

## **Schlussbericht**

„Schritte zu einem nachhaltigen Weinbau. Verbesserte Produktivität und Toleranz gegenüber abiotischem und biotischem Stress durch Kombination von resistenten Sorten und nützlichen Mikroorganismen (VitiSmart)“

**Förderkennzeichen:**2815ERA05C

**Zuweisungsempfänger:** Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

**Ausführende Stelle:** Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) – Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen

**Projektleitung:** Prof. Dr. Reinhard Töpfer

**Projektlaufzeit:** 01.05.2016-30.04.2019

## **1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen**

Im Zuge des Klimawandels ist die Rebe immer größerem Druck durch biotischen und abiotischem Stress ausgesetzt. Die Stärkung der Resilienz der Rebe gegenüber diesen Stressoren durch widerstandsfähige Sorten und vorteilhafte Mikroorganismen soll dies nachhaltig verbessern. Das Teilprojekt des JKI-ZR (Julius Kühn-Institut, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof) ist im Arbeitsschwerpunkt in Arbeitspaket 2 (WP2, „Grapevine genetic resources exploitation to screen for more resilient cultivars“), welche gemeinsam mit Partnern bearbeitet wurden, angesiedelt. Es trägt dazu bei, präventive Strategien zur Bekämpfung des Klimawandels im Weinbau zu erarbeiten. Hierbei wurden basierend u.a. auf Hyperspektralanalyse und Referenzbonituren an ausgewählten Rebsorten und Genotypen verschiedenen Methoden zur zerstörungsfreien Evaluierung ihrer Resistenzantwort gegenüber biotischem und abiotischem Stress evaluiert. Die folgenden Themenkomplexe wurden innerhalb des Projektes bearbeitet:

- 1) Untersuchung von Pflanzen mit unterschiedlichen Genorten für Resistenz gegenüber Echtem (PM, powdery mildew) und Falschem Mehltau (DM, downy mildew).
- 2) Markerentwicklung zur Botrytis-Widerstandsfähigkeit von Rebsorten im Hinblick auf Beerenhauteigenschaften: a) Beerenhautbereifung/ -wachsauflage und b) Beerenhautfestigkeit.
- 3) Bestimmung der Hitzetoleranz von Weinbeeren verschiedener Rebsorten.

## **2. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen**

Ein zentraler Schwerpunkt des Teilprojekts am JKI-ZR war die Entwicklung sensor-gestützter Methoden zur zerstörungsfreien Detektion von biotischem und abiotischem Stress unter Verwendung hochauflösender Hyperspektralkameras. Hierfür wurde zunächst ein Labormessplatz zur standardisierten Datenerfassung konstruiert und zwei Hyperspektralkameras (Kamera 1: VIS-NIR, sichtbares Licht und Nahinfrarotbereich, Wellenlängenbereich 400-1.000 nm; Kamera 2: SWIR, kurzwelliger Infrarotbereich, Wellenlängenbereich 1.000-2.500 nm) beschafft. Projektübergreifend wurde der Labormessplatz am JKI-ZR aufgebaut, Hard- und Softwarekomponenten für eine automatisierte Pipeline zur Datenaufnahme etabliert. Die Datenaufnahmepipeline (z.B. Systemaufbau, Kameraeinstellungen, Beleuchtung, Kameraausrichtung, Translationstisch) wurde in einer intensiven Testphase projektübergreifend (VitiSmart, BigGrape) in Zusammenarbeit mit dem BigGrape-Projektpartner, das Fraunhofer Institut für Fabrikbetrieb und Automatisierung (IFF) optimiert und angepasst. Im gesamten Projektverlauf wurden Protokolle für die Datenaufnahme, Arbeitsabläufe zur Datenvorverarbeitung sowie die Entwicklung von Vorhersagemodellen (siehe Abbildung 1) für die jeweiligen Schadbilder (Echter und Falscher Mehltau, Bereifung, Hitzestress) entwickelt.

## Schlussbericht VitiSmart

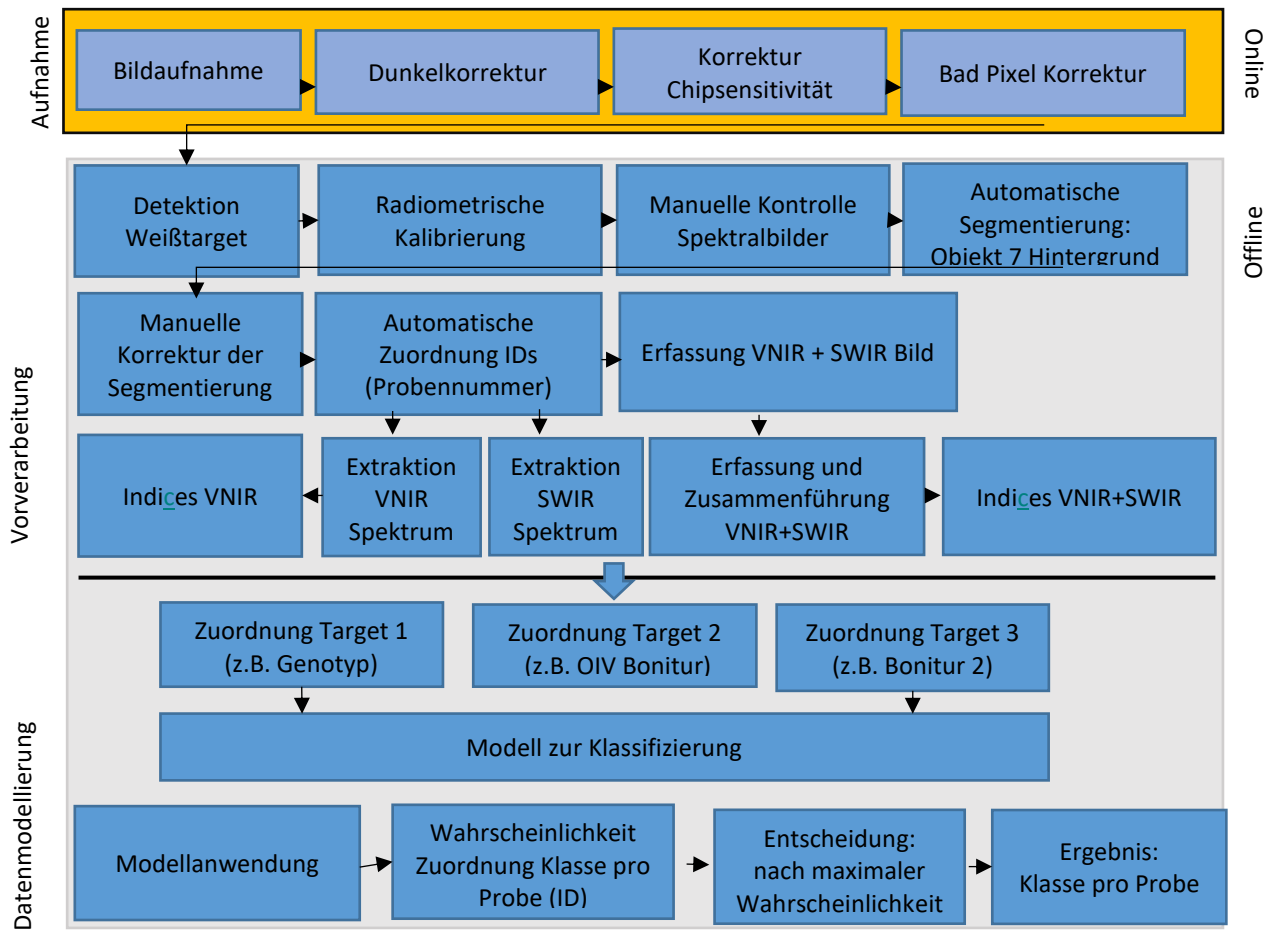


Abb.1: Grundsätzlicher Arbeitsablauf zur Vorverarbeitung, Modellierung und Auswertung der Hyperspektralbilder

Im Rahmen des Projektes erfolgte ein stetiger Austausch mit den Partnern bei zahlreichen Projekttreffen, insbesondere entstanden enge Kooperationen mit den folgenden Partnern:

- Partner 2 (Universität Gent): Probenahmen (2x) am Standort Siebeldingen zur Erfassung und Charakterisierung der Wirt-Pathogen Interaktionen verschiedener Stämme des Pathogens *Plasmopara viticola*. Dabei wurden im engen Austausch, Sporen des Pathogens von drei Rebsorten (Spätburgunder: anfällig, Phoenix: Resistenzträger, weniger anfällig, Regent: Resistenzträger, weniger anfällig) im Freiland am Standort Siebeldingen gewonnen. Zur Untersuchung der Interaktionen des Pathogens mit unterschiedlichen Rebsorten, erfolgte die Bereitstellung von Pflanzenmaterial in den drei Jahren der Projektlaufzeit. Dafür wurden am Standort Geilweilerhof jährlich jeweils 50 Stecklinge von fünf Rebsorten mit unterschiedlichen Resistenzen gegen Falschen Mehltau vorbereitet und dem Partner zur Verfügung gestellt.
- Partner 13 (Universität Groningen): Das Ziel der Charakterisierung des Mikrobioms der Rebe (in WP 3) im Freiland, diente der möglichen Identifizierung von nützlichen Mikroorganismen (z.B. Bakterienstämme, die zur besseren Resistenz gegenüber biotischen Stressfaktoren beitragen). Die Zusammenarbeit mit Partner 13 entstand in der ersten Phase des Projektes und umfasste eine aufwändige Probenahme im Freiland zur Charakterisierung des Mikrobioms der Rebe. Die

Beprobung umfasste die Gewinnung von Bodenproben (Rhizospähre) als auch Feinwurzeln in einer Tiefe von 50 cm. Am Standort Geilweilerhof konnte dafür eine Parzelle zur Verfügung gestellt werden, die zur Testung unterschiedlicher Unterlagen in Kombination mit verschiedenen resistenten Rebsorten dient. Partner 13 plant eine Publikation zu diesen Daten.

- Partner 5 (INRA Bordeaux): Im Austausch mit Partner 5 erfolgte im Jahr 2018 die Beprobung der Rhizospähre verschiedener Zuchtstämme am Standort Siebeldingen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte das Mikrobiom von 15 verschiedenen Resistenzträgern (gegen Echten und Falschen Mehltau) beprobt und zur Verfügung gestellt werden.

