

**Zuwendungsempfänger/ausführende Stelle:**

Staatliches Weinbauinstitut, Abteilung Biologie  
Merzhauser Str. 119, 79100 Freiburg

Projektleitung: Dr. Michael Fischer\*

Koordination: Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer

Mitarbeit 1.11.2009 – 30.6.2010: Raphael Streit, Dr. Franziska Peters

**Abschlußbericht**

**Forschungsvorhaben 06HS022**

**„Untersuchungen zu den Übertragungswegen der Esca-Erkrankung  
im Weinbau und Erarbeitung von Verfahren zur Erzeugung gesunden  
Rebenpflanzguts“**

Laufzeit: 1.6.2007 - 30.6.2010

Berichtszeitraum: 1.6.2007 - 30.6.2010

Zusammenarbeit mit anderen Stellen: liegt nicht vor

\* aktuell: Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau,  
Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen; e-mail: [michael.fischer@jki.bund.de](mailto:michael.fischer@jki.bund.de)

## **Einführende Hinweise zum Ablauf des Forschungsvorhabens**

Auf den Seiten 2-4 summarisch dargestellt sind die im Forschungsvorhaben 2007 formulierten Ziele und Aufgabenstellungen. Der für das Projekt ursprünglich genehmigte Zeitraum umfasste den 1.6.2007 bis zum 31.5.2009. Für diesen Zeitraum liegen zwei Zwischenberichte vor, zum 31.1.2008 und zum 31.10.2008. Die jeweiligen Zusammenfassungen dieser Zwischenberichte sind nachfolgend auf den Seiten 5-7 aufgeführt.

Bedingt durch saisonal bedingte Abläufe in den Betrieben und/oder durch neu aufgekommene Fragestellungen wurde sehr rasch eine Verlängerung des Forschungsvorhabens ins Auge gefasst und auch genehmigt: der entsprechende Zeitraum umfasste den 1.6.2009 bis zum 30.6.2010. Für diesen Zeitraum wurden bestehende Arbeitsziele umformuliert oder überhaupt neu definiert. Beginnend auf Seite 8, umfasst der vorliegende Bericht sehr hauptsächlich diesen Verlängerungszeitraum sowie den vom ursprünglichen Forschungsvorhaben verbliebenen Zeitraum 1.11.2008 bis 31.5.2009.

Ein bei der Verlängerung des Forschungsvorhabens nicht absehbares „Problem“ ergab sich dadurch, dass der Projektleiter Esca zum 1.11.2009 das Weinbauinstitut verlassen hat. Eine Bearbeitung des Verlängerungsvorhabens durch den „Projektleiter Esca“ ist demnach nur für den Zeitraum 1.6.2009 bis zum 31.10.2009 gegeben. Der Bereich „Diagnose“ wurde aber auch nachfolgend von Seiten des WBI bearbeitet; der entsprechende Berichtsabschnitt wurde von dort aus formuliert und ist hier eingefügt.

Im Antrag zum Forschungsvorhaben 2007 waren die Ziele und Planungen wie folgt formuliert worden:

### **1. Ziele und Aufgabenstellung**

#### **Erstes Teilziel: Abschätzung des Gefährdungspotentials**

Ob und in welchem Umfang sind Mutterpflanzen für die Erzeugung von Rebenpflanzgut und die davon gewonnenen Edelreiser bzw. Unterlagen latent mit holzerstörenden Pilzen infiziert?

Über welche Wege (welche Schritte des Verarbeitungsprozesses?) gelangen holzerstörende Pilze in Vermehrungsmaterial?

In welchem Ausmaß werden die besagten Pilze durch Jungpflanzen verbreitet?

#### **Zweites Teilziel: Phytosanitäre Maßnahmen**

Es sollen zuverlässige Verfahren zur Kontrolle von Edelreisern und Unterlagen entwickelt werden. Außerdem sollen physikalische, chemische und biologische Verfahren zur Behandlung von Pfropfreben geprüft werden. Dabei soll für die Applikation von Fungiziden ein geschlossenes System (Tauchbehandlung) erprobt werden.

### **Drittes Teilziel: Durchführung von phytosanitären Maßnahmen**

Jedem Schritt der Vermehrung von Rebenpflanzgut sollen Maßnahmen zugeordnet werden, die eine weitere Ausbreitung holzerstörender Pilze unterbinden. Über dieses Schema wäre die Ausbreitung der Pathogene über das Rebenpflanzgut von Anfang an zu verhindern.

#### **1.1. Planung und Ablauf**

In fünf Arbeitspaketen sollen Fragestellungen zur Biologie, Epidemiologie und Diagnose der Esca-Krankheit bearbeitet und auf der Basis der wissenschaftlichen Resultate Verfahren zur Erzeugung gesunden Pflanzgutes erarbeitet werden:

Bewertung der Bedeutung der Esca-Krankheit für die Zertifizierung von Rebenpflanzgut und den internationalen Pflanzgutverkehr (Arbeitspaket 1).

Untersuchung der latenten Infektion von Vermehrungsmaterial einschließlich der Mutterrebenbestände (Arbeitspaket 1).

Erarbeitung von Methoden zur Routinediagnose der Esca in Vermehrungsmaterial (Arbeitspaket 2).

Untersuchung der Möglichkeiten einer Kontamination von Rebenpflanzgut mit Esca-Erregern (Arbeitspaket 3).

Identifizierung der Infektionsquellen und Infektionswege während der Erzeugung von Rebenpflanzgut (Arbeitspaket 4).

Erarbeitung geeigneter Maßnahmen zur Vermeidung von Infektionen von Rebenpflanzgut mit Esca-Erregern (Arbeitspaket 5).

#### **1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn**

Esca ist eine Krankheit der Weinrebe, die weltweit in den Weinbaugebieten vorkommt und zu wirtschaftlichen Schäden führt. Die Symptome der Esca-Krankheit sind in allen Weinbaugebieten gleich; sie äußern sich in Blattverfärbungen, Nekrosen an Blättern und Trauben sowie vorzeitigem Absterben der Rebstöcke. Esca verläuft an älteren Rebstöcken meist chronisch über mehrere Jahre hinweg; gelegentlich (und zunehmend!) kommt auch die akute Form vor, bei der Pflanzen innerhalb weniger Wochen absterben. In Junganlagen verläuft Esca in der Regel akut und die betroffenen Pflanzen sterben innerhalb einer Vegetationsperiode ab. Diese Form der Esca wird im internationalen Sprachgebrauch als „Petri Disease“ oder „Young Vine Decline“ bezeichnet. Zu den Verursachern gehören die mitosporischen Pilze *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* sowie evtl. der Ascomycet *Botryosphaeria obtusa*. In älteren Weinreben, etwa ab dem 4. Standjahr, treten zu den geschilderten Verfärbungen im Holz Weißfäule und die charakteristischen Blatt- und Traubensymptome der Esca-Krankheit hinzu. Die Weißfäule wird in Europa durch den Basidiomyceten *Fomitiporia mediterranea* (Mittelmeer-Feuerschwamm) verursacht, während

in Übersee (Australien, Südafrika, Nordamerika) andere *Fomitiporia*-Arten oder dazu verwandte Pilze die Ursache der Weißfäule sind. Untersuchungen von Arbeitsgruppen aus Italien und Frankreich sowie des Staatlichen Weinbauinstituts zeigen, dass die Weißfäule in der Regel mit Infektionen durch die genannten mitosporischen Pilze verbunden ist. Dies lässt den Schluss zu, daß die mitosporischen Pilze Infektionen durch *Fomitiporia* fördern. Aus den gleichen Arbeitsgruppen liegen Hinweise vor, dass die Esca-Erreger durch Wunden in das Holz der Weinrebe eindringen.

Esca ist seit langem bekannt, ihr Vorkommen hat sich aber bis vor ca. 25 Jahren weitgehend auf den mediterranen Raum beschränkt; Hinweise aus dritten Ländern liegen nur sehr vereinzelt vor. Seit ca. 20 Jahren breitet sich die Esca und damit verbunden auch „Petri Disease“ weltweit aus. Vor allem „Petri Disease“ ist international ein großes Problem geworden, da sie prinzipiell sehr junge Weinreben und möglicherweise auch Pflanzmaterial befallen kann. Innerhalb von Europa ist die Situation verschärft, da Esca bzw. „Petri Disease“ vor allem in Italien und Südfrankreich weit verbreitet ist und sich immer noch in der Ausbreitung befindet. Die Erreger sind womöglich aus südlichen Anbaugebieten Europas nach Deutschland eingewandert bzw. eingeschleppt.

Im Jahr 1985 wurde das erste Vorkommen der Esca in Deutschland vom Staatlichen Weinbauinstitut in den südwestdeutschen Weinbaugebieten entdeckt. Seither befindet sich die Krankheit in der Ausbreitung und hat inzwischen das gesamte deutsche Weinbaugebiet erfasst. Nach Beobachtungen vor Ort sind inzwischen vermehrt Junganlagen von z.T. rasch verlaufenden Absterbeerscheinungen mit den typischen Symptomen der Esca bzw. „Petri Disease“ betroffen. Weinreben, die von der „Petri Disease“ betroffen sind, zeigen in Längsschnitten ihres Holzes dunkle Verfärbungen, aus denen, abgesehen von dem Erreger der Weißfäule, das charakteristische Spektrum der Esca-Erreger isoliert werden kann. Begleitet werden die genannten Phänomene oft von einer sogenannten Gummosis, d.h. dem Austreten einer dunkel verfärbten, gummiartigen Masse aus den betroffenen Bereichen. Eine gezielte *in-vitro*-Infektion gesunden Pflanzgutes mit den jeweiligen Pilzen, d.h. *Phaeoconiella* und/oder *Phaeoacremonium*, führt nach mehrmonatiger Inkubationszeit oft zur beschriebenen Braun- oder Schwarzverfärbung im Xylem des Holzes. Die Vermutung liegt nahe, dass Jungpflanzen bereits bei ihrer Ankunft am Pflanzort spezifisch von holzbewohnenden Pilzen befallen sein können, die sich während des jeweiligen Vermehrungsvorganges in der Pflanze etabliert haben. In Deutschland ist in erster Linie *Phaeoconiella chlamydospora* zu finden, während *Phaeoacremonium aleophilum* und *Botryosphaeria obtusa* weit seltener auftreten. Wenn in älteren Weinreben, etwa ab dem 4. Standjahr, Infektionen durch *Fomitiporia mediterranea* hinzu kommen, treten zunehmend die charakteristischen Blatt- und/oder Traubensymptome und Weißfäule auf.

