und für die RNA-Extraktion entsprechend verarbeitet.

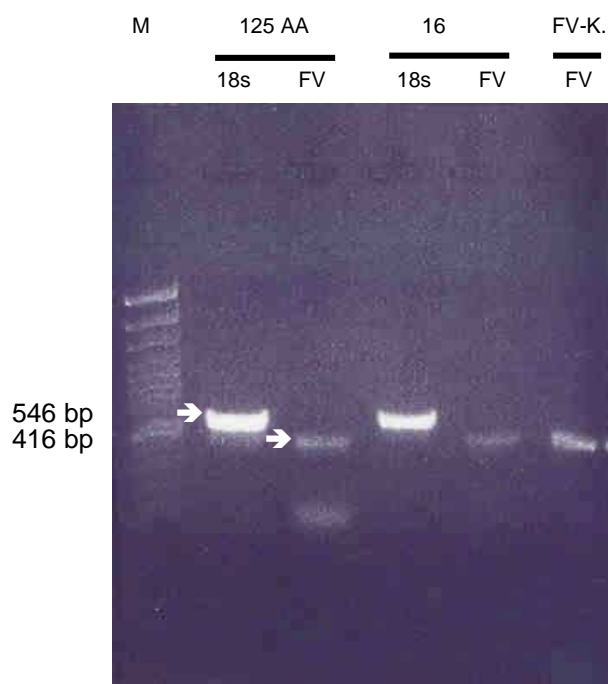


Abb.29: Nachweis von Virus-RNA aus Wurzelmaterial von Gewächshausreben der Testpflanze 16 und der Standardunterlage Kober 125 AA inokuliert mit virusinfizierten Nematoden. Die Amplifikation der Fragmente 18s rRNA (546bp) und FV (416 bp) erfolgte mit spezifischen Primern. Als Positivkontrolle (FV-K.) diente Wurzelmaterial von eindeutig virustragenden Pflanzen; M=Marker.

In der Standard-Unterlage Kober 125 AA konnte eine erfolgreiche Übertragung des GFLV schon nach nur vier Wochen durch die Nematoden nachgewiesen werden (Abb.29, Spur 3). Auch bei der Testpflanze 16 war eine Detektion des GFLV in der Wurzel möglich (Spur 5). Die Testung einzelner Wurzelabschnitte (eingeteilt wie in Versuch 3.3.3) zeigte eine Ausbreitung des GFLV nach der Besaugung durch *X. index*. Bei Kober 125 AA konnte das Virus bereits in den verholzten Abschnitten der Wurzel nachgewiesen werden, in denen im Gegensatz zu Testpflanze 16 kein Virus detektiert werden konnte (Daten nicht dargestellt).

3.3.4 Nachweis von Abwehrreaktionen bei *Vitis spec.* durch den Befall von *X. index*

3.3.4.1 Molekularer Nachweis von Abwehrgenen mit RT-PCR bei *Vitis spec.* durch den Befall von *X. index*

Zu genaueren Untersuchung des Abwehrverhaltens von attackierten Rebwurzeln durch die Nematoden wurde eine Charakterisierung mit Hilfe von Abwehrgenen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Dazu wurde RNA aus dem Wurzelgewebe verschiedener Testreben isoliert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt (s. 2.5.1.1). Es wurden spezifische Primer für die Callosesynthase und die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) verwendet, um Transkripte dieser beiden Enzyme anzuzeigen (Abb.30). Der Nachweis von Callosesynthase im Zusammenhang mit der Nematodenbesaugung wurde in dieser Arbeit nach ersten Erkenntnissen aus Versuchsansätzen mit der Rebenperonospora (*Plasmopara viticola*) angewendet. Die Callosesynthase wird zwar konstitutiv exprimiert aber dennoch konnte das gehäufte Auftreten von Transkripten in der Weinrebe durch die Induktion von diesem Pathogen festgestellt werden [persönl. Mitteilung, Dr. H.-H. Kassemeyer, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg]. Die molekularbiologische Analyse erfolgte nach einer Zeitdauer von vier Wochen nach der Inokulation. Der Nachweis der Transkripte von Abwehrgenen wurde mindestens dreimal pro Testrebe durchgeführt.

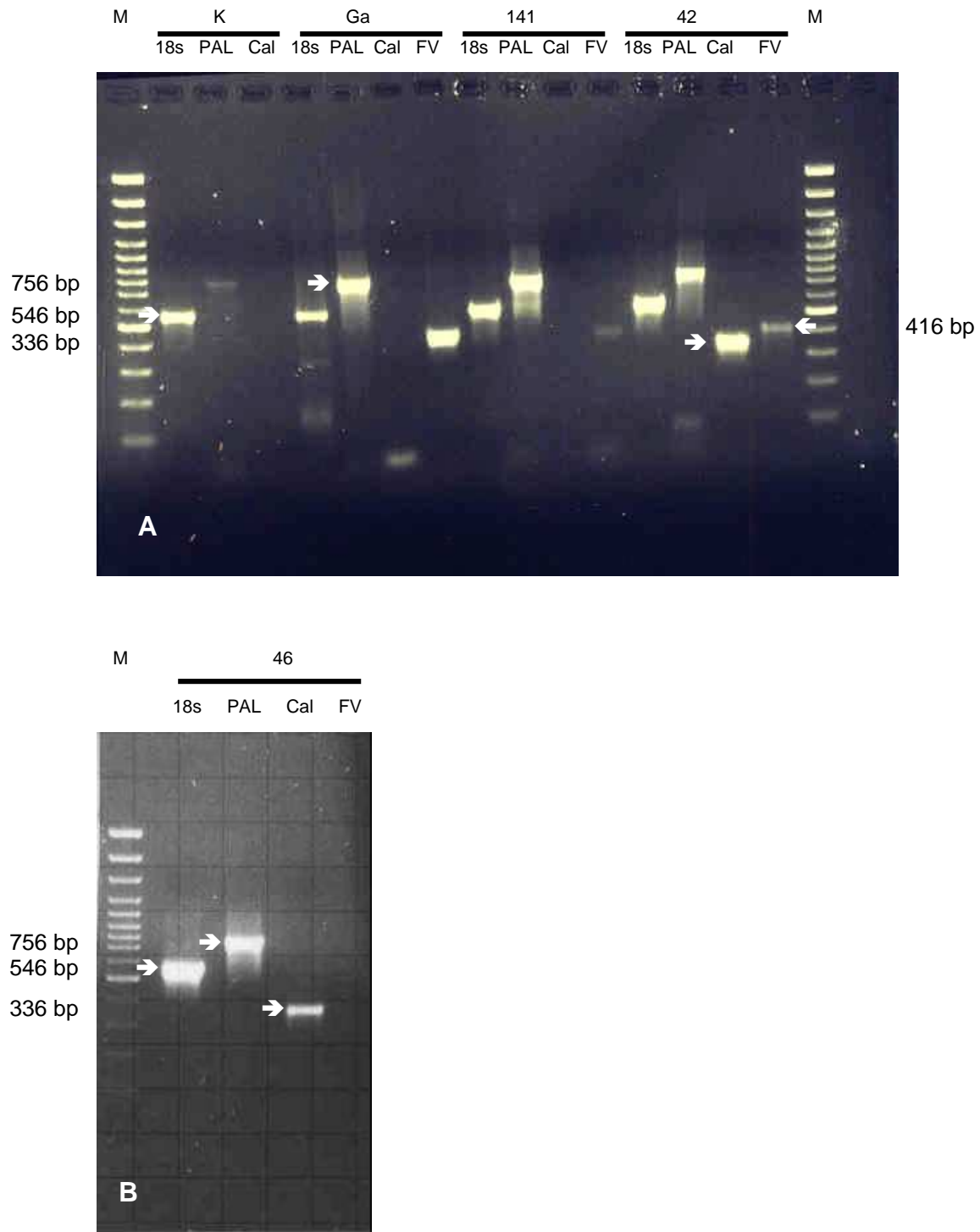


Abb.30: Nachweis von Abwehrgenen aus Wurzelmaterial verschiedener *Vitis*-Spezies 141 und 42 (A) und 46 (B) nach vierwöchiger Inokulation mit Nematoden. Als Kontrolle (K) diente nicht-inokuliertes Wurzelmaterial von Kober 5 BB, als Positivkontrolle (Ga) für eine Penetration durch Nematoden wurde eine entstandene Wurzelgalle von Kober 125 AA verwendet. Die Amplifikation der Fragmente 18s rRNA (546bp) und PAL (756bp) und Cal (336 bp) erfolgte mit spezifischen Primern. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde zusätzlich die Übertragung des GFLV (416 bp) bei den jeweiligen Pflanzen dargestellt; M=Marker.

Bei einer besaugten Wurzelgalle der Standard-Unterlage Kober 125 AA war ein PAL-Transkript feststellbar (Abb.30, Spur 6). Es konnte aber keine Callosesynthese detektiert werden. Zum Vergleich ist die erfolgte Transmission des GFLV dargestellt (Spur 8). Bei der Testpflanze 141 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) konnte ein PAL-Transkript als Reaktion auf die Nematodenbesaugung detektiert werden (Spur 10). Auch hier war kein Vorkommen von Callosesynthese-Transkripten aufgetreten. Spur 12 zeigt zum Vergleich das entsprechende GFLV-Fragment (416 bp) von Testpflanze 141. Nachweisbar waren bei der Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) sowohl PAL- als auch Callosesynthese-Transkripte (Spur 14+15) sowie die virale RNA des GFLV (Spur 16). Eine nicht inokulierte Pflanze der Standard-Unterlage Kober 5 BB diente als Kontrolle.

Bei Testpflanze 46 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) konnten gleichzeitig Transkripte von PAL und Callosesynthese gezeigt werden (Abb.30, Spur 3+4). Bei dieser Pflanze konnte, wie schon in Kapitel 3.2.1 erwähnt, keine virale RNA des GFLV nachgewiesen werden (Spur 5).

3.3.4.2 Cytologischer Nachweis von Abwehrreaktion mit Färbereagenzien verschiedener *Vitis*-Wurzeln durch den Befall von *X. index*

Die besaugten Wurzeln von *in-vitro*-Stecklingen wurden im zweiten Versuchsteil neben der molekularbiologischen Analyse einer spezifischen Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) zur Detektion von Superoxid-Radikalen im betroffenen Wurzelgewebe unterzogen. Zur Überprüfung von Calloseablagerungen wurde eine Anilinblau-Färbung durchgeführt.

In der Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) und mit Anilinblau dargestellt.



Abb.31a: Kontrolle nicht inokuliert (Kober 125 AA), gefärbt mit NBT/Anilinblau.



Abb.31b: Kober 125 AA drei Tage nach Inokulation, gefärbt mit NBT/Anilinblau; blauer Bereich = Superoxidbildung an Saugstelle (Pfeil).



Abb.31c: Testpflanze 141 (*V. vinifera* x *V. rufo-tomentosa*) drei Tage nach Inokulation, gefärbt mit NBT/Anilinblau; braune Bereiche = Nekrosen; blaue Areale = Superoxidbildung (Pfeile).

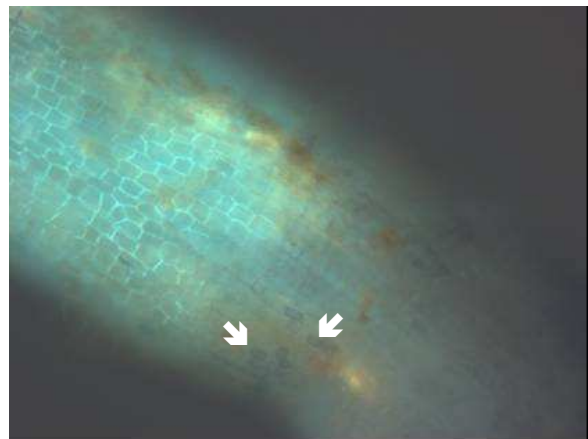


Abb.31d: Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*), gefärbt mit NBT/Anilinblau; fluoreszierende Bereiche = Callose; Superoxidbildung (Pfeile).

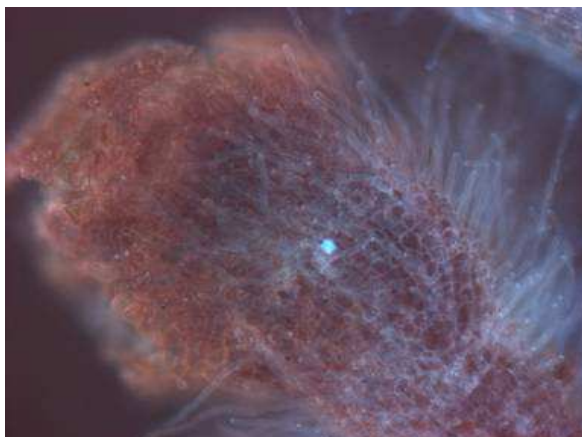


Abb.31e: Wurzelgalle von Kober 125 AA zwei Wochen nach Inokulation, gefärbt mit NBT/Anilinblau.



Abb.31f: Testpflanze 141 (*V. vinifera* x *V. rufo-tomentosa*) zwei Wochen nach Inokulation, gefärbt mit NBT/Anilinblau; Nekrose (Pfeil).

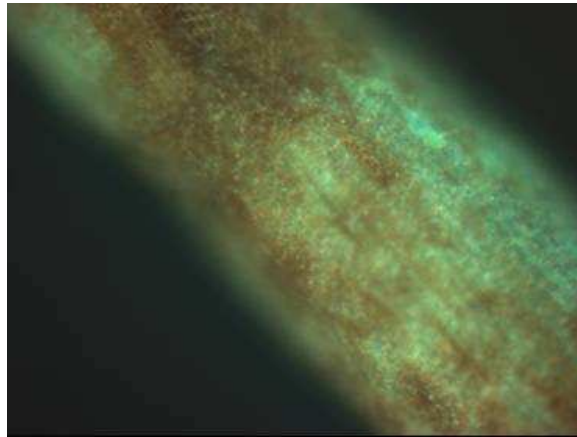


Abb.31g: Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) zwei Wochen nach Inokulation, gefärbt mit NBT/Anilinblau; hell fluoreszierende Bereiche = Callose.

Die Wurzeln der Testpflanzen wurden jeweils drei Tage und nach zweiwöchiger Inokulation mit den Nematoden angefärbt. Die Färbung erfolgte zuerst mit NBT und anschließend mit Anilinblau. Die Wurzelpräparate wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Eine nicht inokulierte Wurzel von Kober 125 AA diente als Kontrolle (Abb.31a).

Nach drei Tagen Inokulationszeit war bei der Testpflanze Kober 125 AA nach Anfärben mit NBT eindeutig ein abgegrenzter blauer Bereich im vorderen Bereich der Wurzel erkennbar (Abb.31b). Es handelte sich hier um die Ansammlung von reduziertem NBT in penetrierten Zellen, das durch die Reduktion mit Superoxid-Radikalen sichtbar wurde. Durch die intensive Saugtätigkeit war ein Loch im Wurzelgewebe entstanden. Hier war keine Calloseeinlagerung sichtbar. Die Gallenbildung hatte noch nicht eingesetzt. Bei der Testpflanze 141 war nach drei Tagen eine Nekrosenbildung durch die abgegrenzten, braunen Bereiche im Saugbereich erkennbar. Es konnte aber keine Callose detektiert werden. Durch die Besaugung wurde die Bildung von Superoxid-Radikalen in den betroffenen Arealen induziert (Abb.31c). Bei der Testpflanze 42 konnte drei Tage nach der Inokulation neben der Superoxidbildung in dem Nekrosenbereich zusätzlich eine Einlagerung von Callose sichtbar gemacht werden (Abb.31d). Die hell fluoreszierenden Bereiche in unmittelbarer Nähe der nekrotisierten Bereiche zeigten eine Verdickung der Zellwand durch Calloseablagerung.

Nach zweiwöchiger Inokulationszeit waren bei Pflanzen von Kober 125 AA große, braune Gallen entstanden. Ein Färben dieser Gallen nach dieser Zeit zeigte weder eine Superoxidansammlung, noch eine Calloseeinlagerung. Es war eine große Dichte von Riesenzellen mit umliegenden Bereichen aus kollabierten Zellen erkennbar (Abb.31e). Nach zwei Wochen Inokulationszeit nahm die Saugtätigkeit der Nematoden an den Wurzeln von Testpflanze 141 ab. Die lokal entstandenen Nekrosen zeigten nach der NBT-Färbung keine Anwesenheit von Superoxid-Radikalen oder die Einlagerung von Callose nach der Anilinblau-Färbung (Abb.31f). Bei der Testpflanze 42 hat bei der Entstehung von Nekrosen eine Calloseeinlagerung stattgefunden. Diese lässt sich auch noch durch die hell fluoreszierenden Bereiche zwischen den nekrotisierten Arealen nach einer Zeitdauer von zwei Wochen erkennen. Nach dieser Zeit waren allerdings wie bei Testpflanze 141 keine Superoxid-Radikale mehr detektierbar (Abb.31g).

Die Bildung von Superoxid-Radikalen trat gleichzeitig bei allen Testpflanzen nach drei Tagen Inokulationszeit auf. Dagegen war nach zwei Wochen kein Superoxid mehr in dem penetrierten Wurzelgewebe enthalten. Eine Calloseeinlagerung fand nur bei Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) statt (Tab. 9).

Tab.9: Übersicht über die Reaktionen der Wurzeln verschiedener *Vitis*- Spezies nach der Inokulation mit *X. index* (+= vorhanden / - =nicht vorhanden).

Zeit [d]	Gallen		Nekrosen		Superoxid		Callose	
	3 Tage	14 Tage	3 Tage	14 Tage	3 Tage	14 Tage	3 Tage	14 Tage
Kober 125 AA	-	+	-	-	+	-	-	-
141	-	-	+	+	+	-	-	-
42	-	-	+	+	+	-	+	+

3.4 BIOTESTS

3.4.1 Untersuchung der Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte

Um festzustellen, wie sich *X. index* auf einer Agarplatte ausbreitet, wenn ihm kein Stimulus angeboten wird, wurde folgender Test durchgeführt. 25 Tiere wurden im Zentrum der Platte (Ø 9 cm) aufgesetzt.

In Abbildung 32 ist die Verteilung der Nematoden zu verschiedenen Zeitpunkten für jeden einzelnen Ring verdeutlicht. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt, die Mittelwerte bestimmt und die Anzahl der Nematoden pro Fläche (cm²) in den einzelnen Ringen berechnet.

Bemerkenswert war, dass bereits zwei Minuten nach dem Aufsetzen einzelne Nematoden bis zum äußeren Petrischalenrand wanderten. Im Vergleich zu Ring 1 änderte sich in den Ringen 2 und 3 die Anzahl der Nematoden pro cm² während der Zeit von zwei bis 128 Minuten nur sehr wenig (Abb. 32). In diesen beiden Ringen befanden sich immer ungefähr gleich viele Nematoden, da die Tiere ständig am Umherwandern waren. Es konnte demnach keine Ansammlung von Nematoden in einem Bereich der Petrischale festgestellt werden, sondern die Tiere verteilten sich schnell ungerichtet und willkürlich. Die Anzahl der Nematoden in der Fläche des vierten Ringes war vergleichbar mit der des dritten Ringes, da immer mehr Tiere den Rand der Petrischale erreicht hatten und schließlich wieder wegwanderten. Nach 128 Minuten waren in allen Ringen annähernd die gleiche Anzahl an Nematoden vorhanden, so dass nach dieser Zeit eine gleichmäßige Verteilung auf der Agarplatte feststellbar war.

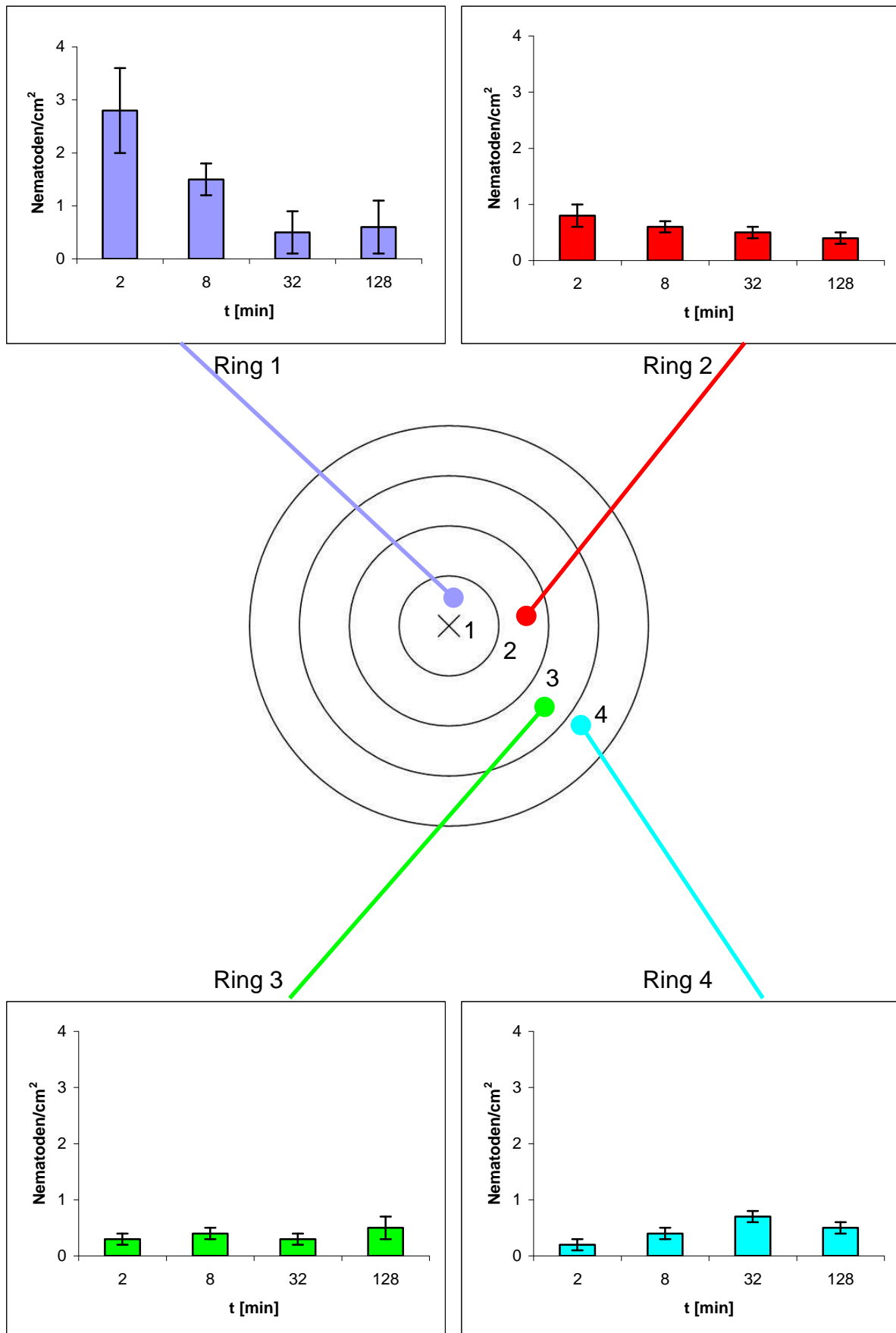


Abb.32: Übersicht über die zeitliche Verteilung der Nematoden in jedem einzelnen Ring der Petri-

schale (Mitte) über eine Zeitdauer von insgesamt 128 Minuten.

3.4.2 Wanderungstests

Verschiedene Wanderungstests wurden durchgeführt um herauszufinden, ob es sich bei der Auffindung der Nahrungsquelle um eine gerichtete Bewegung der Nematoden handelt. Dafür wurden den Nematoden in verschiedenen Versuchsansätzen (V1-V3) Stimuli in Form von gekeimten Rebsamen angeboten. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob der Nematode auch noch den Ort der Nahrungsquelle aufsucht, wenn diese aber vorher entfernt wurde (Versuch V4). Um eine mögliche Diffusion von in das Agarmedium abgegebenen Wurzelexudaten zu überprüfen, wurden die Versuche in unterschiedlichen Zeitabständen durchgeführt.

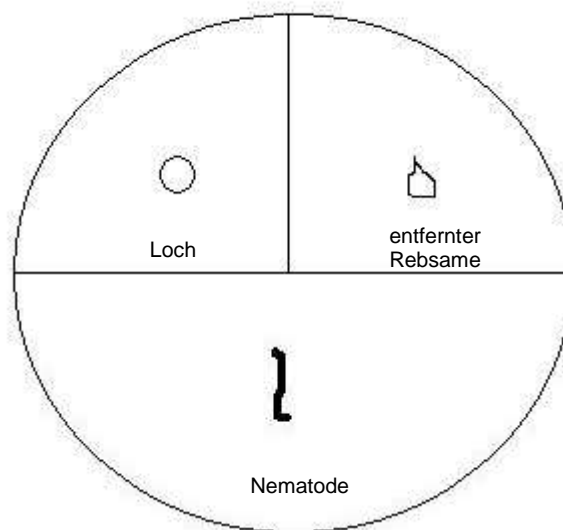


Abb.33: Beispiel einer Versuchsanordnung in einer Petrischale (\varnothing 9 cm), gefüllt mit Agarmedium (0,8 %), für die Versuche V1-V4.

Versuch (V1): Gekeimter Rebsamen gegen ungekeimten Rebsamen:

Das Ergebnis zeigt, dass sich bereits zu Beginn der Messung ab etwa einer Stunde schon mehr Nematoden im Sektor des gekeimten Samens befanden als im Sektor des ungekeimten Samens (Abb. 34). Die Nematodenanzahl, die sich im Sektor des Sämlings aufhielt, überstieg zu jedem Zeitpunkt der Messung die Anzahl der Nematoden im Sektor des ungekeimten Samens. Die Zahl der Nematoden, die in einen der beiden Sektoren wanderte, nahm im Laufe des Versuches in beiden Sektoren zu. Dies verdeutlichen auch der Anstieg der Geraden der beiden Mittelwertskurven. In den ersten zwei Stunden waren die Unterschiede in der Anzahl der Nematoden zwischen den beiden Sektoren sehr gering. Erst nach 3,5 Stunden nahm die Anzahl der Tiere im Sektor des Sämlings deutlich zu. Am ungekeimten Rebsamen stieg die Anzahl der Nematoden mit der Zeit ebenfalls an, aber mit deutlich geringerer Geschwindigkeit. Dies spiegelt sich auch in der Steigung der Geradengleichungen wieder. Im letzten Zeitabschnitt des Versuches, von sieben bis neun Stunden, waren teilweise nahezu dreimal so viele Nematoden am Sämling wie am ungekeimten Rebsamen zu finden.

Um zu überprüfen, um wie viel größer die Anzahl an Nematoden am gekeimten Samen im Vergleich zur Alternativvariante war, wurde für jeden Sektor der prozentuale Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt (Abb. 35). Das Verhältnis des Sektors mit Rebsamen zu dem Alternativsektor wurde in den folgenden Auswertungen, wie in Gleichung 1 (siehe 2.7.4) beschrieben, als Präferenz bezeichnet.

Anhand der Regressionsgeraden durch die Mittelwerte kann man erkennen, dass sich die Präferenz der Nematoden für den Sämling tendenziell von zu Beginn durchschnittlich 34 % nach einer Stunde auf 50 % nach neun Stunden vergrößerte (Abb. 35). Außerdem wird deutlich, dass bereits nach 30 Minuten 25 % der gewanderten Nematoden ihre Präferenz am gekeimten Samen hatten. Die Streuungen der Einzelwerte, die anfangs noch sehr groß waren (zwischen 100 und -100) verringerten sich hier bereits ab 4,5 Stunden (zwischen 100 und 0).