Über das Projekt hinaus entstanden im Rahmen der Arbeiten folgende Kooperationen:

- Kooperation mit Universität Bonn (Institut Informatik 4): Im Rahmen dieser Kooperation wurde ein weiteres bildgebendes Sensorsystem zur Erfassung der Beerenoberfläche entwickelt. Die Versuchsreihen erfolgten in zwei Jahren am Standort Siebeldingen. Dafür wurden an 3 bzw. 4 Terminen pro Jahr Messungen an Einzelbeeren verschiedener Rebsorten durchgeführt. Sowohl die Probenahme, als auch die Referenzierung der aufgenommenen Sensordaten erfolgten im Rahmen von VitiSmart und in Eigenleistung. Die Ergebnisse der Zusammenarbeit sind in der unten aufgeführten Veröffentlichung (1) publiziert.
- COST Action (Universität Lissabon): Im Rahmen einer COST Förderung konnte im Jahr 2017 eine Gastwissenschaftlerin am Geilweilerhof in einem drei-Monatigen Forschungsaufenthalt zahlreiche Versuche zu Veränderungen des Metaboloms von Reben nach Inokulation mit Falschem Mehltau durchführen. Die Versuche konnten im Rahmen von VitiSmart zur Erhebung weiterer Datensätze zur sensorbasierten Erfassung von Falschem Mehltau genutzt werden. Die Ergebnisse der Zusammenarbeit sind in der unten aufgeführten Publikation (2) veröffentlicht.

## **Task 2.1 Nicht-invasive Evaluierung von biotischem Stress (Echter und Falscher Mehltau)**

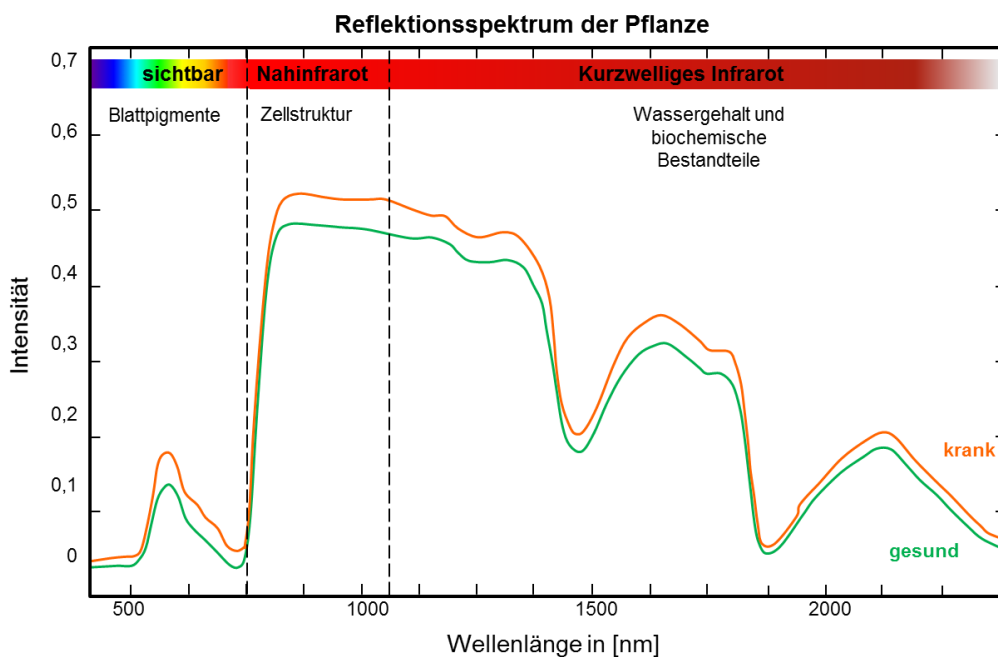
### a) Untersuchungen am Echten Mehltau (engl. Powdery Mildew - PM)

Als erstes wurden zwei Methoden zur Infektion von ganzen Blättern unter standardisierten Laborbedingungen getestet: (1) Sporenübertragung mittels Pinsel und (2) Sporenübertragung im Infektionsturm (Kooperation mit Partner 7, Silvia Vezzulli, Fondazione Edmund Mach). Hierbei wurden Luftverwirbelungen mittels Teichpumpe simuliert, die Sporen wurden somit berührungsfrei von einem infizierten Blatt ähnlich wie unter natürlichen Bedingungen in den Infektionsturm transportiert. Methode (2) ist zwar zeiteffizienter, da während eines Durchgangs vier Testplatten (36 Blätter) gleichzeitig inokuliert werden können, die Luftverwirbelung jedoch zu einer erhöhten Kontaminationsrate auf den Agarplatten durch pilzliche und bakterielle Erreger führte. Aus diesem Grund wurde für alle Versuche zur Entwicklung sensorbasierter Evaluierungsverfahren Methode (1) eingesetzt. Die Infektionsbedingungen im Klimaschrank wurden optimiert, die Methode etabliert (Meilenstein 2.1.1) und an einem Set von 20 ausgewählten Genotypen durchgeführt und Hyperspektraldaten aufgenommen.

## Schlussbericht VitiSmart

Die Genotypen sind anfällige Rebsorten, pilzwiderstandsfähige Neuzüchtungen (Piwis) und Zuchtstämme, welche entweder keine, eine oder bis zu drei kombinierte Resistenzen aufweisen (siehe Tabelle A.1 im Anhang).

Die Datenaufnahme mittels Hyperspektralkamerasystem erfolgte an Zeitreihen (Messungen erfolgten von  $t_0$  = vor Inokulation; bis 14 Tage nach Inokulation, im Abstand von zwei Tagen). Die Einzelblätter wurden in den Hyperspektralbildern den Genotypen und Wiederholungen zugeordnet, um das mittlere Reflektionsspektrum pro untersuchtem Blatt zu extrahieren. Abbildung 2 zeigt schematische Reflektionsspekten eines kranken bzw. gesunden Blattes.



**Abb.2:** Schematische Darstellung der spektralen Signatur vom sichtbaren bis in Nahinfrarotbereich (VNIR) und im kurzwelligen Infrarot (SWIR) eines gesunden Blattes (grün) und eines kranken Blattes (orange).

Im Rahmen des Vorhabens wurde ein Tool zur Auswertung von Hyperspektraldaten zur zerstörungsfreien Evaluierung des Befalls mit echtem Mehltau (PM) entwickelt. Das Tool basiert auf zwei verschiedenen Modellen: Modell (1) der Klassifizierung nach OIV Deskriptor 455-1 (im Folgenden als „OIV“ bezeichnet) und Modell (2) zur Klassifizierung gemäß der binoskopischen Bonitur der Blätter (im Folgenden als „CLASS“ bezeichnet). Zur Referenzierung von Modell (1) wurden parallel visuelle Bonituren nach OIV 455-1 der Blätter durchgeführt (Tabelle A.1 im Anhang). Zur Referenzierung von Modell (2) wurde ein im Rahmen von VitiSmart etabliertes Klassifizierungssystem genutzt, das auf der binoskopischen Bewertung der Infektion mit *Erysiphe necator* beruht (9 = keine Kolonien sichtbar, 7 = vereinzelte kleine, abgegrenzte Kolonien + Myzel auf der Blattoberfläche sichtbar, 5 = kleine abgrenzbare Kolonien, auf der Blattoberfläche verteilt + sich deutlich ausbreitendes Myzel, 3 = Kolonien nicht klar abgrenzbar, große Bereiche der Blattoberfläche mit sporulierenden Kolonien überzogen, 1 = Blattoberfläche ist zu mehr als 70 % von sporulierenden Kolonien überzogen, deutlich wahrnehmbarer weißer Belag auf der Blattoberfläche). Zur Erstellung der Modelle wurden fünf Datensätze erhoben, zwei

davon dienten als Trainingsdatensätze, drei als Anwendungsdatensätze. Im Zuge der Kreuzvalidierung wurde jeder Datensatz mindestens einmal als Trainingsdatensatz eingesetzt. Zur Evaluierung des erstellten Tools konnten drei weitere Datensätze (Jahr 2018) genutzt werden. Hierbei konnten unterschiedliche Klassifikationsgenauigkeiten erzielt werden (Tabelle 1).

**Tab.1:** Klassifikationsgenauigkeiten der beiden Modelle zur Detektion von Infektionen mit PM. OIV: Modell zur Zuordnung zu 5 Klassen des OIV Deskriptors 455-1. CLASS: Modell zur Zuordnung zu VitiSmart Klassifizierungssystem (fünf Klassen)

Referenz- datensatz	VNIR (400 - 1.000 nm)		SWIR (1.000 - 2.500 nm)	
	Trainings- daten	Testdaten	Trainings- daten	Testdaten
OIV	72%	91%	79%	70%
CLASS	61%	58%	64%	58%

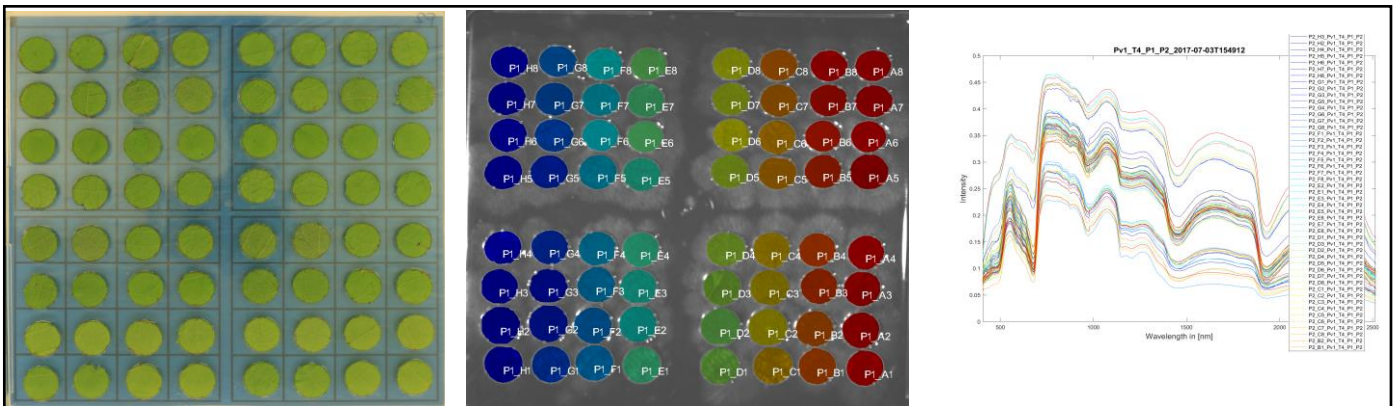
Die Ergebnisse (Tabelle 1) zeigen, dass sich das entwickelte Modell (OIV) zur Zuordnung der Blätter - auf Basis der VNIR-Daten, zur entsprechenden OIV Klasse mit einer Klassifikationsgenauigkeit von 91 % (für den Anwendungsdatensatz), zur automatisierten und objektiven Bonitur von Infektionstests mit PM eignet. Die Klassifikationsgenauigkeiten sind für die VNIR-Daten signifikant besser als für die SWIR-Daten. Die Klassifikationsgenauigkeit des Modells (CLASS) weist mit max. 64 % eine unzureichende Genauigkeit auf. Das Modell (CLASS) ist somit für eine zuverlässige Evaluierung der Infektion nicht aussagekräftig. Die Infektionsstellen sind räumlich auf sehr kleine Blattbereiche begrenzt. Mit dem angewandten Modellierungsverfahren wird jedoch das durchschnittliche Reflektionsspektrum des gesamten Blattes analysiert, d.h. sowohl infizierte als auch gesunde Bereiche, was zu einer Unterschätzung der Infektion führen kann. Für den Einsatz in der Züchtung wäre deshalb Modell (OIV) mit einer Klassifikationsgenauigkeit von 91% vorzuziehen.