## 2. Material und Methoden

Die diesbezüglichen Ausführungen beschränken sich auf den Zeitraum vom 2. Zwischenbericht bis zum Abschluss des Projekts; d.h. für die unten genannten Arbeitspakete 1, 3, 4 und 5 ist der Zeitraum vom 1.11.2008 bis zum 31.10.2009 abgedeckt, für das Arbeitspaket 2 gilt dies für den Zeitraum 1.11.2008 bis zum 31.6.2010. Die Details zu „Material und Methoden“ sind weiter unten (ab Seite 8) unter 3.1., „Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse“, bei der Beschreibung der jeweiligen Arbeitspakete eingefügt.

## 3. Ergebnisse

Der Zeitraum 1.6.2007 bis zum 31.10.2008 wird hier durch die Zusammenfassungen der jeweiligen Zwischenberichte abgedeckt.

Erster Zwischenbericht – Zusammenfassung: Zeitraum 1.6.2007 – 31.1.2008

*„Die bisherigen Untersuchungen zeigen klar, dass der Bereich Pflanzmaterial innerhalb des Komplexes Esca-Krankheit eine wichtige Rolle einnimmt. Ohne dass eine Ursache dafür benannt werden könnte, ist in der Pfropfrebe vor allem der Unterlagen-Bereich von einer Infizierung und Etablierung der Erreger betroffen. Dabei spielt die Sorte der Unterlage offensichtlich keine entscheidende Rolle. Die bisherigen Daten erlauben keine Rückschlüsse auf die mögliche Bedeutung der geographischen Herkunft des Materials.*

*Frisch von den Muttergärten angeliefertes Pflanzmaterial, sowohl Unterlagen als auch Edelreiser, sind unabhängig von Sorte und Herkunft sehr weitgehend frei von sichtbarem Befall. Im Rahmen des Veredlungsprozesses kann es demnach innerhalb einiger Monate zu einer deutlichen Etablierung der Erreger kommen.*

*Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Untersuchungen ergeben sich Hinweise auf mögliche Ursachen des Problems Esca in Pflanzmaterial und Junganlagen: Unterlagen-Muttergärten zeigen (fast) keine äußerlich sichtbaren Symptome der Krankheit; eine Bonitur auf Esca-Erreger ist demnach vom Betreiber kaum zu leisten. Gleichzeitig deuten die Untersuchungen im Holz („Zapfen“) einen deutlichen Befall im inneren Bereich der Pflanze an, der wahrscheinlich korreliert ist mit dem Alter der Muttergärten. Auch alte Muttergärten, trotz vereinzelten Ausfalls von Stöcken, sind aber im wesentlichen ohne äußere Symptome und werden entsprechend weiterhin in den Produktionsprozeß mit einbezogen. Die während des Veredlungsprozesses beprobten Werkzeuge waren frei von nachweisbarem Befall, für die Wasserbäder gilt dies mit einer einzigen Ausnahme. Durch im Tauchwasser vorhandene Konidien könnte theoretisch bislang auch intaktes Pflanzmaterial besiedelt und infiziert werden. Dieser Gesichtspunkt wird weiter zu beachten sein.*

*Das festgestellte Erreger-Spektrum umfasst die mitosporischen und endophytischen Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*. Eine entscheidende Rol-*

le konnte für *Botryosphaeria obtusa* nicht nachgewiesen werden; die Art fand sich nur in Einzelfällen und führte nach künstlicher Infektion an Gewächshauspflanzen nicht zur typischen *Esca*-assoziierten Symptomatik. Eine Rolle als Begleitpilz wird aber nicht gänzlich ausgeschlossen. Eine wichtige Rolle in älteren Reben spielt jedenfalls der Ascomyceten *Eutypa lata*.

Die Routine-Diagnose vor allem großer Probenmengen wird mit einer verfeinerten visuellen Bonitur geleistet; Fragen nach dem potentiellen („unsichtbaren“) Vorkommen der Erreger bleiben damit aber teilweise offen. PCR-gestützte Maßnahmen mit spezifischen Primern erlauben prinzipiell einen derartigen Nachweis, sind aber bislang nicht ausreichend reproduzierbar.

Behandlungsmaßnahmen von Pflanzmaterial erbrachten keine eindeutigen Hinweise auf deren Nutzen. Heißwasserbehandlungen unter den üblichen Bedingungen scheinen gegenüber den Erregern nur beschränkt wirksam; erhöhte Temperaturen zeigen nachteilige Folgen gegenüber dem verwendeten Pflanzmaterial.“

Zweiter Zwischenbericht – Zusammenfassung: Zeitraum 1.2.2008 – 31.10.2008

„Die Befunde auch des zweiten Berichtszeitraumes unterstreichen die Bedeutung des Bereiches Pflanzmaterial für die *Esca*-Krankheit. Der Infektionsdruck geht dabei offensichtlich vom Bereich Unterlage aus; sichtbar ist dies sowohl im Vermehrungsmaterial als auch in den Pfropfreben. Für den Untersuchungsbereich - Deutschland, Frankreich und Italien - ist fast ausschließlich *Pch* als *Esca*-assoziiertes Pathogen in Pflanzmaterial auszumachen; nur aus zwei Partien ergab sich der Nachweis von *Pal*. Dabei spielt die geographische Herkunft des Materials ebenso wie die Sorte keine sichtbare Rolle. Unabhängig von der einbezogenen Sorte - hier untersucht Spätburgunder, Müller-Thurgau und Riesling - sind Edelreiser nahezu frei von sichtbarem Befall.

In Muttergärten sowohl für Unterlagen als auch für Edelreiser zeigen sich ältere, mit früheren Schnittmaßnahmen in Zusammenhang stehende Holzbereiche gleichermaßen infiziert (jeweils etwa 10%); eine nach außen sichtbare Symptomatik findet man aber nur in Edelreis-Anlagen (< 2%). Auch bei wiederholtem Ansatz hat sich nun bestätigt, dass frisch von den Muttergärten angeliefertes Pflanzmaterial, sowohl Unterlagen als auch Edelreiser, im Holz nur sehr geringen Befall aufweist (etwa 1% bzw. 0.5% - eine Ausnahme bildet Material aus einem vergleichsweise sehr alten Muttergarten, mit etwa 2.5% sichtbarem Befall). Im Rahmen des Veredelungsprozesses verdoppelt sich dieser sehr geringe Infektionsgrad, bleibt aber insgesamt auf niedrigem Niveau (in 4-6-monatigen Pfropfreben aus der Rebschule etwa 2%). Daten über den Infektionsgrad nach der Ernte oder nach Lagerung (die Pflanzen sind dann etwa 10-12 Monate alt) liegen für den Berichtszeitraum noch nicht vor, zeigten aber für 2007 einen sehr beträchtlichen Anstieg auf etwa 20%, wiederum fast ausschließlich in den

Unterlagen. Die Ursachen dieses rapiden, noch zu verifizierenden, Anstiegs innerhalb weniger Monate sind nicht eindeutig bestimmbar.

Die molekulare Untersuchung der mit dem Veredelungsprozeß verbundenen Wasserbäder und Werkzeuge erbrachte den wiederholten Nachweis von Pch. Prä-infiziertes Vermehrungsmaterial könnte demnach als Ausgangspunkt für weitere Infektionen und die Ausbreitung der Erreger dienen. Unklar bleibt hier, inwieweit die Verbreitungseinheiten der Erreger im Rahmen der Verarbeitung aus dem Inneren des Holzes nach außen treten und/oder ob sie ohnehin bereits äußerlich an der Rinde sitzen. Wie oben bereits erwähnt, stellt Vermehrungsmaterial aus alten, stark vorbelasteten, Unterlagen-Muttergärten womöglich eine vergleichsweise erhöhte Infektionsquelle dar. Im Sinne einer Kontrolle scheint eine wie auch immer geartete Behandlung von Muttergärten jedenfalls sinnvoll.

Das mit den im Holz sichtbaren Symptomen assoziierte Erreger-Spektrum beschränkt sich sehr weitgehend auf den mitosporischen Pilz *Phaeomoniella chlamydospora*; *Phaeoacremonium aleophilum* kommt im Untersuchungsgebiet deutlich seltener vor. *Botryosphaeria obtusa* oder auch *Phomopsis viticola* fanden sich wieder nur in Einzelfällen. In/an unsachgemäß gelagertem Holz findet sich immer wieder auch *Botrytis cinerea*.

Die gegenüber dem ersten Berichtszeitraum vermehrten Nachweise der Erreger aus Wasserbädern und Verarbeitungsresten sind auch auf die Weiterentwicklung der molekular gestützten Diagnose zurückzuführen. Bedingt durch eine verfeinerte DNA-Extraktions-Methode und die Etablierung eines „nested PCR“-Systems konnten die Kenntnisse über das potentielle Vorkommen der Erreger erweitert werden. Eine 1:1 Übertragung der unter Laborbedingungen gewonnenen Befunde auf Freilandbedingungen ist aber nach wie vor nicht ohne weiteres möglich. Für die in der Praxis häufig notwendigen großmaßstäblichen Probendurchsätze wird weiterhin auf das visuelle Verfahren zurückzugreifen sein.