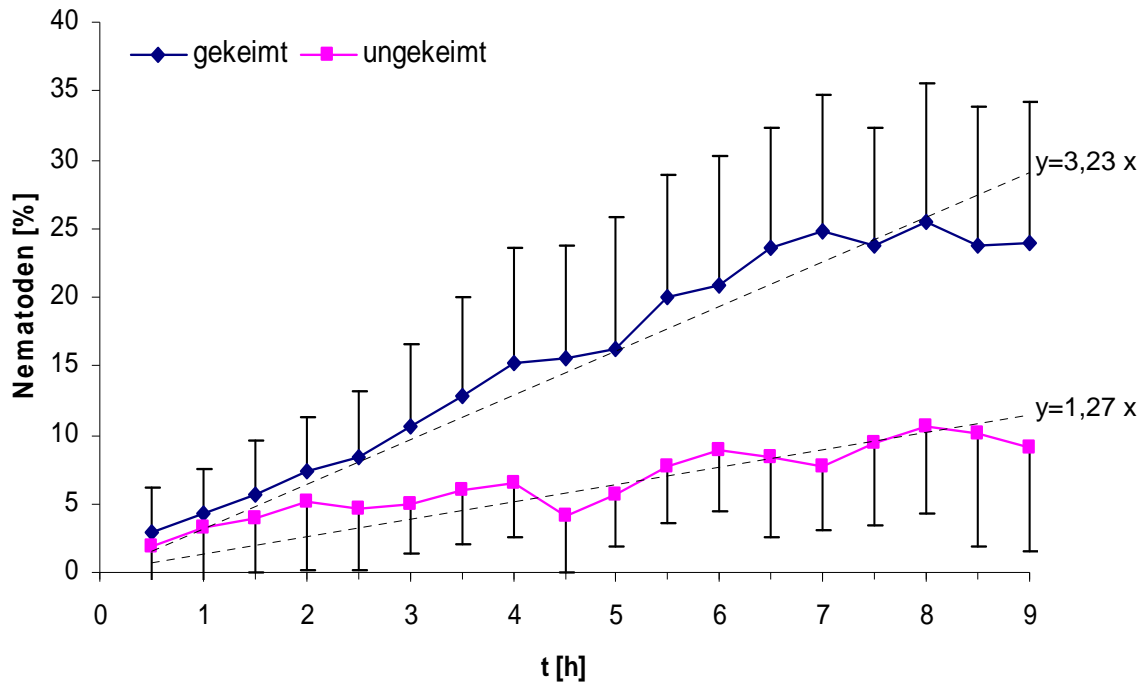


Abb. 34. V1. Prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; $n=11$), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder ungekeimter Rebsame) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten. Die Regressionsgeraden zeigen die durchschnittliche Beziehung zwischen den beiden Variablen

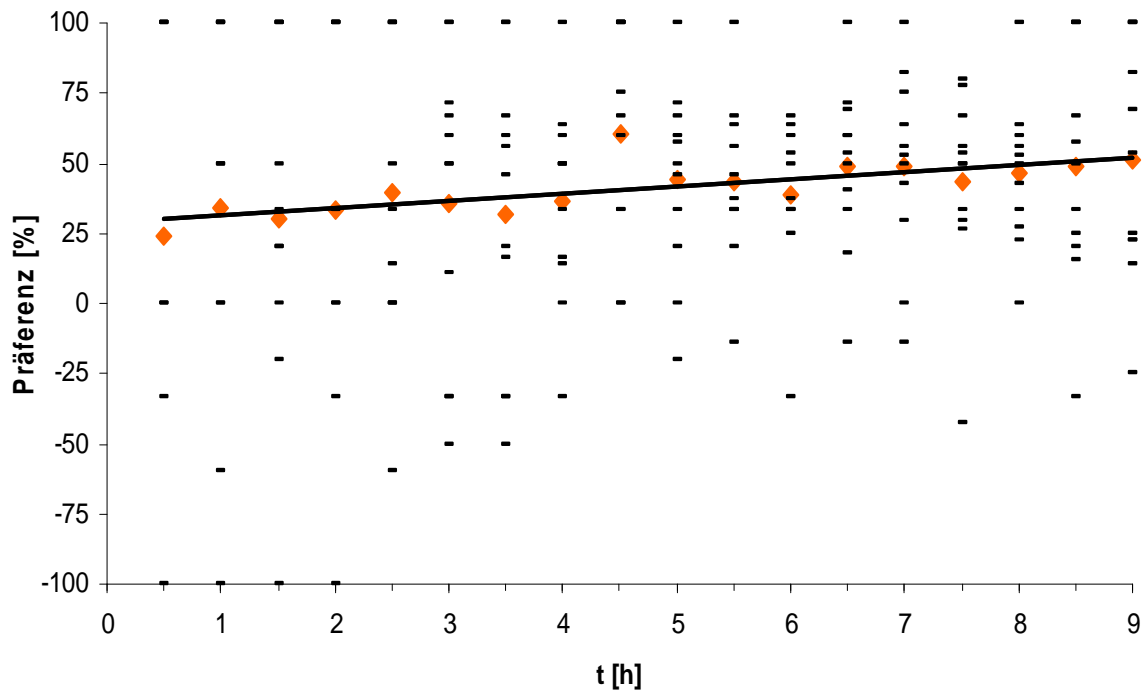


Abb. 35. Präferenzwerte der gewanderten Nematoden (25 Nematoden = 100 %) für den Sektor des gekeimten Samens (positiver Bereich) gegenüber dem Sektor des ungekeimten Samens (negativer Bereich) (V1). Durch die eingezeichneten Mittelwerte (orange) wurde eine Regressionsgerade (Geradengleichung: $y = 2,5x + 29,1$) gelegt.

Versuch (V2): Gekeimter Rebsamen gegenüber einem Stein:

Die Ergebnisse des prozentualen Anteils an aufgesetzten Nematoden zeigen, dass eine Mehrheit der Nematoden den Sektor des gekeimten Rebsamens aufsuchte (Abb. 36). Die Nematodenanzahl am Stein lag zu jedem Zeitpunkt der Messung unter der des Sämlings. Anhand der beiden Kurven kann man erkennen, dass sich die Anzahl der Nematoden, die in Richtung des gekeimten Samens wanderten, mit der Zeit deutlich vergrößerte. Aus den Gleichungen der beiden Regressionsgeraden wird ersichtlich, dass die Steigung der Geraden der Nematoden am Sämling nahezu um das Dreifache größer ist. Dies zeigt, dass im gesamten Verlauf des Versuches deutlich mehr Nematoden den gekeimten Rebsamen aufsuchten, als den Stein. Beim Betrachten der Mittelwerte wird diese Tendenz bereits zu Beginn des Versuches deutlich. Schon nach mehr als zwei Stunden waren fast doppelt so viele Nematoden am gekeimten Samen als am Stein zu finden. Dies setzte sich bis sieben Stunden nach Inokulation fort. Bei 7,5 und 8 Stunden nach der Inokulation der Platte konnte man sogar nahezu die dreifache Anzahl an Nematoden am Sämling beobachten.

Diese Tendenz spiegelte sich auch in den einzelnen Präferenzwerten wieder (Abb. 37).

Anhand der Regressionsgerade kann man erkennen, dass die Präferenz der Nematoden für den Sämling im Laufe des Versuches anstieg (Abb. 37). Die Präferenz der Nematoden für den gekeimten Samen erhöhte sich von zu Beginn durchschnittlich 24 % nach einer Stunde, auf 50 % nach neun Stunden um mehr als das Doppelte.

Vergleicht man die Steigungen der Regressionsgeraden des Versuches V1 ($b = 2,51$) mit der des Versuches V 2 ($b = 2,22$) so wird deutlich, dass diese nahezu identisch verlaufen (Abb. 35, 37).

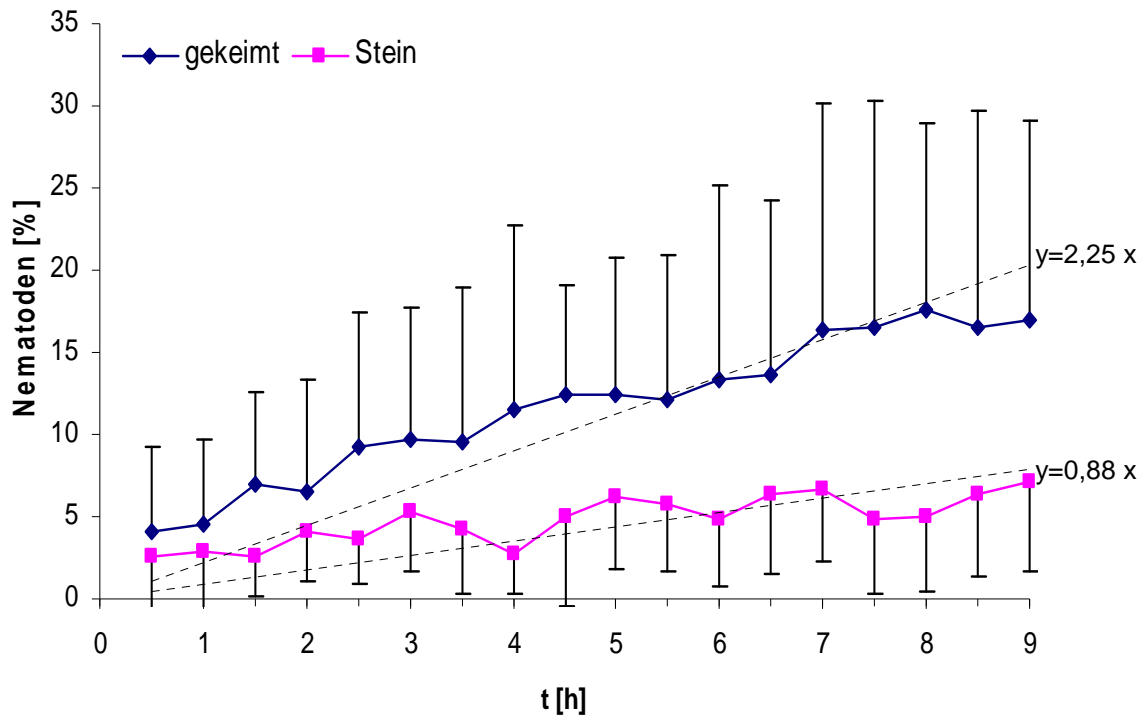


Abb. 36. V2. prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=13), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder Stein) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten.

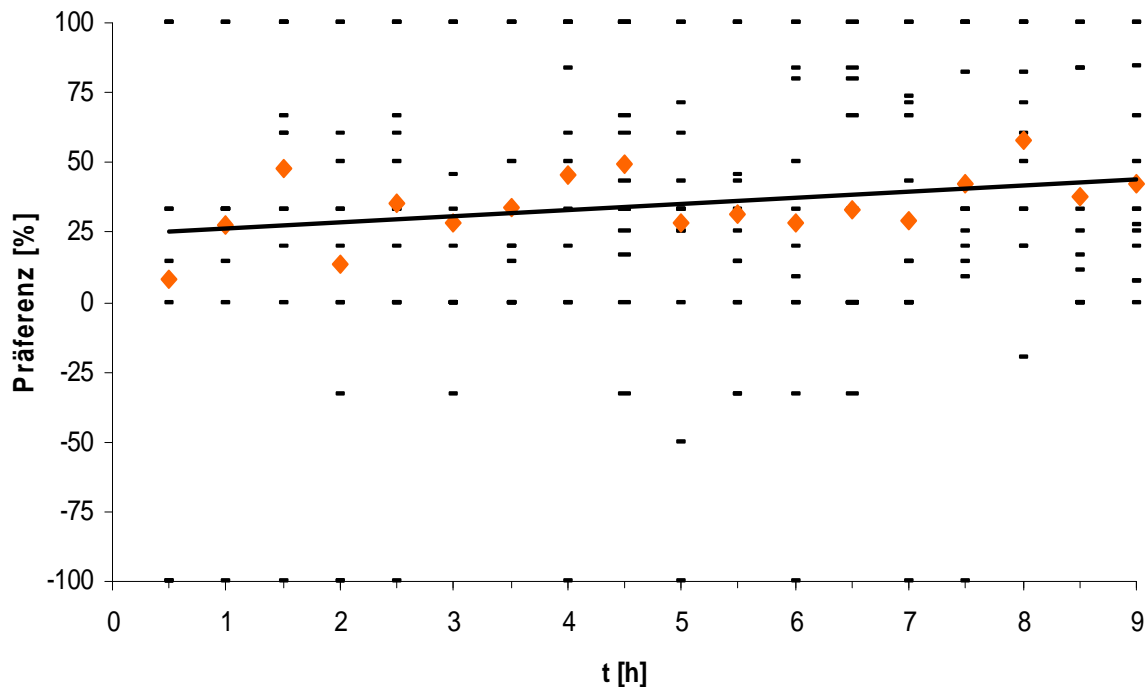


Abb. 37. Präferenzwerte der gewanderten Nematoden (25 Nematoden = 100 %) für den Sektor des gekeimten Samens (positiver Bereich) gegenüber dem Sektor des Steins (negativer Bereich) (V2). Durch die eingezeichneten Mittelwerte (orange) wurde eine Regressionsgerade (Geradengleichung: $y = 2,2x + 23,9$) gelegt.

Versuch (V3): Gekeimter Rebsamen gegen vakanten Keimungsbereich:

Ein vakanter Keimungsbereich stellt eine leere Stelle im Agarmedium des Versuchsansatzes dar, an dem zuvor ein gekeimter Rebsame gewachsen war und vor Versuchsbeginn entfernt wurde. Es wird in diesem Versuch deutlich, dass sich die Mittelwerte des prozentualen Anteils an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden in den beiden Alternativen kaum unterschieden (Abb. 38). Es hielten sich nahezu gleich viele Nematoden im Sektor des Keimungsbereiches wie im Sektor des gekeimten Samens auf. Die Mittelwerte des gekeimten Rebsamens waren nur leicht erhöht gegenüber denen des Keimungsbereiches des entfernten Sämlings. Hier war es nicht möglich Regressionsgeraden durch die Mittelwerte zu legen, da zwischen 0,5 und 6,5 Stunden kaum ein Anstieg der Mittelwerte in den Alternativen zu verzeichnen ist. Erst nach sieben Stunden begannen die Kurven zu divergieren. Auch hier wurden die Präferenzwerte berechnet (Abb. 39).

Die Ergebnisse zeigen, dass die durchschnittlichen Präferenzwerte zu Beginn der Messungen bis etwa sieben Stunden sehr stark schwankten (Abb. 39). Auch die Streuung der Einzelwerte war sehr groß. Aus diesem Grund konnte keine Regressionsgerade durch die Mittelwerte gelegt werden. Eine Präferenz der Nematoden für den gekeimten Samen war in diesem Versuch im Gegensatz zu den anderen Versuchen bis sieben Stunden nicht vorhanden. Hier waren anfangs vermehrt auch Werte unter Null zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass die Nematoden auch die Stelle des entfernten Samens aufsuchten. Aus dieser Grafik wird allerdings deutlich, dass ein Trend ab ca. sieben Stunden hin zum Sektor des gekeimten Samens zu verzeichnen war. Die Streuungen der Einzelwerte wurden ab sieben Stunden geringer. Die prozentuale Anzahl der gewanderten Nematoden, die sich am gekeimten Samen befanden, nahm mit der Zeit zu.

In der Auswertung dieses Wanderungsversuchs wurde die Zeitreihe auf diese Trendänderung hin überprüft. Hierzu wurde der Vorzeichen-Trendtest von Cox und Stuart verwendet [Sachs, 1984]. Dieser Test zeigt, dass der Trend der gewanderten Nematoden hin zum gekeimten Samen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% signifikant ist ($P = 0,02$).

In den Versuchen V1 – V3 wurde der Regressionskoeffizient b_{xy} anhand des entsprechenden t-Tests gegen Null geprüft [Sachs, 1984]. In allen drei Versuchen wurde $H_0 : b_{xy} = 0$ auf dem 0,01 % Niveau verworfen. Die Regressionskoeffizienten b_{xy} von V1 – V3 unterschieden sich hoch signifikant von Null.

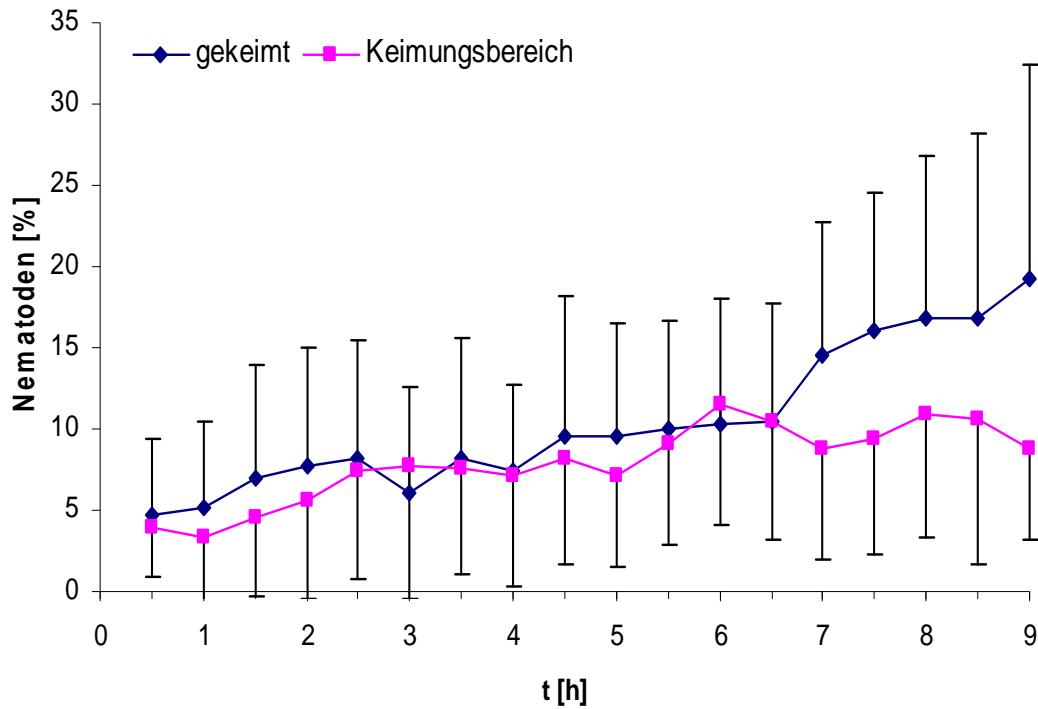


Abb.38. V3. prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=8), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder vakanter Keimungsbereich des Sämlings) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten.

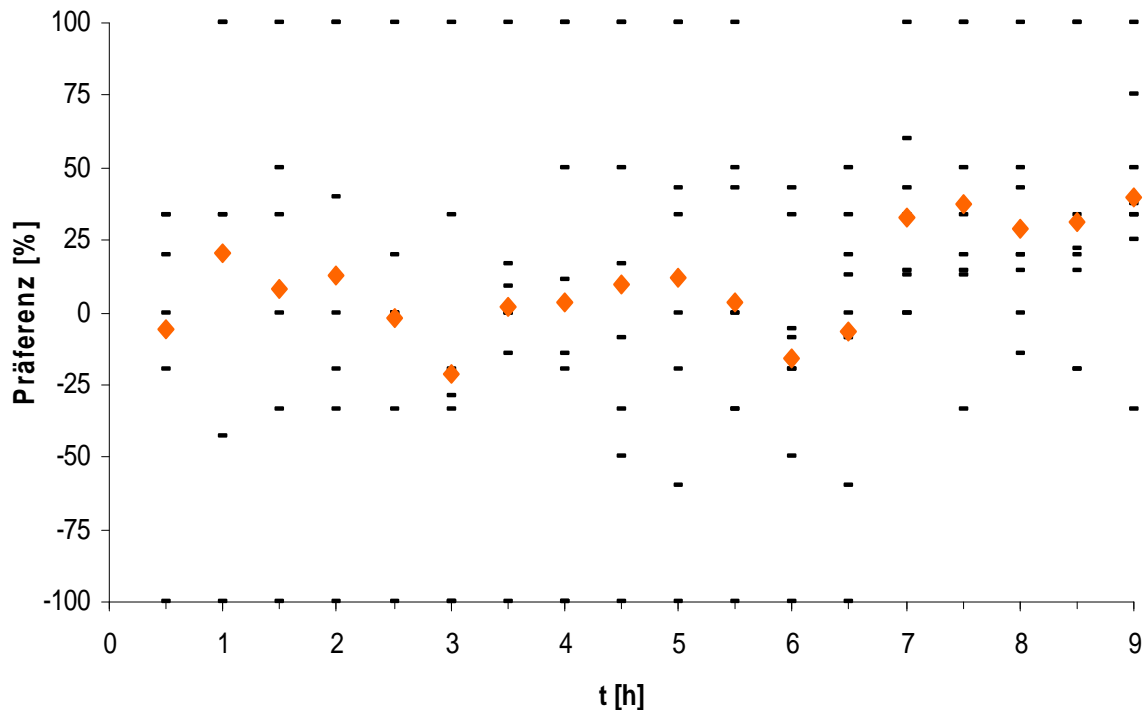


Abb.39. Präferenzwerte der gewanderten Nematoden (25 Nematoden = 100 %) für den Sektor des gekeimten Samens (positiver Bereich) gegenüber dem vakanten Keimungsbereich (negativer Bereich) eines entfernten Sämlings (V3).

Versuch (V4): Gekeimter Rebsame entfernt gegen Vertiefung im Agar:

Die Grafik zeigt die bevorzugten Sektoren eines einzelnen Nematoden aus vier Messungen über jeweils eine Stunde (Abb.40). Der Nematode hatte die Wahl zwischen dem vakanten Ort eines Rebsämlings oder einem ausgestanzten Loch in gegenüber-liegenden Bereichen auf der Petrischale. Es wurde viermal pro Stunde im Abstand von 15 Minuten der Sektor notiert, in dem sich der Nematode befand. Die erste Messung fand eine Stunde nach dem Entfernen des gekeimten Samens statt. Die zweite Messung wurde zwei Stunden nach dem Entfernen des Rebsämlings durchgeführt. Die letzte Messung erfolgte sieben Stunden nachdem der Sämling entfernt wurde.

Innerhalb der ersten Messung suchte der Nematode eindeutig den Sektor des vakanten Keimungsbereichs auf, in dem sich zuvor der Sämling befand. Die zweite Messung zeigt, dass der Nematode immer noch bevorzugt den vakanten Keimungsbereich aufsuchte, doch die Intensität im Vergleich zur ersten Stunde ist deutlich geringer. Sieben Stunden nachdem der Sämling entfernt wurde, war nun keine eindeutige Präferenz des Nematoden mehr zu beobachten. Beide Sektoren, der vakante Keimungsbereich und das Loch im Agar, wurden gleich häufig aufgesucht.

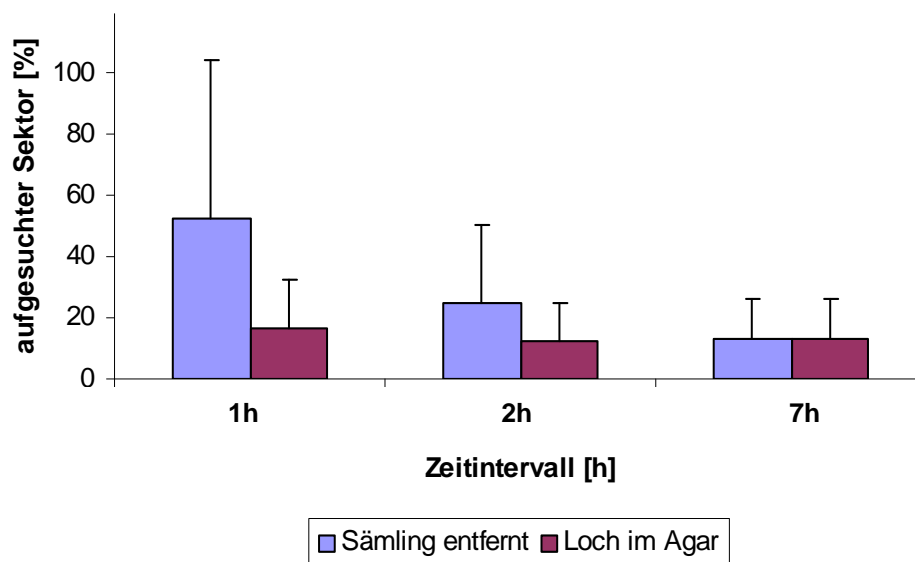


Abb.40: Aufgesuchter Sektor eines einzelnen Nematoden zu den Zeiten 1h, 2h und 7h nach Entfernen eines Rebsämlings.

3.4.3 Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel

Anhand dieses Versuchs sollte herausgefunden werden, ob *X. index* auf jung, aktiv wachsende Wurzelbereiche spezialisiert ist oder auch andere vorhandene Ressourcen, wie beispielsweise ältere und verholzte Wurzelteile als Nahrungsquelle nutzt.

Gut gewachsene Gewächshausreben (5 Jahre alt) wurden aus den Töpfen herausgenommen und pro Pflanze jeweils eine langgewachsene Wurzel vorsichtig von der Erde befreit. Ohne diese Wurzel von der Pflanze abzutrennen, wurde die Wurzel in einer Petrischale mit Agarmedium eingegossen und nach Erkalten des Mediums 50 Nematoden aufgesetzt. Die Anzahl der Nematoden an den jeweiligen Wurzelordnungen wurde jeden dritten Tag notiert und für die Darstellung der Mittelwert aller Messungen ermittelt (s. 2.7.5).

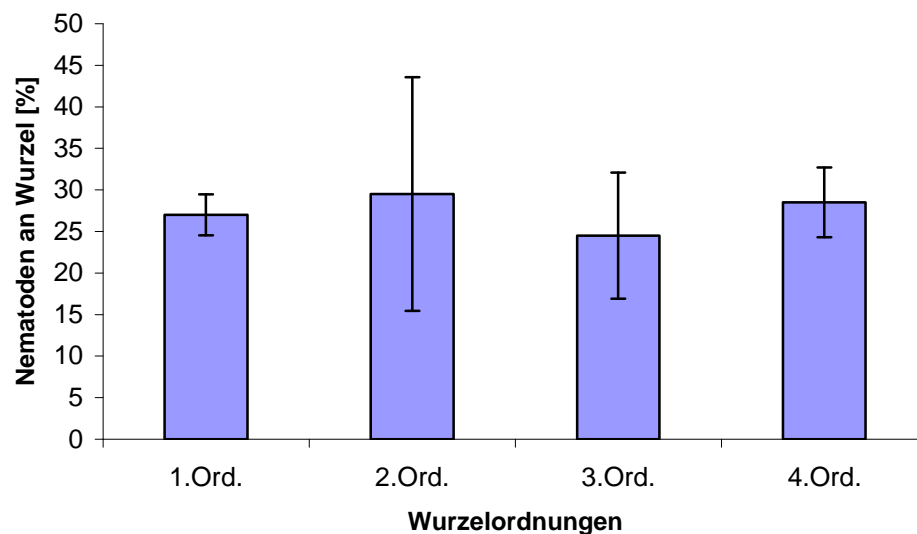


Abb.41: Anteil der Nematoden an den jeweiligen Wurzelordnungen (Mittelwerte aus vier Messungen)

Die Graphik zeigt, daß an allen Wurzelordnungen ungefähr gleich viele Nematoden zu finden waren. Es handelt sich um Mittelwerte der gezählten Nematoden von vier Messungen innerhalb 12 Tage. Nach Berechnung mit ANOVA sind die Werte statistisch alle gleich (Abb.41). Die Nematoden nutzten alle dargebotenen Wurzel-

abschnitte. Auch konnte beobachtet werden, dass die Nematoden Stellen mit verletzter Wurzelrinde, sowie ältere, stärker lignifizierte Wurzelteile aufsuchten und dort saugten.

3.4.4 Attraktivität eines *Vitis rotundifolia* und eines *Vitis rotundifolia*-*Vitis rotundifolia*-Hybrids gegenüber einer Standardunterlage Kober 5BB

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob bestimmte Rebsorten von den Nematoden bevorzugt attackiert werden. Da unter den zu testenden *V. rotundifolia*- und *V. rotundifolia*-Hybriden nach neuen nematodentoleranten Unterlagen gesucht wurde, wurden zwei unterschiedliche Hybride gegenüber einer bekanntlich anfälligen Standard-Unterlagsrebe Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*) getestet. Zunächst wurden die Wurzeln den Nematoden jeweils einzeln in Petrischalen angeboten, um zu prüfen, ob die Wurzeln aller getesteten Pflanzensorten als Nahrungsquelle genutzt werden (Abb.42).