#### b) Infektionen mit Falschem Meltau (engl. Downy Mildew - DM)

Zur Untersuchung der Infektion mit Falschem Mehltau wurden Blattscheibentests unter standardisierten Laborbedingungen nach Schwander et al. (2012) getestet und etabliert (Meilenstein 2.1.1). Ein Protokoll wurde erstellt und dem Projektverbund zur Verfügung gestellt. Zur Entwicklung einer sensor-gestützten Evaluierungsmethode mittels Hyperspektraldaten wurden Infektionsversuche an 30 ausgewählten Genotypen durchgeführt, die unterschiedliche Resistenzen gegen den pilzlichen Schaderreger tragen (Tabelle A.2 im Anhang). Als Referenzbonituren für die Hyperspektralanalyse erfolgten ebenfalls parallel zur Datenaufnahme visuelle Bonituren nach OIV Deskriptor 452-1 (9 = sehr hohe Resistenz, 7 = hohe Resistenz, 5 = mittlere Resistenz, 3 = geringe Resistenz, 1 = sehr geringe Resistenz). Des Weiteren erfolgte die binoskopische Bonitur und Einteilung in fünf Klassen nach Schwander et al. (2012): 9 = keine Sporangiohoren, 7 = 1 – 5 Sporangiohoren, 5 = 6 -20 Sporangiohoren, 3 = > 20 Sporangiohoren und 1 = dichter Sporangiohoren Rasen.

## Schlussbericht VitiSmart

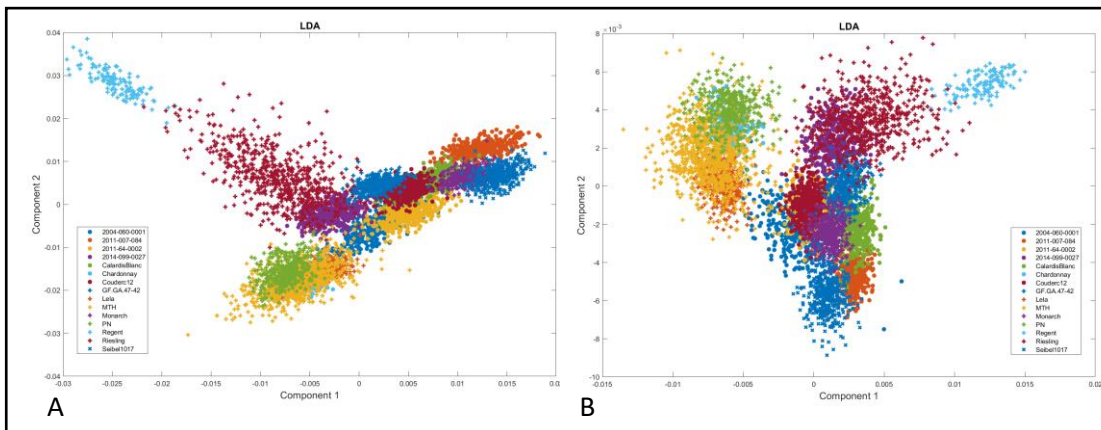
Für eine automatisierte Datenauswertung wurde das Pflanzenmaterial nach einem standardisierten Schema angeordnet (Abbildung 3). Die Analysen erfolgten an Zeitreihen (Aufnahme vor Inokulation und ab Inokulation täglich bis 7 Tage nach Inokulation).



**Abb.3:** Anordnung Blattscheiben, Zuweisung der ID pro Blattscheibe und resultierende mittlere Reflektionsspektren pro Blattscheibe für Infektionsversuche mit *Plasmodiopsis viticola* (DM). Für die Auswertung wurde nur das Zentrum der Blattscheiben (Durchmesser von 5 mm, Stelle der Inokulation) berücksichtigt, da die Infektion immer in diesem Bereich detektiert wurde.

Bei einer ersten Analyse der Hyperspektraldaten zum Zeitpunkt  $t_0$  (vor Inokulation), konnten bereits Unterschiede im mittleren Reflektionsspektrum pro Blattscheibe (BS) identifiziert werden, d.h. die Blätter unterschiedlicher Rebsorten reflektieren unterschiedlich. Zur Validierung wurde eine Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) durchgeführt (siehe Abb. 4). Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Blattmaterial von Regent auf Grund der Reflektionseigenschaften in beiden aufgenommenen Spektralbereichen von den anderen Rebsorten unterscheiden lässt. Die Rebsorte Riesling zeigt in beiden spektralen Bereichen (VNIR und SWIR) die größte Streuung in ihren Reflektionseigenschaften und lässt sich deshalb nicht in jedem Fall zuverlässig von anderen Genotypen abgrenzen. Für die weiteren Rebsorten zeigen die Daten im VNIR Bereich eine enge Gruppierung, nicht alle Gruppen lassen sich unterscheiden. Die Analyse zeigt, dass sich die Reflektionseigenschaften der untersuchten Rebsorten vor allem im Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 1000 nm unterscheiden. Dies könnte beispielsweise auf unterschiedliche Chlorophyllgehalte, Nährstoffmangel o.ä. zurückzuführen sein und ist eine wichtige Kenngröße für die spätere Evaluierung der Stressreaktion. Das entwickelte Modell deutet auf einen Unterschied bei unterschiedlichen Pflanzenmaterial hin. Die Klassifikationsgenauigkeit von 65% ist für eine zuverlässige Unterscheidung von Rebsorten zum jetzigen Zeitpunkt jedoch zu gering. Es müssen weitere Datensätze erhoben werden, mit denen das zu Grunde liegende Modell trainiert werden kann.

## Schlussbericht VitiSmart



**Abb. 4:** A: LDA der Spektren von 400 nm – 1000 nm (VNIR) verschiedener Rebsorten; B: LDA der Spektren von 1000 nm – 2000 nm (SWIR) verschiedener Rebsorten

Im nächsten Schritt wurden die Hyperspektraldaten unterschiedlicher Zeitpunkte während des Infektionsversuchs analysiert, d.h. vor der Inokulation ( $t_0$ ), 1 dpi ( $t_1$ ), 2 dpi ( $t_2$ ), 3 dpi ( $t_3$ ), 4 dpi ( $t_4$ ), 5 dpi ( $t_5$ ), 6 dpi ( $t_6$ ) und 7 dpi ( $t_7$ ). Auf Grund der Analysen im ersten Projektjahr anhand erster Modellierungen wurde festgestellt, dass in den ersten 3 Tagen nach der Inokulation keine Stress- bzw. Resistenzreaktionen detektiert werden konnte, wurde im Folgejahr auf die Messungen in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation verzichtet.

Insgesamt konnten 15 unabhängige Datensätze erhoben werden. Ein Datensatz ist eine vollständige Zeitreihe bestehend aus Hyperspektral- und Referenzdaten zu den oben genannten Zeitpunkten  $t_0$  bis  $t_7$ . Diese Datensätze wurden für die Modellentwicklung zunächst in acht Trainings- und sieben Testdatensätze unterteilt (Modell 1 siehe Tabelle 2). Anhand der Trainingsdaten werden die Modelle entwickelt und die Klassifikationsgenauigkeit anhand der Testdatensätze validiert. Zusätzlich wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt, d.h. jeder Datensatz wurde mindestens einmal als Trainingsdatensatz verwendet (Modell 2 siehe Tabelle 3). Die erzielten Klassifikationsgenauigkeiten wurden sowohl für die Trainingsdatensätze, als auch für die Anwendungsdatensätze erfasst (siehe Tabelle 2).

**Tab.2:** Klassifikationsgenauigkeiten von Modell (1) basierend auf Referenz- und Bilddaten der VNIR bzw. SWIR Hyperspektralkameras. OIV = OIV-Deskriptor 452-1, SPOR = Klassifizierung in fünf Klassen nach Anzahl gezählter Sporangiothoren.

Referenz- datensatz	VNIR (400 - 1.000 nm)		SWIR (1.000 - 2.500 nm)	
	Trainings- daten	Testdaten	Trainings- daten	Testdaten
OIV	71%	69%	64%	63%
SPOR	63%	67%	55%	58%
Annotation	88%	N/A	68%	N/A

Mit dem entwickelten Modell (1) konnte eine Klassifizierungsgenauigkeit von bis zu 71 % für die VNIR Kamera erreicht werden. Für eine zuverlässige Zuordnung im Testdatensatz war die Genauigkeit jedoch



unzureichend. Aus diesem Grund wurden die Trainingsdatensätze der VNIR zusätzlich annotiert, d.h. es wurden Bereiche auf den Blattscheiben manuell gekennzeichnet, die eine Infektion oder Resistenzreaktionen zeigten. Auf diese Weise konnten die beiden Vorhersagemodelle mit zusätzlichen Referenzdaten trainiert werden. Die Merkmalsannotation führte zu einer deutlichen Verbesserung beider Modelle auf bis zu 88% für die VNIR Kamera. Für das Modell 2 (Kreuzvalidierung) sind die Genauigkeiten in Tabelle 3 dargestellt. Auch in diesem Modell wurden die manuell annotierten Daten berücksichtigt.

**Tab.3:** Klassifikationsgenauigkeiten von Modell (2) basierend auf Referenz- und Bilddaten der VNIR bzw. SWIR Hyperspektralkameras, mit neuer Klasse im OIV Modell nach erneuter Kreuzvalidierung

Referenz- datensatz	VNIR (400 - 1.000 nm)		SWIR (1.000 - 2.500 nm)	
	Trainings- daten	Testdaten	Trainings- daten	Testdaten
OIV	75%	80%	61%	83%
SPOR	68%	70%	51%	70%
Annotation	91%	N/A	75%	N/A

Wie aus Tab.2 und 3 hervorgeht, konnte an den Testdatensätzen eine Klassifikationsgenauigkeit von bis zu 83% erzielt werden. Das entwickelte Tool kann somit zur Evaluierung der Infektion mit Falschen Mehltau kann zur Auswertung neuer Hyperspektraldatensätze eingesetzt werden. Im Projekt wurde die methodische Grundlage für die Hyperspektraldatenaufnahme und – Auswertepipeline gelegt, welche durch Modellanpassungen optimiert werden können, um die Klassifikationsgenauigkeit noch zu steigern.