Im Sinne einer Kontrolle erbrachten die Behandlungsmaßnahmen von Pflanzmaterial gewisse Fortschritte; eine Behandlung unter 52 °C, 30 min. - Bedingungen zeigte demnach vergleichsweise verbesserte Wirksamkeit gegenüber den Erregern in Reinkultur, ohne dabei zu stark auf Vermehrungsmaterial wie Unterlagen oder Edelreiser zu wirken. Offen bleiben hier Fragen nach der Wirksamkeit des Verfahrens gegenüber den Erregern in situ sowie gegenüber Pfropfreben - bedingt durch den Pfropfvorgang und die damit verbundenen Phänomene ließe sich hier an eine erhöhte Empfindlichkeit denken. Ebenfalls problematisch bleibt letztendlich die Erfolgskontrolle: sie ließe sich wohl nur über längere Inkubationszeiten des behandelten Materials unter kontrollierten Bedingungen leisten. Eine Überprüfung auf molekularem Weg ist zwar prinzipiell möglich, das Verfahren unterscheidet aber nicht zwischen vitalem und nicht-vitalem Inokulum. Diese Frage ließe sich nur durch begleitende Kultivierungsversuche beantworten.“

Die folgenden, ausführlichen, Darstellungen beziehen sich auf den verbleibenden Zeitraum des Originalvorhabens (1.11.2008 – 31.5.2009) sowie den gesamten Verlängerungszeitraum (1.6.2009 – 30.6.2009). Für letzteren gilt die oben angeführte Einschränkung hinsichtlich der Verfügbarkeit des Projektleiters.

### **3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse**

Insgesamt waren fünf Arbeitspakete formuliert worden; ihre Bearbeitung stellt sich im Einzelnen wie folgt dar.

#### ***Arbeitspaket 1: Untersuchung von Schnittrückständen ( sog. „Zapfen“) in Unterlagenschnittgärten***

##### **Problemstellung**

In Unterlagenschnittgärten ist eine Esca-Bonitur beruhend auf äußerer Symptomatik offensichtlich nicht möglich (**Abb. 1**); eine eindeutige Blattsymptomatik war in den entsprechenden Begehungen nur in sehr seltenen Ausnahmefällen zu beobachten. Die Arbeiten zu diesem Gesichtspunkt (siehe hierzu auch den 2. Zwischenbericht) konnten aber zeigen, dass verholzte Schnittrückstände aus Vorjahren in unterschiedlichem Ausmaß die für das Holz typische Symptomatik aufweisen. Im Berichtszeitraum sollte dieser Befund anhand ausgewählter Unterlagenschnittgärten im In- und Ausland verifiziert und darauf beruhend ein mögliches Boniturverfahren entwickelt werden. Darüber hinausgehend war es ein Anliegen, weitere und nach Möglichkeit quantifizierende Einblicke in den grundsätzlich vorhandenen Befallsgrad Esca in Unterlagenschnittgärten zu gewinnen.



**Abb. 1.** 16-jähriger Mutterstock Unterlagen, Kriechkultur: die Blätter von im Holz symptomatischen Stöcken bleiben während der Vegetationsperiode fast durchwegs symptomfrei. Dieses Phänomen ist unabhängig von der Erziehungsform, d.h. Kriech- oder Tischkultur.

## Material und Methoden

Insgesamt wurden 5 Vermehrungsanlagen für Unterlagen beprobt. Die Muttergärten beinhalten die in deutschen Anbaugebieten gängigen Sorten 5BB, 125AA und SO4 (jeweils: *Vitis riparia* x *V. berlandieri*). Einbezogen waren sowohl in- auch ausländische Anlagen mit Kriech- oder Tischkultur.

Hinweis: auf Wunsch der Kooperationspartner werden die Anlagen im Folgenden nur in kodifizierter Form, allerdings unter Angabe von Sorte und Pflanzjahr, betrachtet. Nur für die inländischen Anlagen wurden die Proben selbst ausgewählt, für die ausländischen Anlagen wurden die Proben von den jeweiligen Betreibern zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung der Holzsymptome in den „Zapfen“ wurden für jede Anlage je 50 Proben, entsprechend altersmäßig nicht definierbaren Basalbereichen früher entnommener Triebe, entnommen. Diese „Zapfen“ finden sich durchwegs im Basalbereich der beprobten Stöcke. Pro Stock wurde jeweils ein „Zapfen“ einbezogen. Die Beurteilung auf vorhandene Symptomatik erfolgte jeweils visuell; die Einschätzung erfolgte dabei nur nach „vorhanden“ bzw. „nicht vorhanden“, eine Differenzierung nach Befallsschwere wurde nicht versucht.

## Ergebnisse

- Holzsymptome in „Zapfen“ (**Tab. 1**):

Der Anteil symptomatischer Holzproben war uneinheitlich und steht in möglicher Abhängigkeit vom Alter der jeweiligen Anlage/Mutterstöcke. Ältere Anlagen zeigten demnach eine vergleichsweise erhöhte Befallsrate; etwa 20% Befall wurde für etwa 20-jährige Anlagen beobachtet; im Vergleich dazu ergab sich ein etwa 5%iger Befall für die etwa 5-jährigen Anlagen. Insgesamt waren die Symptome im Vergleich zu den zugehörigen, allerdings nur stichprobenartig überprüften, Trieben deutlicher und gleichzeitig vermehrt ausgebildet. Eine noch unauffällige Symptomentwicklung für einen frisch angeschnittenen „Zapfen“ ist in **Abb. 2** dargestellt. Zumindest basierend auf der - allerdings begrenzten - Anzahl der Probeflächen scheint das Auftreten von Symptomen unabhängig von Unterlagensorte, Herkunftsland und auch Erziehungsform.

**Tab. 1.** Holzsymptome in „Zapfen“ entnommen von Mutterstöcken aus Unterlagsanlagen

Muttergarten	1989	1992	1995	2004	2005
Pflanzjahr					
Sorte	5BB	SO4	125AA	125AA	5BB
Symptome	11 <sup>1</sup> (22%)	10 (20%)	8 (16%)	2 (4%)	3 (6%)

<sup>1</sup> Anzahl symptomatischer „Zapfen“ (n = 50/Anlage)



**Abb. 2.** Mutterstock Unterlagen, Tischkultur: im Basalbereich eines physiologisch intakten Zapfens finden sich erste Anfänge einer Esca-typischen Symptomatik (der Pfeil zeigt auf einen dunkel verfärbten Gefäßbereich).

- Holzsymptome in Mutterstöcken von Unterlagen in Abhängigkeit vom Pflanzjahr (**Tab. 2**): Soweit verfügbar, waren über den Untersuchungszeitraum Mutterstöcke unterschiedlichen Alters sowie unterschiedlicher Sorten und geographischer Herkunft auf typische Symptomatik im Holz untersucht worden. Die nachfolgende **Tab. 2** berücksichtigt gleichermaßen Befunde aus den jeweiligen Stöcken und/oder Zapfen. Die Befunde beruhen sehr hauptsächlich auf visueller Bonitur, zur Einzelüberprüfung unklarer Befalls-Situationen wurden auch Re-Isolierungsmaßnahmen auf künstlichem Medium durchgeführt.

**Tab. 2.** Sichtbare Symptomatik im Holz von Mutterstöcken aus Unterlagsanlagen

<b>Pflanzjahr Anlage (Anzahl beprobter Anlagen)</b>	<b>Holz (Stock, Zapfen): % sichtbarer Befall</b>
<b>1980-1985 (n = 2)</b>	100% (= alle Proben befallen)
<b>1986-1990 (n = 4)</b>	66%
<b>1991-1995 (n = 9)</b>	38%
<b>1996-2000 (n = 12)</b>	34%
<b>jünger (n = 5)</b>	> 20%

Erfahrungen mit dem Verfahren der visuellen Bonitur ebenso wie Befunde aus anderen Bereichen, z.B. vollständig verfügbare Stöcke aus Ertragsanlagen, zeigen, dass die angegebene

nen Prozentwerte den tatsächlichen Sachverhalt wohl nur unvollständig widerspiegeln – der tatsächliche Befall dürfte durchwegs noch höher liegen. Prinzipiell und über die jeweiligen Anlagen uneinheitlich konnte ein beträchtlicher Anteil der Stöcke ja nur über die Zapfen bonitiert werden, ohne dass ein Einblick in den eigentlichen Holzkörper (wichtig vor allem der Stammkopfbereich) möglich war.

Grundsätzlich gilt, dass für alle untersuchten Anlagen der Anteil der Blattsymptomatik gegen Null war (dies gilt auch bereits für frühere Begehungen im Rahmen des Forschungsvorhabens). Des Weiteren besteht offensichtlich eine Korrelation zwischen Alter der beprobten Anlage und der Häufigkeit der Symptomatik – demnach sind ältere Stöcke häufiger befallen als junge. Unter Berücksichtigung der begrenzten Bonitur-Möglichkeiten ist davon auszugehen, dass wohl generell in Anlagen älter als 20-25 Jahre kein Stock mehr frei von innerer Symptomatik ist. Nach bisherigen Erfahrungen gilt dies gleichermaßen für Pfropfreben in Ertragsanlagen.

- Erregerspektrum in Mutterstöcken (**Abb. 3**):



**Abb. 3.** Mutterstock Unterlagen, Alter 9 Jahre: nach einigen Tage bei feuchter Lagerung wächst aus befallenen Bereichen der Esca-spezifische Erreger der Weißfäule, *Fomitiporia mediterranea*, aus. Aus dem gezeigten Stock ließen sich darüber hinaus *Phaeomoniella chlamydospora* (Pfeil oben) sowie *Eutypa lata* (Pfeil links) isolieren.

Die stichprobenartig erhobenen Befunde zum Erreger-Spektrum in Mutterstöcken weisen auf eine zu Ertragsanlagen identische Verteilung. In älteren Stöcken geradezu ubiquitär und auch räumlich dominant ist demnach der Erreger der Weißfäule, *Fomitiporia mediterranea*, der an älteren Stöcken sogar sporulierende Fruchtkörper ausbilden kann und auch aus weitgehend abgebauten Stöcken noch erfolgreich kultivierbar ist. Daneben finden sich sehr häufig der mitosporische Pilz *Phaeomoniella chlamydospora*, nur in seltenen Ausnahmen auch *Phaeoacremonium aleophilum*. Auch die für Esca typischen Begleitpilze wie *Eutypa lata* (eigentlich Verursacher eines eigenen Krankheitsbildes, der Eutypiose) sind in älteren Stöcken regelmäßig zu finden.