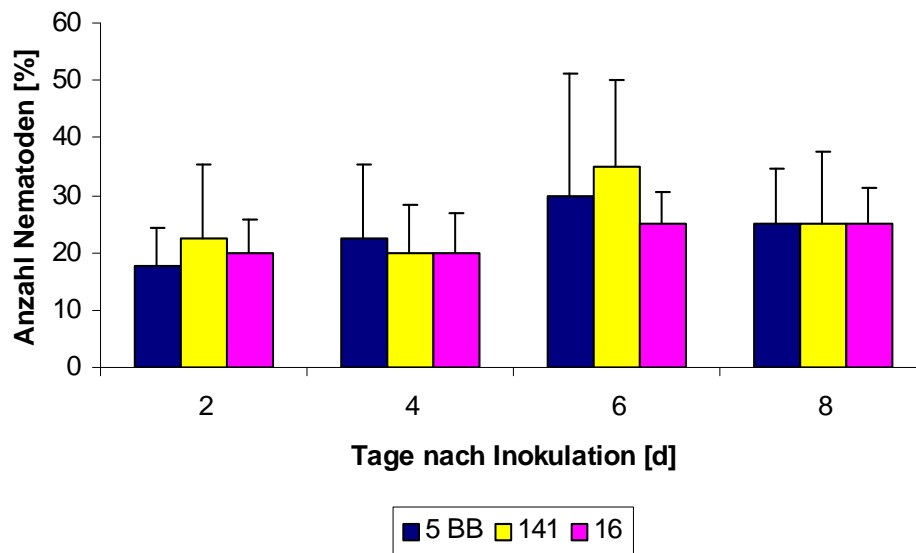


Abb.42: Anteil der Nematoden an den Wurzeln der Testpflanzen 16 und 141 im Vergleich zu Kober 5 BB in Einzelgefäßen über einen Zeitraum von acht Tagen.

Die Grafik stellt die Mittelwerte der gezählten Nematoden aus jeweils zwei Messtagen dar. Es war zu erkennen, dass die Wurzeln der Testpflanzen 16 (*V. vinifera* × *V. rotundifolia*) und 141 (*V. vinifera* × *V. rotundifolia*) in gleicher Weise

über einen Zeitraum von 12 Tagen von den Nematoden aufgesucht wurden, wie die der Kontrollpflanze Kober 5 BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*). Dieses Ergebnis konnte durch ANOVA bestätigt werden (Abb.42). Es konnten Saugtätigkeiten an den Wurzeln beider Testpflanzen beobachtet werden. Bei der Testpflanze 16 setzte jedoch die Saugtätigkeit einige Tage später ein als bei Kober 5 BB und war auch nicht so intensiv. Die Nematoden waren zwar an den Wurzeln von Testpflanze 16 aufzufinden, doch nur wenige waren aktiv am Saugen (Daten nicht dargestellt).

In einem zweiten Versuchsteil wurde die Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) mit der Standardunterlage Kober 5 BB zusammen in einem Gefäß auf Präferenz durch *X. index* getestet (Abb.43). In diesem Teilversuch sollte überprüft werden, ob bei der Auswahl zweier unterschiedlicher Rebpflanzen eine bestimmte bevorzugt wird.

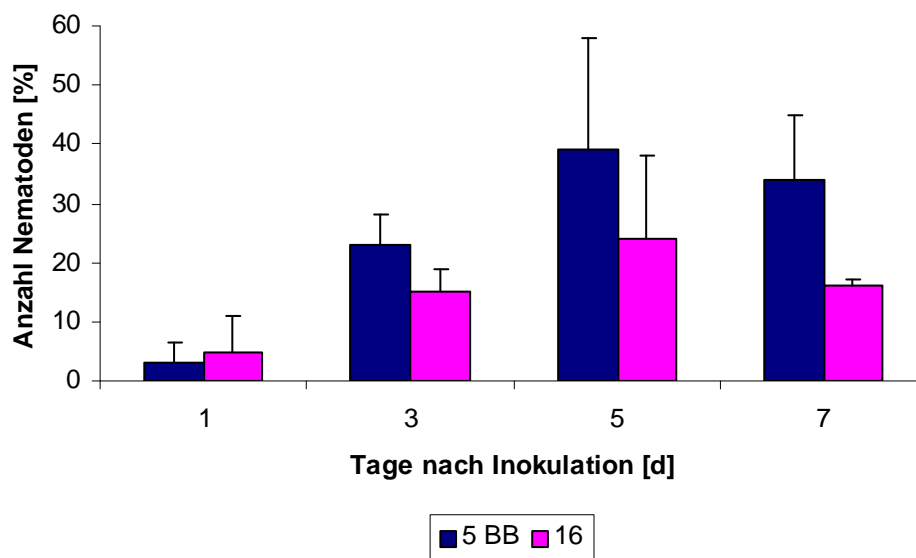


Abb.43: Anteil der Nematoden an den Testpflanzen Kober 5 BB und 16 zusammen in einem Gefäß über einen Zeitraum von 7 Tagen.

Befanden sich beide Testpflanzen in einem Gefäß, wurde die Standard-Unterlage Kober 5 BB nicht eindeutig gegenüber der Testnummer 16 von den Nematoden bevorzugt. Diese Tatsache konnte mit ANOVA belegt werden und zeigte keine Signifikanz der Werte. Die niedrige Anzahl der Nematoden an beiden Wurzeln am ersten Versuchstag ist auf das beobachtete Umherwandern der Tiere innerhalb des

Agarmediums zurückzuführen. Es wurden beide Testpflanzen besaugt, doch die Saugtätigkeit setzte bei Testpflanze 16 einige Tage später ein. Bei Kober 5 BB hingegen war schon nach wenigen Tagen eine Gallenbildung sichtbar.

3.4.5 Attraktivität von inaktivierten Wurzeln

In diesem Versuch sollte die Attraktivität von toten Wurzelteilen gegenüber *X. index* getestet werden. Dazu wurden die entsprechenden Wurzeln in Wasser abgekocht und den Nematoden im Vergleich zu lebenden Wurzeln angeboten. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes sollte festgestellt werden, ob die Nematoden totes Wurzelgewebe von lebendem unterscheiden können.

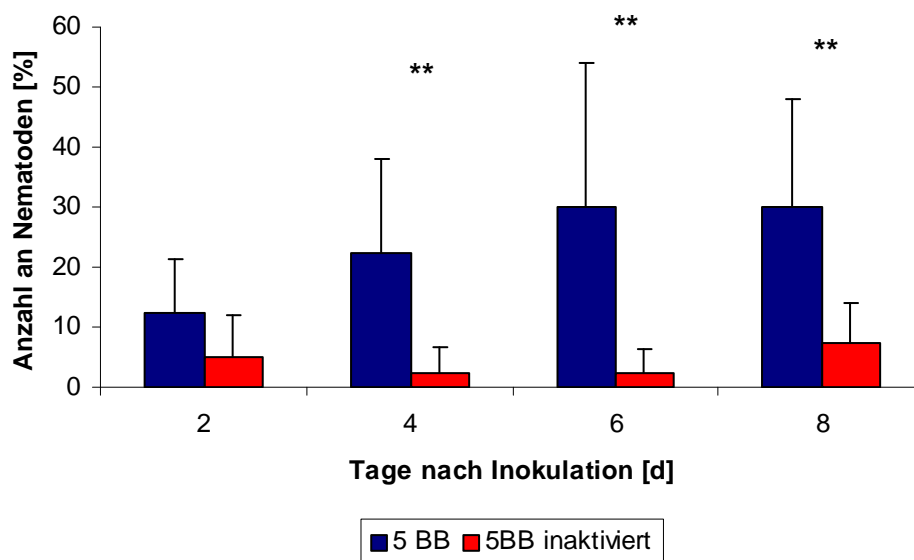


Abb.44: Anteil der Nematoden an den Wurzel von Kober 5 BB und inaktivierten Wurzeln in getrennten Gefäßen über einen Zeitraum von acht Tagen.

Nach zwei Versuchstagen konnte noch keine eindeutige Präferenz der Nematoden festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl an lebenden Wurzeln als auch an abgekochten Wurzeln Nematoden zu finden. Es war eine deutliches Umherwandern der Tiere im gesamten Agarmedium feststellbar. Erst ab einer Zeitdauer von vier Tagen war eine Präferenz erkennbar. *X. index* war fast nur an lebenden Wurzeln zu finden, an denen auch eine Saugtätigkeit mit

Wurzelgallenbildung zu beobachten war. In den Ansätzen mit abgekochten Wurzeln waren nur vereinzelt Tiere direkt bei den Wurzeln aufzufinden, die restlichen Tiere befanden sich im Agarmedium verteilt. Es konnte keine Saugtätigkeit beobachtet werden. Die statistische Auswertung mit ANOVA zeigte, dass sich die Werte von lebenden Wurzeln und abgekochten Wurzeln ab einer Zeitdauer von vier Versuchstagen unterscheiden (99 % Signifikanz; **, Abb.44).

3.4.6 Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat

Mit diesem Versuch sollte durch das Pflanzenhormon Methyljasmonat eine induzierte Abwehrreaktion der Rebwurzeln gegenüber *X. index* erzielt werden. Mit der Anwendung dieses Pflanzenhormons sollte die Besaugung durch die Nematoden reduziert oder sogar ganz verhindert werden.

Dazu wurden *in-vitro*-Stecklinge der Standard-Unterlage Kober 5 BB mit 5 μM Methyljasmonat behandelt. Die Stecklinge wurden aus dem Anzuchtmedium entfernt und in sterile Deckelgläser mit 25 ml Wasser und Methyljasmonat für drei Tage in die Klimakammer gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Stecklinge aus den Deckelgläsern herausgenommen, in Agarmedium eingegossen und danach den Nematoden angeboten.

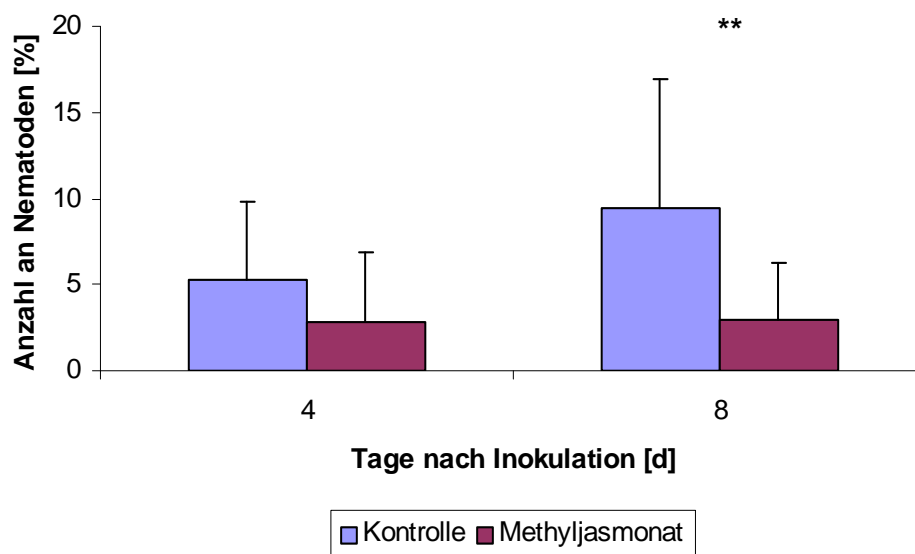






Abb.45: Anteil der Nematoden an den unbehandelten Wurzeln von Kober 5 BB und mit Methyljasmonat behandelten Wurzeln in jeweils getrennten Gefäßen über einen Zeitraum von acht Tagen.

Die Grafik zeigt, dass nach einer Testdauer von vier Tagen deutlich weniger Nematoden an den mit Methyljasmonat behandelten Wurzeln zu finden waren (Abb.45). Dieser Effekt war nach einer Zeitdauer von acht Tagen noch deutlicher zu sehen. Unter dem Mikroskop war erkennbar, dass die Nematoden keine Saugversuche an den mit Methyljasmonat behandelten Wurzeln vornahmen. Die behandelten Wurzeln wirkten etwas bräunlicher, doch die Pflanzenstecklinge wiesen insgesamt keine sichtbaren Schädigungen wie beispielsweise eine Braunfärbung der Blätter auf. Bei den Wurzeln der Kontrolle konnte eine Saugtätigkeit mit Gallenbildung an den Wurzeln beobachtet werden. Nach acht Tagen konnte mit Hilfe des ANOVA-Tests zwischen der Nematodenanzahl an den unbehandelten und den mit Methyljasmonat behandelten Wurzeln ein Unterschied mit 99 %iger Signifikanz ermittelt werden (**Abb.45).

3.5 PRAXISORIENTIERTE FREILANDVERSUCHE

Um die Symptomatik des GFLV im Freiland zu untersuchen, wurden zwei ausgewählte Flächen im Weinanbaugebiet Kaiserstuhl, am Standort Bahlingen und Sasbach kartiert und eine Sichtbonitur durchgeführt. Es wurde ein Flächenplan der Weinberge erstellt und darin auffällige Rebstöcke mit Virussympomen markiert. Dabei wurde zwischen Pflanzen mit eindeutigen Virussympomen und virusverdächtigen Pflanzen unterschieden. Am Standort Sasbach wurde eine weitere Symptomausprägung, die Petersilienblättrigkeit, festgestellt und separat mit einer Farbe versehen. Die Virusbonituren wurden in den Jahren 2004, 2005 und 2006 jeweils Anfang Juli durchgeführt. Um die Sichtbonitur der Virussympome zu bekräftigen wurden von abgegrenzten Bereichen Blattproben entnommen und mit ELISA auf eine Infektion mit dem GFLV getestet. Mit diesem Freilandversuch sollte eine herdartige Ausweitung des GFLV durch Nematoden überprüft werden. In den Pflanzplänen wurden alle auffälligen Pflanzen mit Virussympomen gekennzeichnet. Der Farbindex der visuellen Bonitur aus drei Jahren gliedert sich wie folgt:

-  auffällige Pflanzen mit Virussymptomen aus dem Jahr 2004
 -  auffällige Pflanzen mit Virussymptomen aus dem Jahr 2005
 -  auffällige Pflanzen mit Virussymptomen aus dem Jahr 2006
 -  auffällige Pflanzen mit Virussymptomen in allen 3 Jahren
-
- + positiv auf GFLV im ELISA-Test
 - negativ auf GFLV im ELISA-Test

Die visuellen Bonituren aus drei aufeinander folgenden Jahren von den beiden Standorten sind in den folgenden Schaubildern zusammengefasst und farblich dargestellt (Abb.46+47). Die unterschiedlichen Farben stehen für die virusauffälligen Pflanzen nach der Sichtbonitur, die einmal im Jahr durchgeführt wurde. In dieser Darstellung werden aus Übersichtsgründen alle optisch zweifelsfrei auffälligen Pflanzen, die eindeutige Virussymptome trugen oder virusverdächtig waren, aufgezeigt. Die Übersicht auf die visuellen Einzelbonituren aus den drei Jahren an den Standorten Bahlingen und Sasbach befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Abb.50-55). Beide Rebflächen waren mit unterschiedlichen Rebsorten bepflanzt, in Sasbach *V. vinifera* C.v. *Chardonnay* und in Bahlingen *V. vinifera* C.v. *Spätburgunder*.

R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3
25	38	45	51	54	53	52	52	52	51	51	51	50	50	49	49	49	49
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
24	37	44	50	53+	52	51	51	51	50	50	50	49	49	48	48	48	48
23	36	43	49	52	51	50	50	50	49	49	49	48	48	47	47	47	47
O	O	O	O	O	50	49	49	49	48	48	48	47	47	46	46	46	46
22	35-	42	48	51	49	48	48	48	47	47	47	O	O	O	O	O	O
21	34-	41	47	50	O	O	O	O	O	O	O	46-	46-	45-	45-	45-	45-
20	33-	40	46	49	48	47	47	47	46	46	46	45-	45-	44-	44-	44-	44
O	O	O	O	O	47	46	46	46	45	45	45	44-	44-	43-	43-	43-	43
19	32-	39	45-	48-	46	45	45	45	44	44	44	43-	43-	42-	42-	42-	42
18	31-	38-	44-	47-	45	44	44	44	43	43	43	O	O	O	O	O	O
17	30-	37-	43-	46-	O	O	O	O	O	O	O	42-	42-	41-	41-	41-	41
16	29-	36-	42-	45-	44	43	43	43	42	42	42	41-	41-	40-	40-	40+	40
O	O	O	O	O	43	42	42	42	41	41	41	40-	40-	39-	39-	39-	39
15	28-	35+	41-	44-	42	41	41	41	40	40	40	39-	39-	38-	38-	38-	38
14	27-	34-	40-	43-	41	40	40	40	39	39	39	O	O	O	O	O	O
13	26-	33-	39-	42-	O	O	O	O	O	O	O	38	38	37	37	37	37
12	25-	32-	38-	41-	40	39	39	39	38	38	38	37	37	36	36	36	36
O	O	O	O	O	39	38	38	38	37	37	37	36	36	35	35	35	35
11	24-	31-	37-	40-	38	37	37	37	36	36	36	35	35	34	34	34	34
10	23-	30-	36-	39-	37	36	36	36	35	35	35	O	O	O	O	O	O
9	22-	29-	35-	38-	O	O	O	O	O	O	O	34	34	33	33	33	33
8	21-	28-	34+	37-	36	35	35	35	34	34	34	33	33	32	32	32	32
O	O	O	O	O	35	34	34	34	33	33	33	32	32	31	31	31	31
7	20-	27-	33-	36-	34	33	33	33	32	32	32	31	31	30	30	30	30
6	19-	26-	32-	35-	33	32	32	32	31	31	31	O	O	O	O	O	O
5	18-	25-	31-	34-	O	O	O	O	O	O	O	30	30	29	29	29	29
O	17-	24-	30-	33-	32	31	31	31	30	30	30	29	29	28	28	28	28
4	O	O	O	O	31	30	30	30	29	29	29	28	28	27	27	27	27
3	16-	23-	29-	32-	30	29	29	29	28	28	28	27	27	26	26	26	26
2	15-	22-	28+	31-	29	28	28	28	27	27	27	O	O	O	O	O	O
O	14-	21-	27-	30-	O	O	O	O	O	O	O	26	26	25	25	25	25
1	13-	20-	26-	29+	28	27	27	27	26	26	26	25	25	24	24	24	24
	O	O	O	O	27	26	26	26	25	25	25	24	24	23	23	23	23
	12-	19-	25-	28-	26	25	25	25	24	24	24	23	23	22	22	22	22
	11-	18-	24-	27-	25+	24	24	24	23	23	23	O	O	O	O	O	O
	10+	17-	23-	26-	O	O	O	O	O	O	O	22	22	21	21	21	21
	9	16-	22	25	24	23	23	23	22	22	22	21	21	20	20	20	20
	O	O	O	O	23	22	22	22	21	21	21	20	20	19	19	19	19
	8	15	21	24	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	18	18	18
	7	14	20	23	21	20	20	20	19	19	19	O	O	O	O	O	O
	6	13	19	22	O	O	O	O	O	O	O	18	18	17	17	17	17
	5	12	18	21	20	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	16
	O	O	O	O	19	18	18	18	17	17	17	16	16	15	15	15	15
	4	11	17	20	18	17	17	17	16	16	16	15	15	14	14	14	14
	3	10	16	19	17	16	16	16	15	15	15	O	O	O	O	O	O
	2	9	15	18	O	O	O	O	O	O	O	14	14	13	13	13	13
	O	8	14	17	16	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	12	12
	1	O	O	O	15	14	14	14	13	13	13	12	12	11	11	11	11
		7	13	16	14	13	13	13	12	12	12	11	11	10	10	10	10
		6	12	15	13	12	12	12	11	11	11	O	O	O	O	O	O
		5	11	14	O	O	O	O	O	O	O	10	10	9	9	9	9
		O	10	13	12	11	11	11	10	10	10	9	9	8	8	8	8
		4	O	O	11	10	10	10	9	9	9	8	8	7	7	7	7
		3	9	12	10	9	9	9	8	8	8	7	7	6	6	6	6
		2	8	11	9	8	8	8	7	7	7	O	O	O	O	O	O
		O	7	10	O	O	O	O	O	O	O	6	6	5	5	5	5
		1	6	9	8	7	7	7	6	6	6	5	5	4	4	4	4
			O	O	7	6	6	6	5	5	5	4	4	3	3	3	3
			5	8	6	5	5	5	4	4	4	3	3	2	2	2	2
			4	7	O	O	O	O	3	3	3	2	2	O	O	O	O
			3	6	5	4	4	4	2	2	2	O	O	1	1	1	1
			2	O	4	3	3	3	O	O	O	1	1				
			O	5	3	2	2	2	1	1	1						
			1	4	2	O	O	O									
				3	O	1	1	1									
				2	1												
				O													
				1													

Abb.46: Flächenplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympomen nach den Sichtbonituren aus den Jahren 2004 (gelb), 2005 (blau) und 2006 (orange) sowie in allen 3 Jahren (grün) am Standort Bahlingen im Kaiserstuhl (R=Reihe / O= Sticket); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	54	54	53	55+	52	53	52	52	50	50	48	50	49	49	49
54	53	53	52	54	51	52	51	51	49	49	47	49	48	48	48
53	52	52	51	53	0	51	50	50	48	48	46	48	47	0	0
52	0	0	0	0	50	50	49	49	47	47	45	47	0	47	47
0	51	51	50	52	49	49	48	48	0	0	0	0	46	46	46
51	50	50	49	51	48	48	0	0	46	46	44	46	45	45	45
50	49	49	48	50	47	0	47	47	45	45	43	45	44	44	44
49	48	48	47	49	0	47	46	46	44	44	42	44	43	0	0
48	47	47	0	0	46	46	45	45	43	43	41	43	0	43	43
47	0	0	46	48	45	45	44	44	42	0	0	0	42	42	42
0	46	46	45	47	44	44	43	43	0	42	40	42	41	41	41
46	45	45	44	46	43	43	0	0	41	41	39	41	40	40	40
45	44	44	43	45	42	0	42	42	40	40	38	40	39	39	39
44	43	43	42	44	0	42	41	41	39	39	37	39	38	0	0
43	42	42	0	0	41	41	40	40	38	38	36	38	0	38	38
42	0	0	41	43	40	40	39	39	37	0	0	0	37	37	37
0	41	41	40	42	39	39	38	38	0	37	35	37	36	36	36
41	40	40	39	41	38	38-	0	0	36-	36	34	36	35	35	35
40	39	39	38	40	37	0	37-	37-	35+	35	33	35	34	34	34
39	38	38	37	39	0	37+	36+	36-	34+	34	32	34	33	0	0
38	37	37	0	0	36-	36+	35+	35-	33-	33	31	33	0	33	33
37	0	0	36	38	35-	35-	34-	34-	32-	0	0	0	32	32	32
0	36	36	35	37	34-	34-	33-	33-	0	32	30	32	31	31	31
36	35	35	34	36	33-	33-	0	0	31+	31	29	31	30	30	30
35	34	34	33	35	32-	0	32+	32-	30+	30	28	30	29	29	29
34	33	33	32	34	0	32-	31+	31-	29-	29	27	29	28	0	0
33	32	32	0	0	31-	31-	30+	30-	28-	28	26	28	0	28	28
32	0	0	31	33	30-	30+	29-	29-	27-	0	0	0	27	27+	27
0	31	31	30	32	29-	29-	28+	28-	0	27	25	27	26	26	26
31	30	30	29	31	28-	28-	0	0	26-	26	24	26	25	25	25
30	29	29	28	30	27+	0	27-	27+	25-	25	23	25	24	24	24
29	28	28	27	29	0	27-	26-	26-	24-	24	22	24	23	0	0
28	27	27	0	0	26-	26-	25-	25+	23-	23	21	23	0	23	23
27	0	0	26	28	25+	25-	24-	24-	22-	0	0	0	22	22	22
0	26	26	25	27	24-	24-	23+	23-	0	22	20	22	21	21	21
26	25	25	24	26	23-	23-	0	0	21-	21	19	21	20	20	20
25	24	24	23	25	22+	0	22-	22-	20-	20	18	20	19	19	19
24	23	23	22	24	0	22-	21-	21-	19-	19	17	19	18	0	0
23	22	22	0	0	21-	21-	20-	20-	18-	18	16	18	0	18	18
22	0	0	21	23	20-	20	19-	19-	17-	0	0	0	17	17	17
0	21	21	20	22	19-	19+	18-	18-	0	17	15	17	16	16	16
21	20	20	19	21	18-	18	0	0	16	16	14	16	15	15	15
20	19	19	18	20	17+	0	17	17	15	15	13	15	14	14	14
19	18	18	17	19	0	17	16	16	14	14	12	14	13	0	0
18	17	17	0	0	16	16	15	15	13	13	11	13	0	13	13
17	0	0	16	18	15	15	14	14	12	0	0	0	12	12	12
0	16	16	15	17	14	14	13-13	13	0	12	10	12	11	11	11
16	15	15	14	16	13	13	0	0	11	11	9	11	10	10	10
15	14	14	13	15	12	0	12	12	10	10	8	10	9	9	9
14	13	13	12	14	0	12-	11	11	9	9	7	9	8	8	8
13	12	12	0	0	11-	11-	10	10	8	8	6	8	7	7	7
12	0	0	11-	13-	10-	10-	9	9	7	7	5	7	6	6	6
0	11	11	10-	12-	9-	9-	8	8	6	6	0	6	5	5	5
11	10	10	9-	11-	8-	8-	7	7	5	5	4	5	0	0	0
10	9	9	8+	10-	7-	7-	6	6	0	0	3	0	4	4	4
9	8	8	7-	9-	6-	6-	5	5	4	4	2	4	3	3	3
8	7	7	6-	8+	5-	5-	0	0	3	3	1	3	2	2	2
7	6	6	5+	7+	0	0	4	4	2	2	0	2	1	1	1
6	5	5	0	6-	4-	4+	3	3	1	1	0	1	0	0	0
5	0	0	4-	5+	3-	3-	2	2	0	0	0	0	0	0	0
0	4	4	3-	0	2-	2-	1	1	0	0	0	0	0	0	0
43	3	3	2-	4-	1-	1-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1-	3-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	2-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb.47: Flächenplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussyptomen nach den Sichtbonituren aus den Jahren 2004 (gelb), 2005 (blau) und 2006 (orange) sowie in allen 3 Jahren (grün) am Standort Sasbach im Kaiserstuhl (R=Reihe / O= Sticket); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

Die Pflanzpläne der Rebflächen an den beiden Standorten Bahlingen und Sasbach zeigen viele symptomtragende Pflanzen (Abb.46+47). Die unterschiedliche Farbgebung der markierten Rebstöcke steht für das Auftreten von Virussympomen in den einzelnen Jahren. Es wurden Pflanzen mit eindeutigen Virussympomen wie Kümmerwuchs, Panaschüren auf den Blättern, Kurzknottedigkeit und verrieselten Trauben als krank eingestuft. Neben diesen eindeutig befallenen Reben wurden auch virusverdächtige Reben, die nur ein auffälliges Virusmerkmal aufwiesen in dem Pflanzplan eingetragen und mit der gleichen Farbe für kranke Rebstöcke versehen.

Die Bereiche der Entnahme von Blattproben sind stärker umrandet. Mit den Blattproben aus diesen Bereichen wurde jährlich ein ELISA-Test durchgeführt (s.2.5.2). Die Positiv- und Negativkontrollen für diese Testung stammten aus dem Rebensortiment des Weinbauinstituts. Eine ELISA-Probe wurde als positiv gewertet, wenn der OD-Wert dieser Probe dreifach höher als der der Negativ-Kontrolle lag. Rebpflanzen, die positiv auf das GFLV getestet wurden, sind mit einem + gekennzeichnet, virusfreie mit einem -, auch wenn sie als virusauffällig in der Sichtbonitur deklariert wurden.

Bei den Sichtbonituren waren (zwischen 2004-2006) immer mehr Rebstöcke virusauffällig. Durch die unterschiedliche Farbgebung für jedes einzelne Boniturjahr wird ersichtlich, dass zwischen den Jahren immer wieder unterschiedliche Boniturergebnisse erzielt wurden. Viele Rebstöcke zeigten Virussympome, aber im darauf folgenden Jahr waren teilweise keine Symptome mehr sichtbar. Zusätzlich wurden die Rebstöcke farblich gekennzeichnet, die durchweg in allen 3 Boniturjahren virustragend waren. Aus den beiden Pflanzplänen wird so deutlich, dass die Anzahl der Rebstöcke mit Virussympomen nach der Sichtbonitur innerhalb der letzten drei Jahre zunimmt. Doch im Gegensatz dazu konnten nicht alle nach der Sichtbonitur auffälligen Pflanzen auch im ELISA-Test positiv auf das GFLV getestet werden. Innerhalb der Jahre 2004-2006 war eine Abnahme der tatsächlich im ELISA-Test positiv getesteten Pflanzen zu erkennen (Tab.10).