- c) Screening von Genotypen im Feld zur Identifikation von neuen Resistenzquellen mittels Hyperspektralanalyse

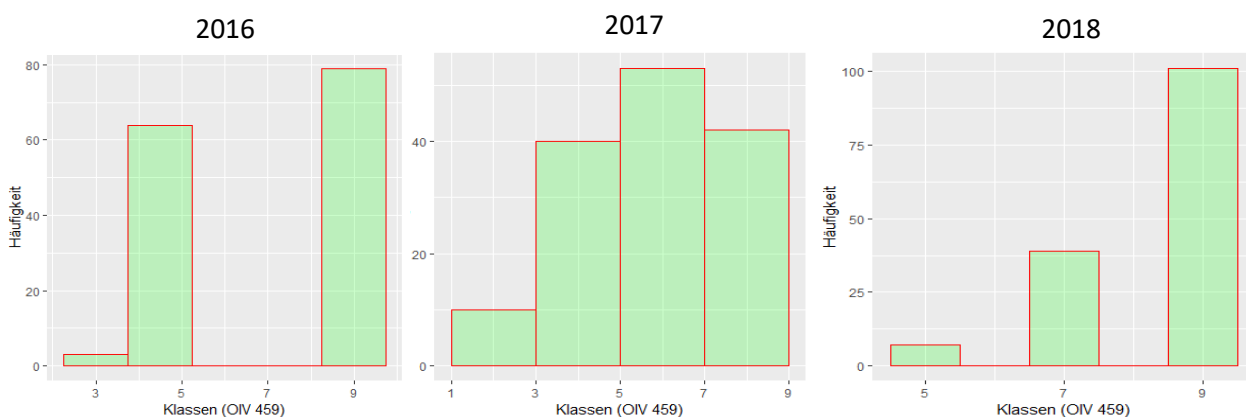
Eine grundlegende Voraussetzung für die Identifikation neuer Resistenzquellen ist eine objektive, schnelle und sensorgestützte Datenerfassung im Freiland. Im Rahmen des Vorhabens und Projektübergreifend wurde die automatisierte Freiland-Phänotypisierungsplattform „Phenoliner“ aufgebaut (Kicherer et al., 2017) und getestet. Der Phenoliner ist ein umgebauter Traubenvollernter, welcher nun eine automatisierte Aufnahme georeferenzierter Hyperspektralaufnahmen im Weinberg ermöglicht. Hierfür können die im Labor eingesetzten Hyperspektralkameras eingebaut werden, wodurch die Durchführung von Machbarkeitsstudien (z.B. Test auf Übertragbarkeit von Labordaten auf Freilanddaten) zukünftig möglich wird. Im Rahmen des Vorhabens wurden mit dem „Phenoliner“ Felddaten mit den Hyperspektralsensoren erhoben und damit die Grundlage geschaffen, um im Freiland größere Zahlen an Genotypen, z.B. in der Genbank zu evaluieren und auf diese Weise neue Resistenzquellen zu identifizieren. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Arbeiten werden bereits in neuen Forschungsprojekten berücksichtigt und sollen in einer Machbarkeitsstudie zur frühzeitigen Detektion von *Plasmopara viticola* im Weinberg eingesetzt werden.

## Task 2.2 Kartierungsmerkmale – Beitrag zur *Botrytis* Resilienz

Im Rahmen des Projektes wurde die Beerenhautbereifung, d.h. die Wachsaufgabe, als eine wichtige physikalische Barriere untersucht, da eine dichte und undurchlässige Wachsschicht wie eine Schutzschicht auf der Beere wirkt. Neben der Wachsaufgabe sind auch die Beerenhautdicke und Widerstandsfähigkeit der Beerenhaut gegenüber Mikrorissen wichtige Beereigenschaften, um Infektionen mit dem Graufäule Erreger *Botrytis cinerea* (*Botrytis*) vorzubeugen.

### a) Phänotypisierung von *Botrytis*-Befall im Freiland (Sorten und Kartierungspopulation) nach OIV

Die visuellen Bonituren erfolgten über drei Jahre hinweg im Freiland. In der Kartierungspopulation 'Calardis Musqué' x 'Villard Blanc' (im Folgenden CM x VB genannt) wurden 150 F1-Nachkommen mindestens zehn Trauben an sechs Rebstöcke pro Genotyp bewertet. Zur Bewertung wurde der OIV Deskriptor 459 (Widerstandsfähigkeit gegenüber *Botrytis*) eingesetzt und die Bonitur zur Lesereife, d.h. 85 – 100 °Oe durchgeführt (Ergebnisse in Abbildung 5). Die Freilandbonitur wurde ebenfalls an Referenzsorten (Cabernet Blanc, Cabernet Sauvignon, Calardis Blanc, Dakapo, Norton, Riesling, Sauvignon Blanc und Seibel 7511) durchgeführt.



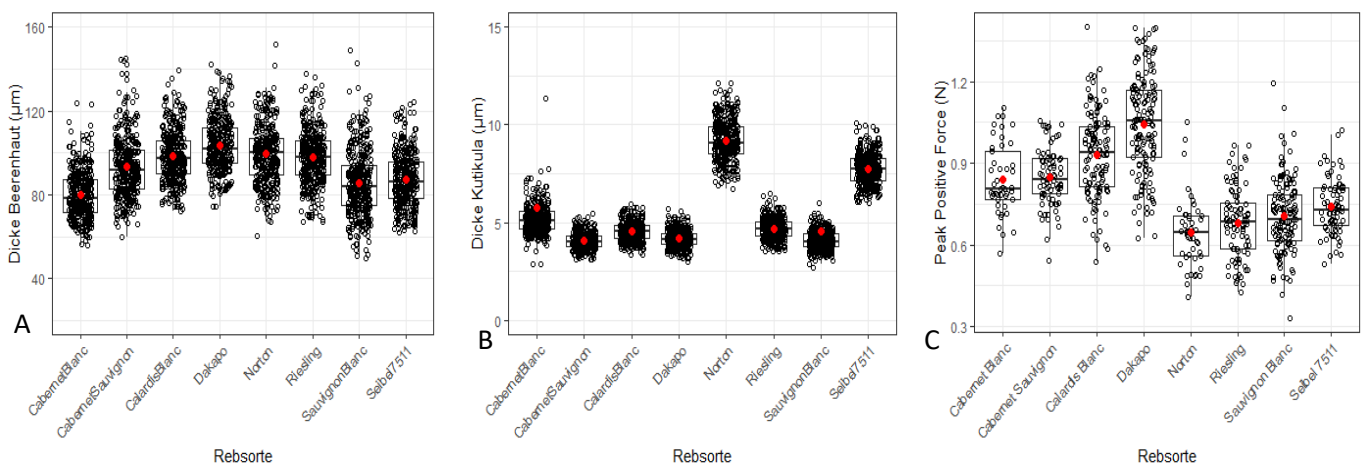
**Abb. 5:** Häufigkeitsverteilung der Boniturstufen zur Bewertung der Widerstandsfähigkeit von Trauben gegenüber *Botrytis* (OIV 459) in 2016, 2017 und 2018. Bewertet wurde die Kartierungspopulation CMxVB. Klasse 1: Sehr starke Anfälligkeit; Klasse 3: starke Anfälligkeit; Klasse 5: mittlere Anfälligkeit; Klasse 7: geringe Anfälligkeit; Klasse 9: unanfällig.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Jahren. In 2016 und 2018 war durch trockene Witterungsbedingungen während der Traubenreife der Befallsdruck durch *Botrytis* sehr gering und nur in 2017 zeigten ca. 30% der untersuchten Genotypen eine sehr starke bis starke Anfälligkeit (Klasse 1 und 3). Für die Bewertung der Beerenhauteigenschaften auf die Widerstandsfähigkeit von Beeren gegenüber *Botrytis* wurden deshalb die Befallsdaten der Botrytisbonitur aus 2017 verwendet. Dabei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Bereifung der Weinbeeren und der Botrytis Anfälligkeit (Rangkorrelation nach Spearman: p-Wert: 0,00034 und rho = 0,4).

## b) Phänotypisierung mittels Texturmessung – Sensorbasierte Bewertung der Beerenhautfestigkeit

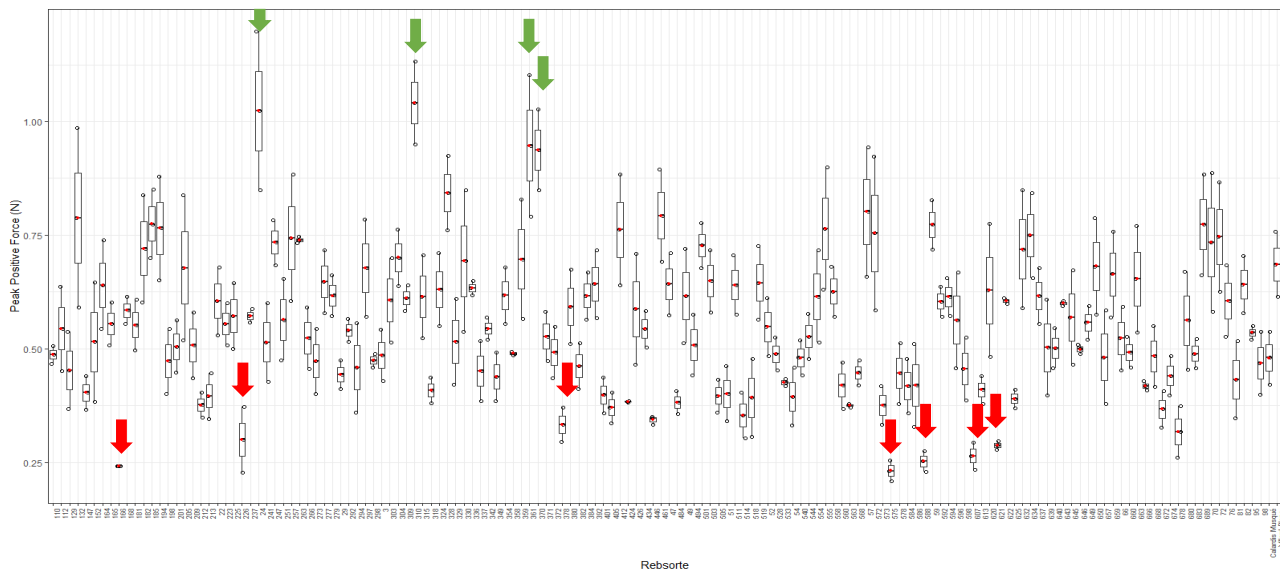
In Eigenleistung wurde die Beerenhautfestigkeit mittels Textur-Analyse zur Lesereife der Trauben gemessen. Hierbei wird die Durchstechkraft gemessen, d.h. die Kraft welche benötigt wird um mit einem Texturmessgerät eine dünne Nadel durch die Beerenhaut einer intakten Beere zu stechen. Dieser Wert soll einerseits von der Beerenhautdicke als auch von der Beerenfleischfestigkeit abhängen. Zur Evaluierung wurden die Beeren von 35 Rebsorten (enthalten die acht Referenzsorten, an denen die Methoden zur Erfassung der Oberflächeneigenschaften der Beeren im Rahmen des Vorhabens getestet wurden) untersucht, die Widerstandsfähigkeiten gegenüber Botrytis, von sehr stark anfällig bis unanfällig repräsentieren. Die Auswahl beinhaltet sowohl Rebsorten, die sich in vieljährigen Bonituren als widerstandsfähig erwiesen haben (Cabernet Blanc, Seibel 7511, Dakapo, Norton, Saperavi, GF.GA.-52-42, Calardis Blanc, Chambourcin, Pinotin), als auch Rebsorten, die als anfällig gelten (Riesling, Morio Muskat, Optima, Müller-Thurgau, Blauer Portugieser). Die Ergebnisse der Texturanalyse ist anhand der Referenzsorten in Abb. 6 A dargestellt. Über die Texturanalyse hinaus erfolgte in Eigenleistung die mikroskopische Vermessung der Dicke der Kutikula und der Beerenhaut (Zellschichten der Epidermis). Die Ergebnisse der Vermessungen sind in Abb. 6 B und C dargestellt. Die vier Sorten mit einem hohen Wert für den Texturparameter Peak Positive Force zeigen gleichzeitig eine dickere Beerenhaut.