Bereits in jungen und äußerlich völlig unauffälligen Stöcken lassen sich die typischen Erreger sowie weitere holzbewohnende Pilze nachweisen (in **Abb. 3** gezeigt für einen 9-jährigen, äußerlich unauffälligen Mutterstock). Mutterstöcke für Unterlagen stellen demnach einen geeigneten Besiedlungsraum für diverse Pilze dar und werden wie auch andere Holzpflanzen im Lauf der Jahre in typischer Weise besiedelt. Die Verteilung der Symptomatik im Holz ist meist eindeutig: demnach dienen die im Lauf der Bearbeitung zwangsläufig entstehenden Schnittwunden als primäre Eintrittspforten für die über die Luft verbreiteten Sporen/Konidien der Erreger.

### **Resümee Arbeitspaket 1**

---

- an Mutterstöcken verbleibende Schnittrückstände („Zapfen“) stellen prinzipiell einen geeigneten Indikator zur Erfassung eines Esca-Befalls dar.
  - die Erreger-Situation ist offensichtlich abhängig vom Alter der Anlage.
  - die Erreger-Situation in Unterlagen-Schnittgärten entspricht prinzipiell der Situation in Ertragsanlagen.
  - die Erreger sind bereits in jungen Stöcken (bzw. Anlagen) vorhanden.
-

## **Arbeitspaket 2: Nachweisverfahren der Esca-Erreger, vor allem *Pch*, während des Rebveredlungsprozesses** (bearbeitet von Raphael Streit, WBI Freiburg)

### **Problemstellung**

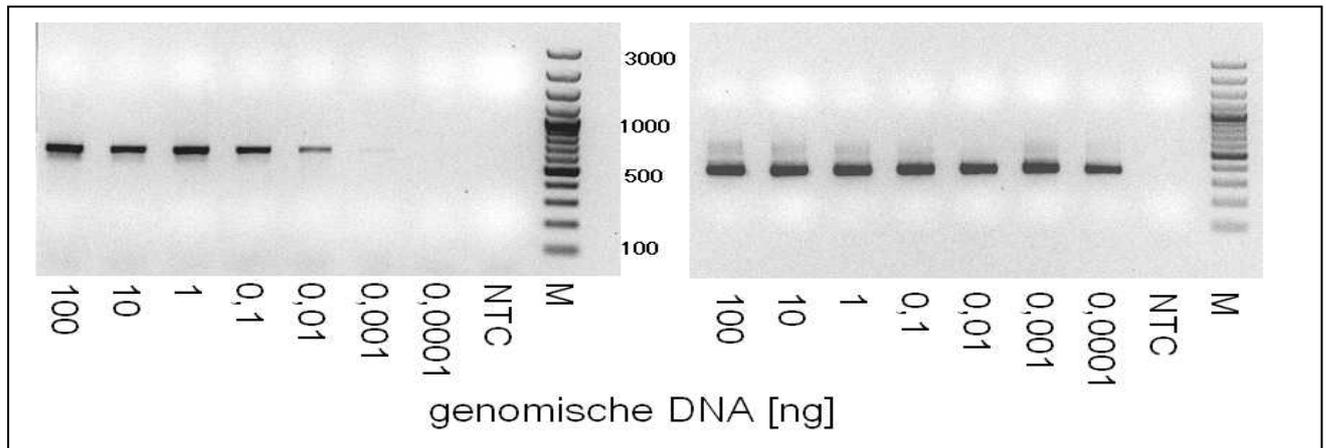
Molekularbiologischer Nachweis von *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*): nested PCR. Zielsetzung dieses Arbeitspaketes war es, eine zuverlässige und reproduzierbare Nachweismethode für Pflanzgut-relevante Esca-Erreger wie *Pch* zu etablieren. Der Nachweis mittels PCR scheint hierfür eine geeignete Methode. Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen, wurde vor allem an der Entwicklung einer nested-PCR gearbeitet.

### **Material und Methoden**

Mit entscheidend für den erfolgreichen Nachweis von *Pch* ist das Design der Primer: Der zu untersuchende Bereich liegt vollständig im Bereich der ribosomalen RNA-Gene. Das äußere Primerpaar, ITS5 bzw. ITS4, liegt auf der 18S bzw. 28S rDNA. Da die ribosomale DNA einen stark konservierten Bereich des Genoms darstellt, sind die ITS Primer nicht art-spezifisch, sondern für alle Asco- und Basidiomyceten einsetzbar. Die ITS5/4 Primer amplifizieren ein Fragment mit der Größe von ca. 600bp. Die PCH5/PCH3 Primer amplifizieren ein Fragment mit ca. 400bp. Die Spezifität des Nachweises für *Pch* wird durch die PCH Primer erreicht, die auf der ITS1 bzw. ITS2 Sequenz liegen. Die internal transcribed spacer (ITS)-Region weist einen sehr variablen Charakter auf und ist somit für die Unterscheidung einzelner Arten besonders geeignet.

### **Ergebnisse**

Um die Nachweisgrenzen des Verfahrens zu testen, wurde ein DNA-Extrakt aus Reinkulturen von *Pch* hergestellt. Die Extraktion des auf künstlichem Nährboden kultivierten Pilzmycels wurde mit der CTAB-Methode vorgenommen. Es wurden Konzentrationen von 100 ng bis 0,0001ng DNA getestet. Wie in **Abb. 4** zu erkennen ist, reicht die Nachweisgrenze der nested-PCR Teil 1 (ITS5-4) bis zu einer Konzentration von 0,01ng. Für die nested-PCR Teil 2 (PCH5-3) wurde 1 µl des vorangegangenen PCR-Produkts als Template eingesetzt. Eine Konzentration von 100pg (entsprechend 0.0001 ng) konnte auf diesem Weg noch deutlich und reproduzierbar nachgewiesen werden (rechts in **Abb. 4**). Entsprechend ist anzunehmen, dass das Potential des Verfahrens mit den bisher getesteten Konzentrationen noch nicht völlig ausgeschöpft ist.

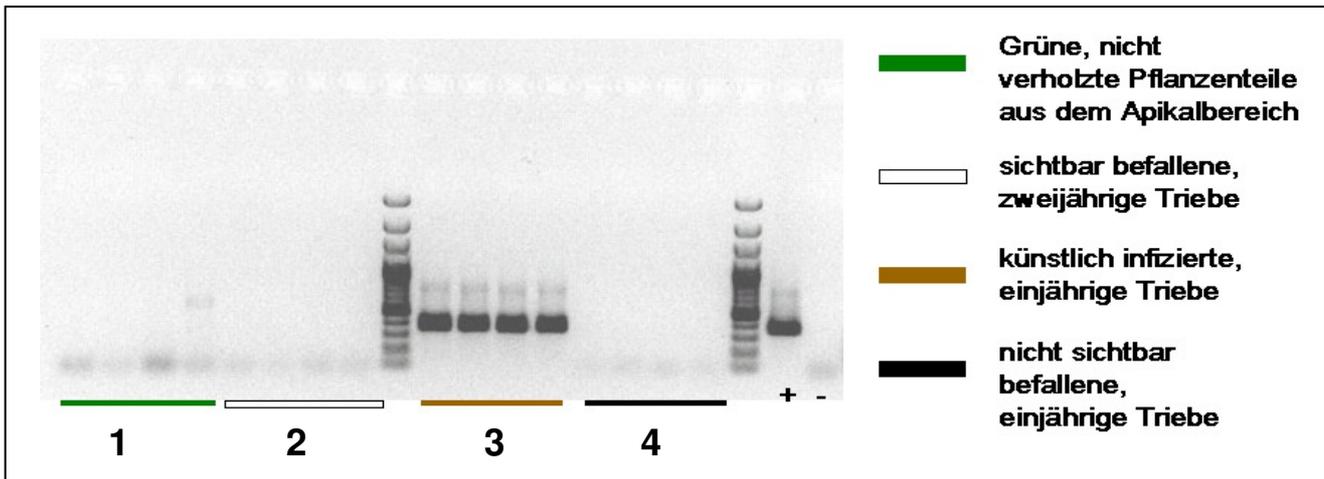


**Abb. 4:** 1% Agarosegele, Aufgetragen wurden die PCR-Produkte einer Verdünnungsreihe genomischer DNA einer Reinkultur von *Pch*. Links: Primer ITS5/4, Fragmentgröße ca. 600bp. Rechts: Primer PCH5/3, Fragmentgröße ca. 400bp.

Die Nachweismethode wurde im Weiteren unter „*in vivo*“-Bedingungen an Pflanzen aus dem Freiland und/oder dem Gewächshaus getestet (**Abb. 5**); dazu wurden DNA-Extrakte aus ausgewählten Bereichen des Sprosses von verschiedenen Reben hergestellt:

1. aus dem Freiland und Gewächshaus: apikale, noch unverholzte Spross- und Blattstücke. Der daraus gewonnene DNA-Extrakt sollte erwartungsgemäß nur *V. vinifera* DNA enthalten und daher als Negativkontrolle dienen. Um eine äußerliche Kontamination zu verhindern, wurden die Pflanzenteile vor der Extraktion oberflächensterilisiert.
2. aus dem Freiland: zweijährige Sprossabschnitte, die im Querschnitt deutlich sichtbar Gummosis aufwiesen.
3. autoklavierte, einjährige Sprossabschnitte, die auf PDA-Platten künstlich mit *Pch* infiziert worden waren. Die Sprossabschnitte waren bei der Probennahme sehr stark mit Pilzmycel überwachsen, sie dienten als Positivkontrolle.
4. aus dem Gewächshaus: einjährige Sprossabschnitte von Topfreben ohne sichtbaren Befall im Querschnitt.

Die DNA der genannten Probenreihen wurde demnach durchwegs aus dem Holz der jeweiligen Sproßabschnitte gewonnen. Das Verfahren der Wahl war wiederum die CTAB-Methode, die daraus gewonnene DNA diente als template innerhalb des vorgestellten nested-PCR Verfahrens zur Überprüfung auf *Pch* (**Abb. 5**).