Jahr	Bahlingen (tatsächlich positiv)	Sasbach (tatsächlich positiv)
2004	21 %	65 %
2005	12 %	40 %
2006	11 %	33 %

Tab.10: Anteil [%] der tatsächlich im ELISA-Test positiv getesteten Pflanzen von denen nach der Sichtbonitur als krank eingestuften Pflanzen.

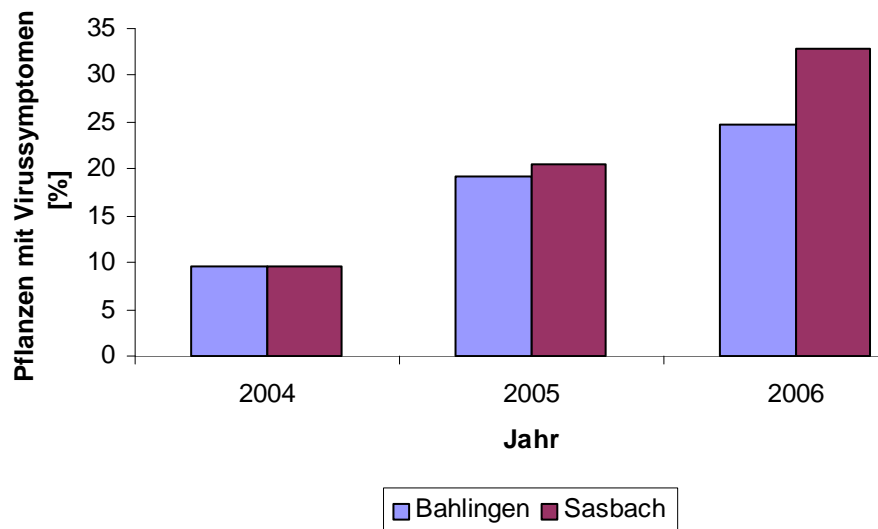


Abb.48: Anteil an Pflanzen mit Virussympptomen [%] nach einer Sichtbonitur an den Standorten Bahlingen und Sasbach.

Die Grafik zeigt einen Anstieg der virusauffälligen Rebstöcke nach den visuellen Bonituren an den zwei Standorten Bahlingen und Sasbach im Kaiserstuhl (Abb.48). Im ersten Versuchsjahr lag der Befall noch unter 10 % in beiden Flächen. Nach drei Jahren konnte fast eine Verdreifachung der virusausfälligen Reben festgestellt werden. Es wird auch deutlich, dass am Standort Sasbach mehr Reben betroffen sind als in Bahlingen (Abb.48).

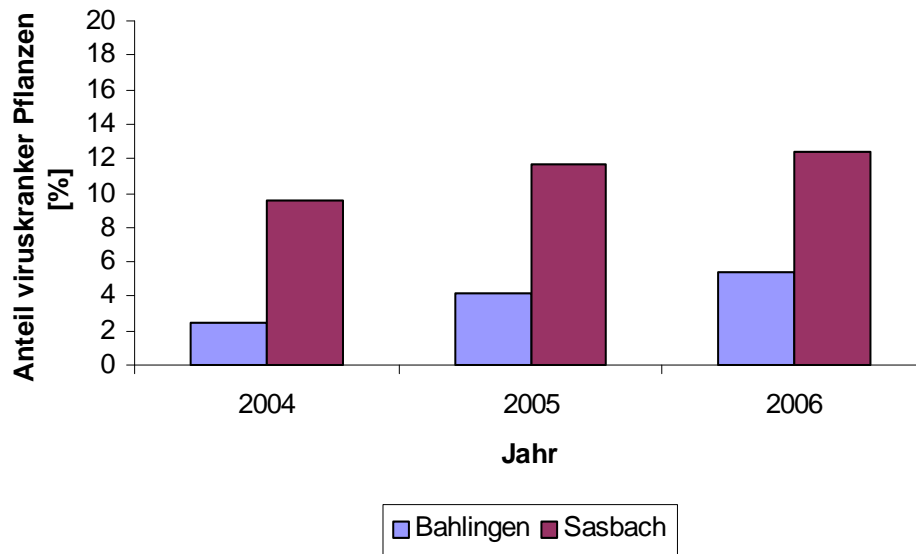


Abb.49: Anteil an viruskranken Pflanzen in den Blattprobenbereichen [%], positiv mit der ELISA-Methode getestet an den Standorten Bahlingen und Sasbach.

Neben dem Anstieg der virusauffälligen Reben in der Sichtbonitur zeigt diese Grafik eine leichte Zunahme von virushaltigen Reben, die durch die ELISA-Methode positiv getestet wurden. Erneut ist erkennbar, dass der Standort Sasbach stärker betroffen ist als der Standort Bahlingen (Abb.49).

Zusätzlich wurden in allen drei Versuchsjahren von beiden Flächen Bodenproben bis zu einer Tiefe von 60 cm entnommen und auf das Vorkommen des Virusüberträgers *X. index* untersucht. In keiner der beiden Flächen konnten Nematoden dieser Art gefunden werden.

4 DISKUSSION

Alle gängigen im Weinbau verwendeten Unterlagsreben sind bekanntlich anfällig für Viruskrankheiten wie das GFLV [Sopp *et al.*, 1998]. Es ist daher umgehend ein Bedarf an virusresistenten Reben vorhanden. Selbst bei Neuanpflanzungen ist eine Reinfektion der Reben mit dem Virus über die Nematoden nicht auszuschließen. Daher müssen Reben gezüchtet werden, die wenigstens eine Toleranz oder sogar eine Art Resistenz gegen Nematoden oder gegen das in dieser Arbeit behandelte Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) besitzen.

4.1 ENTWICKLUNG EINES STERILEN *IN-VITRO*-TESTSYSTEMS ZUR BEOBACHTUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN *IN-VITRO*-SÄMLINGEN UND STECKLINGEN DER VERWENDETEN REBPFLANZEN UND *XIPHINEMA INDEX*

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung und Optimierung eines Testsystems für Reben, das detaillierte Einblicke in das Wurzel-Nematoden-System erlaubt. Nur so war es gewährleistet, mehr über eine mögliche Resistenz von Reben zu erfahren. Da die Rebpflanzen und die Nematoden in getrennten Kulturen angezogen wurden, war es nötig ein gemeinsames System für beide Organismen zu entwickeln. Es wurden daher verschiedene Medienarten und auch entsprechende Konzentrationen getestet bis die optimalen Bedingungen für Nematoden und Rebpflanzen gegeben waren. Da über die Vegetationsperiode hinaus mit sterilen *in-vitro*-Reben gearbeitet wurde, musste dementsprechend auch eine Sterilkultur des virus-übertragenden Nematoden *Xiphinema index* angelegt werden. Neben der sterilen Kultivierbarkeit von Rebenstecklingen aus dem Freiland in einem begrenzten jahreszeitlichen Rahmen, musste ein gemeinsames Steril-medium für die Nematoden und Reben gefunden werden. Die Testung zur Virustransmission durch Nematoden mit den verwendeten Pflanzen fand sowohl mit *in-vitro*-Pflanzen als auch mit Gewächshauspflanzen statt. Das Testsystem wurde für die Gewächshausbedingungen nach Weischer & Wyss [1976] variiert und angepasst.

Zudem war nicht nur die Virustransmission auf die Testreben von Interesse, sondern es konnten mit Hilfe des *in-vitro*-Testsystems auch unterschiedliche Reaktionen der

Wurzeln von Rebpflanzen auf die Nematodenbesaugung festgestellt werden. Zwei unterschiedliche Wurzelreaktionen gaben den Anlass zur näheren Charakterisierung. Neben der molekularbiologischen Analyse der Expression von Abwehrgenen wurden auch Wurzelpräparate durch Färbemethoden auf die Ausbildung der Pflanzenabwehr untersucht. Außerdem konnten präzisere Einblicke in das Auffinden der Rebwurzeln als Nahrungsquelle des Nematoden erhalten werden.

Im Freiland konnte die Symptomatik und Problematik des GFLV praxisnah in zwei Rebflächen im Kaiserstuhl nachverfolgt werden.

4.2 CHARAKTERISIERUNG UND BEDEUTUNG DER REAKTION VON WURZELN DER VERSCHIEDENEN VITIS-SPEZIES AUF DIE BESAUUNG DURCH XIPHINEMA INDEX

Xiphinema index findet man in vielen Weinbaugegenden auf der ganzen Welt. Diese Art hat ein begrenztes Wirtsspektrum, hauptsächlich die Weinrebe (*Vitis spec.*) und die Feige (*Ficus carica*; Wyss, 1999). An Feige kann ein besseres Vermehrungspotential erreicht werden, weil diese nicht mit dem GFLV infiziert werden kann und dadurch keine Nachteile für die Pflanze entstehen [Esmenjaud *et al.*, 1994]. Nematoden der Gattung *Xiphinema* besaugen die Wurzeln von Weinreben längere Zeit und die Pflanze reagiert darauf mit einer Reaktion der Wurzeln. Phytoparasitäre Nematoden wie *X. index* besitzen einen langen Mundstachel, mit dem sie tief in die Pflanzenwurzel, meistens nahe der Wurzelspitze, eindringen. Die attackierten Wurzelspitzen von bestimmten Wirtspflanzen, wie beispielsweise Feigen, bilden eine Galle aus [Sijmons, 1993].

Bei den gängigen, im Weinbau verwendeten Unterlagsreben Kober 5 BB und Kober 125 AA (*V. berlandieri* x *V. riparia*) konnte ebenfalls eine typische Gallenbildung an den Wurzeln durch die Besaugung beobachtet werden. Die Saugtätigkeit der Nematoden setzte bei diesen Sorten rasch, häufig schon innerhalb weniger Stunden ein. Es handelt sich bei diesen *V. riparia*-Kreuzungen um reblausresistente Sorten, die auch eine gute Resistenz gegen Mehltaukrankheiten besitzen [Vogt & Schruft, 2000]. Jedoch konnte eine hohe Anfälligkeit gegenüber Nematoden durch diese kompatible Interaktion beobachtet werden.

Migratorische Ektoparasiten wie *X. index* saugen an bestimmten Zellen für eine begrenzte Zeit. Diese Nematoden penetrieren tiefer gelegene Wurzelzellen mit ihrem langen Stylet. Wahrscheinlich werden Sekrete, in den Oesophagus-Drüsen gebildet, durch das Stylet in die perforierten Zellen abgegeben [Wyss, 1978]. Diese Sekrete bewirken zelluläre Veränderungen, wie synchrone Kernteilungen ohne Cytokinese, Zellwandeinstülpungen und Hypertrophie. Es entsteht durch die Penetration mit dem Stylet direkt am Nahrungskanal eine Wölbung, die mit modifiziertem Cytoplasma gefüllt ist. Diese Beobachtungen wurden bei anderen phytoparasitären Nematodengattungen gemacht und könnten daher bei *X. index* identisch sein [Sijmons *et al.*, 1994]. Das in der Arbeit verwendete Agarmedium für Pflanze und Nematode erlaubte detaillierte Beobachtungen des Saugvorgangs der Nematoden an den Wurzeln. Es wurde das eingeführte Stylet des Nematoden innerhalb der Wurzel gesehen und gleichzeitig war das Pumpen des oesophagischen Bulbus bei der Nahrungsaufnahme zu erkennen.

Wurzelgallen üben auf saugende Nematoden eine lang andauernde, attraktive Wirkung aus [Wyss, 1978]. Auch bei Kober 5 BB und Kober 125 AA waren stark besaugte Wurzelgallen sehr attraktiv und wurden nach dem Abwandern immer wieder aufgesucht. Es konnte außerdem häufig eine Ansammlung von Nematoden an Gallen beobachtet werden. Nach wenigen Tagen kam es auch zur Eiablage durch die Weibchen im Bereich dieser Wurzelgallen. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von Rumpenhorst & Weischer [1978]. Wurzelgallen sind anscheinend sehr attraktiv für Weibchen von *X. index*, denn sie stellen eine gute Nahrungsquelle dar, was zu einer vermehrten Eiproduktion und Eiablage der Nematoden führt [Rumpenhorst & Weischer, 1978]. Die frisch geschlüpften Larven penetrierten ebenfalls die Wurzelgallen.

Schnitte durch Gallengewebe zeigen viele multinukleate Zellen [Weischer & Wyss, 1976]. Die Vielkernigkeit dieser Zellen entsteht durch synchrone Mitosen ohne Cytokinese [Rumpenhorst & Weischer, 1978]. Multinukleate Riesenzellen dienen als Nahrungsquelle, werden aber durch die anhaltende Saugtätigkeit zerstört [Wyss 1999]. Nach einigen Tagen waren die stark besaugten Wurzelgallen braun gefärbt und es waren immer mehr kollabierte Zellen zu erkennen. Wurden einzelne Wurzelzellen zu stark durch das Stylet des Nematoden penetriert, waren zum Teil sogar Löcher im Wurzelgewebe durch das Kollabieren dieser Zellen entstanden. Ein getesteter *V. vinifera* x *V. rotundifolia*-Hybrid (Nr. 35) zeigte auch diese typische

Gallenbildung. Ähnliche Beobachtungen wurden an den Testreben 91 (*V. solonis*), 136 (*V. cinerea*) und 173 (*C.v. Ramsey*; Tab.7) gemacht. Die Gallenbildung der Wurzeln zeigte sich durch die verschiedenen Rebsorten hinweg, so dass diese Reaktion der Wurzeln als empfindlich oder suszeptibel bezeichnet werden kann.

Eine ganz anders verlaufende Reaktion der Rebwurzeln auf die Nematodenbesaugung war die Bildung von Nekrosen. Die direkt penetrierten Wurzelareale verfärbten sich mit der Zeit braun. Diese nekrotischen Bereiche waren abgegrenzt und breiteten sich nicht aus, wie auch schon in früheren Untersuchungen festgestellt wurde [Wyss, 1999]. Die Nekrosen waren nicht auf die äußere Wurzelschicht, die Rhizodermis beschränkt, sondern entstanden auch entlang des tief eingeführten Stylets von *X. index*.

Die *V. rotundifolia*- und *V. rufotomentosa*-Hybride, außer Hybrid 35, gehörten zu den nekrosenbildenden Rebpflanzen (Tab.7). Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) zeigte nur bei einer der getesteten Pflanzen eine Nekrosenbildung. Dieser Befund war auf einen Fall beschränkt, bei dem die Anzahl der Nematoden verdoppelt wurde. Möglicherweise könnte diese Pflanze eine Art von Resistenz besitzen, die auf die Wurzelbeschaffenheit zurückzuführen ist. Bei den übrigen Testpflanzen aus unterschiedlichen Kreuzungen waren keine Unterschiede in der Nekrosenbildung an den Wurzeln zu erkennen.

Boulbas und Pistre [1978], Bouquet [1981] sowie Staudt & Weischer [1992] berichten über die Resistenz von *V. rotundifolia* gegen *X. index*. Züchtungsprogramme mit *V. rotundifolia* und *V. rufotomentosa* wurden in Frankreich durch Bouquet & Danglot [1983] und in Kalifornien durch Meredith *et al.* [1982] vorgenommen. Aus diesen Züchtungsprogrammen stammen auch die verwendeten Hybride aus dem Freiburger Rebsortiment. Die in dieser Arbeit getesteten Hybride wurden bereits von G. Staudt auf ihre Resistenzeigenschaften gegenüber der Transmission des GFLV getestet. Diese Testungen fanden mit Gewächshausreben, gepflanzt in Erde, statt. Die Pflanzen wurden anhand des ELISA-Tests auf eine Infektion mit dem GFLV untersucht. Dabei wurden einige *V. rotundifolia*- und *V. rufotomentosa*-Hybride aus diesem Rebsortiment als resistent gegenüber dem GFLV erklärt [eigene, nicht veröffentlichte Unterlagen des Staatlichen Weinbauinstituts Freiburg]. Doch eine Resistenz oder sogar Immunität mit gezielter Meidung dieser Wurzeln der *V. rotundifolia*- und *V. rufotomentosa*-Hybride durch die Nematoden konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Auch die Reaktion (Gallenbildung) der Wurzeln der

Testpflanze 91 (*V. solonis*) in dem *in-vitro*-Testsystem stimmte nicht mit den früheren erhobenen Daten überein. *V. solonis* wurde nach der Inokulation mit *X. index* als resistent deklariert, da keine Symptome des Nematodenbefalls an den Wurzeln zu bemerken waren. Die Wurzeln wurden von Kunde *et al.* [1968] in Kategorien für Anfälligkeit oder Resistenz eingeteilt. Die Wurzeln wurden dafür von der Erde befreit und visuell analysiert. Der Befall wurde mit Hilfe von Symptomen an den Wurzeln wie lokale Schwellungen oder die Lateralwurzelbildung abgeschätzt [Kunde *et al.*, 1968]. Diese abweichenden Beobachtungen lassen sich damit erklären, dass die früheren Resistenzversuche ausschließlich mit in Erde gepflanzten Topfreben durchgeführt wurden und damit detaillierte Beobachtungen der Wurzel-Nematoden-Interaktion nicht möglich waren.

Die beiden verwendeten *Muscadinia*-Arten waren wenig für eine sterile Kultivierung geeignet. Von den wenigen, lebenden Stecklingen kamen viele nicht über das Zwei-Blatt-Stadium hinaus und die Wurzelausbildung fand nur in einzelnen Fällen statt. *Muscadinia*-Arten sind bekannt für ihre schlechte Bewurzelung [Walker *et al.*, 1989]. Es konnte daher nur eine Testung mit Nematoden für *M. dulcet* und *M. regale* vorgenommen werden. Ergänzend wurden zusätzlich Gewächshausreben der beiden Arten verwendet, die aber auch kein optimales Wachstum zeigten. Sowohl bei *in-vitro*-Pflanzen als auch Gewächshausreben von *M. dulcet* und *M. regale* konnte keine Saugtätigkeit von *X. index* an diesen Wurzeln und somit keine Abwehrreaktion festgestellt werden. Ob nun die Meidung dieser Wurzeln durch *X. index* auf die Beschaffenheit der Wurzeln selbst oder auf abgegebene Wurzelexudate, die repellent wirkten, zurückzuführen ist, ist noch unklar und sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bouquet & Boursiquot [1998] sprachen im Falle von *Muscadinia* von einer „hohen Resistenz“ gegenüber *X. index*. Es handelt sich hier um in eine eigene Untergattung eingestufte *Muscadinia*-Reben. Die Sonderstellung von *Muscadinia*-Reben ergibt sich aus dem unterschiedlichen Chromosomensatz. Die taxonomische Einteilung ist zur Zeit noch nicht eindeutig, da diese Weinreben, zu denen auch *Vitis rotundifolia* gehört, einer abgegrenzten Gruppe zuzuordnen sind [Staudt & Weischer, 1992].

Aufgrund der beobachteten Reaktionen der Wurzeln, wurden Rebsorten mit einer Gallenbildung, einer kompatiblen Interaktion, laut McKenry *et al.* [2001] als anfälliger gegenüber anderen ohne Gallenbildung eingestuft. Daher wurden nur Reben mit einer Nekrosenbildung an den Wurzeln für die Virustransmission ausgesucht.

Die wildbestäubten Sämlinge der verwendeten Testreben zeigten bis auf Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) mit den Mutterpflanzen identische Reaktionen der Wurzeln (Tab.8). Die Ausprägung der Abwehrreaktion der Sämlingswurzeln wich auch in den nacheinander folgenden Jahrgängen nicht ab. Demnach könnte es sich bei dem Merkmal Nekrosen, wie bei der Gallenbildung von Kober 5 BB, um eine dominante Vererbung von Eigenschaften handeln, da bekanntlich die F1-Nachkommen in diesem Fall alle identische Reaktionen der Wurzeln aufwiesen. Unterschiede in der Merkmalsausprägung findet man bei den Nachkommen der Testpflanze 16, von denen nur Samen aus dem Jahr 2003 zur Verfügung standen. Hier war unter den Sämlingen aus einer F1-Generation eine unterschiedliche Merkmalsausprägung aufgetreten. Es waren durch die Besaugung von *X. index* sowohl eine Nekrosenbildung als auch eine Gallenbildung sichtbar. Die Eltern-Generation der Testpflanze 16 war damit heterozygot. Aus Kreuzungsexperimenten ist bekannt, dass Testpflanze 16 zwittrig ist [persönl. Mitteilung Jörger, V.; Staatliches Weinbauinstitut Freiburg]. Die Weinrebe (*V. vinifera*) ist in ihrer Ursprungsform in der Regel getrenntgeschlechtlich. Aufgrund der früheren Zuchtwahl blühen aber fast alle Kultursorten zwittrig. Während der jahrtausendelangen Geschichte der Rebkultur entstanden neue Sorten durch Mutationen, aus Zufallssämlingen oder durch Bastardierung. Somit sind alle Weinreben, was die Ausprägung an Merkmalen betrifft, heterogen. Diese generative Vermehrung führt stets zu einer großen erblichen Aufspaltung der Nachkommen [Vogt & Schruft, 2000; Currle *et al.*, 1983]. Das Merkmal der Gallenbildung wurde somit durch eine Wildbestäubung von dem Pollen eines unbekanntem Kreuzungspartners eingekreuzt, da die Mutterpflanze 16 bekanntermaßen keine sichtbare Reaktion der Wurzeln und in einem Fall eine Nekrosenbildung zeigte. Durchaus möglich wäre es aber auch, dass eine Selbstbestäubung der zwittrigen Blüten stattgefunden hat und das Merkmal der Nekrosenbildung in der F1-Generation selbst weitervererbt wurde.

Mit Hilfe des etablierten *in-vitro*-Testsystems war es möglich detaillierte Beobachtungen der Interaktion zwischen verschiedenen Rebwurzeln und Nematoden zu machen. Neben der Gallenbildung in Folge der Nematodenbesaugung, könnte die Nekrosenbildung eine Resistenzeigenschaft für die Abwehrmaßnahme der Pflanze sein. Für züchterische Interessen könnte das Auftreten der identischen Reaktionen an den Wurzeln bei den Nachkommen dieser Pflanzen von Vorteil sein.

4.3 NACHWEIS DES GFLV IN *VITIS SPEC.* MIT RT-PCR

4.3.1 Nachweis des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen und in Pollen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

In der weinbaulichen Praxis, ist es laut EU-Pflanzgutverordnung [2002] Pflicht, Reben vor dem Auspflanzen auf das Vorhandensein von Viruskrankheiten zu testen. Damit soll einer Verbreitung von Pflanzenviren in Weinbergsflächen vorgebeugt werden, da die Vektoren solcher Pflanzenviren mittlerweile natürlich in der Umgebung vorkommen. Es handelt sich bei den Vektoren von verschiedenen Rebvirosen neben Nematoden auch um Schmier- oder Schildläuse. Doch speziell das GFLV wird nur von *X. index* übertragen [Mohr, 2005]. Die gängigste Methode zum Nachweis von Viruskrankheiten bei Reben ist das DAS-ELISA-Verfahren [Clark & Adams, 1977]. Für diese Methode auf immunserologischer Basis wird meistens Blattmaterial verwendet. Die Entnahme von Blattmaterial ist aber abhängig von der Jahreszeit und vom Entwicklungsstand der Rebe. Um eine genaue Detektion von Rebvirosen zu gewährleisten, müssen die Blattproben zur Hauptzeit der Vegetationsperiode, meistens zur Mitte des Sommers, von der mittleren Laubwand einer Rebepflanze stammen [persönl. Mitteilung, Bohnert, P.; Staatliches Weinbauinstitut Freiburg].

Da die Durchführung der Transmissionsversuche mit den verwendeten Testreben nicht nur während der Vegetationsperiode der Rebe stattfand, wurde eine ganzjährige, vor allem sensitivere Methode auf molekularbiologischer Basis genutzt. Die Anwendung der RT-PCR wurde zur Detektion des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen der Rebe eingesetzt. Dabei wurde nur ungefähr die Hälfte an Pflanzenmaterial benötigt als für die ELISA-Testung. Deshalb konnte auch die Resistenzprüfung mit *in-vitro*-Pflanzenmaterial durchgeführt werden. Ein weiteres Vorteil für die RT-PCR ist die kürzere Testdauer von Virustransmissionen, da schon kleinste Mengen viraler RNA nach bereits vier Wochen nachgewiesen werden. Das GFLV war in eindeutig infizierten Rebepflanzen aus dem Sortiment des Weinbauinstituts in allen Pflanzenteilen nachweisbar. Deutliche GFLV-Fragmente (416 bp) wurden in den Wurzeln, Stängeln, Blättern und Beeren amplifiziert. Das GFLV-Fragment in der Stängelprobe ist weniger deutlich ausgeprägt. Dies mag an

dem verminderten Gehalt viraler RNA im Stängelgewebe liegen, da dort fast ausschließlich Stützgewebe, also die Zellwände toter Zellen, vorhanden ist [Strasburger, 2002]. Da phytopathogene RNA-Viren auf lebende Zellen angewiesen sind, wandern sie lokal durch die Plasmodemen von Zelle zu Zelle. Für den Langstreckentransport wird in den meisten Fällen das Phloem, aber auch das Xylem benutzt [Drews *et al.*, 2004]. Deshalb werden die Viren nicht im Bereich des Stängels angelagert und weitertransportiert. Das GFLV kann sich in der gesamten Pflanze ausbreiten und es kommt in den Blättern zu einer mosaikartigen Sprenkelung durch befallene Interkostalfelder [Strasburger, 2002]. Bei diesen sogenannten Panaschüren handelt es sich um Chloroplastendefekte [Drews *et al.*, 2004]. Des Weiteren konnte auch der Pollen von infizierten Reben positiv auf das GFLV getestet werden. Doch eine Übertragung des GFLV durch Pollen in Rebflächen ist bisher nicht dokumentiert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass oftmals virusinfizierter Pollen entwicklungsgestört, weniger vital und konkurrenzfähig als gesunder ist, so dass die Effektivität der Pollenübertragbarkeit mancher Viren begrenzt oder unmöglich ist [Meyer-Kahsnitz, 1993]. Alle Viren, die durch Pollen übertragbar sind, werden auch auf Samen übertragen, aber nur einige samenübertragbare Viren sind auch pollenübertragbar. Das GFLV konnte in den angezogenen Sämlingen infizierter Rebpflanzen detektiert werden, wird aber nicht durch Pollen übertragen. Der Mechanismus der Samenübertragung des GFLV ist bisher in der Literatur nicht geklärt [Drews *et al.*, 2004].

Der Nachweis des GFLV in den einzelnen Pflanzenteilen von eindeutig infizierten Reben bestätigte das Gelingen der RT-PCR-Methode. Daher konnte auch die gewonnene RNA aus den Wurzeln dieser infizierten Pflanzen als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Amplifizierung des GFLV-Fragmentes bei den Virus-Transmissionsversuchen fungieren.

4.3.2 Nachweis des GFLV in *in-vitro*-Stecklingen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

Mit einigen ausgewählten Testpflanzen wurden Virus-Transmissionsversuche durchgeführt. Es wurden für diese Resistenzprüfung hauptsächlich nekrosenbildende Testreben verwendet, weil in dieser Abwehrreaktion das Potential für eine mögliche Resistenz gesehen wurde. Mit Testpflanze 10 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) konnten

keine Transmissionsversuche durchgeführt werden, da diese Rebe ein schlechtes Wachstum aufwies und demnach nicht genügend Pflanzen zur Verfügung standen. Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) war ebenfalls schlecht geeignet für eine *in-vitro*-Kultivierung, so dass hier nur eine Testung mit Gewächshausreben (s. 4.2.3) vorgenommen werden konnte. Da die Standard-Unterlagen Kober 5 BB und Kober 125 AA virusanfällig sind, wurden diese als positive Kontrolle für eine Virustransmission verwendet. Für die Testung wurden die Nematoden für mindestens drei Monate an GFLV-kranken Reben im Gewächshaus inokuliert und danach aus der Erde ausgewaschen [Staudt, 1997]. Nach der Inokulation der Testpflanzen wurden die Ansätze täglich mikroskopiert und die Saugtätigkeit sowie daraus resultierende Wurzelreaktionen erfasst. Die Testpflanzen 42, 46, 140 und 141 waren, obwohl sie unterschiedliche Kreuzungseltern besitzen, an den Wurzeln nekrosenbildend, weshalb sie zur Resistenzprüfung verwendet wurden.

Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) zeigte sich sensitiv für eine Virusübertragung. Obwohl diese Pflanze als Abwehrreaktion Nekrosen bildete, fand eine Übertragung statt. Die Ausbildung von Nekrosen kann also nicht als Resistenzkriterium für eine Abschottung gegenüber einem Virus gesehen werden. Für eine erfolgreiche Übertragung des Virus muss sich das Virus in einer Zelle befinden, die den Saugprozeß des Nematoden mindestens so lange überlebt bis eine Virusreplikation und Wanderung in anliegende Zellen stattgefunden hat [MacFarlane, 2003].

Bei Testpflanze 46 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*), ein gleicher Hybrid wie Testpflanze 42, aber ein ungleicher Genotyp, war nach bisherigen Untersuchungen keine Virusübertragung nachweisbar. Dieser Hybrid bildete ebenfalls Nekrosen bei einer Besaugung durch Nematoden. Bei dieser Pflanze könnte die Nekrosenbildung förderlich für die Ausbildung einer Virusresistenz sein. Da die Transmissionsversuche bei Testpflanze 46 mit mehreren Nematoden, die aus verschiedenen Töpfen mit GFLV-kranken Pflanzen stammten, durchgeführt wurden, wird das Ergebnis bekräftigt. Dennoch ist bei diesem Transmissionsversuch nicht auszuschließen, dass die Nematoden eventuell kein Virus aufgenommen haben könnten. Um sicher zu sein, wäre in diesem Fall auch eine längerfristige Testdauer von mindestens acht Wochen sinnvoll. Die Resistenz von *V. rotundifolia* und auch deren Hybride mit *V. vinifera* deutete sich schon in früheren Untersuchungen an [Staudt, 1997]. Diese hohe Resistenz von *V. rotundifolia* ist auf die schlechte Eignung als Wirtspflanze

zurückzuführen. Es befanden sich zwar Nematoden an den Wurzeln, doch die Wurzeln wurden seltener angestochen, daher wäre diese Pflanze als resistent gegenüber *X. index* und zusätzlich als immun gegenüber dem GFLV einzustufen. Der rapide Verfall der angestochenen Zellen könnte die Verbreitung der Viruspartikel, die durch die Abgabe mit dem Speichel übertragen wurden, verhindern. Eventuelle Infektionen sind aber nicht völlig auszuschließen, wie bei Testpflanze 42 [Staudt & Weischer, 1992].

V. rotundifolia-Hybride, gekreuzt mit *V. vinifera* sind für ihre teilweise oder totale Sterilität bekannt [Staudt & Weischer, 1992]. Dadurch lässt sich auch das Fehlen von Samen bei Testpflanze 46 erklären. Nach den Untersuchungen von Bouquet & Boursiquot [1998] zeigten Reben der Untergattung *Muscadinia*, in die Testpflanze 46 einzustufen wäre, 3, 12 und 24 Monate nach der Inokulation mit virustragenden Nematoden eine totale Resistenz gegenüber der Transmission des GFLV. Möglicherweise könnte die hohe GFLV-Resistenz von *V. rotundifolia* an der mangelnden Fähigkeit der Nematodenpopulation liegen, sich zu ernähren und zu vermehren. [Bouquet & Boursiquot, 1998]. Man könnte also bei *V. rotundifolia* nach Fritzsche *et al.* [1987] von einer Immunität gegenüber dem GFLV sprechen. Demnach wäre Testpflanze 46 tolerant gegenüber *X. index*, doch immun gegenüber dem GFLV [Fritzsche *et al.*, 1987]. Längerfristige Virustestungen mit Testpflanze 46 über vier Wochen hinaus wären in diesem Fall dennoch sinnvoll und interessant.

Bei den Testpflanzen 140 und 141 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) konnte nicht eindeutig eine Virusübertragung festgestellt werden. Da einmal die Größe des amplifizierten Fragments nicht exakt mit dem gewünschten GFLV-Fragment übereinstimmte und zudem die Ausprägung der Banden sehr schwach war, lassen sich keine genauen Aussagen treffen. Dennoch könnte vielleicht *V. rotundifolia*-Kreuzung 140 im Vergleich zu Kober 5 BB oder Kober 125 AA eine Replikation des GFLV erschweren, da in diesem Fall die FV-Bande sehr schwach sichtbar war. Trotz der Ausbildung von Nekrosen bei beiden Testpflanzen kann aber letztendlich eine Virustransmission möglicherweise nicht vollständig verhindert werden. Reben der Art *V. rotundifolia* wurden von Kunde *et al.* [1968] als resistent eingestuft. Doch diese Einschätzung bezieht sich nach den Angaben des Autors auf die Beurteilung der Symptome am Wurzelsystem. Zum Zeitpunkt der früheren Untersuchungen wurde mit in Erde gepflanzten Topfreben gearbeitet und so war eine detaillierte Beobachtung der Wurzeln nicht möglich. Darüber hinaus wurden die Versuche von

Kunde *et al.* [1968] mit der ELISA-Methode durchgeführt, einer Methode, die vielleicht nicht sensitiv genug für eine kurzzeitige Detektion des GFLV war. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, dass auch keine Virusübertragung stattfand, wenn keine Symptome an den Wurzeln zu sehen waren. In diesen, zum Teil vor Jahrzehnten durchgeführten Virus-Transmissionsversuchen, war die RT-PCR-Methode noch nicht etabliert und somit wurde ausschließlich mit der ELISA-Methode gearbeitet. In den Transmissionsversuchen in dieser Arbeit war es gelungen, die sensitivere RT-PCR-Methode anzuwenden, die vielleicht diese schwache Bande des GFLV-Fragments nach einer Zeitdauer von nur vier Wochen detektierte. Zur Absicherung dieses Ergebnisses sollte eine Wiederholung der Virustransmission mit diesen Pflanzen erfolgen.

Die Standard-Unterlage Kober 5 BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) war, wie erwartet, sensitiv für eine Transmission des GFLV. Bei dieser Testpflanze hatte außerdem eine Gallenbildung an den Wurzeln stattgefunden. Auch Sopp *et al.* [1998] konnten eine leichte Übertragbarkeit an Kober 5 BB feststellen, da von fünf getesteten Pflanzen alle mit dem GFLV infiziert wurden.

Zusätzlich wurde auch die Übertragbarkeit des GFLV an Feigen getestet. Doch eine Virusübertragung auf die Feige fand trotz zahlreicher Gallenbildungen an den Wurzeln nicht statt. Dies konnte auch in früheren Experimenten festgestellt werden [Demangeat *et al.*, 2005]. Virulente *X. index* können an Feigenwurzeln saugen, doch die Wurzeln erlauben keine Replikation der GFLV-Partikel, so dass das Virus verloren geht und die Nematoden sind schließlich nach 12 Wochen nicht länger virulent. Die Gallenbildung resultiert womöglich aus einer Induktion von Nährzellen für den Nematoden und kann daher vielleicht nicht direkt als Pflanzenabwehr gesehen werden. Die genaue Ursache dieser Immunität von Feigen gegenüber dem GFLV ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Nach diesem Resistenzscreening von verschiedenen Testpflanzen liegt die Hoffnung auf eine virusresistente Unterlage bei Testpflanze 46. Außerdem könnte ein Zusammenhang von dem Auftreten von Nekrosen bei *V. rotundifolia*-Hybriden und eventuell sogar bei *V. rotundifolia*-Hybriden mit einer Resistenz gegenüber dem GFLV bestehen.

4.3.3 Nachweis des GFLV in Gewächshauspflanzen von *Vitis spec.* mit RT-PCR

Mit Gewächshausreben der Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) und Kober 125 AA (*V. berlandieri* x *V. riparia*) wurden Virus-Transmissionsversuche durchgeführt. Hybrid 16 wurde deshalb zur Gewächshausprüfung mit virustragenden Nematoden herangezogen, weil diese Pflanze in der *in-vitro*-Testung, von einem Fall abgesehen, nie eine Wurzelreaktion gegen *X. index* zeigte. Daher sollte getestet werden, ob diese Pflanze trotz deutlich beobachteter reduzierter Saugtätigkeit durch *X. index* eine Virusübertragung zulässt.

Bei der Standard-Unterlage Kober 125 AA fand eine Virusübertragung statt und das entsprechende GFLV-Fragment wurde amplifiziert. Auch Testpflanze 16 konnte positiv auf eine GFLV-Übertragung getestet werden, zeigte also trotz eines *V. rotundifolia*-Elternteils, keine Immunität gegenüber der Virusübertragung. Vermutlich verbreitet sich das Virus in Testpflanze 16 langsamer aus als bei Kober 125 AA, da bei der Testung unterschiedlich alter Wurzelbereiche kein Virus im verholzten Teil detektiert werden konnte. Da die Wurzeln dieser beiden getesteten Gewächshausreben viel dicker und verholzter als die feinen *in-vitro*-Wurzeln waren, konnte auch eine entsprechende Reaktion der Wurzeln kaum wahrgenommen werden. Bei Kober 125 AA waren daher nur wenige Gallen an den Wurzeln ausgeprägt und bei Testpflanze 16 war nur in einem Fall eine Abwehrreaktion der Wurzeln sichtbar. Dennoch konnte täglich durch Mikroskopieren der Wurzeln die Saugtätigkeit der Nematoden beobachtet werden. Deshalb kann nicht angenommen werden, dass ohne sichtbare Symptome auch keine Virusübertragung stattfand, wie in früheren Versuchen behauptet, die zum Teil eine visuelle Charakterisierung der Wurzelsymptome als Resistenz- oder Anfälligkeitskriterium nutzten [Bouquet & Boursiquot, 1998].

Dennoch sind Reben der Art *V. rotundifolia* bekannt für eine Resistenz gegenüber der Transmission des GFLV durch *X. index* [Staudt & Weischer, 1992]. Zwei Hybride O39-16 und O43-43, gezüchtet in Kalifornien, zeigten eine Feldresistenz in virusverseuchten Flächen. Doch diese Hybride O39-16 und O43-43 wurden positiv auf das GFLV getestet, entwickelten jedoch normale Ernten [Walker *et al.*, 1994]. Eine erfolgreiche Transmission des GFLV durch den Nematoden heißt dennoch nicht, dass es auch zum Ausbruch der Krankheit in der Pflanze kommt. Die Pflanze

könnte in der Lage sein, das Virus abzuschotten, so dass keine Ausbreitung in der Pflanze stattfindet [Walker *et al.*,1989]. Diese Tatsache deckt sich auch mit den Beobachtungen von Staudt & Kassemeyer [1990], die *V. rotundifolia*-Hybride als resistent einstufen, nachdem die ELISA-Testung negativ auf die Detektion des GFLV ausgefallen war. Man spricht in diesem Fall von einer inkompatiblen Interaktion, wenn das Pathogen die Pflanze zwar infiziert, jedoch vor oder nach schwacher Symptomausprägung in seinem Wachstum gehemmt bzw. abgetötet wird. In diesem Fall ist die Pflanze resistent gegen den betreffenden avirulenten Erreger [Schopfer & Brennecke, 2006]. Zeitlich ausgedehntere Testungen über die eventuell fortschreitende Ausbreitung des Virus in den verschiedenen Teilen der Pflanze wären sinnvoll und interessant. Anhand der nicht so sensitiven ELISA-Methode wurde das Virus nach ungefähr fünf Monaten etwa am dritten Knotenpunkt des Sprosses nachgewiesen [Staudt, 1997].

Es könnte sich nämlich bei diesem *V. rotundifolia*-Hybrid 16 im Gegensatz zu oben auch um eine Art von passiver Resistenz, der "Nichtwirts-Resistenz,, handeln [Walker *et al.*,1985]. Nach Heath [1981] ergibt sich die Resistenz gegenüber dem GFLV in *Muscadinia*-Reben aus der Inkompabilität zwischen dem Virus und dem Zellgewebe und nicht aus einer Abwehrreaktion.

Daher könnte ein akzeptables Toleranzlevel gegenüber *X. index* bzw. des GFLV durch Zuchtprogramme erreicht werden. Ein resistenter Rebstock sollte nur minimale Wurzelverletzungen durch den Nematoden zulassen und aber auch das Virus tolerieren und keine Transmission auf die Nachkommen erlauben [Meredith *et al.*, 1982].

4.3.4 Nachweis von Abwehrreaktionen bei *Vitis spec.* durch den Befall von *Xiphinema index*

Nachdem die Reaktion der Wurzeln anhand der mikroskopischen Beobachtungen in Wurzelgallen und Nekrosen eingeteilt wurden, sollten die molekularbiologische Analyse von Abwehrgenen und spezifische Färbemethoden zur näheren Charakterisierung angewendet werden. Die lokal begrenzten Nekrosen der Wurzel, in der Nähe der Saugstellen, die im Gegensatz zu den Riesenzellen in einer Galle gebildet wurden, sind vermutlich eine Art HR (HR= hypersensitive cell response) [Williamson,

1999]. Der Zeitraum der Entstehung von Nekrosen, d. h. bis die Pflanze auf das Anstechverhalten und vielleicht die Injektion von Sekreten reagiert, lässt auf eine gezielte Auslösung durch den Nematodenbefall schließen. Eine HR könnte die Fähigkeit einer Pflanze sein, Resistenzmechanismen auszubilden. Auf die Entstehung von Gallen oder Nekrosen der betroffenen Wurzeln im Zusammenhang mit deren Abwehrreaktionen und der Übertragung des GFLV wird im Folgenden Bezug genommen.

Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) ist eines der bestuntersuchten Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Die Bildung von Phytoalexinen, induzierbaren Abwehrsubstanzen, zum Beispiel nach einer Pilzinfektion beinhaltet eine sehr schnelle Induktion der PAL [Heldt, 1996]. Deshalb kann die PAL als Maßstab der chemischen Abwehr der Pflanze verwendet werden [Dunn *et al*, 1998].

Viele Pflanzen reagieren auf einen Pathogenbefall mit der Synthese von Callose. Callose ist ein β -1,3-Glucan mit einer unverzweigten, schraubig gewundenen Kette. Callose bildet ohne weitere Bestandteile sehr kompakte Strukturen und dient der Pflanze als universelles Abdichtungsmaterial. Callose kann in der Plasmamembran nach Gewebsverletzungen rasch in beträchtlichen Mengen synthetisiert werden. Daher wurde auch die Aktivität der Callosesynthase als molekularbiologischer Beweis einer schnell eintretenden Abwehrreaktion verwendet [Heldt, 1996]. Die Einlagerung von Callose in Zellgewebe kann durch eine Anilinblau-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die PAL und Callose-Synthase treten in Genfamilien, das heißt in mehrfacher Ausfertigung auf, d.h. die Funktion eines angeschalteten Gens kann von einem verwandten Gen übernommen werden [Schopfer & Brennicke, 2006]. Die Callosesynthase wird zwar konstitutiv exprimiert, doch ein gehäuftes Auftreten von Transkripten bei der Weinrebe steht mit der Induktion durch das Pathogen *Plasmopara viticola* in engem Zusammenhang [persönl. Mitteilung, Dr. H.-H. Kassemeyer, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg]. Bei dieser Charakterisierung wurde ausschließlich qualitativ das Auftreten von spezifischen Transkripten während des Nematodenbefalls detektiert. Eine quantitative Analyse wäre sinnvoll und würde sicherlich präzisere Aussagen über die Transkriptmengen dieser Gene erlauben. Eine weitere Charakterisierung der pflanzlichen Abwehr ist die Detektion von Superoxid-Radikalen. Diese Sauerstoff-Radikale, die in den attackierten und in angrenzenden Zellen dieser stattfindenden HR-Reaktion gebildet werden, können durch eine Reduktion des Nitroblue-

Tetrazoliums, sichtbar gemacht werden. Die Ansammlung von H_2O_2 ist eine der häufigsten Abwehrreaktionen in der Pflanzenwelt [Hückelhoven & Kogel, 1998; Trujillo et al., 2004]. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffarten (ROS) hat die Funktion als Signalmolekül bei Pathogen-Abwehrmechanismen. Das Grundmolekül Sauerstoff wird in reaktivere ROS-Formen durch Elektronentransfer mit Elektronentransfer-Mechanismen umgewandelt. Dies resultiert in der Formation von einzelnen Sauerstoff-Molekülen und schließlich in der darauf folgenden Reduktion zu Superoxid.

Die schnellste Reaktion einer Pflanze auf Pathogenattacken ist der „oxidative-burst“ also die Produktion einer ROS, in erster Linie Superoxid und H_2O_2 an der betroffenen Stelle. Superoxid wird schnell in Wasserstoffperoxid umgewandelt, das im Gegensatz zu Superoxid die Plasmamembran durchwandern kann. Steigen die Superoxid- und Wasserstoffperoxid-Level in Pflanzen aufgrund einer Pathogen-Attacke an, führt eine hypersensitive Reaktion zum Zelltod der Wirtszellen. Dieser programmierte Zelltod ist auf das Wasserstoffperoxid zurückzuführen, das diesen Mechanismus aktiviert. Wasserstoffperoxid wird durch einen weiteren Elektronentransfer schließlich in Wasser umgewandelt [Apel et al., 2004].

Bei allen verwendeten Testpflanzen, unabhängig um welche Kreuzung es sich handelte, konnte durch die Saugtätigkeit ein Transkript der PAL detektiert werden. Eine leichte PAL-Aktivität war auch bei der nicht inokulierten Kontrolle vorhanden. Dies könnte auf die Reaktion der Wurzeln während der Verarbeitung für die RNA-Extraktion zurückzuführen sein. PAL kann außerdem auch konstitutiv exprimiert werden, da dieses Gen in einer Multigen-Familie vorkommt. Die vermutlich erhöhte Aktivität dieses Enzyms bei der Saugtätigkeit durch Nematoden lässt sich damit erklären, dass es sich für die Pflanze um eine Stresssituation handelt. Pflanzen produzieren viele phenolische Komponenten bei Attacken oder Infektionen durch Pilze und Bakterien. Diese Komponenten sind verantwortlich für die Pflanzenabwehr. PAL-Transkripte findet man in den Hauptorganen von Pflanzen wie Blättern, Stängel, Wurzeln und Blüten [Fukasawa-Akada et al., 1996].

Nach drei Tagen Versuchsdauer war bei allen von Nematoden attackierten Wurzeln eine Superoxidbildung sichtbar. Die Ansammlung von Superoxid-Radikalen fand direkt in den Arealen der Wurzel statt, die von den Nematoden besaugt wurden. Diese Superoxidbildung war aber nach längerer Versuchsdauer (14 Tage) bei beiden Reaktionen der Wurzeln, sowohl bei den Gallen als auch bei den Nekrosen nicht

mehr feststellbar. Demnach ist die Bildung von Superoxidradikalen nach der Attacke durch Nematoden zeitlich begrenzt. Im fortgeschrittenen Stadium der Reaktion der Wurzeln scheint sich die Pflanze nicht mehr mit einer Abwehrreaktion zu wehren und hat diese Wurzel aufgegeben. Mehrere Wochen alte Gallen, die ständig weiterbesaugt wurden, wiesen schon Löcher und Deformierungen auf, wie auch von Wyss [1978] beobachtet werden konnte. Bei der Ausbildung von Nekrosen war neben der PAL-Aktivität nicht bei allen Testpflanzen eine Calloseeinlagerung feststellbar. Die Einlagerung von Callose war in diesem Fall auf die *V. rotundifolia*-Hybride beschränkt.

Bei der Ausbildung einer typischen Wurzelgalle von Kober 125 AA (*V. berlandieri* x *V. riparia*) war wahrscheinlich eine sehr hohe Aktivität der PAL vorhanden, was auf das stark ausgebildete Fragment hindeutet. Wie schon in Abschnitt 4.2.3 erwähnt, verhinderte eine Gallenausbildung an den Wurzeln von Kober 125 AA eine Virusübertragung nicht. Eine Callose-Einlagerung konnte durch die Anilinblau-Färbung einer Wurzelgalle nicht nachgewiesen werden. In Folge dessen konnten das Auftreten der PAL und die anfängliche Bildung von Superoxid nicht als effektive Abwehrmechanismen dienen.

Obwohl Testpflanze 141 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) eine andere Reaktion der Wurzeln aufwies, nämlich die Ausbildung von Nekrosen, kann eine Virusübertragung nicht ausgeschlossen werden. Bei diesem Hybrid war keine Callose-Synthese aktiv und nach den Färbungen keine Callose-Deposition im Gewebe sichtbar. Da aber die Detektion des GFLV bei den Testpflanzen 141 und 140 nicht eindeutig geklärt werden konnte, besteht somit vielleicht die Chance auf eine Resistenz. Wiederholungen der Virustransmission mit diesen Pflanzen wären somit zur Aufklärung dieses Sachverhaltes nötig. Es könnte dennoch einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Callose-Synthese und einer möglichen Verhinderung der Übertragung des GFLV bei anderen Kreuzungen geben.

Deshalb waren die Testpflanzen 42 und 46, beide *V. vinifera* x *V. rotundifolia*-Kreuzungen, doch unterschiedliche Genotypen, interessant. Beide Pflanzen waren an den Wurzeln nekrosenbildend und zeigten sowohl PAL- als auch Callosesynthese-Transkripte. Die Deposition von Callose konnte auch im Gewebe von Testpflanze 42 durch eine Anilinblau-Färbung lokalisiert werden. Außerdem konnte bei Testpflanze 42 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) schon drei Tage nach Inokulation mit Nematoden auch eine Callose-Einlagerung an den Zellwänden durch

die Anilinblaufärbung sichtbar gemacht werden. Es fand hauptsächlich eine Callose-Ansammlung in der durch das Stylet attackierten Zellen statt. Pflanzenzellen antworten auf eine mechanische Verletzung oder Pilzinfektion mit einer schnellen Ansammlung von Callose an der inneren Oberfläche der betroffenen Zellwand [Williamson, 1999]. Trotz dieser geeigneten Abwehrmaßnahmen fand eine Übertragung des Virus bei Testpflanze 42 statt.

Bei Testpflanze 46 hingegen konnte kein GFLV-Fragment nach einer Besaugung durch die Nematoden amplifiziert werden. Wahrscheinlich dient in diesem Fall die Deposition von Callose zur Virusabschottung. Eine Callose-Synthese kann durch mechanische Verletzungen, wie in diesem Fall durch die Saugtätigkeit der Nematoden, physiologischen Stress und Infektionen durch Phytopathogene induziert werden. Eine Callose-Ansammlung zieht Veränderungen der Pflanzenzellmembran mit sich, die mit einer ansteigenden Ca^{2+} -Konzentration und einer Aktivierung der membrangebundenen Callose-Synthase einhergehen [Yun et al., 2006]. Daher könnte die Callosebildung die Plasmodesmen defekter Zellen, die die Viren u.a. als Transportweg nutzen, verschließen, um eine Gefährdung anderer Zellen des Symplasten zu verhindern [Heldt, 1996].

Ein eher untypisches Reaktionsverhalten wie die Bildung von Nekrosen an Wurzeln auf die Besaugung durch Nematoden könnte dennoch ein Indiz für resistente Pflanzen sein. Es konnte schon früher gezeigt werden, dass Wurzeln von *Vitis spec.* eine nekrotische, hypersensitive Antwort bezüglich des Befall durch *X. index* zeigten [Weischer, 1982; Staudt & Weischer, 1992]. Bei *V. rotundifolia* konnte keine kompatible Interaktion, wie eine Schwellung oder Gallenbildung beobachtet werden. Dies deutet eventuell auf eine hohe Toleranz oder Resistenz dieser Pflanzen gegenüber *X. index* oder sogar dem GFLV hin [Staudt & Weischer, 1992].

Die Abwehrreaktion in Form einer ROS zeigte sich demnach bei allen Testpflanzen nur in der Anfangsphase der Besaugung durch *X. index*. Zu welchem Zeitpunkt die Pflanze diese Art von Abwehrreaktion ausschaltet, müsste noch untersucht werden.

Die Attraktivität einer Wurzel kann für die Nematoden auch verloren gehen, wenn das Wurzelwachstum reduziert ist oder zum Stillstand kommt. Der Grund für diesen Effekt ist unbekannt [Perry, 1996].

Nach diesen Ergebnissen könnte ein Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von Callose-Synthase-Transkripten oder auch der Einlagerung von Callose in die betroffenen Pflanzenzellen mit dem Auftreten einer Resistenz bestehen. Diese

Eigenschaften waren nur bei einem *V. rotundifolia*-Hybrid, nämlich Testpflanze 46, zu finden.

4.4 BIOTESTS

4.4.1 Untersuchung der Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte

Anhand dieses Tests sollte untersucht werden, wie sich *X. index* auf einer Agarplatte ausbreitet, wenn ihm kein Stimulus geboten wird. In diesem Versuch ohne Stimulus konnte gezeigt werden, dass sich die Nematoden frei und ungerichtet bewegen und gleichmäßig ausbreiten. Die Nematoden, die in der Mitte der Petrischale aufgesetzt wurden, breiteten sich unmittelbar nach dem Aufsetzen zu dem Petrischalenrand hin aus. Waren die Nematoden schließlich in Ring 4 am Petrischalenrand angekommen, kehrten sie um und wanderten in eine andere Richtung weiter. Es fand demnach ohne Stimulus keine Akkumulation von *X. index* statt. Nematoden sind in der Lage abgegebene Reize von ihrer Umgebung, ihren Wirtspflanzen und Artgenossen zu erkennen. Nematoden, die sich ungerichtet bewegen, zeigen als einmalige Reizantwort eine gerichtete Bewegung [Gaugler & Bilgrami, 2004].

Die orientierte Bewegung als Reaktion auf Veränderungen in der Umgebung wird Taxis genannt. In diesem Versuch fand ohne Stimulus eine willkürliche Ausbreitung auf der Agarplatte statt. Daher handelte es sich nicht um Taxis. Denn bei Taxis zeigt der Nematode eine direkte Orientierung durch gezieltes Hin- oder Wegwandern zu dem Stimulus [Gaugler & Bilgrami, 2004]. Somit kann man davon ausgehen, dass bei einer Akkumulation von den Tieren ein Stimulus vorhanden sein muß. Diese Tatsache kann in den folgenden Versuchen zur Auffinden einer Wirtspflanze dargelegt werden.

4.4.2 Wanderungstests

Mit den verschiedenen Versuchsansätzen sollte getestet werden, wie gezielt Nematoden von *X. index* eine Nahrungsquelle lokalisieren können, zum Teil auch nachdem die Wirtspflanze entfernt wurde.