Zusätzlich wurde die Textur auch an den 150 Genotypen der Kartierungspopulation bestimmt (Abbildung 7).



**Abb. 6:** Ergebnisse der Analysen der Beerenoberfläche der acht Referenzsorten. A = Ergebnis der Texturanalyse, gezeigt ist der Faktor Peak Positive Force (Kraft, die benötigt wird um eine intakte Beerenhaut mit einer Nadel zu durchstechen), B = Ergebnisse der mikroskopischen Vermessung der Kutikula (äußere, der Beerenhaut aufgelagerte Schicht), C = Ergebnisse der mikroskopischen Vermessung der Beerenhautdicke.

## Schlussbericht VitiSmart



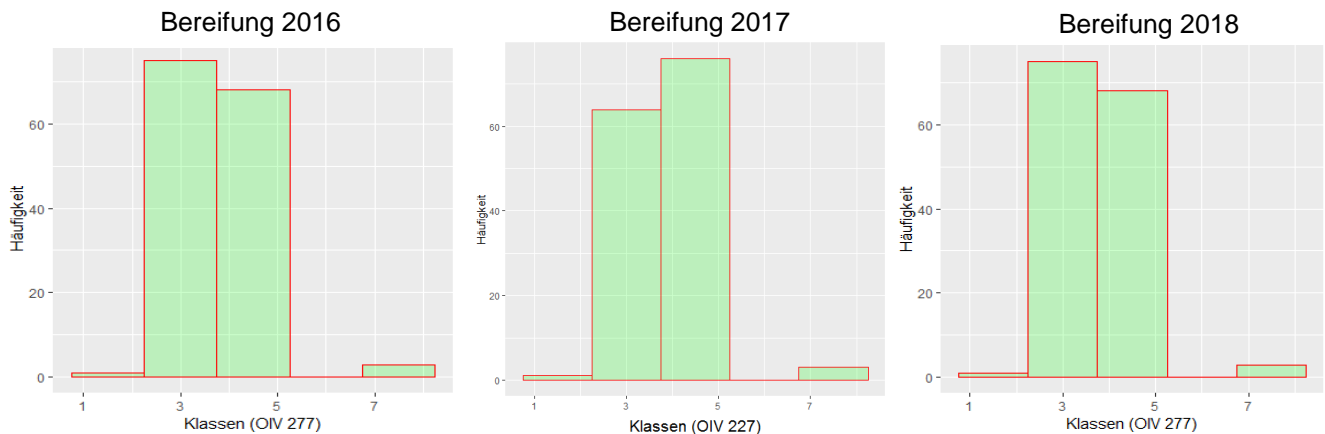
**Abb. 7:** Ergebnisse der Texturanalyse zur Bewertung der Beerenhautfestigkeit (Lesereife) der Genotypen der Kartierungspopulation. Mit grünen Pfeilen markiert: Genotypen mit sehr hoher Beerenhautfestigkeit (unanfällig gegenüber *Botrytis*). Mit roten Pfeilen markiert: Genotypen mit sehr niedriger Beerenhautfestigkeit anfällig gegenüber *Botrytis*.

Aus der Analyse geht hervor, dass ein großer Teil der Genotypen eine mittlere Beerenhautfestigkeit besitzt (entsprechend Gruppe 3 der Referenzsorten). Allerdings traten mit den Genotypen 1989-030-0024, 1989-030-0310, 1989-030-0361 und 1989-030-0370 auch Genotypen mit einer sehr hohen Beerenhautfestigkeit auf, die über den Werten der Peak Positive Force (N) der Gruppe 1 der Referenzen (Sorten mit hoher Beerenhautfestigkeit) liegen. Demgegenüber sind mit den Genotypen 1989-030-0166, 1989-030-0226, 1989-030-0378, 1989-030-0575, 1989-030-0588, 1989-030-0607 und 1989-030-0621 ebenfalls Genotypen mit einer sehr niedrigen Beerenhautfestigkeit vertreten, die unter den niedrigsten Werten der Referenzen liegen. Die Texturdaten wurden für eine QTL Analyse verwendet (siehe 2.2.d).

### c) Evaluierung der Bereifung

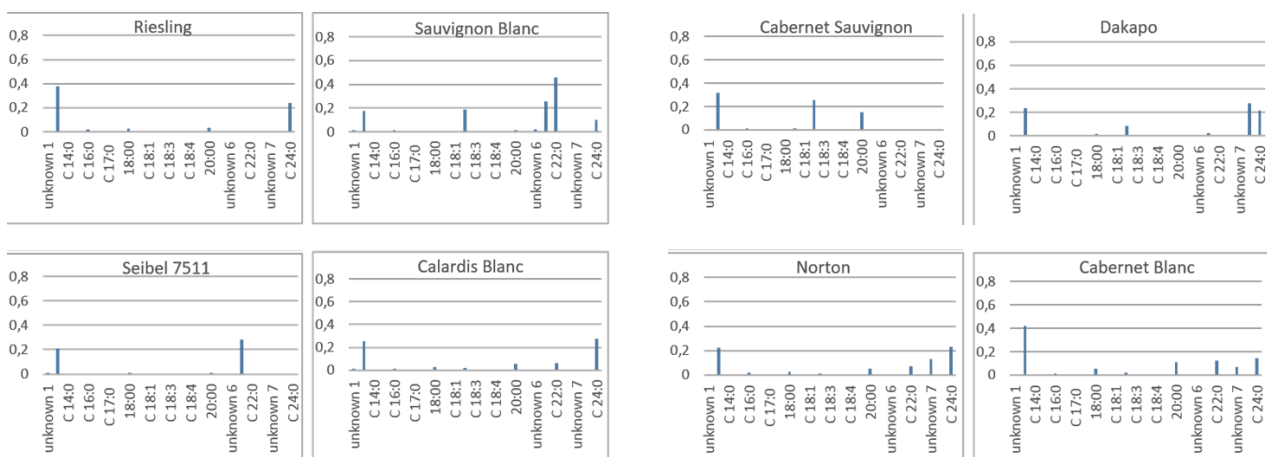
Die Evaluierung der Bereifung erfolgte sowohl an den Referenzsorten, als auch an den Genotypen der Kartierungspopulation. Die Bewertung erfolgte im Freiland an zwei Terminen (Termin 1 bei einer Beerenreife von ca. 70°Oe und Termin 2 Lesereife). Mit Hilfe des OIV-Deskriptors 227 (Bereifung) wurden analog zur Bewertung in Punkt 2.6 mindestens 10 Trauben pro Genotyp bewertet (Abbildung 8). Die Kartierungspopulation wurde dabei in allen drei Jahren des Vorhabens überwiegend mit den Noten 3 und 5 bewertet (geringe bis mittlere Bereifung) und nur für ein paar wenige Genotypen visuell starke Bereifung (Klasse 7), d.h. eine dicke Wachsschicht bzw. eine sehr dünne oder leicht ablösbare Wachsschicht (entspricht Klasse 1) festgestellt. Die Beobachtungen waren dabei nicht normalverteilt. Die visuelle Bewertung der Bereifung ist dabei subjektiv und hängt stark von Lichtverhältnissen, Tageszeit, Beerenfarbe und –Form ab.

## Schlussbericht VitiSmart



**Abb. 8:** Häufigkeitsverteilung zur Bereifung der Beeren (OIV 277) in der Kartierungspopulation CM x VB in 2016, 2017, 2018. Klasse 1: keine oder sehr geringe Bereifung; Klasse 3: geringe Bereifung; Klasse 5: mittlere Bereifung; Klasse 7: starke Bereifung; Klasse 9: sehr starke Bereifung.

Um eine objektive Methode zur Bewertung der Bereifung zu entwickeln, wurde ein analytisches Referenzverfahren zur qualitativen Analyse der Wachszusammensetzung sowie ein Auswerteverfahren mittels Hyperspektralbildern getestet. Dabei wurde angenommen, dass unterschiedliche Wachszusammensetzungen und –Strukturen eine Veränderung der spektralen Reflektion bewirken. Zunächst wurde die Aufnahme von Hyperspektralbildern etabliert und im Anschluss an die Datenaufnahme (Datengrundlage: 405 Beeren pro Rebsorte) die Oberflächenwachse der Beeren extrahiert und in Kooperation mit dem JKI Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (JKI-RS) analysiert. Nach einer zeit- und arbeitsintensiven Etablierungsphase der Wachsextraktion und gaschromatografischen Analyse (GC) konnte schließlich die Zusammensetzungen der Wachsschicht zum Projektende analysiert werden. Dabei zeigten sich bei den untersuchten Sorten unterschiedliche Zusammensetzungen der Wachsschicht (Abbildung 9).