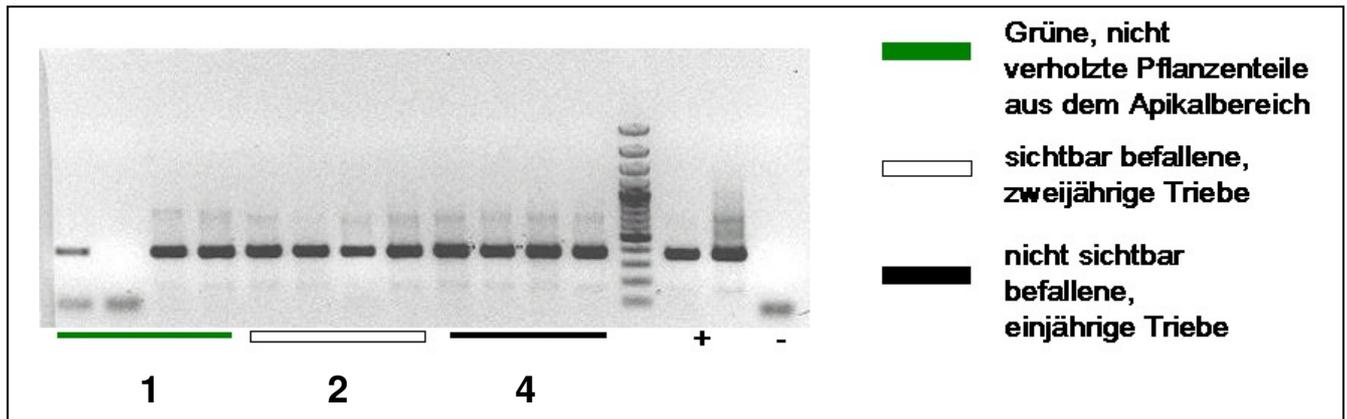


**Abb. 5:** Agarosegel 1%. Dargestellt ist das Ergebnis der nested-PCR Teil 2 (PCH5-3); die für *Pch* diagnostischen Banden besitzen eine Größe von ca. 400bp. Zyklenzahl: 35; eingesetztes Template: 1 $\mu$ l. Nur die Proben der Versuchsreihe 3 zeigen einen eindeutigen Nachweis von *Pch*.

Wie in **Abb. 5** erkennbar, zeigt eine der vier Wiederholungen der Probenreihe 1 (grüne, unverholzte Pflanzenteile) eine Bande im Bereich von 600bp, woraus hervorgeht, dass es sich nicht um das gesuchte Fragment (erwartete Größe: etwa 400bp) handelt. Das nämliche Fragment findet sich durchwegs auch bei der Probenreihe 3 (künstlich infiziert, einjährig) sowie in der Positivkontrolle. Womöglich korreliert dieses Fragment mit einem über die Primer ITS5 und ITS4 amplifizierten unbekanntem Basidio- oder Ascomyceten. Die sichtbar symptomatischen (Probenreihe 2) und nicht sichtbar symptomatischen (Probenreihe 4) Proben zeigen keine Banden.

Da für die sichtbar befallenen Proben der zweijährigen Triebe, entgegen den Erwartungen, kein Nachweis für *Pch* möglich war, wurden die gleichen Proben mit einer erhöhten Zyklenzahl (40, 45) sowie in Verdünnungsreihen des Templates von 1 (unverdünnt) bis 1/1000 getestet. Die Befunde blieben allerdings unverändert. Folgende Erklärungen für diese Befunde bieten sich an:

Bei Holzproben besteht die grundsätzliche und bekannte Gefahr, dass inhibitorische Substanzen wie z.B. phenolische Verbindungen oder auch Polysaccharide die PCR Reaktion unterdrücken können. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde das Reaktionsgemisch nach erfolgter DNA-Extraktion und vor der PCR mit 1 $\mu$ l einer definierten Konidiensuspension (entsprechend ca. 3 Konidien/ $\mu$ l) angereichert. Getestet wurden alle Proben, die zuvor kein positives Signal aufgewiesen hatten, also die Probenreihen 1, 2 und 4. Als Ergebnis zeigten nach der Zugabe der Konidiensuspension alle Proben bis auf eine Ausnahme innerhalb der Serie 1 eine Bande in der gesuchten Größe von 400bp (siehe **Abb. 6**).



**Abb. 6:** Agarosegel 1%. Dargestellt ist das Ergebnis der nested-PCR Teil 2. Zu dem Reaktionsgemisch wurde vor der PCR 1µl Konidiensuspension zugegeben. Die für *Pch* diagnostischen Banden besitzen eine Größe von ca. 400bp. Zyklenzahl der PCR: 35; Template 1µl. Ein Nachweis für *Pch* zeigt sich in allen Probenreihen (Ausnahme Probenreihe 1, mit einer Fehlstelle).

Der in **Abb. 6** gezeigte Befund stünde demnach in einem gewissen Widerspruch zu der Vermutung einer inhibitorischen Wirkung des Holzanteils: bereits nach Zugabe eines sehr geringen Anteils von Konidien zeigen alle zuvor negativ verlaufenen Proben nun einen eindeutigen Nachweis von *Pch*. Dafür lässt sich eine Reihe möglicher Ursachen benennen, die innerhalb des folgenden „Resümee“ angeführt sind.

### Resümee Arbeitspaket 2

- gegenüber einer „einfachen“ PCR zeigt die nested-PCR eine erhöhte Sensitivität
- das Problem der „deutlich symptomatischen Triebe“ bleibt ungelöst und ein *Pch*-Befall war auf molekularem Weg nicht nachzuweisen. Dieser Befund kann mehrere Gründe haben:

- i) Symptome und Erreger sind räumlich voneinander getrennt
- ii) inhibitorische Substanzen unterdrücken den PCR-Ablauf (aber: negativ getestete Holzproben mit Symptomatik führten nach Zugabe von Konidien zu einem Nachweis von *Pch*)
- iii) der pilzliche (DNA-)Anteil in den Proben liegt unterhalb der Nachweisgrenze

### **Arbeitspaket 3: Infektionsquellen und –wege während der Veredlung und in der Rebschule**

#### **Problemstellung**

Während der Wintermonate wird das Schnittmaterial aus den Unterlagen-Schnittgärten in die Pflanzgut erzeugenden Betriebe geliefert. Frisch angeliefertes Schnittmaterial ist weitestgehend frei von sichtbarer Symptomatik (siehe hierzu den 2. Zwischenbericht): demnach beträgt der sichtbare Befallsgrad für Unterlagen zum Anlieferungszeitpunkt etwa 0.5%, für Edelreiser liegt der Wert nahe 0%. In Junganlagen, d.h. etwa 15 Monate später, kann es jedoch bereits zu teilweise beträchtlichen Befallserscheinungen im Holz und auch sichtbaren Ausfällen kommen.

#### **Material und Methoden**

In Fortführung und Ausweitung früherer Untersuchungen wurden zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen aus den Bereichen: Muttergärten, nach der Ernte angeliefertes Material, frisch hergestellte Pfropfreben, Rebschulen, sowie verkaufsfertige Pfropfreben.

Alle Proben wurden visuell bonitiert. In Ausnahmefällen wurden ergänzend Re-Isolierungen sowie molekulare Analysen vorgenommen. Bedingt durch die vorab festgestellte Befalls-Situation lag für den Berichtszeitraum das Hauptaugenmerk überwiegend auf dem Bereich Unterlagen. Die visuelle Bonitur erfasste die gesamte Länge der pflropffertigen Unterlagen, entsprechend etwa 30-35 cm. Re-Isolationen sowie molekulare Untersuchungen beschränkten sich auf die Bereiche der Schnittstellen. Nach erfolgter Pfropfung wurden entsprechend auch die Edelreis-Komponenten überprüft. Das Material stammte aus drei verschiedenen Betrieben; sowohl in- als auch ausländisches Material wurde in die Untersuchungen einbezogen.

Die für die jeweiligen Zeitpunkte einbezogene Anzahl der Triebe ist uneinheitlich, war aber für den Bearbeitungszeitraum immer größer als 200.

#### **Ergebnisse**

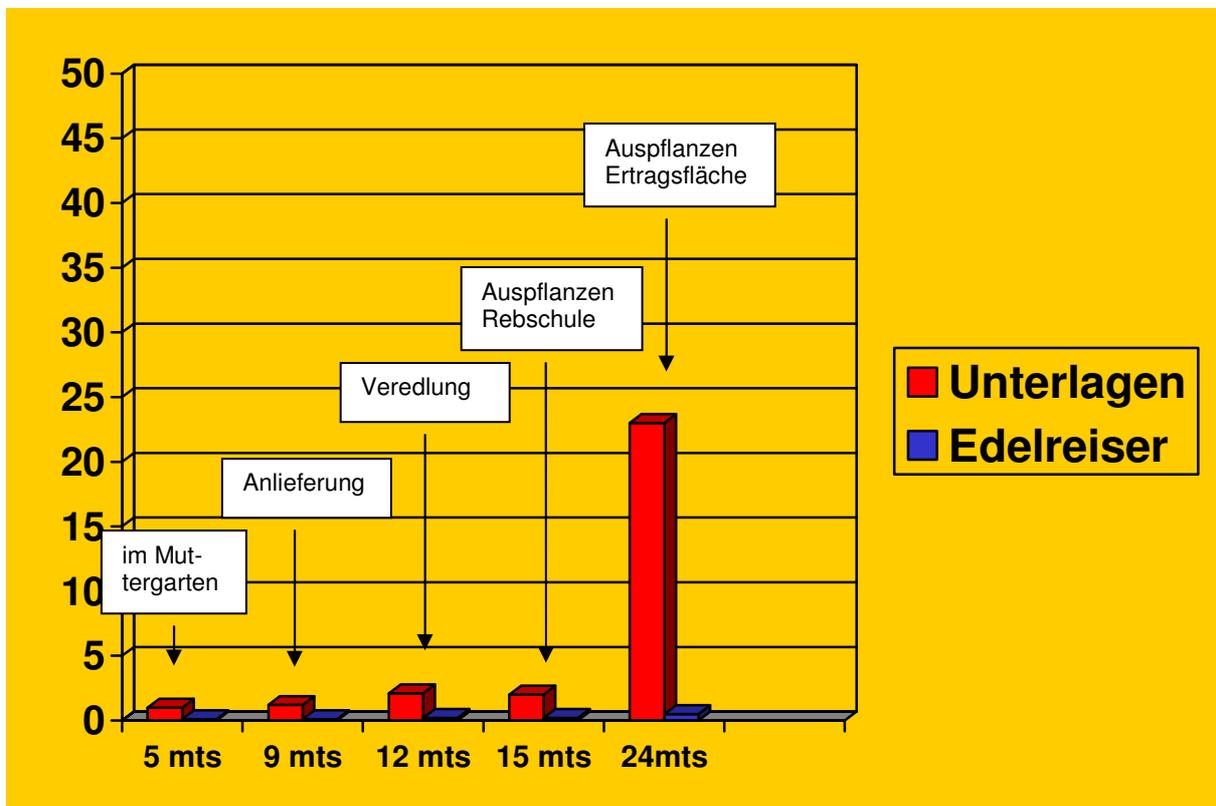
Die für die Jahre 2008 und 2009 gewonnenen Befunde sind in der **Abb. 7** zusammengefaßt. Berücksichtigt sind gleichermaßen die Unterlagen- und die Edelreiskomponenten.