In der Arbeit wurde gezeigt, dass die Nematoden einen dargebotenen Stimulus in Form eines Rebensämlings gezielt aufsuchten. Wurden den Nematoden zu dem gekeimten Rebensämling verschiedene Alternativen, wie ungekeimte Rebsamen oder sogar Steine angeboten, suchte die Mehrheit der Nematoden eindeutig den Rebensämling auf. In dem Versuchsansatz, bei dem den Nematoden ein gekeimter Rebsame gegenüber einem leeren Keimungsbereich (Rebensämling 3 Tage nach Auskeimen entfernt) angeboten wurde, war über eine Zeitdauer von sieben Stunden keine Präferenz feststellbar. Die Nematoden suchten in der gleichen Weise sowohl den gekeimten Rebsamen als auch den leeren Keimungsbereich auf. Wurzelexudate, die am vakanten Ort zurückblieben, waren anscheinend bis zu einer Zeitspanne von sieben Stunden stabil, ehe sie vermutlich degradiert oder diffundiert waren. Es könnte sich daher bei diesen Lockstoffen um flüchtige oder instabile Substanzen handeln. Eine Isolierung und Strukturaufklärung dieser Substanzen wäre in diesem Zusammenhang interessant und bedarf weiterer Untersuchungen. Da die Nematoden nach dieser Zeit auf der gegenüberliegenden Seite von dem gekeimten Rebsamen einen stabilen Konzentrationsgradienten von den Wurzeln lokalisierten, bewegten sie sich daraufhin vermehrt zu den vorhandenen Wurzeln. In diesem Sektor waren vermutlich attraktive Substanzen in höheren Konzentrationen vorhanden.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das Verhalten von *X. index* nach dem Entfernen des Rebensämlings mit einem weiteren Versuchsansatz genauer untersucht. Einem einzelnen Nematoden wurde ein vakanter Keimungsbereich und eine Vertiefung im Agar angeboten. Der Nematode suchte nach dem Entfernen des Rebensämlings eindeutig den vakanten Ort der Wirtspflanze auf. Nach einer Stunde befand sich demnach noch ein sehr stabiler Gradient von den Wurzelexudaten der Wirtspflanze im Agarmedium. Deshalb entschied sich der Nematode noch eindeutig für die vakante Stelle des Rebensämlings. Dieser Konzentrationsgradient half dem Nematoden zur Orientierung. Der Konzentrationsgradient wurde aber schwächer, da ja die Quelle für die ständige Abgabe von Wurzelexudaten entfernt wurde. Bereits

zwei Stunden nach der Entfernung des Rebensämlings suchte der Nematode nicht mehr mit der gleichen Intensität als nach einer Stunde diesen vakanten Ort des Rebensämlings auf. So kam es, dass nach letztendlich sieben Stunden keine Präferenz des Nematoden mehr auftrat. Der Nematode konnte nach dieser Zeit nicht mehr unterscheiden, in welchem Sektor sich der Rebensämling befand. Die beiden Sektoren und somit auch der Sektor ohne Stimulus wurden gleich häufig aufgesucht. Die Wurzelexudate des Rebensämlings waren möglicherweise komplett zerfallen oder diffundiert. Dies deckt sich auf mit den Beobachtungen, die bei dem Versuch mit einem gekeimten Rebsamen (s.o) gemacht wurden. Nach diesen Beobachtungen sind abgegebene Wurzelexudate, die im Agarmedium nach dem Entfernen der Wirtspflanze zurückbleiben bis zu einer Zeitdauer von sieben Stunden stabil.

Ein ähnliches Beispiel konnte mit (E)- β -Caryophyllen, abgegeben von Maiswurzeln durch den Fraß der Larven des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera*) festgestellt werden. Dieser Signalstoff lockt den Nematoden *Heterorhabditis megidis* an, und besitzt im Biotest eine Stabilität von etwa zwei Stunden [Rasmann *et al.*, 2005]. Die Wirkung von (E)- β -Caryophyllen wurde auch auf *X. index* getestet, zeigte aber keinen eindeutig anlockenden Effekt.

Die Ansammlung von Nematoden an Wirtspflanzen ist ein geläufiges Verhalten bei der Nahrungssuche. Haben Nematoden ein Attraktans einer Wirtspflanze aufgespürt, bewegen sie sich entlang eines Gradienten. Der Punkt, an dem eine willkürliche Bewegung in eine koordinierte Bewegung übergeht, wird als angeschaltetes Antwortverhalten bezeichnet [Bilgrami *et al.*, 2001]. Bewegen sich Nematoden daraufhin direkt zur Nahrungsquelle spricht man von Koordination. Während dieser Phase nehmen die Vorwärts- und Rückwärtsbewegung des Nematoden und zusätzlich die Kopfbewegungen deutlich zu [Gaugler & Bilgrami, 2004].

Der Nahrungsapparat von beispielsweise *Xiphinema diversicaudatum*, einer weiteren Art aus der Familie der Longidoriden, enthält Neurone, die eine chemosensorische und mechanosensorische Funktion besitzen [Robertson, 1975+1979]. Daher könnte der Nahrungsapparat von *X. index* als naher Verwandter dieser Art gleich aufgebaut sein. Die Orientierung durch Chemorezeptoren wurde auch schon bei anderen Nematodenarten untersucht. *Meloidogyne incognita* und *Caenorhabditis elegans* reagieren auf volatile Komponenten. *Globodera rostochiensis* reagiert speziell auf Wurzeldiffusate von Kartoffeln (*Solanum tuberosum*; Gaugler & Bilgrami, 2004).

Die von Pflanzen abgegebenen Wurzel diffusate bezeichnet man als Allelochemikalien, die nicht nur Nematoden anlocken können [Perry, 1996]. Wenn Nematoden nach Wurzeln suchen, orientieren sie sich entlang von Gradienten der Wurzel ausschüttungen. Diese interspezifischen Lockstoffe induzieren eine positive Antwort bei dem Empfänger und werden daher als Kairomone bezeichnet. Kairomone müssen hydrophil sein, weswegen diese Stoffe durch den Boden, gelöst in einer Wasserphase, verbreitet werden. Zusätzlich müssen diese Stoffe auch eine gewisse Zeit stabil sein, damit ein Konzentrationsgradient über größere Abstände aufrecht erhalten bleibt [Rühm *et al.*, 2002]. Die Nematoden sind also in der Lage eine Nahrungsquelle, wie beispielsweise einen Rebsamen gezielt zu orten. Ein Rebsame gibt Wurzel diffusate ab, die die Nematoden anhand Chemorezeptoren wahrnehmen. Daher wird die Chemotaxis zur Orientierung im Boden und schließlich zum Auffinden einer Nahrungsquelle benutzt.

4.4.3 Präferenz der Nematoden für verschiedene Abschnitte der Wurzel

Viele pflanzenparasitische Nematodenarten besitzen spezifische Stellen der Nahrungsaufnahme an der Wirtspflanze. *Xiphinema*, *Paralongidorus* und *Longidorus* bevorzugen für die Besaugung die Wurzelspitzen und tiefer gelegenes Wurzelgewebe innerhalb dieses Bereiches [Radewald & Raski, 1962b; Wyss, 1980]. Larven, des ersten und zweiten Stadiums von *Xiphinema index* saugen bevorzugt in der Wurzelhaarregion und ältere Larvenstadien dieses Nematoden besaugen eher das Apikalgewebe einer Wurzel von *Vitis vinifera* [Fisher & Raski, 1967]. Durch diesen Versuch sollte deshalb herausgefunden werden, ob je nach dargebotenem Wurzelabschnitt auch auf andere, nicht spezifische Wurzelbereiche zurückgegriffen wird.

Es wurde gezeigt, dass alle Abschnitte der Wurzeln, von der Wurzelspitze bis zum verholzten Teil, als Nahrungsquelle von den Nematoden genutzt wurden, sofern sie die einzig verfügbare Nahrungsquelle sind. Alle angebotenen Wurzelkategorien der Rebe wurden von *X. index* in gleichem Maße als Nahrungsquelle genutzt und somit besaugt. Es konnte sogar eine Saugtätigkeit an verholztem Gewebe beobachtet werden. Bei dickerem, stärker lignifiziertem Wurzelgewebe, das auch Verletzungen der Wurzelrinde aufwies, waren die Nematoden gehäuft an eben solchen Stellen

saugend aufzufinden. Bei knappem Nahrungsangebot war *X. index* in der Lage die Vorliebe für bestimmte Wurzelbereiche zu vernachlässigen und vorhandene Nahrungsressourcen, die sonst keinen optimalen Ort für die Nahrungsaufnahme darstellten, zu nutzen. Auch in früheren Untersuchungen mit *X. index* konnte schon beobachtet werden, dass diese an der gesamten Wurzel saugen und nicht nur an der Wurzelspitze [Cohn, 1970].

4.4.4 Attraktivität eines *Vitis rotundifolia* und eines *Vitis rotundifolia*-*Vitis rotundifolia*-Hybrids gegenüber einer Standardunterlage Kober 5 BB

Nematoden erreichen eine Nahrungsquelle durch Chemotaxis. Treten sie nun in Kontakt mit der Nahrungsquelle, identifizieren sie die Wirtspflanze durch Mechanorezeptoren. Zuerst erfolgt ein Kontakt mit den Lippen des Nematoden, um einen geeigneten Punkt zur Penetration der Wurzeloberfläche zu finden. Erst nachdem die Wirtspflanze für eine Nahrungsaufnahme als geeignet empfunden wird, beginnt die Saugtätigkeit [Gaugler & Bilgrami, 2004]. Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *X. index* dieses Wirtswahlverhalten auch innerhalb einer Wirtspflanzenart wie *Vitis spec.* ausübt. Dazu wurden verschiedene *V. vinifera*-Hybride auf deren Eignung als Wirtspflanzen gegenüber *X. index* getestet. Ausgewählt wurde Testpflanze 16 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) aufgrund deren symptomloser Reaktion ihrer Wurzeln auf die Saugtätigkeit (s. 4.1). Sowie eine nekrosenbildende Testpflanze 141 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) als auch eine gallenbildende Standardunterlage Kober 5 BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) wurden zum Vergleich ausgewählt. Die Wurzeln der verschiedenen Rebsorten wurden den Nematoden jeweils einzeln in Agarmedium eingegossen, angeboten. Diese Versuchsanordnung wurde deshalb so gewählt, um eine praxisnahe Gegebenheit in Rebflächen zu simulieren. Denn in Rebflächen würde den Nematoden auch nur jeweils eine Sorte an Unterlagsreben zur Verfügung stehen.

Es konnte festgestellt werden, dass sowohl von den getesteten Reben Pflanze 16, Pflanze 141 und auch Kober 5 BB in gleichem Maße von *X. index* als Wirtspflanze erkannt wurden. Es konnte annähernd eine identische Anzahl an Nematoden an den Wurzeln jeder einzelnen Testpflanze erfasst werden. Hatte also *X. index* nicht die Wahl zwischen den Wurzeln von unterschiedlichen Rebsorten, wurde die einzig

vorhandene Nahrungsressource, unabhängig um welche Kreuzung es sich handelte, angenommen. Obwohl die Anzahl der Nematoden an den Wurzeln von Testpflanze 16 mit den Vergleichspflanzen übereinstimmte, konnte eine sichtbare Saugtätigkeit dort erst einige Tage später beobachtet werden. Dies könnte vielleicht auf die Beschaffenheit der Wurzeln dieser Pflanze zurückgeführt werden, die den Nematoden keine optimale Nahrungsaufnahme ermöglicht.

Hatte *X. index* die Wahl zwischen Wurzeln unterschiedlicher Rebsorten in einem Gefäß, so zeigte sich auf den ersten Blick eine Tendenz zur Bevorzugung von Kober 5 BB gegenüber Testpflanze 16, was aber statistisch nicht signifikant war. Aufgrund der wenigen Exemplare von Testpflanze 16 konnte dieser Versuch dementsprechend nur in dreifacher Ausführung angesetzt werden. Um nun ein klareres Ergebnis aus dieser Testung zu erhalten, müsste dieser Versuch noch mehrere Male wiederholt werden.

4.4.5 Attraktivität von inaktivierten Wurzeln

Wie gezeigt werden konnte, haben Wurzeln von Wirtspflanzen einen anlockenden Effekt auf die Nematoden. Die Wahrnehmung solcher Reize wird auf das Vorhandensein von Chemorezeptoren, die sich in der Kopfregeion befinden, zurückgeführt [Aumann *et al.*, 1998]. Die Amphiden sind die größten Sinnesorgane, die in erster Linie als Chemorezeptoren dienen [Jones, 2002]. Anhand dieses Versuches sollte untersucht werden, ob hitzeinaktivierte, also tote Rebwurzeln weiterhin eine attraktive Wirkung auf *X. index* haben. Also sollte überprüft werden, ob die Nematoden diese toten Wurzeln mittels Chemorezeption immer noch wahrnehmen können und sich so koordiniert dorthin bewegen.

Nach vier Tagen konnte bereits eine eindeutige Bevorzugung zu den lebenden Wurzeln hin beobachtet werden. Bis zum Versuchsende nach acht Tagen waren mit großem Abstand sehr viel mehr Nematoden an den lebenden Wurzeln von Kober 5 BB zu zählen. Es konnten nur sehr wenige Tiere an den abgekochten Wurzeln gefunden werden, was auf ein zufälliges Auffinden der Wurzeln durch die Tiere hindeutet. Da so viele Tiere an den lebenden Wurzeln von Kober 5 BB aufzufinden waren, kann nur durch ein gezieltes Hinbewegen zu diesen Wurzeln begründet werden, da die Tiere die abgegebenen Wurzelexudate der Rebwurzel wahr-

genommen haben und sich somit dorthin orientiert hatten. Diese Tatsache konnte schon in dieser Arbeit dargestellt werden (s.4.3.2). Also werden diese Wurzelexudate für die Anlockung nur von lebenden Wurzeln gebildet. An diesen toten Wurzeln konnten dennoch einzelne Insertionen des Stylets der Tiere beobachtet werden, was auf eine Abtastung der Wurzeloberfläche mit Hilfe der Mechanorezeptoren hinweist. Durch diesen Versuch wurde klar, dass tote Rebwurzeln nicht gezielt von *X. index* aufgesucht werden können, da sie durch fehlende Wurzelexudate nicht geortet werden konnten.

Lebende Wurzelreste von Reben sind aber weiterhin attraktiv für *X. index*, denn sie werden gehäuft aufgesucht und es war auch eine Saugtätigkeit der Nematoden feststellbar. Das Ergebnis dieses Versuchs weist auf das Problem der Rodung von Rebflächen hin, die in der weinbaulichen Praxis bis heute speziell in virusverseuchten Böden als Bekämpfungsmaßnahme empfohlen und eingesetzt wird. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Attraktivität von Wurzelresten geht klar hervor, dass eine ausreichende Rodung von virusverseuchten Rebflächen nur dann effektiv ist, wenn infizierte Rebstöcke samt Feinwurzeln ordnungsgemäß entfernt werden. Kleinste Wurzelreste reichen aus, um die Lebensdauer von *X. index* zu verlängern. Dieses Problem wurde auch schon von Meredith *et al.* [1982] erkannt und dadurch eine Brachezeit in Virusflächen von bis zu 10 Jahren empfohlen, weil sich die Nematoden an verbliebenen Wurzelresten ernähren konnten.

Raski *et al.* [1965] fanden heraus, dass Bodenproben aus gerodeten Rebflächen lebende Rebwurzeln beinhalten. Mehr als 90 % der so gefundenen Wurzeln leben. Außerdem überlebte *X. index* 4,5 Jahre bei Anpflanzung von Wintergetreide und anschließender Sommerbrache nachdem die Rebpflanzen gerodet wurden [Rühm *et al.*, 2002]. Nach neuesten Untersuchungen von Demangeat *et al.* [2005] sind Nematoden der Art *X. index* in der Lage in Weinbergsböden mindestens vier Jahre ohne potentielle Nahrungsquelle zu überleben und das GFLV zu behalten.

4.4.6 Induktion der Pflanzenabwehr durch Methyljasmonat

Methyljasmonat ist ein Methylester des Phytohormons Jasmonsäure. Bereits sehr niedrige Konzentrationen lösen in Pflanzen physiologische Abwehrreaktionen aus

[Schopfer & Brennecke, 2006]. Nachdem in einem ähnlichen Versuch von Soriano *et al.* [2004] bei Hafer (*Avena sativa*) durch Methyljasmonat eine Pflanzenabwehr gegen den Zystenematoden *Heterodera avenae* induziert werden konnte, sollte dieses Experiment auf die Weinrebe (*Vitis spec.*) übertragen werden.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass *X. index* mit Methyljasmonat behandelte Wurzeln von Kober 5 BB meidet. Nach acht Tagen Versuchsdauer konnte eine signifikante Unterscheidung zwischen den Nematodenzahlen an behandelter und unbehandelter Wurzel ermittelt werden. Die Anzahl der Nematoden an den behandelten Wurzeln blieb über die Versuchsdauer konstant niedrig, wogegen die Anzahl der Nematoden an den Kontrollwurzeln anstieg. Die Wurzeln der mit Methyljasmonat behandelten Wurzeln waren leicht bräunlich verfärbt. Dennoch wurde diese verwendete Konzentration des Methyljasmonats als verträglich von dem Rebensteckling angenommen, da zuvor getestete höhere Konzentrationen dieses Pflanzenhormons eine stark schädigende Wirkung aufwiesen und eine Braunfärbung der Blätter verursachten. In höheren Konzentrationen sind Jasmonsäure und ihre Methylester für ihre Seneszenzförderung bekannt. Dennoch wurde bei Jasmonsäure eine Funktion als Signalsubstanz bei der Auslösung der Synthese bestimmter Phytoalexine nachgewiesen [Heldt, 1996].

Die klare Meidung der behandelten Wurzeln durch die Nematoden lässt demnach auf eine durch Methyljasmonat induzierte Abwehrreaktion der Rebe schließen. Schließlich konnte, wie schon Soriano *et al.* [2004] feststellen, dass durch die Applikation des Wurzelhormons Methyljasmonat effektiv die Invasion von *H. avenae* in Hafer (*Avena sativa*) reduziert wird, dieser Effekt auch bei der Weinrebe (*V. vinifera*) mit *X. index* erzielt werden. Möglicherweise wurden Wurzelexudate abgegeben, die repellent auf *X. index* wirkten. Nachgewiesen ist dies in Tabakpflanzen (*Nicotiana attenuata*), bei denen eine exogene Applikation von Methyljasmonat zu einer gesteigerten Abgabe von volatilen organischen Verbindungen führt. Jasmonsäure führt nicht nur zur Abgabe von volatilen Duftstoffen, sondern außerdem auch zum Anstieg von vielen nicht-volatilen Abwehrstoffen in der Pflanze wie Phenole, Alkaloide, Terpenoide und Proteinase-Inhibitoren [Lou *et al.*, 2005]. In vielen anderen Pflanzen lösen Jasmonate bei exogener Applikation außerdem die Bildung von Proteinase-Inhibitoren aus [Schopfer & Brennecke, 2006].

4.5 PRAXISORIENTIERTE FREILANDVERSUCHE

Momentan ist eine direkte Bekämpfung des GFLV im Freiland nicht möglich [Höbaus & Nieder, 1992]. Daher ist es wichtig sorgfältige Kontrollen von Vermehrungsbeständen der Reben durchzuführen. Damit soll der Ausschluss von virusinfiziertem Pflanzgut von der Vermehrung gewährleistet werden. Um die Symptomatik und vor allem die Folgen einer Virusinfektion praktisch an Rebpflanzen nachzuverfolgen, wurde folgender Freilandversuch durchgeführt. Zwei virusbefallene Rebflächen im Kaiserstuhl, an den Standorten Bahlingen und Sasbach wurden zu Beginn dieser Arbeit kartiert, Pflanzpläne erstellt und jedes Jahr Sichtbonituren sowie die Entnahme von Blattproben durchgeführt. Es wurde deshalb so vorgegangen, da bei diesen Flächen, der Verdacht der Übertragung des GFLV durch *X. index* im Boden bestand. Tritt nämlich das Virus mit seinem Vektor zusammen auf, sind dementsprechend Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen. Beim Auftreten eines Virusvektors im Boden einer Rebfläche ist eine Rodung und anschließende Brache wegen der Reinfektion der Nematoden nötig. Wird aber kein Virusvektor gefunden und die Befallssymptome erscheinen nicht herdartig, kann die Rebanlage vorerst bestehen bleiben.

Nach den Vermerken der Sichtbonitur und der ELISA-Testung von bestimmten Rebstöcken wurde in den Pflanzplänen nach herdförmiger Ausbreitung von virusbefallenen Reben gesucht. GFLV-infizierte Weinreben zeigen oft eine ungleichmäßige Verteilung in erkrankten Weinbergen, als Resultat einer von Pflanze zu Pflanze erfolgten Virusübertragung durch den Vektor *X. index* [Andret-Link *et al.*, 2004]. Einige Bereiche in den beiden Pflanzplänen von Bahlingen und Sasbach kamen der Ballung eventuell virusinfizierter Rebstöcke und einer herdförmigen Virusausbreitung durch Nematoden schon sehr nahe. Deshalb wurden diese Bereiche zusätzlich durch Blattproben und eine anschließende ELISA-Testung auf das Vorkommen des GFLV überprüft. Die virusauffälligen Rebstöcke waren in den meisten Fällen im Jahr 2004 an beiden Standorten positiv für das GFLV. Doch kam es vor, dass auch als krank eingestufte Rebstöcke, negativ im ELISA-Test auf das GFLV reagierten. In den Jahren 2005 und 2006 wurden immer mehr Reben virusauffällig, doch die Anzahl eindeutig viruskranker Reben, getestet durch ELISA, nahm ab. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Virussymptome aufgetreten waren, doch die Nachweisbarkeit für den ELISA-Test noch nicht ausreichte. Dadurch wird deutlich, dass eine Sichtbonitur nicht als alleiniges Kriterium zu Detektion des

GFLV herangezogen werden kann, da immer Fehler oder Unsicherheiten in der Symptombewertung auf menschlicher Ebene auftreten können. Dennoch wird die Sichtbonitur als gängiges Verfahren in der weinbaulichen Praxis zur Einschätzung von Rebkrankheiten verwendet. Da es hauptsächlich auf die Ertragsmengen und weniger auf die Krankheitssymptome der Pflanzen ankommt, werden aufwändigere Testmethoden zur Identifizierung bestimmter Krankheiten nicht gewünscht oder sogar wegen anfallender Kosten von den Winzern abgelehnt.

In den einzelnen Jahren kam es in beiden Versuchsflächen auch vor, dass im Vorjahr virusauffällige Rebestöcke im Folgejahr keine Virussympptome aufwiesen und umgekehrt. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Ausprägung von Virussympptomen von dem physiologischen Befinden eines Rebstockes und dadurch auch von den einwirkenden Umwelteinflüssen abhängt. In besonders heißen Sommern, die unter anderem sogar zum Trockenstress der Rebe führen können oder in frostreichen Wintern, kann damit in der folgenden Vegetationsperiode die Symptomausprägung des GFLV stärker ausgebildet sein. Die mehr oder weniger starke Ausbildung von Symptomen ist auch von der jeweiligen Rebsorte abhängig [Vogt & Schruft, 2000]. Aus umweltphysiologischen Gründen könnte es immer die Möglichkeit einer Wachstumsstörung oder Verrieselung der Trauben geben. In Folge dessen sind zusätzlich Labortests wie zBsp. eine sensitivere RT-PCR für eine sichere Virusdetektion heranzuziehen.

Dennoch trat am Standort Sasbach ein abweichendes Symptom des GFLV auf, die sogenannte Petersilienblättrigkeit, die am Standort Bahlingen nicht zu sehen war. Die betroffenen Reben mit dieser Petersilienblättrigkeit, waren extrem im Wachstum zurückgeblieben, die Blätter fühlten sich trocken, lederartig an waren stark gezähnt und schließlich geformt wie die der Petersilie (*Petroselinum crispum*). Diese etwas außergewöhnliche Symptomausprägung konnte im ELISA-Test positiv auf das GFLV getestet werden. Doch ist das Auftreten dieser Petersilienblättrigkeit vermutlich nicht auf den Standort der beiden Flächen zurückzuführen, sondern auf die Rebsorten, die angepflanzt wurden [Vogt & Schruft, 2000]. Die Symptomausprägung könnte wie schon oben erwähnt bei diesen Pflanzen anders verlaufen. Diese Petersilienblättrigkeit war nur bei der Rebsorte *V. vinifera* C.v. *Chardonnay* in Sasbach aufgetreten, nicht aber am Standort Bahlingen, wo *V. vinifera* C.v. *Spätburgunder* gepflanzt war. Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten dieser außergewöhnlichen

Symptomausprägung könnte eine zusätzliche Erkrankung oder eine Mangelerscheinung dieser Rebstöcke sein.

In den jährlichen Bodenproben dieser Flächen wurde kein Virusvektor *X. index* gefunden. Dennoch ist die Anwesenheit von *X. index* in den Flächen nicht auszuschließen, da diese Nematoden nur vereinzelt und zusätzlich auch sehr tief im Boden vorkommen können. Nach Literaturangaben können Nematoden der Art *X. index* bis 240 cm oder noch tiefer vorkommen. So wurde *X. index* schon in einer Tiefe von 360 cm gefunden [Rühm *et al.*, 2002]. *X. index* ist in sehr geringer Zahl vorwiegend in Sandböden vertreten, so dass in 250 ccm Boden nur ein Individuum von *X. index* zu finden war. Dennoch waren diese Nematoden immer in reisigkranken Beständen mit dem GFLV anzutreffen [Rüdel, 1971]. Daher wären zahlreichere Bodenproben von mehr als 60 cm Tiefe in diesen Flächen sinnvoll.

Der Freilandversuch in zwei virusbefallenen Rebflächen zeigte letztendlich deutliche Unterschiede zwischen der Sichtbonitur und der ELISA-Testung von befallenen Reben. Da die Sichtbonitur von so vielen Kriterien abhängig sein kann, ist in diesem Fall die ELISA-Testung als bevorzugte Methode, um das Auftreten des GFLV zu überprüfen, zu verwenden. Nach diesen Ergebnissen war es öfters vorgekommen, dass virusauffällige Rebpflanzen nach der Sichtbonitur in der ELISA-Testung negativ auf das GFLV getestet wurden. Entweder waren die entsprechenden Reben aufgrund verschiedener Mangelerscheinungen in einem kranken Zustand oder die ELISA-Testmethode erlaubte keine genaue Detektion des GFLV. Die Viruspartikel des GFLV könnten vielleicht in Einzelfällen so geringer Konzentration vorgelegen haben, dass sie einfach nicht nachgewiesen werden konnten. Dennoch sind Fehler bei der Blattprobenahme nicht auszuschließen, so dass es in Ausnahmefällen zu Verwechslungen von Trieben der Reben kam. Parallel zu dem ELISA-Test wäre ein genaueres Testverfahren wie die RT-PCR zur Optimierung der Boniturergebnisse von Vorteil, denn eine Sichtbonitur wird immer menschliche Fehleinschätzungen beeinhalten.

4.6 AUSBLICK: FÜR DIE WEINBAULICHE PRAXIS ERGIBT SICH AUS DEN VORGESTELLTEN ERGEBNISSEN WEITERHIN

Reben der Art *V. rotundifolia* aus der Untergattung *Muscadinia* haben einen anderen Chromosomensatz als die übrigen Arten, was ihre Verwendung als Kreuzungspartner erschwert. Sie lassen sich schlecht bewurzeln und sind wenig kalkverträglich. Außerdem vererben sie als Wildrebe aus dem subtropischen Südosten Nordamerikas sehr hohe Wärmeansprüche und eine mangelnde Winterfrosthärte. Dies sind alles Eigenschaften, die nicht gerade für ihre Eignung als Kreuzungspartner in der Unterlagenzüchtung sprechen. Wenn die Züchter sich trotzdem für diese Art interessieren, dann deshalb, weil *V. rotundifolia* hervorragende Resistenzen gegen fast alle Schadorganismen besitzt. Die Schaffung von Unterlagen, die eine volle Resistenz gegen die Übertragung von Viruskrankheiten durch Nematoden besitzen, könnte deshalb am ehesten mit Hilfe der *Vitis rotundifolia* gelingen [Vogt & Schruft, 2000]. Daher ist es notwendig die Kultivierung und Handhabung dieser so wertvollen Rebsorte zu optimieren, so dass deren außerordentlichen Resistenzeigenschaften für die Züchtung neuer widerstandsfähiger Reben genutzt werden können. Dafür müsste großen Wert auf die vielleicht sehr speziellen Ansprüche dieser Rebsorte, wie beispielsweise optimale Nährstoffansprüche oder Temperaturbedingungen, gelegt werden. Zusätzlich könnte mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten *in-vitro*-Testsystems genau die Art von Resistenz oder Immunität dieser Pflanzen bestimmt werden und daher eine große Hilfe für die Resistenzzüchtung darstellen. Das Hauptinteresse liegt letztendlich darin, ob diese Rebsorte tatsächlich mit dem GFLV infiziert werden kann. Durch das *in-vitro*-Testsystem wäre es möglich die Interaktion von Rebwurzel und Nematoden und zusätzlich mit Hilfe der RT-PCR eine Übertragung des GFLV genaustens zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zwölf Testpflanzen des Weinbauinstituts Freiburg wurden auf deren Resistenzeigenschaften gegenüber dem Virusvektor *Xiphinema index* und dem GFLV getestet. Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines *in-vitro*-Testsystems für Reben, das detaillierte Einblicke in das Wurzel-Nematoden-System erlaubt.