**Abb. 9:** Auszug der Wachsbestandteile der Referenzsorten; Sorten mit ähnlichen Eigenschaften sind gruppiert dargestellt: Riesling und Sauvignon Blanc; Seibel 7511 und Calardis Blanc; demgegenüber stehen Cabernet Sauvignon und Dakapo und Norton und Cabernet Blanc

Inzwischen konnte projektübergreifend ein erstes statistisches Modell mit den Hyperspektraldaten und den dazugehörigen Wachsbestandteilen trainiert und getestet werden. Wie in Tabelle 4 zusammengefasst, zeigt das Modell eine sehr hohe Zuordnungsgenauigkeit, d.h. beispielsweise, dass

die Beeren der Sorte Dakapo anhand ihrer spektralen Signatur fehlerfrei zugeordnet werden (Zuordnungsgenauigkeit 100%). Dakapo zeigte auch in der Zusammensetzung der Oberflächenwachse einen Unterschied in der Kombination der Bestandteile (Kombination aus C18.1 und hoher Anteil an Komponente „unknown7“, welche sich beispielsweise im Cabernet Sauvignon nicht nachweisen lässt). Die Rebsorten Riesling und Sauvignon Blanc werden vom Modell in 9.63 % der Fälle verwechselt. Betrachtet man die Beerenoberflächen mit einem Rasterelektronenmikroskop (nicht gezeigt) so zeigen beide Rebsorten eine visuell sehr ähnliche Wachsstruktur, auch wenn sich diese in der Zusammensetzung (siehe Abb. 9) z.T. stark unterscheiden.

**Tab. 4:** Konfusionsmatrix der Modellierung der Hyperspektraldaten zur Erkennung von sortenbedingten Unterschieden in der Wachszusammensetzung; Grau unterlegt ist die Klassifikationsgenauigkeit des Modells zur jeweiligen Sorte

	Cabernet Blanc	Cabernet Sauvignon	Calardis Blanc	Dakapo	Norton	Riesling	Sauvignon Blanc	Seibel 7511
Cabernet Blanc	99.26	0.00	0.00	0.0	0.00	0.74	0.00	0.00
Cabernet Sauvignon	0.00	96.30	0.00	0.0	2.96	0.00	0.74	0.00
Calardis Blanc	0.74	0.00	97.04	0.0	0.00	0.00	0.00	2.22
Dakapo	0.00	0.00	0.00	100.0	0.00	0.00	0.00	0.00
Norton	0.00	0.74	0.00	0.0	99.26	0.00	0.00	0.00
Riesling	1.48	0.00	0.74	0.0	0.00	88.15	9.63	0.00
Sauvignon Blanc	5.19	0.00	0.00	0.0	0.00	6.67	88.15	0.0
Seibel 7511	0.00	0.00	2.22	0.0	0.00	0.74	0.00	97.04

Die Entwicklung einer robusten Datenaufnahme zur hyperspektralen Evaluierung der Beerenwachsschicht und ein erstes Modell sind ein wichtiger Grundstein, um Sorten anhand ihrer chemischen Wachszusammensetzung oder basierend auf ihrer Oberflächenstruktur (3D-Struktur der Wachsauflage) unterscheiden zu können. Hierfür ist es jedoch notwendig, das Modell mit weiteren Datensätzen zu optimieren, die Übertragbarkeit auf weitere Sorten zu prüfen und die Anwendung in Züchtung oder Präzisionsweinbau zu etablieren.

#### d) QTL-Analyse für Beerenbereifung

Für QTL Analysen wurde die Kartierungspopulation CM x VB genutzt, um korrelierende SSR-Marker für das Merkmal der Beerenbereifung (siehe a) zu identifizieren. Dazu wurden in die bestehende genetische Karte weitere Marker integriert. Voraussetzung für eine QTL Analyse ist eine Normalverteilung der Boniturdaten. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe Abbildung 8), da die Varianz des Merkmals in der untersuchten Kartierungspopulation gering ist und überwiegend nur zwei Boniturstufen bonitiert werden konnten. Aus diesem Grund wurden sensorgestützte Methoden zur objektiveren Erfassung von Beerenhauteigenschaften eingesetzt (siehe b) und deren Anwendbarkeit für QTL Analysen getestet

## Schlussbericht VitiSmart

(siehe Tabelle 5). Hierbei konnten insgesamt 27 signifikante QTLs identifiziert werden, welche einen LOD-Wert mit bis zu 8,57 zeigten und 23.4% der Variation erklärten. Alle untersuchten Beerenhauteigenschaften (Dicke der Beerenhaut, Textur-Analyse, Impedanz der Beerenhautoberfläche als Indikator für Dicke und Durchlässigkeit der Beerenhautoberfläche) QTLs auf Chromosom 16. Auf diesem Chromosom wurde auch ein QTL für den Reifebeginn, die Veraison detektiert (Zyprian et al. 2016). Es kann also angenommen werden, dass in der untersuchten Kartierungspopulation die unterschiedlichen Beerenhauteigenschaften auf diesem Chromosom liegen oder die Merkmalsausprägung vom Zeitpunkt der Veraison abhängt.

**Tab 5:** Ergebnisse einer QTL Analyse in der Kartierungspopulation CM x VB für weitere die Beerenhauteigenschaften. Verrechnet wurden Beerenhautdicke (BST), Texturdaten (TA\_Area, TA\_Gradient und TA\_Peak-Positive-Force) sowie Impedanz der Beerenhautoberfläche (Zrel, als Indikator für die Dicke und Durchlässigkeit der Kutikula inkl. Wachsaufgabe). Grün hinterlegte LOD-Werte (LOD = Logarithm of the Odds) sind signifikant. chr = Chromosom; IM = Intervall Mapping (statistisches Analyseverfahren zur Identifizierung von QTLs)

trait	type	chr.	LODmax position	linked marker	LODmax	chr. spec. significa	expl. variation [%]	genome wide significanc
BST	IM	1	93.646		3.74	2.9	11.9	4.3
BST	IM	17	49.108		3.55	2.7	11.3	4.3
BST	IM	14	24.731	GF14-52	3.41	2.9	10.9	4.3
BST	IM	11	23.917	VMC6C3	2.88	2.8	9.3	4.3
BST	IM	16	53.697	GF16-44_166	2.86	3	9.2	4.3
TA_Area	IM	16	43.582	GF16-48_232	8.57	2.9	23.4	4.3
TA_Area	IM	14	24.731	GF14-52	4.78	3	13.8	4.3
TA_Area	IM	1	97.646		4.34	2.8	12.6	4.3
TA_Area	IM	18	12.45		3.76	3	11	4.3
TA_Area	IM	12	0	GF12-03	3.22	2.7	9.5	4.3
TA_Area	IM	9	0	GF09-09	3.17	2.7	9.4	4.3
TA_Area	IM	11	0	GF11-01_135	2.96	2.5	8.8	4.3
TA_Area	IM	5	47.365		2.57	2.6	7.7	4.3
TA_Gradient	IM	2	14.706		6.18	2.6	17.5	4.3
TA_Gradient	IM	17	33.177		4.93	2.8	14.2	4.3
TA_Gradient	IM	5	54.555		4.15	2.7	12.1	4.3
TA_Gradient	IM	16	5		3.97	2.8	11.6	4.3
TA_Gradient	IM	10	70.115	VMC3E11.2_82	3.51	2.7	10.4	4.3
TA_Gradient	IM	13	1		3.44	2.9	10.1	4.3
TA_Gradient	IM	1	93.646		2.78	2.9	8.3	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	16	37.608		7.55	2.8	20.9	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	1	98.646		5.65	2.9	16.1	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	5	49.555		4.8	2.9	13.9	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	14	38.723	GF14-09	4.75	3	13.7	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	2	19.683	GF02-34_398	3.59	2.4	10.6	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	13	10.939	VCHR13C	3.13	2.9	9.3	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	18	11.45		2.91	3	8.7	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	10	87.782		2.77	3	8.2	4.3
TA_PeakPositiveForce	IM	12	27.584		2.71	2.7	8.1	4.3
Zrel	IM	7	25.185		4.85	3	14.6	4.4
Zrel	IM	16	44.984	GF16-12	4.3	2.9	13	4.4
Zrel	IM	10	0	VMC3D7	2.88	2.8	8.9	4.4
Zrel	IM	19	38.344	GF19-05	2.57	2.7	8	4.4

In Eigenleistung wurde die Textur-Analyse in einer weiteren Kartierungspopulation Dakapo x Cabernet Sauvignon und eine QTL Analyse durchgeführt. Dabei wurde ein QTL auf Chromosom 2 mit einem LOD Wert von 20.42 identifiziert. Um die identifizierten Regionen zu bestätigen, sind weitere mehrjährige Studien, z.B. Genome-Wide-Association-Studies (GWAS) notwendig.

### Task 2.3 Evaluierung von Pflanzenmaterial auf abiotischen Stress

Im Rahmen dieses Arbeitspakets sollte die Anfälligkeit von Sorten für Hitzestress untersucht werden. Ein typisches Hitzestresssymptom kann die Sonnenbrandneigung unreifer Beeren sein, d.h. eine Verbräunung an Beeren, welche später eintrocknen und somit den Ertrag drastisch reduzieren können. Für eine objektive und automatisierte Evaluierung der Anfälligkeit gegenüber Sonnenbrandneigung wurde ein standardisierter Labortest zur Induktion von Hitzestress an Einzelbeeren etabliert. Die Methodenetablierung (Meilenstein 2.1.6) erfolgte an den Sorten 'Bacchus' (weiße Rebsorte, anfällig) und 'Chardonnay' (weiße Rebsorte, unanfällig). Darüber hinaus wurden weitere im Projektverbund festgelegte Sorten 'Cabernet Sauvignon' (rote Rebsorte, unanfällig) und 'Monastrell' (rote Rebsorte, Anfälligkeit in Deutschland unklar) im phänologischen Entwicklungsstadium BBCH 75 bis 77 geprüft. Es wurden Einzelbeeren in Zellkulturschalen fixiert und der Hitzestress durch eine Behandlung für acht Stunden bei 45 °C in einem Trockenschrank induziert. Für eine objektive Evaluierung wurden Farbbilder (RGB) aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte während der Hitzestressbehandlung im Abstand von zwei Stunden. Bereits nach kurzer Behandlungszeit konnten bei der anfälligen Sorte 'Bacchus' Verbräunungsreaktionen detektiert werden. Die Verbräunungsreaktionen wurden an allen Einzelbeeren visuell erfasst, in fünf Klassen unterteilt (siehe Abbildung 10).