Ausgangspunkt für die verwendete Zeitskala in **Abb. 7** ist der Zeitpunkt des Austriebs in den Muttergärten, in Abhängigkeit vom Standort sind das etwa die Monate April-Mai. Der Zeitpunkt des Austriebs ist gleichgesetzt mit „0 mts“. Zu den überprüften Stadien der Pflanzgut-Erzeugung stellte sich die Symptomatik im Bereich der Unterlagen dann wie folgt dar:

- Fünf Monate („5 mts“) nach erfolgtem Austrieb aus Muttergärten entnommenes Material ist nur sehr gering sichtbar belastet;

- frisch im Betrieb angeliefertes Material („9 mts“) weist einen Befallsgrad von etwa 2% auf, wobei der Befall durchwegs sehr schwach ist;
- der Befallsgrad ist unmittelbar nach dem Veredelungsprozeß („12 mts“) leicht angestiegen...
- ...und bleibt nach dem Auspflanzen in die Rebschule („15 mts“) weitgehend unverändert.
- ein sehr deutlicher Anstieg ist dann aber in den verkaufsfertigen Pfropfreben („24 mts“) zu beobachten – hier liegt der Anteil der sichtbar befallenen Unterlagskomponenten bereits bei über 20%.

Edelreiskomponenten waren zu jedem Zeitpunkt in deutlich geringerer Anzahl und geringem Ausmaß befallen (z.B. ~ 0.2% nach „15 mts“), mit sehr geringem Anstieg über die Zeitskala.



**Abb. 7.** Symptomentwicklung in Unterlagen (rot) bzw. Edelreisern (blau) über die Zeit in Monaten (mts) nach dem Austrieb in den Muttergärten. Angabe in % sichtbar befallene Proben (n = jeweils mehrere Hundert).

In der folgenden **Tab. 3** ist für den Bereich Rebschule (entsprechend dem Zeitpunkt „15 mts“ in **Abb. 7**) exemplarisch die jeweilige Anzahl symptomatischer Unterlagen zusammengestellt. Die Proben rühren aus vier Rebschulen her, alle aus inländischen Weinbaugebieten. Die Befallsrate bewegt sich zwischen etwa 1.5% und etwa 2.5%. Zusammengefaßt ergibt sich so der in **Abb. 7** ausgewiesene Wert von 2% Befall.

**Tab. 3.** Pfropfreben: über visuelle Bonitur festgestellte Symptomatik in der Unterlagen-Komponente; Proben entnommen aus 4 verschiedenen Rebschulen.

<b>Anlage</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U5</b>	<b>U6</b>
<b>Sorte</b>	<b>5BB</b>	<b>125AA</b>	<b>SO4</b>	<b>SO4</b>
<b>symptomatisch</b>	3 <sup>1</sup> (~ 1.5%)	4 (~2%)	4 (~2%)	5 (~2.5%)

<sup>1</sup> Anzahl symptomatischer Triebe (n = > 200/Anlage)

Eine Einschränkung des in **Tab. 3** aufgeführten Datenmaterials liegt in der begrenzten geographischen Bandbreite, ausländische Proben standen für diesen Bereich der Pflanzguterzeugung gar nicht zur Verfügung. Die Erfahrungen aus dem Arbeitspaket 1 würden aber auf ähnlich geartete Befallszahlen hindeuten.

Für fast alle symptomatischen Proben aus dem Bereich Rebschule gilt, dass die Ausprägung durchwegs schwach war; eine äußere Symptomatik an den Blättern war in keinem Fall festzustellen. Für alle symptomatischen Unterlagen gilt, dass die Symptomatik am Pfropf- und Wurzelende, d.h. im Bereich der ehemaligen Schnittstellen, deutlich stärker oder überhaupt nur dort ausgebildet war. Dies wird als Hinweis darauf betrachtet, dass ein Hauptanteil der Infektionen vorzugsweise über die Schnittstellen erfolgt. Die Edelreis-Komponente war praktisch nicht betroffen.

### Resümee Arbeitspaket 3

- 
- zwischen „15 mts“ (Rebschule) und „24 mts“ (verkaufsfertig, frisch ausgepflanzt) kommt es in den Unterlagen zu einer deutlichen Steigerung der Symptomatik.
    - das Ausmaß unsichtbarer (Vor)-infektionen bleibt unklar.
  - Edelreiser bleiben bis zum Stadium „24 mts“ sehr weitgehend symptomfrei.
    - im Holz befallener Unterlagen kommt es zu einer charakteristischen Symptomverteilung.
  - offene Schnittflächen sind eine wichtige Eintrittspforte für die Erreger.
-

## **Arbeitspaket 4: Infizierbarkeit von Unterlagen vs. Edelreiser**

### **Problemstellung**

Alle Beobachtungen im Zusammenhang mit der Pflanzgut-Erzeugung deuten darauf hin, dass Unterlagen gegenüber Esca-relevanten Infektionen möglicherweise „anfälliger“ sind als Edelreiser. Einschränkend zu beachten ist hierbei aber die unterschiedliche Vorgeschichte der jeweiligen Muttergärten sowie die Tatsache, dass Mutterstöcke von Unterlagen trotz z.T. massiven inneren Befalls keine äußere Symptomatik zeigen – sie werden entsprechend weiterhin in den Erzeugungsprozeß mit einbezogen (im Unterschied zu Edelreisern, die aus normalen Ertragsanlagen und also entsprechenden Bonitur-Möglichkeiten gewonnen werden). Die beobachtete „Anfälligkeit“ im Inneren der Unterlagen-Komponenten in Pfropfreben korreliert jedenfalls nicht mit der äußeren Symptomatik.

### **Material und Methoden**

Ausgangspunkt der Experimente waren molekular auf Befallsfreiheit überprüfte Unterlags- bzw. Edelreistriebe. Für jede einbezogene Sorte Unterlagen bzw. Edelreis wurden 30 Triebe auf diese Weise überprüft und nachfolgend kultiviert. Nach dem Vortreiben wurden die Pflanzen einzeln getopft. Die Infektion erfolgte zeitnah an einer künstlich gesetzten Schnittstelle mit 50 µl einer Konidien suspension von *Pch* ( $1 \times 10^5$  Konidien/ml). Jeweils 20 Kontrollpflanzen wurden statt *Pch* mit Wasser „infiziert“.

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert; eine erste Auswertung erfolgte nach 3, eine zweite und abschließende Auswertung nach 6 Monaten. Die Auswertung erfolgte durchwegs visuell; einbezogen wurden sowohl Längs- als auch Querschnitte, letztere durchwegs im Bereich der ursprünglichen Infektionsstelle.

### **Ergebnisse (Tab. 4)**

Zum ersten Boniturzeitpunkt (3 Monate) zeigten die beiden Unterlagssorten, 125AA und 5BB, erste Anzeichen einer beginnenden Symptomatik im Holz. Diese beschränkte sich auf den unmittelbaren Bereich der erfolgten Infektion. Sowohl die beiden Edelreissorten, Müller-Thurgau und Spätburgunder, als auch die Kontrollpflanzen waren zum genannten Zeitpunkt völlig frei von Symptomatik.

Nach 6 Monaten wurden die restlichen Pflanzen geerntet. Sowohl für die Unterlagen- als auch für die Edelreissorten war nun ein sichtbarer Befall nachweisbar. Ausgehend von der Infektionsstelle erstreckte sich der symptomatische Bereich für Unterlagen über etwa 5-11 cm (125AA) bzw. 5-12 cm (5BB), für Edelreiser betrug die entsprechende Distanz etwa 3-10 cm (Müller-Thurgau) bzw. 3-9 cm (Spätburgunder). Die Symptomatik war prinzipiell über den gesamten Querschnitt des Triebes, dabei aber oft ungleichmäßig, ausgebildet. Die Anzahl

betroffener Gefäße im Xylemteil variierte demnach. Wie anhand der Abbildung in **Tab. 4** exemplarisch gezeigt, waren die Symptome in Unterlagen fast durchwegs deutlicher entwickelt als in Edelreisern, auf einen Versuch einer umfassenden Quantifizierung wurde aber verzichtet. Eine äußere Symptomatik war für keine Versuchspflanze nachweisbar, auch Wuchsstörungen waren nicht zu beobachten.

Die verbleibenden Kontrollpflanzen waren, mit einer Ausnahme (Unterlage 5BB), frei von jeglicher Symptomatik. Ein Unterschied in der äußeren Entwicklung war gegenüber den infizierten Pflanzen nicht festzustellen.

**Tab. 4.** Symptomentwicklung im Holz künstlich infizierter Unterlagen- und Edelreissorten nach 3 bzw. 6 Monaten Inkubationszeit im Gewächshaus

Unterlagen bzw. Edelreiser	<i>Pch</i> : Infizierbarkeit (Symptomausprägung cm)		Befallsschwere (oben: 5BB unten: Müller-Thurgau)
	nach 3 Mon.	nach 6 Mon.	
125AA <sup>1</sup>	(-)	5-11 cm	
5BB <sup>1</sup>	(-)	5-12 cm	
Müller-Thurgau <sup>1</sup>	-	3-10 cm	
Spätburgunder <sup>1</sup>	-	3-9 cm	

<sup>1</sup> jeweils n = 30

Eine Einschränkung der vorgestellten Untersuchungen liegt in ihrem begrenzten Zeitrahmen; sie vermitteln aber immerhin eine Vorstellung von der zeitlichen Dimension der Symptomentwicklung innerhalb infizierter Pflanzen. Inwieweit die Befunde auf Bedingungen im Freiland übertragbar sind, muß offen bleiben.