Anhand dieses *in-vitro*-Testsystems konnten zwei unterschiedliche Reaktionen der Wurzeln dieser Testreben auf die Saugtätigkeit der Nematoden festgestellt werden. Es konnte sowohl eine Gallenbildung als auch eine Nekrosenbildung bei den unterschiedlichen Kreuzungen der Testpflanzen beobachtet werden.

Alle Testpflanzen aus verschiedenen Kreuzungen zeigten eine Abwehrreaktion gegenüber den Nematoden. Dies resultierte in Auftreten von Transkripten der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und der Bildung von Superoxid-Radikalen. Bei zwei *V. rotundifolia*-Hybriden war zusätzlich die Callose-Synthase aktiv und es kam außerdem zu einer Callose-Deposition an den betroffenen Stellen im Wurzelgewebe.

Bis auf Testpflanze 46, einem *V. rotundifolia*-Hybrid waren alle getesteten Reben nach vier Wochen Versuchsdauer sensitiv für eine Transmission des GFLV. Dieser Hybrid war an den Wurzeln durch die Saugtätigkeit der Nematoden nekrosenbildend und zeigte eine Callose-Synthase-Aktivität.

X. index findet seine Wirtspflanzen durch Chemotaxis. Er orientiert sich anhand von Wurzelexudaten, die von Wurzeln ins Medium abgegeben werden. Totes Wurzelgewebe kann der Nematode nicht lokalisieren und stellt keinen Stimulus dar. Bei knappem Nahrungsangebot nutzt der Nematode vorhandene Nahrungsressourcen aller Rebsorten mit verschiedenster Beschaffenheit. Mit dem Pflanzenhormon Methyljasmonat behandelte Wurzeln wurden gezielt gemieden.

Zwei mit dem GFLV infizierte Rebflächen an verschiedenen Standorten zeigten innerhalb dreijähriger Beobachtung eine Zunahme von virustragenden Rebstöcken. Ein Hinweis auf die Verbreitung durch virusübertragende Nematoden konnte durch Bodenproben bisher nicht bestätigt werden.

6 LITERATUR

Adam, A.; Farkas, T.; Somlyai, G.; Hevesi, M.; Kiraly, Z. (1989): Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: Deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 13-26

Agrios G. N. Plant Pathology 4th Edition, *Academic Press*

Alfaro, A., Goheen, A.C. (1974): Transmission of strains of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. *Plant disease reporters* 58 (6): 549-552

Andret- Link, P.; Schmitt-Keichinger, C.; Demangeat, G.; Komar, V.; Fuchs, M. (2004): The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by ist nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320: 12-22

Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399

Aumann, J. (1997): Monoxenic culture of *Xiphinema index* (Nematoda:Longidoridae) on *Ficus carica*. *Nematol. medit.* 25: 209-211

Aumann, J.; Dietsche, E.; Rutencrantz, S.; Ladehoff, H. (1998): Physico-chemical properties of the female sex pheromone of *Heterodera schachtii* (Nematoda: Heteroderidae). *International Journal of Parasitology* 28: 1691-1694

Bassermann-Jordan (1991): Geschichte des Weinbaus, *Nachdruck: Pfälzische Verlagsanstalt, Landau*

Bijli, K.M., Singh, B.P., Sridhara, S., Arora, N. (2001): Isolation of Total RNA from Pollens. *Prep. Biochem. & Biotechnol.*, 31 (2): 155-162

Bilgrami, A.L.; Pervez, R.; Yoshiga, T.; Kondo, E. (2001): Attraction and aggregation behaviour of predatory nematodes, *Mesodorylaimus bastiani* and *Aquatides thornei* (Nematoda: Dorylaimida). *Applied Entomology and Zoology*. Vol. 36 (2): 243-249

Bleyer, G.; Kassemeyer, H.-H. (1992): Untersuchungen über das Vorkommen der Nematodengattungen *Xiphinema*, *Longidorus* und *Paralongidorus* in Weinbergen von Baden-Württemberg. *Vitic. Enol. Sci.* 47: 96-102

Bleyer, K. (1991): Mineralstoffverteilung in Rebwurzeln im Verlaufe der Vegetationsperiode. *Diplomarbeit Forschungsanstalt Geisenheim*

Boulbas, D; Pistre, R. (1978): Resistance de certaines Vitaceés et des portes-greffes usés en viticulture au nématode *Xiphinema index* et à l'inoculation par le virus du court-noué (GFLV). In: *Génétique et Amélioration de la Vigne*. C.R. 2^{ème} Symposium International sur l'Amélioration de la Vigne, Bordeaux (France), 14-18 juin 1977. INRA ed., Paris : 200-207

Bouquet, A. (1981): Resistance to Grapevine Fanleaf Virus in Muscadine Grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease* 65 (10): 791-793

Bouquet, A.; Boursiquot, J. M. (1998): Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread, using *Vitis x Muscadinia* hybridization. *Proc. VII Int'l Symp. On Grapevine Genetics and Breeding* : 517- 526

Bouquet, A.; Danglot Y. (1983): Search for grape rootstocks resistant to the transmission of grape fanleaf virus (GFV) by the nematode *Xiphinema index* THORNE & ALLEN. Enzyme-linked immunosorbent assay as a quick method of selection. *Agronomie, Paris* 3: 957-963

Brendel, G. (1988): Einsatz der *in vitro* - Kultur bei *Vitis* zur Erzeugung von virusfreiem Pflanzgut. *Dissertation Universität Hohenheim*

Brown, D. J. F.; Coiro, M. I. (1985): The reproductive capacity and longevity of *Xiphinema index* (Nematoda : Dorylaimida) from three populations on selected host plants. *Revue Nematol.* 8 (2): 171- 173

Brückbauer, H. (1978): Brache beim Neuaufbau von Weinbergen. *Der Deutsche Weinbau* 6: 213-217

Bundesamt für Verbraucherschutz & Lebensmittelsicherheit: www.bvl.bund.de

Cadman, C.H. (1963): Biology of soil-borne viruses. *Annual Review of Phytopathology* 1: 143-172

Clark M.F.; Adams A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483

Cohn, E. (1970): Observations on the feeding and symptomatology of *Xiphinema index* an *Longidorus* on selected Host Roots. *J. of Nematol.* 2 (2): 167-173

Coiro, M. I.; Serino, M. (1991): possible herbaceous hosts for *Xiphinema index* in virus transmission experiments. *Nematol. medit.* 19: 251- 252

Currle, O.; Bauer, O.; Hofäcker, W.; Schumann, F.; Frisch, W. (1983): Biologie der Rebe. *D. Meiningen Verlag und Druckerei, Neustadt an der Weinstrasse*

De Almeida Engler, J.; de Vleeschauwer, V.; Burssens, S.; Celenza, J. L.; Inze, D.; van Montagu, M.; Engler, G.; Gheysen, G. (1999): Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia. *The Plant Cell, Vol. 11: 793-807*

Decker (1969): Phytonematologie. *VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin*

Demangeat, G.; Voisin, R.; Minot, J.-C.; Bosselut, N.; Fuchs, M.; Esmenjaud, D. (2005): Survival of *Xiphinema index* in Vineyard Soil and Retention of Grapevine Fanleaf Virus over extended Time in the Absence of Host Plants. *Phytopathology* 95 (10): 1151-1156

Deutsches Weinbaujahrbuch 2002. Waldkircher Verlag, 2002, 53. Jahrgang

Deutsches Weininstitut GmbH, Mainz (1993/1997): Deutscher Weinatlas

Drews, G.; Adam, G.; Heinze, C. (2004): Molekulare Pflanzenvirologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Dunn, D.C., Duncan, L.W., Romeo, J.T. (1998): Changes in Arginine, PAL activity, and nematode behavior in salinity-stressed citrus. *Phytochemistry* 49 (2): 413-417

Esmenjaud, D.; Abad, P.; Pinck, L.; Walter, B. (1994): Detection of a region of the coat protein gene of grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode vector *Xiphinema index*. *Plant Dis.* 78: 1087-1090

Fisher, J.M.; Raski, D. J. (1967): Feeding of *Xiphinema index* and *X. diversicaudatum*. *Proc.Helm.Soc.Wash.* 34: 68-72

Fritzsche R.; Decker, H.; Lehmann, W.; Karl, E.; Geißler, K. (1987): Resistenz von Kulturpflanzen gegen tierische Schaderreger Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Flegg, J.J. (1967): Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb`s decanting and sieving technique. *Ann.appl.Biol.* 60: 429-437

Fukasawa-Akada, T.; Kung, S.; Watson, J.C. (1996): Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* 30: 711-722

Gaugler, R.; Bilgrami, A.L. (2004): Nematode behaviour. *CAB International*

Heath, M.C. (1981): Resistance of plants to rust infection. *Phytopathology* 71: 971-974

Heldt, H.W. (1996): Pflanzenbiochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*

Hewitt, W. B.; Raski, D. J.; Goheen, A. C. (1958): Nematode vectors of soil-borne virus of grapevines. *Phytopathology* 48: 586-595

Hoagland, D.R.; Arnon D.L. (1938): The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif., Coll. Agri., Agri. Exp. Station, Berkely, Calif., Circular 347*

Höbaus, E.; Nieder, G. (1992): Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge im Weinbau. 2. Auflage. *Wien: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft.*

Hood, M. E.; Shew, H. D. (1996): Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86: 704-708

Hückelhoven, R.; Kogel, K.-H. (1998): Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (4): 292-300

Jones, J. (2002) aus: The Biology of Nematodes (Donald L. Lee). *Taylor & Francis, London*

Knop, W. (1860): Über die Ernährung der Pflanzen durch wässrige Lösungen unter Ausschluss des Bodens. *Landwirtsch. Versuchsstat.* 2:65-99, 270-293

Kunde, R.M.; Lider, L.A.; Schmitt, R.V. (1968): A test of *Vitis* resistance to *Xiphinema index*. *Am. J. Enol. Vitic.* 19:1:30-36

Linsmaier, E.M.; Skoog, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127

Lou, Y-G.; Du, M-H.; Turlings, T.C.J.; Cheng, J-A.; Shan, W-F. (2005): Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. *Journal of Chemical Ecology* 31 (9): 1985-2002

MacFarlane, S. A. (2003): Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Molecular Plant Pathology* 4 (3): 211-215

Martelli, G. P.; Savino, V. (1991): Fanleaf degeneration. In: Pearson, R.C.; Goheen, A. (Eds.). *Compendium of Grape Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, S 48-49

McKenry, M.V.; Kretsch, J.O.; Anwar, S.A. (2001): Interactions of selected rootstocks with ectoparasitic nematodes. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (4): 304-309

Meredith, C. P.; Lider, L.A.; Raski, D. J.; Ferrari, N. L. (1982): Inheritance of tolerance to *Xiphinema index* in vitis species. *Am. J. Enol. Vitic.* 33 (3): 154-158

Meyer-Kahsnitz, S. (1993): Angewandte Pflanzenvirologie. *Berhard Thalacker-Verlag, Braunschweig*

Mohr, H. D. (2005): Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. *Ulmer Verlag, Stuttgart*

Ohnesorge, B. (1976): Tiere als Pflanzenschädlinge. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*

Perry, R.N. (1996): Chemoreception in plant parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34: 181-199

Radewald, J. D.; Raski, D. J. (1962a): A study of the life cycle of *Xiphinema index*. *Phytopath.* 52: 748

Radewald, J. D.; Raski, D. J. (1962b): Studies on the host range and pathogenicity of *Xiphinema index*. *Phytopath.* 52: 748- 749

Raski, D. J.; Hewitt, W. B.; Goheen, A. C.; Taylor, C. E.; Taylor, R. H. (1965): Survival of *Xiphinema index* and reservoirs of fanleaf virus in fallowed vineyard soil. *Nematologica* 11: 349-352

Rasmann, S.; Köllner, T.G.; Degenhardt, J.; Hiltbold, I.; Toepfer, S.; Kuhlmann, U.; Gershenson, J.; Turlings, T.C.J. (2005): Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434: 732-737.

Rathay, E. (1882): Die Gabler oder Zwiewipflerreben. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 3: 316-320

Robertson, W.M. (1975): A possible gustatory organ associated with the odontophore in *Longidorus leptcephalus* and *Xiphinema diversicaudatum*. *Nematologica* 21: 443-448

Robertson, W. M. (1987): Possible mechanisms of virus retention in virus vector nematodes. *Annual Report of the Scottish Crop Research Institute for 1986. Invergowrie. S.127*

Robertson, W. M.; Henry, C. E. (1986): An association of carbohydrates with particles of arabis mosaic virus retained within *Xiphinema diversicaudatum*. *Ann. appl. Biol.* 109: 299-305

Robertson, W.M.; Wyss, U. (1979): Observations on the ultrastructure and function of the dorsal oesophageal gland cell in *Xiphinema index*. *Nematologica* 25: 391-396

Rüdel, M. (1971): Vorkommen einiger Arten der Gattung *Xiphinema* (Nematoda: Dorylaimidae) in Pfalz und Rheinhessen. *Weinberg und Keller* 18: 505-520

Rüdel, M.; Dechert, F.; Eichhorn, K.W. (1992): Feindpflanzen virusübertragender Nematoden. Möglichkeiten für den Weinbau?. *Rebe und Wein* 45: 190-194

Rühm, R.; Dietsche, E.; Harloff, H-J.; Lieb, M.; Franke, S.; Aumann, J. (2002): Characterisation and partial purification of a white mustard kairomone that attracts the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*. *Nematology* 5 (1):S: 17-22

Rumpfenhorst, H. J.; Weischer, B. (1978): Histopathological and histochemical studies on grapevine roots damaged by *Xiphinema index*. *Revue Nematol.* 1 (2): 217-225

Sachs, L. (1984): Angewandte Statistik. 6. Auflage, Berlin: Springer

Schopfer P.; Brennicke A. (2006): Pflanzenphysiologie. 6. Auflage, Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin

Siddiqi, M. R. (1974): Systematics of the genus *Trichodorus* Cobb. 1913 (Nematoda Dorylaimida), with descriptions of three new species. *Nematologica* 19: 259-278

Sijmons, P. C. (1993): Plant nematode interactions. *Plant Molecular Biology* 23: 917-931

Sijmons, P.C.; Atkinson, H.J.; Wyss, U. (1994): Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 235-59

Sitte, P.; Weiler, E. W.; Kadereit, J. W.; Bresinsky, A.; Körner, C. (2002): Strasburger. Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akad. Verlag GmbH Heidelberg

Sopp, E.; Rühl, E.H.; Holst, H. (1998): Resistance of rootstocks to the virus transmitting nematode *Xiphinema index*. *Vitic. Enol. Sci.* 53 (1): 3-6

Soriano, I. R.; Asenstorfer, R. E.; Schmidt, O.; Riley, I. T. (2004): Inducible Flavone in Oats (*Avena sativa*) Is a novel defense against Plant- Parasitic Nematodes. *Nematology* 94 (11): 1207-1214

Spiegel, Y; Robertson, W. M.; Himmelhoch, S.; Zuckermann, B. M. (1983): Electron microscope characterization of carbohydrate residues on the body wall of *Xiphinema index*. *J. Nematol.* 15. 528-534.

Staudt G.; Kassemeyer, H. H. (1990): Resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index* in some *Vitis* species and hybrids (*in: Proceedings*

of the 5th International Symposium on Grape Breeding, 12-16 September 1989, St. Martin/Pfalz, FR of Germany)

Staudt, G. (1991): Spreading of grapevine fanleaf virus in grapevines after inoculation by *Xiphinema index*. In Rumbos, I.C., Bovey, R., Gonsalves, D., Hewitt, W.B., Martelli, G.P.: *Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Virus Diseases of the Grapevine, ICVG, September 3-7, 1990, Volos, Greece*

Staudt, G. (1997): A quick- test for screening resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. *Vitis* 36 (3): 155-156

Staudt, G.; Weischer, B. (1992): Resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index* in *Vitis rotundifolia* and *Vitis munsoniana*. *Vitic. Enol. Sci.* 47: 56- 61

Taylor, C.E.; Brown, D.J.F. (1997): Nematode vectors of plant viruses. *University Press, Cambridge*

Taylor, C. E.; Robertson, W.M. (1970): Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors. *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X. index* (Thorne and Allen). *Annals of Applied biology* 66: 375-380

Thomas, P.; Schiefelbein, J.W. (2002): Improved method for purification of RNA from stem tissue of grapevine and its use in mRNA profiling. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:231-234

Trujillo, M.; Kogel, K.-H.; Hückelhoven, R. (2004): Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 17 (3): 304-312

Vogt, E.; Schruft, G. (2000): Weinbau. *Eugen Ulmer Verlag GmbH & Co.*

Vovlas, N.; Larizza, A. (1994): Life stages identification and embryology of the virus-vector nematode *Xiphinema index*. *Nematol. medit.* 22: 109-113

Walker, M.A.; Meredith, C.P.; Goheen, A.C. (1985): Sources of resistance to grapevine fanleaf virus (GFV) in *Vitis* species. *Vitis* 24: 218-228

Walker, M.A.; Wolpert, J.A.; Vilas, E.P.; Goheen, A.C.; Lider, L.A. (1989): Resistant rootstocks may control fanleaf degeneration of grapevines. *California Agriculture, March-April*

Walker, M.A.; Wolpert, J.A.; Weber, E. (1994): Field screening of grapevine rootstock selections for resistance to fanleaf degeneration. *Plant Dis.* 78: 134-136

Weischer, B. (1982): Studies on the biology and pathogenicity of virus transmitting nematodes. *Jahresber. BBA f. Landwirtsch. Forstwirtsch., Berlin und Braunschweig*

Weischer, B.; Wyss, U. (1976): Feeding behaviour and pathogenicity of *Xiphinema index* on grapevine roots. *Nematologica* 22: 319-325

Wetzel, T.; Jardak, R.; Meunier, L.; Ghorbel, A.; Reustle, G.M.; Krczal, G. (2002): Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* 101 (1-2): 63-69

Williamson, V. M. (1999): Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 327-331

Wyss U.; Lehmann H.; Jank-Ladwig R. (1980): Ultrastructure of modified root-tip cells in *Ficus carica*, induced by the ectoparasitic nematode *Xiphinema index*. *J. Cell Sci.* 41: 193-208

Wyss, Urs (1978): Root and cell response to feeding by *Xiphinema index*. *Nematologica* 24: 159-166

Wyss, Urs (1999): *Xiphinema index*, Maintenance and feeding in monoxenic cultures, in: Maintenance of human, animal and plant pathogen vectors. *Science Publisher, Inc. Enfield, NH, USA (1999)*

Yun, M. H.; Torres, P. S.; El Oirdi, M.; Rigano, L. A.; Gonzales- Lamothe, R.; Marano, M. R.; Castagnaro, A. P.; Dankert, M. A.; Bouarab, K.; Vojnov, A. A. (2006): Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology* 141: 178-187

R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
25	38	45	51	54	53	52	52	52	51	51	51	50	50	49	49	49	48	48	48
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
24	37	44	50	53	52	51	51	51	50	50	50	49	49	48	48	48	48	47	47
23	36	43	49	52	51	50	50	49	49	49	48	48	47	47	47	47	46	46	46
O	O	O	O	O	50	49	49	48	48	48	48	47	47	46	46	46	45	45	45
22	35-	42	48	51	49	48	48	48	47	47	47	O	O	O	O	O	O	O	O
21	34-	41	47	50	O	O	O	O	O	O	O	46	46	45	45	45	45	44	44
20	33-	40	46	49	48	47	47	47	46	46	46	45	45	44	44	44	43	43	43
O	O	O	O	O	47	46	46	46	45	45	45	44	44	43	43	43	42	42	42
19	32-	39	45-	48-	46	45	45	45	44	44	44	43	43	42	42	42	42	41	41
18	31-	38-	44-	47-	45	44	44	44	43	43	43	O	O	O	O	O	O	O	O
17	30-	37-	43-	46-	O	O	O	O	O	O	O	42	42	41	41	41	41	40	40
16	29-	36-	42-	45-	44	43	43	43	42	42	42	41	41	40	40	40	39	39	39
O	O	O	O	O	43	42	42	42	41	41	41	40	40	39	39	39	39	38	38
15	28-	35+	41-	44-	42	41	41	41	40	40	40	39	39	38	38	38	38	37	37
14	27-	34+	40-	43-	41	40	40	40	39	39	39	O	O	O	O	O	O	O	O
13	26-	33-	39-	42-	O	O	O	O	O	O	O	38	38	37	37	37	37	36	36
12	25-	32-	38-	41-	40	39	39	39	38	38	38	37	37	36	36	36	36	35	35
O	O	O	O	O	39	38	38	38	37	37	37	36	36	35	35	35	35	34	34
11	24-	31-	37-	40-	38	37	37	37	36	36	36	35	35	34	34	34	34	33	33
10	23-	30-	36-	39-	37	36	36	36	35	35	35	O	O	O	O	O	O	O	O
9	22-	29-	35-	38-	O	O	O	O	O	O	O	34	34	33	33	33	33	32	32
8	21-	28-	34-	37-	36	35	35	35	34	34	34	33	33	32	32	32	32	31	31
O	O	O	O	O	35	34	34	34	33	33	33	32	32	31	31	31	31	30	30
7	20-	27-	33-	36-	34	33	33	33	32	32	32	31	31	30	30	30	30	29	29
6	19-	26-	32-	35-	33	32	32	32	31	31	31	O	O	O	O	O	O	O	O
5	18-	25-	31-	34-	O	O	O	O	O	O	O	30	30	29	29	29	29	28	28
O	17-	24-	30-	33-	32	31	31	31	30	30	30	29	29	28	28	28	28	27	27
4	O	O	O	O	31	30	30	30	29	29	29	28	28	27	27	27	27	26	26
3	16-	23-	29-	32-	30	29	29	29	28	28	28	27	27	26	26	26	26	25	25
2	15-	22-	28+	31-	29	28	28	28	27	27	27	O	O	O	O	O	O	O	O
O	14-	21-	27-	30-	O	O	O	O	O	O	O	26	26	25	25	25	25	24	24
1	13-	20-	26-	29+	28	27	27	27	26	26	26	25	25	24	24	24	24	23	23
	O	O	O	O	27	26	26	26	25	25	25	24	24	23	23	23	23	22	22
	12-	19-	25-	28-	26	25	25	25	24	24	24	23	23	22	22	22	22	21	21
	11-	18-	24-	27-	25	24	24	24	23	23	23	O	O	O	O	O	O	O	O
	10-	17-	23-	26-	O	O	O	O	O	O	O	22	22	21	21	21	21	20	20
9	16-	22	28	24	23	23	23	22	22	22	22	21	21	20	20	20	20	19	19
O	O	O	O	O	23	22	22	22	21	21	21	20	20	19	19	19	19	18	18
	8	15	21	24	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	18	18	18	17	17
	7	14	20	23	21	20	20	20	19	19	19	O	O	O	O	O	O	O	O
	6	13	19	22	O	O	O	O	O	O	O	18	18	17	17	17	17	16	16
	5	12	18	21	20	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	16	15	15
	O	O	O	O	19	18	18	18	17	17	17	16	16	15	15	15	15	14	14
	4	11	17	20	18	17	17	17	16	16	16	15	15	14	14	14	14	13	13
	3	10	16	19	17	16	16	16	15	15	15	O	O	O	O	O	O	O	O
	2	9	15	18	O	O	O	O	O	O	O	14	14	13	13	13	13	12	12
	O	8	14	17	16	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	12	12	11	11
	1	O	O	O	15	14	14	14	13	13	13	12	12	11	11	11	11	10	10
		7	13	16	14	13	13	13	12	12	12	11	11	10	10	10	10	9	9
		6	12	15	13	12	12	12	11	11	11	O	O	O	O	O	O	O	O
		5	11	14	O	O	O	O	O	O	O	10	10	9	9	9	9	8	8
		O	10	13	12	11	11	11	10	10	10	9	9	8	8	8	8	7	7
		4	O	O	11	10	10	10	9	9	9	8	8	7	7	7	7	6	6
		3	9	12	10	9	9	9	8	8	8	7	7	6	6	6	6	5	5
		2	8	11	9	8	8	8	7	7	7	O	O	O	O	O	O	O	O
		O	7	10	O	O	O	O	O	O	O	6	6	5	5	5	5	4	4
		1	6	9	8	7	7	7	6	6	6	5	5	4	4	4	4	3	3
			O	O	7	6	6	6	5	5	5	4	4	3	3	3	3	2	2
			5	8	6	5	5	5	4	4	4	3	3	2	2	2	2	O	O
			4	7	O	O	O	O	3	3	3	2	2	O	O	O	O	1	1
			3	6	5	4	4	4	2	2	2	O	O	1	1	1	1		
			2	O	4	3	3	3	O	O	O	1	1						
			O	5	3	2	2	2	1	1	1								
			1	4	2	O	O	O											
				3	O	1	1	1											
				2	1														
				O															
				1															

Abb.50: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2004 am Standort Bahlingen im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
25	38	45	51	54	53	52	52	52	51	51	51	50	50	49	49	49	48	48	48
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
24	37	44	50	53	52	51	51	51	50	50	50	49	49	48	48	48	48	47	47
23	36	43	49	52	51	50	50	50	49	49	49	48	48	47	47	47	47	46	46
O	O	O	O	O	50	49	49	49	48	48	48	47	47	46	46	46	46	45	45
22	35-	42	48	51	49	48	48	48	47	47	47	O	O	O	O	O	O	O	O
21	34-	41	47	50	O	O	O	O	O	O	O	46-	46-	45-	45-	45-	45	44	44
20	33-	40	46	49	48-	47	47	47	46	46	46	45-	45-	44-	44-	44-	44	43	43
O	O	O	O	O	47-	46	46	46	45	45	45	44-	44-	43-	43-	43-	43	42	42
19	32-	39	45-	48-	46-	45	45	45	44	44	44	43-	43-	42-	42-	42-	42	41	41
18	31-	38-	44-	47-	45-	44	44	44	43	43	43	O	O	O	O	O	O	O	O
17	30-	37-	43-	46-	O	O	O	O	O	O	O	42-	42-	41-	41-	41-	41	40	40
16	29-	36-	42-	45-	44-	43	43	43	42	42	42	41-	41-	40-	40-	40+	40	39	39
O	O	O	O	O	43-	42	42	42	41	41	41	40-	40-	39-	39-	39-	39	38	38
15	28-	35+	41-	44-	42-	41	41	41	40	40	40	39-	39-	38-	38-	38-	38	37	37
14	27-	34-	40-	43-	41-	40	40	40	39	39	39	O	O	O	O	O	O	O	O
13	26-	33-	39-	42-	O	O	O	O	O	O	O	38	38	37	37	37	37	36	36
12	25-	32-	38-	41-	40-	39	39	39	38	38	38	37	37	36	36	36	36	35	35
O	O	O	O	O	39-	38	38	38	37	37	37	36	36	35	35	35	35	34	34
11	24-	31-	37-	40-	38-	37	37	37	36	36	36	35	35	34	34	34	34	33	33
10	23-	30-	36-	39-	37-	36	36	36	35	35	35	O	O	O	O	O	O	O	O
9	22-	29-	35-	38-	O	O	O	O	O	O	O	34	34	33	33	33	33	32	32
8	21-	28-	34+	37-	36-	35	35	35	34	34	34	33	33	32	32	32	32	31	31
O	O	O	O	O	35-	34	34	34	33	33	33	32	32	31	31	31	31	30	30
7	20-	27-	33-	36-	34-	33	33	33	32	32	32	31	31	30	30	30	30	29	29
6	19-	26-	32-	35-	33-	32	32	32	31	31	31	O	O	O	O	O	O	O	O
5	18-	25-	31-	34-	O	O	O	O	O	O	O	30	30	29	29	29	29	28	28
O	17-	24-	30-	33-	32-	31	31	31	30	30	30	29	29	28	28	28	28	27	27
4	O	O	O	O	31-	30	30	30	29	29	29	28	28	27	27	27	27	26	26
3	16-	23-	29-	32-	30-	29	29	29	28	28	28	27	27	26	26	26	26	25	25
2	15-	22-	28+	31-	29-	28	28	28	27	27	27	O	O	O	O	O	O	O	O
O	14-	21-	27-	30-	O	O	O	O	O	O	O	26	26	25	25	25	25	24	24
1	13-	20-	26-	29+	28-	27	27	27	26	26	26	25	25	24	24	24	24	23	23
	O	O	O	O	27-	26	26	26	25	25	25	24	24	23	23	23	23	22	22
	12-	19-	25-	28-	26-	25	25	25	24	24	24	23	23	22	22	22	22	21	21
	11-	18-	24-	27-	25+	24	24	24	23	23	23	O	O	O	O	O	O	O	O
	10+	17-	23-	26-	O	O	O	O	O	O	O	22	22	21	21	21	21	20	20
	9	16-	22	25	24	23	23	23	22	22	22	21	21	20	20	20	20	19	19
	O	O	O	O	23	22	22	22	21	21	21	20	20	19	19	19	19	18	18
	8	15	21	24	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	18	18	18	17	17
	7	14	20	23	21	20	20	20	19	19	19	O	O	O	O	O	O	O	O
	6	13	19	22	O	O	O	O	O	O	O	18	18	17	17	17	17	16	16
	5	12	18	21	20	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	16	15	15
	O	O	O	O	19	18	18	18	17	17	17	16	16	15	15	15	15	14	14
	4	11	17	20	18	17	17	17	16	16	16	15	15	14	14	14	14	13	13
	3	10	16	19	17	16	16	16	15	15	15	O	O	O	O	O	O	O	O
	2	9	15	18	O	O	O	O	O	O	O	14	14	13	13	13	13	12	12
	O	8	14	17	16	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	12	12	11	11
	1	O	O	O	15	14	14	14	13	13	13	12	12	11	11	11	11	10	10
		7	13	16	14	13	13	13	12	12	12	11	11	10	10	10	10	9+	9
		6	12	15	13	12	12	12	11	11	11	O	O	O	O	O	O	O	O
		5	11	14	O	O	O	O	O	O	O	10	10	9	9	9	9	8	8
		O	10	13	12	11	11	11	10	10	10	9	9	8	8	8	8	7	7
		4	O	O	11	10	10	10	9	9	9	8	8	7	7	7	7	6	6
		3	9	12	10	9	9	9	8	8	8	7	7	6	6	6	6	5	5
		2	8	11	9	8	8	8	7	7	7	O	O	O	O	O	O	O	O
		O	7	10	O	O	O	O	O	O	O	6	6	5	5	5	5	4	4
		1	6	9	8	7	7	7	6	6	6	5	5	4	4	4	4	3	3
		O	O	7	6	6	6	6	5	5	5	4	4	3	3	3	3	2	2
			5	8	6	5	5	5	4	4	4	3	3	2	2	2	2	O	O
			4	7	O	O	O	O	3	3	3	2	2	O	O	O	O	1	1
			3	6	5	4	4	4	2	2	2	O	O	1	1	1	1		
			2	O	4	3	3	3	O	O	O	1							
			O	5	3	2	2	2	1	1	1								
			1	4	2	O	O	O											
				3	O	1	1	1											
				2	1														
				O															
				1															