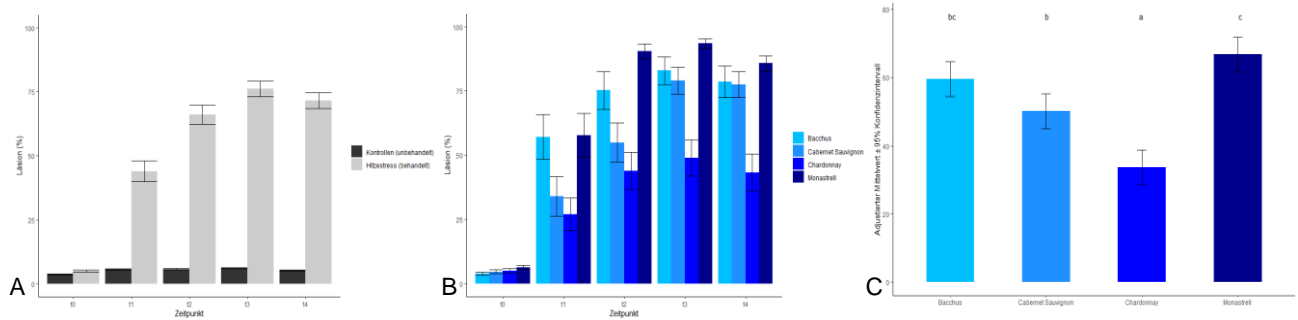


**Abb. 10:** Klassifizierung der Anfälligkeit gegenüber Hitzestress durch visuelle Bonitur. Klasse 9 = keine Läsion, d.h. unanfällig; Klasse 7 = 5 – 20 % Läsion, d.h. geringe Anfälligkeit; Klasse 5 = 21 – 50 % Läsion, d.h. mittlere Anfälligkeit; Klasse 3 = 51 – 75 % Läsion, d.h. starke Anfälligkeit; Klasse 1 = >76 %, d.h. sehr starke Anfälligkeit.

Die aufgenommenen RGB-Bilder wurden mit Hilfe eines halbautomatischen, Matlab-basierten Klassifikationstools TQT (Trait-Quantification-Tool). Mit Hilfe von TQT wurde der prozentuale Anteil brauner Läsionen (Verbräunungsreaktion) pro aufgenommener Beerenoberfläche berechnet. Hierbei hat sich gezeigt, dass die anfälligen Sorten bereits nach kurzer Hitzestressbehandlung (nach zwei Stunden =  $t_1$ ) Verbräunungsreaktionen zeigen (Abbildung 11).



## Schlussbericht VitiSmart



**Abb. 11:** Ergebnis Auswertung RGB-Bilder, als prozentualer Anteil brauner Läsionen an der gesamten Beerenoberfläche und Standardabweichung. A: Vergleich Kontrollen = nicht-behandelt (Raumtemperatur), und Hitzestress behandelte Varianten. B: Vergleich der vier Sorten zu allen Zeitpunkten; Zeitpunkte:  $t_0$  = vor Behandlung,  $t_1$  = nach 2 Std,  $t_2$  = nach 4 Std,  $t_3$  = nach 6 Std,  $t_4$  = nach 8 Std. Anteil brauner Läsionen an der Beerenoberfläche und Standardabweichung. C: Vergleich der adjustierten Mittelwerte der Anteile an Läsionen an der Beerenoberfläche aller vier Sorten und Konfidenzintervall (95%), alle Sorten mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Auf Basis der Untersuchungen wurden Unterschiede in der Ausprägung von Hitzestress-Symptomen in Abhängigkeit der Rebsorte deutlich. Bacchus und Monastrell zeigen sehr früh großflächige Läsionen, während Cabernet Sauvignon und Chardonnay an den ersten Messzeitpunkten kleinflächigere Läsionen zeigen und auch nach acht Stunden Beeren mit geringer oder keiner Symptom-Ausprägung zu beobachten sind. Die Übertragbarkeit des standardisierten Labortests auf die Sonnenbrandanfälligkeit im Freiland konnte unter den besonderen klimatischen Bedingungen 2019 geprüft werden.

**Tab 6:** Sonnenbrandbonitur auf den Flächen des Geilweilerhofs 2019. Bonitur an 20 Trauben pro Sorte. Klasse 9 = keine verbräunten Beeren, d.h. unanfällig; Klasse 7 = 5 – 20 % der Beeren sind verbräunt und/oder zeigen Deformierungen, d.h. geringe Anfälligkeit; Klasse 5 = 21 – 50 % der Beeren verbräunt/ deformiert, d.h. mittlere Anfälligkeit; Klasse 3 = 51 – 75 % der Beeren sind verbräunt und/oder deformiert, d.h. starke Anfälligkeit; Klasse 1 = >76 %, d.h. sehr starke Anfälligkeit, z.T. ganze Trauben betroffen.

Rebsorte	Sonnenbrand
Bacchus	5
Cabernet Sauvignon	5
Chardonnay	3
Monastrell	9
Calardis Blanc	5
Calardis Musque	9
Cabernet Blanc	1
Dakapo	3
Riesling	5
Sauvignon Blanc	1
Norton	3
Seibel 7511	3

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das RGB-Tool für die Auswertung von Hitzestress-Versuchen an Einzelbeeren in der Züchtung eingesetzt werden kann und damit auch verschiedene Rebsorten evaluiert werden können. Parallel zur RGB Bildauswertung wurde ein Modell zur Bewertung der Hitzestressanfälligkeit anhand von Hyperspektralbildern getestet. In der zweiten

## Schlussbericht VitiSmart

Projekthälfte wurden analog zu den RGB-Bildaufnahmen fünf Bilddatensätze mit dem Hyperspektralkamerasystem aufgenommen. Davon wurden drei als Trainingsdatensätze eingesetzt und zwei als Testdatensätze. Zur Evaluierung des Tools wurden weitere drei Datensätze aufgenommen und ausgewertet.

Zunächst wurde ein Modell erstellt, das die Sortenunterschiede auf Einzelbeerenebene erfasst (Sorte). Die Klassifikationsgenauigkeiten Wellenlängenbereiche (VNIR und SWIR) mit bis zu 97% sehr hoch einzustufen (Tabelle 7) und konnte zur Erkennung der vier Rebsorten eingesetzt werden. Nach der Sortenerkennung wurde ein weiteres Modell getestet, um die Hitzestressanfälligkeit vorherzusagen (Tabelle 7).

**Tab. 7:** Klassifikationsgenauigkeit der beiden Modelle Sorte = Zuordnung der Beeren zur Rebsorte und Referenz = Klassifizierung der Hitzestressanfälligkeit.

Referenz- datensatz	VNIR (400 - 1.000 nm)		SWIR (1.000 - 2.500 nm)	
	Trainings- daten	Testdaten	Trainings- daten	Testdaten
Sorte	85%	97%	77%	96%
Referenz	65%	93%	47%	69%

Die Klassifikation aufgrund der VNIR-Daten ist mit einer Genauigkeit von 93 % als sehr hoch einzustufen. Die Klassifikationsgenauigkeit konnte durch die SWIR-Daten nicht verbessert werden, weshalb für die Evaluierung der Hitzestressanfälligkeit der Einsatz der VNIR-Hyperspektral ausreichend ist.

### **3. Darstellung und Erläuterung der Angemessenheit von Aufwand und Zeit („Wirtschaftlichkeit“)**

Der fortschreitende Klimawandel (Niederschläge, Trockenheit) wird Pflanzenkrankheiten beeinflussen, da die Anpassungsfähigkeit von Pathogenen größer ist als die ihrer Wirtspflanzen. Somit werden Resistenzen überwunden werden. Abiotische Faktoren, wie Temperatur, beeinflussen die Anfälligkeit der Wirtspflanzen für Krankheitserreger, sowie ihre Aggressivität zusätzlich. Die Wechselwirkung zwischen pflanzlicher Resistenz und abiotischer Stresstoleranz dürfte die Auswirkungen des Klimawandels mit den weitreichendsten Folgen für die pflanzliche Produktion repräsentieren. Im Projekt VitiSmart wurden diese Zusammenhänge im Rahmen eines interdisziplinären Teams bearbeitet. Eine staatliche Förderung dieser Forschung ist unbedingt notwendig.

Die in diesem Projektteil definierten und erzielten Ergebnisse stellen in ihrer Gesamtheit eine wichtige methodische Entwicklung auf dem Gebiet der Hyperspektralanalyse dar. Die Arbeiten dienen der Entwicklung methodischer Ansätze zur Detektion von biotischen und abiotischem Stress im Rahmen der Rebenforschung und Rebenzüchtung, um diese Evaluierungsmethoden innovativer und nicht

invasiv zu gestalten. Es lieferte wichtige Methoden und Prototyp-Pipelines zur sensor-gestützten Detektion von verschiedenen abiotischen und biotischen Merkmalen im Labormaßstab und legte damit auch die Basis für eine Übertragung der Methoden in eine Freilandanwendung.

Erste aus diesem Projekt hervorgehende Erkenntnisse in Form von Datenaufnahme und – auswertung werden schon in weiterführenden Projekten und neuen Fragestellungen genutzt.

Mit Blick auf das sehr breit gefächerte Aufgabenspektrum und die erreichten Ergebnisse ist das Vorhaben als erfolgreich einzustufen.

#### **4. Aufführen von Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.**

Alle in der Vorhabensbeschreibung formulierten Aufgaben wurden bearbeitet und Ergebnisse erzielt. Witterungsbedingt waren einige Datensätze aus dem Freiland nicht für genetische Studien (QTL-Analysen) verwertbar, da diese Daten nicht normalverteilt waren. Diesen Befund erbrachte ebenfalls die Kartierungspopulation CM x VB für das Merkmal Beerenbereifung. In diesem Fall ist die zu geringe genetische Diversität ursächlich, wie die Ergebnisse in Abb. 8 zeigen. Die Pilotstudie zur Erfassung des Merkmals Beerenbereifung mittels Hyperspektralsensor in Verbindung mit Wachsanalysen zeigt einen, im Vergleich zur subjektiven OIV-Bonitur, aussichtsreichen neuen methodischen Ansatz.

#### **5. Darstellung und Erläuterung der wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.**

Sorten mit neuen oder verbesserten Resistenzeigenschaften dienen der Erhöhung der Produktionssicherheit und werden eine verringerte Aufwendung an Pflanzenschutzmitteln zur Folge haben. Mit Hilfe der Hyperspektralanalytik wurde im Projekt ein zerstörungsfreies Analyseverfahren herangezogen, das unter Umständen auch eine Merkmalerkennung vor der Symptomausprägung ermöglicht. Die Methode ist sowohl im Labormaßstab, als auch in Freiland über den gesamten Bestand, bis hin zu Einzelpflanzen oder Blattscheiben einsetzbar. Die im Projekt etablierte Pipeline und die erarbeiteten Tools bilden die Grundlage für Entscheidungshilfen, die im Hinblick auf biotischen und abiotischen Stress weiterentwickelt werden können. Erste QTL-Analysen haben gezeigt, dass es für einzelne Merkmale möglich ist, relevante Bereiche im Genom zu finden, die durch weitere Datensätze bestätigt werden müssen (witterungsbedingt nicht im Projekt möglich). Andererseits war die Merkmalsvarianz für die Beerenhauteigenschaft Beerenbereifung in dieser Kartierungspopulation zu gering, um reproduzierbare QTLs zu detektieren und Marker für die Züchtung zu entwickeln. Dieses wichtige Merkmal für die Botrytis-Widerstandsfähigkeit kann mittels Hyperspektralanalyse wesentlich objektiver erfasst werden. Für Anschlussprojekte müssen zudem neue Kartierungspopulationen erstellt werden, die eine entsprechende Varianz aufweisen. Das Vorhaben hat wesentliche Erkenntnisse für die

Phänotypisierung von biotischen und abiotischen Merkmalen der Weinrebe geliefert. In künftigen Projekten sollten einzelne Merkmale herausgegriffen und vertieft analysiert werden. Besonders aussichtsreich ist eine Fortentwicklung des Schnelltest für Hitzestress, was im Kontext zum Klimawandel von hoher Relevanz ist. Auch die Analyse der Botrytismerkmale über Sensoren versprechen genauer Daten und einen verbesserten Zugang zur Genetik sowie Anwendungen im Präzisionsweinbau.