#### Resümee Arbeitspaket 4

- 
- Unterlagen und Edelreiser sind über Schnittwunden künstlich infizierbar.
  - die Symptomatik ist in Unterlagen tendenziell früher sichtbar, die Symptomausbreitung verläuft tendenziell schneller.
  - im Gewächshausversuch zeigen weder Unterlagen noch Edelreiser innerhalb des Versuchszeitraumes äußere Symptome.
  - infizierte Pflanzen unterscheiden sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes äußerlich nicht von nicht-infizierten Kontrollpflanzen.
-

## **Arbeitspaket 5: Erarbeitung geeigneter Kontrollmaßnahmen**

### **Problemstellung**

Heißwasserbehandlung (HWT) von Pflanzmaterial ist ein in verschiedenen Ländern (z.B. Frankreich, Australien) regelmäßig geübtes Verfahren zur möglichen Reduktion von Erregern. Nach etlichen Jahren der praktischen Anwendung ist der Erfolg der Maßnahme immer noch unklar und jedenfalls nicht zu quantifizieren. In Reinkulturen zeigen *Pch* und *Pal* gleichermaßen eine beträchtliche Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Standardverfahren HWT (50 °C für 30 min.) – nach einer entsprechender Behandlung sind die Organismen nicht abgetötet, wenn es auch zu einer Verringerung der Keimungsrate sowie zu verzögertem Mycelwachstum kommt. Dieser Rückstand ist unter Laborbedingungen nach einer gewissen Zeitspanne wieder eingeholt.

Frühere Versuche im Rahmen des Projekts (siehe 2. Zwischenbericht) hatten eine beträchtliche Wirksamkeit von „verschärften“ Bedingungen, 55 °C, 30 min., gegenüber den Erregern gezeigt. Eine entsprechende Behandlung von Pflanzmaterial führte jedoch auf deren Seite zu vermehrten Ausfällen gegenüber der standardmäßig behandelten Kontrolle. Behandlungen unter 52 °C, 30 min-Bedingungen führten zu intermediären Ergebnissen hinsichtlich der Erreger, dabei zu keiner Beeinträchtigung der Pflanzen.

### **Material und Methoden**

Inokula von jeweils zwei verschiedenen Mycel-Isolaten von *Pch* bzw. *Pal* wurden in H<sub>2</sub>O bid. überführt und wie folgt behandelt: nach einer 15-minütigen Behandlung bei 52 °C im Thermoblock wurden die Isolate auf RT abgekühlt und dann einer zweiten Behandlung von 52° für 15 min. unterzogen. In einem weiteren Ansatz wurden für die jeweiligen Isolate definierte Konidien suspensionen in einer Konzentration von jeweils  $1 \times 10^5$  Konidien/ml hergestellt und entsprechend behandelt.

Behandelte Mycelfragmente sowie Aliquots der Konidien suspensionen wurden anschließend auf PDA-Medium überführt. Der Zeitpunkt der wieder einsetzenden Mycelentwicklung sowie die Keimungsgeschwindigkeit der Konidien wurden mikroskopisch überprüft; als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz von Mycelien bzw. Konidien bei RT für 30 min.

### **Ergebnisse (Tab. 5)**

Auch verschiedene Abänderungen des Standardverfahrens HWT zeigten gegenüber Reinkulturen von *Pch* und *Pal* nur eingeschränkte Wirksamkeit. Die im Berichtszeitraum vor allem untersuchte Variante der Aufteilung der Behandlung in zwei Teilschritte, entsprechend 2 x 15 min, 52 °C, unterschied sich letztendlich kaum von der ungeteilten Variante, 1 x 30 min., 52 °C. Keines der überprüften Isolate konnte durch die gewählten Versuchsbedingungen zum

völligen Absterben gebracht werden, es traten lediglich Verzögerungen in der Entwicklung auf. Die Ursache dieser Verzögerungen ist unklar. Stammspezifische Muster traten nicht auf, die Isolate reagierten sehr gleichartig auf die Behandlung. Die in **Tab. 5** angegebenen Bandbreiten, z.B. bezüglich der Keimungsgeschwindigkeit, beziehen sich auf Konidien eines einzelnen Isolates: demnach keimen manche Konidien, auch bei gleicher Stammzugehörigkeit, offensichtlich früher aus als andere.

**Tab. 5.** Keimungs- und Wuchsverhalten von *Pch* und *Pal* bei unterschiedlichen Bedingungen HWT (Kontrolle: RT, 30 min; Standardbedingungen HWT = 50 °C, 30 min.)

<b>H<sub>2</sub>O: Temp. Minuten</b>	<b>RT 30</b>	<b>50 °C 30</b>	<b>52 °C 30</b>	<b>52 °C 2 x 15</b>
<b><i>Pch</i> (n = 2)</b>				
- Konidien <sup>1</sup>	1-2	3-5	6-7	6-7
- Mycel <sup>2</sup>	1	2-3	2-4	2-5
<b><i>Pal</i> (n = 2)</b>				
- Konidien <sup>1</sup>	1-2	2-5	4-5	4-6
- Mycel <sup>2</sup>	1	2-4	2-3	2-4

<sup>1</sup> Keimung nach Tagen; <sup>2</sup> Wiederanwachsen nach Tagen

Derlei unter definierten Bedingungen erstellte Laborbefunde sind nur schwerlich auf die Bedingungen innerhalb der Betriebe zu übertragen. Die Erreger mögen sich hier bereits in der Pflanze und/oder frei im Substrat Wasser befinden, mit daraus resultierender unterschiedlicher Erreichbarkeit für die Maßnahme; andererseits liegen die Erreger hier sicherlich in vergleichsweise geringer Konzentration vor. Pflanzmaterial wird üblicherweise in Bündeln getaucht – vorläufige Versuche in dieser Richtung zeigen, dass im Inneren der Bündel die gewünschten Bedingungen nicht ohne weiteres und nicht innerhalb kurzer Zeiträume erreicht werden können. Grundsätzlich fehlen zum aktuellen Zeitpunkt weiterreichende Untersuchungen zur Auswirkung des Verfahrens auf pflanzfertiges Material.

### **Resümee Arbeitspaket 5**

- 
- das Standardverfahren HWT zeigt gegenüber Reinkulturen von *Pch* und *Pal* nur begrenzte Wirksamkeit.
  - Mycel zeigt sich gegenüber den untersuchten Behandlungsvarianten durchwegs widerstandsfähiger als Konidien.
  - eine Übertragung der Laborbefunde auf Bedingungen in der Praxis ist nicht ohne weiteres möglich.
-

### 3.2. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen des Forschungsvorhabens gewonnenen Daten bieten eine vernünftige Grundlage zur Einschätzung des Vorkommens der Esca-Erreger während der Pflanzguterzeugung. Während der Schwerpunkt der Untersuchungen auf einheimischen Regionen liegt, zeigen sie doch das internationale Ausmaß der Problematik – Material aus in- und ausländischen Muttergärten unterscheidet sich demnach kaum in seinen Esca-spezifischen Charakteristika.

Hinsichtlich des Nutzens und der Auswirkungen der Ergebnisse ist das Folgende zu beachten: sie zeigen zwar eindeutig das Vorhandensein der Pathogene in Pflanzmaterial während aller Stadien der Entwicklung und Bearbeitung, die Symptomatik nimmt dabei mit fortschreitender Zeit zu. Quantifizieren hinsichtlich ihrer „bedrohlichen Auswirkung“ lassen sich diese Befunde aber nur schwerlich – in welchem Ausmaß vorinfiziertes Pflanzmaterial tatsächlich an der Problematik in Junganlagen beteiligt ist, lässt sich daraus nicht ableiten. Die immer wieder festgestellte Diskrepanz zwischen äußerer und innerer Symptomatik zeigt, dass über den physischen Befall hinaus auch andere Parameter zum sichtbaren Ausbruch der Krankheit beitragen (müssen?).

Für etliche Bearbeitungsabschnitte der Pflanzguterzeugung liegen nunmehr grundlegende Informationen zum Vorkommen und zur Epidemiologie der Erreger, hauptsächlich *Phaeomoniella chlamydospora*, vor. Für eine zielgerichtete Bekämpfung der Esca sind derlei Daten unverzichtbar und sie definieren mögliche Ansatzpunkte beispielsweise für phytosanitäre Maßnahmen. Eine Erfolgskontrolle kann dabei über verschiedene Auswertungs-Maßnahmen geleistet werden, wobei dem Verfahren der visuellen Bonitur nach wie vor erhöhte Bedeutung zukommt.

Die Gefährdung von Reben in Ertragsanlagen über luftverbreitete Sporen/Konidien ist eine anerkannte Tatsache; ein weiteres zumindest beachtenswertes Gefährdungspotential liegt in der Existenz vorinfizierten Pflanzmaterials. Letztendlich wird eine erfolgversprechende Kontrolle der Esca-Krankheit nur über begleitende Maßnahmen während der Pflanzguterzeugung möglich sein. Die begleitenden Untersuchungen zur Auswirkung von Chinosol zeigen den grundlegenden Nutzen dieser ohnehin routinemäßig genutzten Anwendung (eigentliche Indikation: *Botrytis*) auch gegenüber Esca-Erregern.

Beruhend auf den vorgestellten Daten lassen sich zukünftige Arbeiten zum Thema genauer definieren und spezifisch ausrichten. Bedarf besteht beispielsweise in der Quantifizierung der Befunde zum Vorkommens, in der Relation Betrieb – Freiland, oder generell in der Erfassung der phytosanitären Situation.