Abb.51: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2005 am Standort Bahlingen im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
25	38	45	51	54	53	52	52	52	51	51	51	50	50	49	49	49	49	48	48
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
24	37	44	50	53+	52	51	51	51	50	50	50	49	49	48	48	48	48	47	47
23	36	43	49	52	51	50	50	50	49	49	49	48	48	47	47	47	47	46	46
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
22	35-	42	48	51	49	48	48	48	47	47	47	O	O	O	O	O	O	O	O
21	34	41	47	50	O	O	O	O	O	O	O	46-	46-	45-	45-	45-	45	44	44
20	33	40	46	49	48	47	47	47	46	46	46	45-	45-	44-	44-	44-	44	43	43
O	O	O	O	O	O	46-	46-	46-	45	45	45	44-	44-	43-	43-	43-	43	42	42
19	32	39	45	48	46	45	45	45	44	44	44	43-	43-	42-	42-	42-	42	41	41
18	31	38	44	47	45	44	44	44	43	43	43	O	O	O	O	O	O	O	O
17	30	37-	43	46	O	O	O	O	O	O	O	42-	42-	41-	41-	41-	41	40	40
16	29	36-	42	45	44	43	43	43	42	42	42	41-	41-	40-	40-	40+	40	39	39
O	O	O	O	O	43	42	42	42	41	41	41	40-	40-	39-	39-	39-	39	38	38
15	28	35+	41	44	42	41	41	41	40	40	40	39-	39-	38-	38-	38-	38	37	37
14	27-	34	40	43	41	40	40	40	39	39	39	O	O	O	O	O	O	O	O
13	26	33	39	42-	O	O	O	O	O	O	O	38	38	37	37	37	37	36	36
12	25	32	38	41	40	39	39	39	38	38	38	37	37	36	36	36	36	35	35
O	O	O	O	O	39	38	38	38	37	37	37	36	36	35	35	35	35	34	34
11	24	31	37	40	38	37	37	37	36	36	36	35	35	34	34	34	34	33	33
10	23	30	36	39	37	36	36	36	35	35	35	O	O	O	O	O	O	O	O
9	22	29	35	38	O	O	O	O	O	O	O	34	34	33	33	33	33	32	32
8	21	28	34+	37	36	35	35	35	34	34	34	33	33	32	32	32	32	31	31
O	O	O	O	O	35	34	34	34	33	33	33	32	32	31	31	31	31	30	30
7	20	27	33	36	34	33	33	33	32	32	32	31	31	30	30	30	30	29	29
6	19	26	32	35-	33	32	32	32	31	31	31	O	O	O	O	O	O	O	O
5	18	25	31-	34-	O	O	O	O	O	O	O	30	30	29	29	29	29	28	28
O	17	24	30	33	32	31	31	31	30	30	30	29	29	28	28	28	28	27	27
4	O	O	O	O	31	30	30	30	29	29	29	28	28	27	27	27	27	26	26
3	16	23	29	32	30	29	29	29	28	28	28	27	27	26	26	26	26	25	25
2	15	22	28+	31	29	28	28	28	27	27	27	O	O	O	O	O	O	O	O
O	14-	21	27	30	O	O	O	O	O	O	O	26	26	25	25	25	25	24	24
1	13	20-	26	29+	28	27	27	27	26	26	26	25	25	24	24	24	24	23	23
O	O	O	O	O	27	26	26	26	25	25	25	24	24	23	23	23	23	22	22
12-	19	25	28	26	25	25	25	24	24	24	23	23	22	22	22	22	22	21	21
11	18	24	27	25+	24	24	24	23	23	23	O	O	O	O	O	O	O	O	O
10+	17	23	26	O	O	O	O	O	O	O	22	22	22	21	21	21	21	20	20
9	16	22	25	24	23	23	23	22	22	22	22	21	21	20	20	20	20	19	19
O	O	O	O	23	22	22	22	22	21	21	21	20	20	19	19	19	19	18	18
8	15	21	24	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	18	18	18	18	17	17
7	14	20	23	21	20	20	20	19	19	19	O	O	O	O	O	O	O	O	O
6	13	19	22	O	O	O	O	O	O	O	18	18	17	17	17	17	16	16	16
5	12	18	21	20	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	16	16	15	15
O	O	O	O	19	18	18	18	17	17	17	16	16	15	15	15	15	15	14	14
4	11	17	20	18	17	17	17	16	16	16	15	15	14	14	14	14	14	13	13
3	10	16	19	17	16	16	16	15	15	15	O	O	O	O	O	O	O	O	O
2	9	15	18	O	O	O	O	O	O	O	14	14	13	13	13	13	13	12	12
O	8	14	17	16	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	12	12	12	11	11
1	O	O	O	15	14	14	14	13	13	13	12	12	11	11	11	11	11	10	10
	7	13	16	14	13	13	13	12	12	12	11	11	10	10	10	10	10	9+	9
	6	12	15	13	12	12	12	11	11	11	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	5	11	14	O	O	O	O	O	O	O	10	10	9	9	9	9	9	8	8
	O	10	13	12	11	11	11	10	10	10	9	9	8	8	8	8	8	7	7
	4	O	O	11	10	10	10	9	9	9	8	8	7	7	7	7	7	6	6
	3	9	12	10	9	9	9	8	8	8	7	7	6	6	6	6	6	5	5
	2	8	11	9	8	8	8	7	7	7	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	7	10	O	O	O	O	O	O	O	6	6	5	5	5	5	5	4	4
	1	6	9	8	7	7	7	6	6	6	5	5	4	4	4	4	4	3	3
	O	O	O	7	6	6	6	5	5	5	4	4	3	3	3	3	3	2	2
		5	8	6	5	5	5	4	4	4	3	3	2	2	2	2	2	O	O
		4	7	O	O	O	O	3	3	3	2	2	O	O	O	O	O	1	1
		3	6	5	4	4	4	2	2	2	O	O	1	1	1	1			
		2	O	4	3	3	3	O	O	O	1	1							
		O	5	3	2	2	2	1	1	1									
		1	4	2	O	O	O												
			3	O	1	1	1												
			2	1															
			O																
			1																

Abb.52: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympptomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2006 Standort Bahlingen im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme;+/- Pflanzen nach ELISA.

R 16	R 15	R 14	R 13	R 12	R 11	R 10	R 9	R 8	R 7	R 6	R 5	R 4	R 3	R 2	R 1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	54	54	53	55	52	53	52	52	50	50	48	50	49	49	49
54	53	53	52	54	51	52	51	51	49	49	47	49	48	48	48
53	52	52	51	53	0	51	50	50	48	48	46	48	47	0	0
52	0	0	0	0	50	50	49	49	47	47	45	47	0	47	47
0	51	51	50	52	49	49	48	48	0	0	0	0	46	46	46
51	50	50	49	51	48	48	0	0	46	46	44	46	45	45	45
50	49	49	48	50	47	0	47	47	45	45	43	45	44	44	44
49	48	48	47	49	0	47	46	46	44	44	42	44	43	0	0
48	47	47	0	0	46	46	45	45	43	43	41	43	0	43	43
47	0	0	46	48	45	45	44	44	42	0	0	0	42	42	42
0	46	46	45	47	44	44	43	43	0	42	40	42	41	41	41
46	45	45	44	46	43	43	0	0	41	41	39	41	40	40	40
45	44	44	43	45	42	0	42	42	40	40	38	40	39	39	39
44	43	43	42	44	0	42	41	41	39	37	39	38	0	0	0
43	42	42	0	0	41	41	40	40	38	38	36	38	0	38	38
42	0	0	41	43	40	40	39	39	37	0	0	0	37	37	37
0	41	41	40	42	39	39	38	38	0	37	35	37	36	36	36
41	40	40	39	41	38	38-	0	0	36-	36	34	36	35	35	35
40	39	39	38	40	37	0	37-	37-	35+	35	33	35	34	34	34
39	38	38	37	39	0	37+	36-	36-	34-	34	32	34	33	0	0
38	37	37	0	0	36-	36+	35-	35-	33-	33	31	33	0	33	33
37	0	0	36	38	35-	35-	34-	34-	32-	0	0	0	32	32	32
0	36	36	35	37	34-	34-	33-	33-	0	32	30	32	31	31	31
36	35	35	34	36	33-	33-	0	0	31+	31	29	31	30	30	30
35	34	34	33	35	32-	0	32+	32-	30-	30	28	30	29	29	29
34	33	33	32	34	0	32-	31+	31-	29-	29	27	29	28	0	0
33	32	32	0	0	31-	31-	30+	30-	28-	28	26	28	0	28	28
32	0	0	31	33	30-	30+	29-	29-	27-	0	0	0	27	27	27
0	31	31	30	32	29-	29-	28+	28-	0	27	25	27	26	26	26
31	30	30	29	31	28-	28-	0	0	26-	26	24	26	25	25	25
30	29	29	28	30	27+	0	27-	27-	25-	25	23	25	24	24	24
29	28	28	27	29	0	27-	26-	26-	24-	24	22	24	23	0	0
28	27	27	0	0	26-	26-	25-	25+	23-	23	21	23	0	23	23
27	0	0	26	28	25+	25-	24-	24-	22-	0	0	0	22	22	22
0	26	26	25	27	24-	24-	23-	23-	0	22	20	22	21	21	21
26	25	25	24	26	23-	23-	0	0	21-	21	19	21	20	20	20
25	24	24	23	25	22+	0	22-	22-	20-	20	18	20	19	19	19
24	23	23	22	24	0	22-	21-	21-	19-	19	17	19	18	0	0
23	22	22	0	0	21-	21-	20-	20-	18-	18	16	18	0	18	18
22	0	0	21	23	20-	20-	19-	19-	17-	0	0	0	17	17	17
0	21	21	20	22	19-	19-	18-	18-	0	17	15	17	16	16	16
21	20	20	19	21	18-	18	0	0	16	16	14	16	15	15	15
20	19	19	18	20	17+	0	17	17	15	15	13	15	14	14	14
19	18	18	17	19	0	17	16	16	14	14	12	14	13	0	0
18	17	17	0	0	16	16	15	15	13	13	11	13	0	13	13
17	0	0	16	18	15	15	14	14	12	0	0	0	12	12	12
0	16	16	15	17	14	14	13	13	0	12	10	12	11	11	11
16	15	15	14	16	13	13	0	0	11	11	9	11	10	10	10
15	14	14	13	15	12	0	12	12	10	10	8	10	9	9	9
14	13	13	12	14	0	12	11	11	9	9	7	9	8	8	8
13	12	12	0	0	11	11	10	10	8	8	6	8	7	7	7
12	0	0	11	13	10	10	9	9	7	7	5	7	6	6	6
0	11	11	10	12	9	9	8	8	6	6	0	6	5	5	5
11	10	10	9	11	8	8	7	7	5	5	4	5	0	0	0
10	9	9	8	10	7	7	6	6	0	0	0	3	0	4	4
9	8	8	7	9	6	6	5	5	4	4	2	4	3	3	3
8	7	7	6	8	5	5	0	0	3	3	1	3	2	2	2
7	6	6	5	7	0	0	4	4	2	2	0	2	1	1	1
6	5	5	0	6	4	4	3	3	1	1		1	0	0	0
5	0	0	4	5	3	3	2	2	0	0		0			
0	4	4	3	0	2	2	1	1							
43	3	3	2	4	1	1	0	0							
2	2	2	1	3	0	0									
1	1	1	0	2											
0	0	0		1											
				0											

Abb.53: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympptomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2004 Standort Sasbach im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	54	54	53	55+	52	53	52	52	50	51	48	50	49	49	49
54	53	53	52	54	51	52	51	51	49	50	47	49	48	48	48
53	52	52	51	53	0	51	50	50	48	49	46	48	47	0	0
52	0	0	0	0	50	50	49	49	47	48	45	47	0	47	47
0	51	51	50	52	49	49	48	48	0	47	0	0	46	46	46
51	50	50	49	51	48	48	0	0	46	0	44	46	45	45	45
50	49	49	48	50	47	0	47	47	45	46	43	45	44	44	44
49	48	48	47	49	0	47	46	46	44	45	42	44	43	0	0
48	47	47	0	0	46	46	45	45	43	44	41	43	0	43	43
47	0	0	46	48	45	45	44	44	42	43	0	0	42	42	42
0	46	46	45	47	44	44	43	43	0	0	40	42	41	41	41
46	45	45	44	46	43	43	0	0	41	42	39	41	40	40	40
45	44	44	43	45	42	0	42	42	40	41	38	40	39	39	39
44	43	43	42	44	0	42	41	41	39	40	37	39	38	0	0
43	42	42	0	0	41	41	40	40	38	39	36	38	0	38	38
42	0	0	41	43	40	40	39	39	37-	38	0	0	37	37	37
0	41	41	40	42	39	39	38	38	0	0	35	37	36	36	36
41	40	40	39	41	38	38-	0	0	36-	37	34	36	35	35	35
40	39	39	38	40	37	0	37-	37-	35-	36	33	35	34	34	34
39	38	38	37	39	0	37+	36+	36-	34+	35	32	34	33	0	0
38	37	37	0	0	36-	36+	35-	35-	33-	34	31	33	0	33	33
37	0	0	36	38	35-	35-	34-	34-	32-	33	0	0	32	32	32
0	36	36	35	37	34-	34-	33-	33-	0	0	30	32	31	31	31
36	35	35	34	36	33-	33-	0	0	31-	32	29	31	30	30	30
35	34	34	33	35	32-	0	32+	32-	30+	31	28	30	29	29	29
34	33	33	32	34	0	32-	31-	31-	29+	30	27	29	28	0	0
33	32	32	0	0	31-	31-	30-	30-	28-	29	26	28	0	28	28
32	0	0	31	33	30-	30+	29-	29-	27-	28	0	0	27	27+	27
0	31	31	30	32	29-	29-	28-	28-	0	0	25	27	26	26	26
31	30	30	29	31	28-	28-	0	0	26-	27	24	26	25	25	25
30	29	29	28	30	27+	0	27-	27-	25-	26	23	25	24	24	24
29	28	28	27	29	0	27-	26-	26-	24-	25	22	24	23	0	0
28	27	27	0	0	26-	26-	25-	25+	23-	24	21	23	0	23	23
27	0	0	26	28	25-	25-	24-	24-	22-	23	0	0	22	22	22
0	26	26	25	27	24-	24-	23+	23-	0	0	20	22	21	21	21
26	25	25	24	26	23-	23-	0	0	21-	22	19	21	20	20	20
25	24	24	23	25	22+	0	22-	22-	20-	21	18	20	19	19	19
24	23	23	22	24	0	22-	21-	21-	19-	20	17	19	18	0	0
23	22	22	0	0	21+	21-	20-	20-	18-	19	16	18	0	18	18
22	0	0	21	23	20-	20-	19-	19-	17-	18	0	0	17	17	17
0	21	21	20	22	19-	19+	18-	18-	0	0	15	17	16	16	16
21	20	20	19	21	18-	18-	0	0	16	17	14	16	15	15	15
20	19	19	18	20	17+	0	17	17	15	16	13	15	14	14	14
19	18	18	17	19	0	17	16	16	14	15	12	14	13	0	0
18	17	17	0	0	16	16	15	15	13	14	11	13	0	13	13
17	0	0	16	18	15	15	14	14	12	13	0	0	12	12	12
0	16	16	15	17	14	14	13	13	0	0	10	12	11	11	11
16	15	15	14	16	13	13	0	0	11	12	9	11	10	10	10
15	14	14	13	15	12	0	12	12	10	11	8	10	9	9	9
14	13	13	12	14	0	12-	11	11	X	10	7	9	8	8	8
13	12	12	0	0	11-	11-	10	10	8	9	6	8	7	7	7
12	0	0	11-	13-	10-	10-	9	9	7	8	5	7	6	6	6
0	11	11	10-	12-	9-	9-	8	8	6	7	0	6	5	5	X
11	10	10	9-	11-	8-	8-	7	7	5	6	4	5	0	0	0
10	9	9	8+	10-	7-	7-	6	6	0	5	3	0	4	4	4
9	8	8	7+	9-	6-	6-	5	5	4	0	2	4	3	3	3
8	7	7	6-	8-	5-	5-	0	0	3	4	1	3	2	2	2
7	6	6	5+	7+	0	0	4	4	2	3	0	2	1	1	1
6	5	5	0	6-	4-	4+	3	3	1	2		1	0	0	0
5	0	0	4-	5+	3-	3+	2	2	0	1		0			
0	4	4	3-	0	2-	2-	1	1	0	0					
43	3	3	2-	4-	1-	1-	0	0							
2	2	2	1-	3-	0	0									
1	1	1	0	2-											
0	0	0		1-											
				0											

Abb.54: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2005 Standort Sasbach im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

R16	R15	R14	R13	R12	R11	R10	R9	R8	R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
55	54	54	53	55+	52	53	52	52	50	51	48	50	49	49	49
54	53	53	52	54	51	52	51	51	49	50	47	49	48	48	48
53	52	52	51	53	O	51	50	50	48	49	46	48	47	O	O
52	O	O	O	O	50	50	49	49	47	48	45	47	O	47	47
O	51	51	50	52	49	49	48	48	O	47	O	O	46	46	46
51	50	50	49	51	48	48	O	O	46	O	44	46	45	45	45
50	49	49	48	50	47	O	47	47	45	46	43	45	44	44	44
49	48	48	47	49	O	47	46	46	44	45	42	44	43	O	O
48	47	47	O	O	46	46	45	45	43	44	41	43	O	43	43
47	O	O	46	48	45	45	44	44	42	43	O	O	42	42	42
O	46	46	45	47	44	44	43	43	O	O	40	42	41	41	41
46	45	45	44	46	43	43	O	O	41	42	39	41	40	40	40
45	44	44	43	45	42	O	42	42	40	41	38	40	39	39	39
44	43	43	42	44	O	42	41	41	39	40	37	39	38	O	O
43	42	42	O	O	41	41	40	40	38	39	36	38	O	38	38
42	O	O	41	43	40	40	39	39	37-	38	O	O	37	37	37
O	41	41	40	42	39	39	38	38	O	O	35	37	36	36	36
41	40	40	39	41	38	38-	O	O	36-	37	34	36	35	35	35
40	39	39	38	40	37	O	37-	37-	35+	36	33	35	34	34	34
39	38	38	37	39	O	37+	36+	36-	34+	35	32	34	33	O	O
38	37	37	O	O	36-	36+	35+	35-	33	34	31	33	O	33	33
37	O	O	36	38	35-	35-	34-	34-	32+	33	O	O	32	32	32
O	36	36	35	37	34-	34-	33-	33-	O	O	30	32	31	31	31
36	35	35	34	36	33-	33-	O	O	31+	32	29	31	30	30	30
35	34	34	33	35	32-	O	32+	32-	30+	31	28	30	29	29	29
34	33	33	32	34	O	32-	31-	31-	29+	30	27	29	28	O	O
33	32	32	O	O	31-	31-	30-	30-	28-	29	26	28	O	28	28
32	O	O	31	33	30-	30+	29-	29-	27-	28	O	O	27	27+	27
O	31	31	30	32	29-	29-	28-	28-	O	O	25	27	26	26	26
31	30	30	29	31	28-	28-	O	O	26-	27	24	26	25	25	25
30	29	29	28	30	27+	O	27-	27+	25-	26	23	25	24	24	24
29	28	28	27	29	O	27-	26-	26-	24-	25	22	24	23	O	O
28	27	27	O	O	26-	26-	25-	25+	23-	24	21	23	O	23	23
27	O	O	26	28	25+	25-	24-	24-	22-	23	O	O	22	22	22
O	26	26	25	27	24-	24-	23+	23-	O	O	20	22	21	21	21
26	25	25	24	26	23-	23-	O	O	21-	22	19	21	20	20	20
25	24	24	23	25	22+	O	22-	22-	20-	21	18	20	19	19	19
24	23	23	22	24	O	22-	21-	21-	19-	20	17	19	18	O	O
23	22	22	O	O	21+	21-	20-	20-	18-	19	16	18	O	18	18
22	O	O	21	23	20-	20-	19-	19-	17-	18	O	O	17	17	17
O	21	21	20	22	19-	19+	18-	18-	O	O	15	17	16	16	16
21	20	20	19	21	18-	18-	O	O	16	17	14	16	15	15	15
20	19	19	18	20	17+	O	17	17	15	16	13	15	14	14	14
19	18	18	17	19	O	17	16	16	14	15	12	14	13	O	O
18	17	17	O	O	16	16	15	15	13	14	11	13	O	13	13
17	O	O	16	18	15	15	14	14	12	13	O	O	12	12	12
O	16	16	15	17	14	14	13	13	O	O	10	12	11	11	11
16	15	15	14	16	13	13	O	O	11	12	9	11	10	10	10
15	14	14	13	15	12	O	12	12	10	11	8	10	9	9	9
14	13	13	12	14	O	12-	11	11	X	10	7	9	8	8	8
13	12	12	O	O	11-	11-	10	10	8	9	6	8	7	7	7
12	O	O	11-	13	10-	10-	9	9	7	8	5	7	6	6	6
O	11	11	10-	12-	9-	9-	8	8	6	7	O	6	5	5	X
11	10	10	9-	11-	8-	8-	7	7	5	6	4	5	O	O	O
10	9	9	8+	10-	7-	7-	6	6	O	5	3	O	4	4	4
9	8	8	7+	9-	6-	6-	5	5	4	O	2	4	3	3	3
8	7	7	6-	8-	5-	5-	O	O	3	4	1	3	2	2	2
7	6	6	5+	7+	O	O	4	4	2	3	O	2	1	1	1
6	5	5	O	6-	4-	4+	3	3	1	2		1	O	O	O
5	O	O	4-	5+	3-	3+	2	2	O	1		O			
O	4	4	3-	O	2-	2-	1	1							
43	3	3	2-	4-	1-	1-	O	O							
2	2	2	1-	3-	O	O									
1	1	1	O	2-											
O	O	O		1-											
				O											

Abb.55: Pflanzplan der einzelnen Rebstöcke mit Virussympomen nach der Sichtbonitur aus dem Jahr 2006 Standort Sasbach im Kaiserstuhl (rot: virusauffällig; lila: virusverdächtig); schwarz umrandete Bereiche= Blattprobenahme; +/- Pflanzen nach ELISA.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere ebenfalls, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, im Juli 2007

Nina Feil

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. M. Hahn für die Begutachtung und die sehr wertvollen Ratschläge und Ideen während der letzten 3 Jahre bedanken.

Herrn Dr. M. Breuer danke ich für die herzliche Betreuung und ständige Gesprächsbereitschaft während der ganzen Zeit am Weinbauinstitut.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. V. Jörger für die Vergabe des Themas, der stets die Anforderungen und Rahmenbedingungen dieses FDW-Projektes im Griff hatte und ohne dessen Projektantrag diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei allen meinen Kollegen am Weinbauinstitut Freiburg, die immer sehr hilfsbereit waren und mit denen ich in den letzten 3 Jahren eine schöne Zeit verbracht habe, möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen, mit denen ich im Labor und im Büro eng zusammengearbeitet habe. Danke Sven, Karolin, Carmen, Patricia, Gertrud, Franzi, Susana, Gerti und Michl.

Des Weiteren möchte ich auch Herrn Dr. Kassemeyer für die Diskussionsbereitschaft und für die molekularbiologischen Fragestellungen danken.

Herrn PD. Dr. J. Kusch danke ich für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Ein Dankeschön gilt auch den Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Phytopathologie an der TU Kaiserslautern, die mich immer sehr herzlich behandelt haben. Für die Hilfsbereitschaft in schwierigen Phasen meiner Arbeit danke ich auch Herrn Dr. Andreas Böhm.

Ein großes Dankeschön natürlich an meine Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt und ermutigt haben.

Mein besonderer Dank gilt Gordon, der immer zu mir gestanden hat und meine Launen während dieser Arbeit ertragen musste.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Feil
Vorname: Nina
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Geburtsdatum: 26.07.1978
Geburtsort: Kusel
Eltern: Fritz Feil, Klaudia Feil (geb. Leimer)

Schulische Ausbildung

1985 - 1989: Besuch der Grundschule Rammelsbach
1989 - 1991: Besuch der Realschule Kusel
1991 - 1998: Besuch des Gymnasiums Kusel
24.06.1998: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

01.10. 1998: Beginn des Erststudiums Biologie (Diplom) an der Technischen Universität Kaiserslautern
15.12. 2000: Vordiplom Biologie
03.09. 2003: Diplom Biologie in der Arbeitsgruppe Biotechnologie (IBWF; Prof. Dr. H. Anke) an der TU Kaiserslautern
Thema: Isolierung nematizider Sekundärmetabolite gegen *Meloidogyne incognita*
01.05.2004 - 30.04.2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Staatl. Weinbauinstitut Freiburg mit Betreuung durch Prof. Dr. M. Hahn, Arbeitsgruppe Phytopathologie, TU Kaiserslautern
2004 - 2007: Stipendium über den Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW)

Veröffentlichungen und Vorträge:

Feil, N.; Breuer, M.; Jörger, (2005): V.: Resistenz von Reben gegenüber Wurzelnematoden. *Der Badische Winzer* 11 S.: 24-27

Feil, N. (2005): Der Nematode *Xiphinema index*, Virusüberträger im Weinbau. *Das Deutsche Weinmagazin* 4 S.: 22-23

Feil, N. (2006): Neue Wege zur Kontrolle von Viruskrankheiten. *Der Deutsche Weinbau* 1 S.: 12-14

Feil, N.; Breuer, M.; Jörger, V. (2006): Nematodentoleranz von Reben. *Der Badische Winzer* 12 S. 26-27

Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzen, Lauterbad 2006

55. Deutsche Pflanzenschutztagung in Göttingen 2006