**6. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabensziels ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich evtl. Mitnahmeeffekte)?**

Der Einsatz der Bundesmittel war für die Erreichung des geplanten Vorhabensziel ursächlich. Es wurde ein neues Sensorsystem im Rahmen des Projektes etabliert, erste Auswerte-Pipelines entwickelt, validiert und etabliert und somit ein Grundstein für weitere Arbeiten gelegt. Ohne die Förderung wäre der Einstieg in die sensorbasierte Hyperspektralanalytik nicht möglich gewesen.

**7. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer und Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses**

In der nachfolgenden Veröffentlichung sind die Ergebnisse oder Teile davon publiziert:

- (1) Barré, P., Herzog, K., Höfle, R., Hullin, B. M., Töpfer, R., Steinhage, V. (2019) Automated Phenotyping of Epicuticular Waxes of Grapevine Berries Using Light Separation and Convolutional Neural Networks. COMPUTERS AND ELECTRONICS IN AGRICULTURE, Volume 156, January 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.11.012>
- (2) Maia, M., Höfle, R., Cavaco, A.R., Ferreira, A., Cordeiro, C., Töpfer, R., Kicherer, A., Figueiredo, A., Silva, M.S. (2018) Combining metabolomics and phenotyping to discover biomarkers of resistance to downy mildew. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, Volume 120, May 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.433>

Die Ergebnisse wurden auf folgenden nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt:

- (1) Höfle, R., Herzog, K., Kicherer, A., Töpfer, R. 2017 Grapevine berry wax: One trait supporting resilience to Botrytis cinerea In: 10th Young Scientists Meeting, Siebeldingen, Germany 8th – 10th November 2017, JKI Open Conference System, Young Scientists Meeting 2017
- (2) Höfle, R., Kicherer, A., Herzog, K., Töpfer, R. 2018 Detection of biotic and abiotic stress in grapevine, using different image techniques, VITISMART Workshop, Limassol, Cyprus 3th May 2018
- (3) Höfle, R., Kicherer, A., Töpfer, R. Resistance to Plasmopara viticola – Hyperspectral Investigations In: XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Bordeaux, France, 15-20 July 2018. Bordeaux: Université de Bordeaux, 160

- (4) Höfle, R., Kicherer, A., Töpfer, R. Non-destructive phenotyping methods for abiotic and biotic stress in grapevine breeding In: 9th Young Scientists Meeting, Quedlinburg, Germany 9th – 11th November 2016, JKI Open Conference System, Young Scientists Meeting 2016
- (5) Maia, M., Höfle, R., Cavaco, A.R., Maccelli, A., Laureano, G., Figueiredo, J., Ferreira, A., Crestoni, M.E., Cordeiro, C., Töpfer, R., Kicherer, A., Figueiredo, A., Silva, M.S. Grapevine resistance to *Plasmopara viticola*: the search for metabolic biomarkers In: XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Bordeaux, France, 15-20 July 2018. Bordeaux: Université de Bordeaux, 172
- (6) Töpfer, R., Herzog, K., Höfle, R. Development of a sensor-based approach for objective characterization grapevine cuticles In: XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Bordeaux, France, 15-20 July 2018. Bordeaux: Université de Bordeaux, 87

Im Rahmen des Vorhabens wurden Methoden bzw. Ergebnisse im Rahmen von zwei Workshops präsentiert:

- (1) VITISMART-Workshop, 3th May 2018, Limassol: "Detection of biotic and abiotic stress in grapevine, using different Image techniques (RGB, Light Separation, Hyperspectral Imaging)"
- (2) Student Workshop: "Phenotyping in grapevine breeding – State of the Art and Outlook", 23th May 2018, Siebeldingen

Folgende Veröffentlichung sind geplant:

- Höfle, R., Kicherer, A., Herzog, K., Backhaus, A., Seiffert, U., Töpfer, R., Titel: Hyperspectral Imaging Tool for the Detection of Grapevine Downy Mildew in leaf disc Assays
- Herzog, K; Barré, P.; Kassemeyer, H.; Höfle, R.; Steinhage, V.; Töpfer, R. (2020) Multi-sensor phenotyping reveals new insights into the grapevine berry surface and its structural differences in epicuticular waxes.
- Höfle, R., Kicherer, A., Herzog, K., Backhaus, A., Seiffert, U., Töpfer, R., Titel: Fast and objective detection of abiotic stress of grapevine berries by digital and hyperspectral imaging

**Literaturverzeichnis**

- Barré, P., Herzog, K., Höfle, R., Hullin, M. B., Töpfer, R., & Steinhage, V. (2019). Automated phenotyping of epicuticular waxes of grapevine berries using light separation and convolutional neural networks. *Computers and Electronics in Agriculture*, 156, 263-274. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.11.012>
- Kicherer, A., Herzog, K., Bendel, N., Klück, H.-C., Backhaus, A., Wieland, M., . . . Töpfer, R. (2017). Phenoliner: A New Field Phenotyping Platform for Grapevine Research. *Sensors*, 17(7). doi:10.3390/s17071625
- Letaief, H., Rolle, L., & Gerbi, V. (2008). Mechanical Behavior of Winegrapes under Compression Tests. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(3), 323. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/59/3/323.abstract>
- Maury, C., Madieta, E., Le Moigne, M., Mehinagic, E., Siret, R., & Jourjon, F. (2009). DEVELOPMENT OF A MECHANICAL TEXTURE TEST TO EVALUATE THE RIPENING PROCESS OF CABERNET FRANC GRAPES. *Journal of Texture Studies*, 40(5), 511-535. doi:10.1111/j.1745-4603.2009.00195.x
- Rolle, L., Siret, R., Segade, S. R., Maury, C., Gerbi, V., & Jourjon, F. (2012). Instrumental Texture Analysis Parameters as Markers of Table-Grape and Winegrape Quality: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 11. doi:10.5344/ajev.2011.11059

## Anhang

**Tab. A1:** Rebsorten und Zuchtstämme, welche hinsichtlich PM-Resistenz mittels Hyperspektralanalyse untersucht wurden. Die analysierten Genotypen sind in Tab. 4 aufgeführt, die grau unterlegten Genotypen wurden in beiden Jahren evaluiert. Run = resistance to *Uncinula necator*, Ren = resistance to *Erysiphe necator*; (+/+) = homozygot, Resistenzlocus auf beiden Allelen vorhanden; dpi = days post inoculation

Genotyp /Rebsorte	Resistenzlocus/Resistenzloci	Anzahl Replikate	Durchschnittliche OIV 455.1 Boniturnote (7 dpi)
Spätburgunder (PN)	keine Resistenz	27	3
Chardonnay	keine Resistenz	27	3
Müller-Thurgau (MTH)	keine Resistenz	45	1
Riesling	keine Resistenz	27	3
2000-305-0042	Run1	27	7
2011-064-0002	Run1	27	9
Kishmish Vatkana	Ren1	27	9
Nagrada	Ren1	27	9
Calardis Blanc	Kombinierte Zweifachresistenz Ren3 + Ren9	45	9
2004-060-0001	Kombinierte Zweifachresistenz Ren3 (+/+) + Ren9	27	9
2015-050-0042	Ren3 + Ren9	27	9
2012-180-0002	Ren4	45	9
2012-180-0008	Ren4	27	9
Couderc 12	Ren9	27	7
Regent	Ren3 + Ren9	45	7
Calardis Musqué	Ren3 + Ren9	27	7
2011-007-0084	Run1 + Ren3	45	9
2004-043-0004	Run1 + Ren3	27	9
2009-036-0019	Run1 + Ren1 + Ren3	27	9
2010-007-0002	Run1 + Ren1 + Ren3	45	9

**Tab.A2:** Pflanzenmaterial zur Hyperspektralanalyse – Infektionsversuche mit DM. Grau unterlegte Genotypen wurden Hyperspektral- und Referenzdaten in 2017 & 2018 erhoben.

Genotyp /Rebsorte	Resistenzlocus/Resistenzloci	Durchschnittliche Boniturnote OIV 452-1 (nach 7 Tagen)
Spätburgunder (PN)	Keine Resistenz	3
Chardonnay	Keine Resistenz	3
Müller-Thurgau (MTH)	Keine Resistenz	1
Riesling	Keine Resistenz	3
Bacchus	Keine Resistenz	1
2000-305-0042	Rpv1	7
2011-064-0002	Rpv1	7
Bianca	Rpv3-1	5
Regent	Rpv3-1	7
Chambourcin	Rpv3-1	9
Calardis Musqué (GF.GA-47-42)	Rpv3-2	7

## Schlussbericht VitiSmart

Seibel 1017	Rpv3-2	9
Merzling	Rpv3-3	7
Sibera	Rpv3-3	7
Seyval	Rpv3-3	9
Solaris	Rpv10	9
Monarch	Rpv10	9
Lela	Rpv12	7
Petra	Rpv12	7
2011-007-0133	Rpv1 + Rpv12	9
2014-099-0027	Rpv3-1 + Rpv12	9
2014-099-0064	Rpv3-1 + Rpv12	9
Calardis Blanc	Rpv3-1 + Rpv3-2	9
2004-051-0001	Rpv3-1 + Rpv10	7
2004-060-0001	Rpv3-1 + Rpv10	7
2015-050-0042	Rpv3-1 + Rpv12	7
2015-050-0054	Rpv3-1 + Rpv12	9
2012-114-0133	Rpv1 + Rpv3-1 + Rpv12	9
2011-007-0084	Rpv1 + Rpv3-1 + Rpv12	7
Couderc 12	N.N.	7
Marechal Foch	N.N.	7
Rimon	N.N.	9
2015-515-0010	N.N. ( <i>Vitis labrusca</i> )	9
Seyve Villard 39-639	N.N.	7