#### 4. Zusammenfassung

Die Untersuchungen über den gesamten Bearbeitungszeitraum zeigen, dass Pflanzmaterial in beträchtlichem Ausmaß die Erreger der Esca-Krankheit beinhalten kann. Sichtbar wird ein Befall mit Esca-Erregern vor allem im Bereich Unterlagen; eine nennenswerte Infektion der Edelreis-Komponente wird erst in Ertragsanlagen deutlich. In Deutschland an der Problematik Pflanzmaterial beteiligt sind die mitosporischen Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), in deutlich geringerem Umfang *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pa*). Dies steht in wesentlicher Übereinstimmung mit anderen Weinbauländern, auch außerhalb Europas.

Im Rahmen des Projekts wurde der Pflanzgut erzeugende Prozeß beginnend von den Muttergärten bis hin zur verkaufsfertigen Rebe in Teilabschnitten beobachtet und wissenschaftlich erfasst. Prinzipiell zeigen sich mit zunehmendem Alter erhöhte Befallsraten bereits in den Mutterstöcken (und weiterführend dem daraus gewonnenen Vermehrungsmaterial?). Diese Beobachtung gilt gleichermaßen für alle einbezogenen Sorten von Unterlagen und ist unabhängig von der Erziehungsform und der geographischen Herkunft. Im Weiteren stellte sich heraus, dass der Anteil infizierten Pflanzmaterials über den Erzeugungsprozeß hin zunimmt, wenn auch über einen beträchtlichen Zeitraum nur auf sehr geringem Niveau. Infektionen erfolgen wohl gleichermaßen während der Verarbeitung und im Freiland. In welchem Umfang Pflanzmaterial an der seit einigen Jahren bestehenden Esca-Problematik im Freiland beteiligt ist, lässt sich aber nicht quantifizieren. Bereits in Junganlagen besteht eine beträchtliche Diskrepanz zwischen der physischen Existenz der Erreger im Holzkörper der Pflanze und dem Auftreten sichtbarer Symptome, ein Befall führt demnach nicht zwangsläufig zu Problemen bei der pflanzlichen Entwicklung. Insgesamt sollte eine erfolgsversprechende Kontrolle der Esca jedenfalls bereits die Schiene Pflanzmaterial enthalten. Darüber hinaus werden entsprechende Maßnahmen aber auch im Bereich Ertragsanlagen vonnöten sein.

Eine Esca-bezogene Bonitur auf Blattsymptome ist in Unterschnittgärten kaum möglich – die in Ertragsanlagen typische Symptomatik lässt sich hier nur sehr ausnahmsweise beobachten und korreliert in keiner Weise mit der tatsächlichen und vergleichsweise immer erhöhten Befallssituation. In „Zapfen“ (entspricht den Rückständen früherer Schnittmaßnahmen) zeigt sich gegenüber den diesjährigen Trieben eine deutlich vermehrte Symptomatik; der Anteil von im Holz sichtbar symptomatischen Zapfen scheint dabei abhängig vom Alter der Mutterstöcke. Aktuell nicht zu beantworten ist die Frage, inwieweit diese Schnittrückstände über die Luft (luftverbreitete Konien/Sporen) und/oder über die Mutterpflanze (Einwanderungsprozesse über die Wasserleitungsbahnen) infiziert werden. Beides ist möglich, eine Differenzierung der Symptomatik je nach deren Ursprung lässt sich aber nicht treffen.

Unter Laborbedingungen lassen sich die Erreger auf molekularem Weg auch in sehr geringer Konzentration sowohl in Reinkultur als auch in „gespickten“ Holzproben nachweisen. Unter-

suchungen zum Nachweis in natürlich und künstlich infizierten Holzproben betreffen vor allem *Pch*, in deutlich geringerem Umfang wurde auch der Nachweis von *Pal* untersucht. Nach Erarbeitung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens liefert ein nested-PCR-Verfahren basierend auf spezifischen Primern für *Pch* auch bei sehr geringen Erreger-Konzentrationen reproduzierbare Ergebnisse. Trotz aller Bemühungen ist der Nachweis aus natürlich infizierten Proben aber nicht immer mit der sichtbaren Symptomatik zu korrelieren: sichtbar befallene Proben liefern demnach immer wieder (und auch reproduzierbar!) negative molekulare Befunde. Eine mögliche Ursache mag in der räumlichen Distanz zwischen sichtbarer Symptomatik und physischer Existenz der Erreger liegen. Ein reproduzierbarer Nachweis aus Wasserproben scheint mit dem erarbeiteten Verfahren hingegen möglich.

In den Betrieben frisch angeliefertes Vermehrungsmaterial ist kaum sichtbar befallen, ein entsprechender Nachweis ist nur mühsam zu führen. Während der ersten Monate nach erfolgter Veredelung ist kein nennenswerter Anstieg der im Holz sichtbaren Symptomatik zu beobachten. Frisch in die Rebschule ausgebrachtes Material ist im Bereich Unterlagen zu etwa 2%, im Bereich Edelreis praktisch gar nicht befallen. Die Symptomatik ist durchwegs nur schwach ausgeprägt. Die Verteilung der Symptome im Holz deutet auf eine Infektion über die Schnittstellen hin; diese typische Verteilung gilt gleichermaßen für Unterlagen alleine und für Unterlagskomponenten in fertigen Pfropfreben. Infektionsquellen existieren offenbar für mehrere Bereiche der Pflanzguterzeugung, beinhaltend Wasserbäder, Werkzeuge oder auch Verarbeitungsrückstände.

Schnittwunden sowohl von Unterlagen als auch von Edelreisern sind mit *Pch* und *Pal* künstlich infizierbar. Nach Infektion und 6-monatiger Inkubationszeit zeigen Unterlagen im Vergleich zu ausgewählten Edelreis-Sorten eine geringfügig stärkere Symptomausbreitung im Holz. Eine äußere Symptomatik war in keinem Fall zu beobachten. Ausgehend von der Infektionsstelle beträgt die Ausbreitungsgeschwindigkeit der sichtbaren Symptome in Unterlagen unter Gewächshausbedingungen etwa 10 cm/6 Monate. Eine Übertragung dieser Werte auf Freiland-Verhältnisse scheint nur bedingt möglich.

Heißwasserbehandlung ist ein in verschiedenen Weinbauregionen verpflichtend angewandtes Verfahren zur Desinfizierung von Pflanzmaterial. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten auch verschiedene Abänderungen des Standardverfahrens (entsprechend einer Behandlung für 30 min. bei 50 °C) gegenüber *Pch* und *Pal* nur eingeschränkte Wirksamkeit. Dies gilt, in unterschiedlichem Ausmaß, für eine verlängerte Einwirkdauer, für erhöhte Temperaturen sowie auch für eine Aufteilung der Behandlung in zwei Teilschritte. Eine Stamm-spezifische Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung ist kaum festzustellen. Versuche zu einem möglichen Temperaturgefälle innerhalb behandelter Unterlagenbündel verliefen uneinheitlich, womöglich in Abhängigkeit von der „Packungsdichte“ des Materials.

## **5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**

Die folgenden Ausführungen beziehen sich hauptsächlich auf die im Folgeantrag formulierten Arbeitspakete 1-5.

### ***Arbeitspaket 1. Untersuchung und Bewertung von Schnittrückständen in Unterlagenschnittgärten***

Die geplante Vorgehensweise konnte prinzipiell erfolgreich in die Praxis um- und dort eingesetzt werden. Zumindest eine Abschätzung des Mindestbefalls Esca in in- und ausländischen Muttergärten für Unterlagen ist auf diesem Weg möglich. Das Verfahren ist zwangsläufig mit einem größeren Aufwand verbunden als eine, hier aber ja nicht mögliche, Blattbonitur. Sie bietet dafür den Vorteil einer weiterreichenden Erfassung und ist unabhängig von äußeren Einflüssen.

### ***Arbeitspaket 2: Nachweis-Verfahren für Pch während des Rebveredlungsprozesses***

Die visuelle Nachweismethode wurde weiter verfeinert und bietet einen erfolgversprechenden Ansatz für eine Einschätzung des Befallsgrades in Holzproben. Das potentiell mögliche Vorkommen der Erreger sollte auf molekularem Weg für die Bereiche Wasser, Werkzeug und Holz erfasst werden. Auch nach Erarbeitung geeigneter Zeitpunkte für die Probenahmen war dies weitgehend zuverlässig nur für den Bereich Wasser möglich. Insgesamt stellt sich nach der mehrjährigen Ausarbeitung und Erprobung eines molekularen Nachweises eine Reihe weiterer Fragen, beispielsweise betreffend den Zusammenhang zwischen Symptomatik und physischer Präsenz der Erreger.

### ***Arbeitspaket 3: Infektionsquellen und –wege während der Veredlung und in der Rebschule***

Sowohl mögliche Infektionsquellen als auch Infektionswege konnten zumindest für den geschlossenen Bereich der Betriebe erfaßt und teilweise in ihrer Bedeutung auch beurteilt werden. Schwierig wird die Beurteilung unter Einschluß des Freilandbereiches – der dort herrschende Infektionsdruck aus der Luft und das damit verbundene Gefährdungspotential sind mit den verfügbaren Daten nur annähernd zu ermitteln.

### ***Arbeitspaket 4: Infizierbarkeit von Unterlagen vs. Edelreiser***

Protokolle für eine naturnahe Infektion unter Gewächshausbedingungen konnten erarbeitet werden. Darauf beruhend lassen sich Aussagen über die evtl. unterschiedliche Infizierbarkeit von Unterlagen und Edelreisern treffen. Auch hier gilt, dass innere und äußere Symptomatik nicht korreliert sind.

### **Arbeitspaket 5: Erarbeitung von Kontrollmaßnahmen**

Die Untersuchungen zeigten im Wesentlichen die nur eingeschränkte Tauglichkeit verschiedener Kontrollansätze wie z.B. der Heißwasserbehandlung. Begleitende Arbeiten, die nicht Bestandteil des eigentlichen Vorhabens waren, zeigten die potentielle Nützlichkeit des von den Pflanzgut-Erzeugern ohnehin verwendeten Chinosols. Beruhend auf dem vielfältigen Nachweis der Erreger in den Betrieben muß auf die grundsätzliche Bedeutung phytosanitärer Maßnahmen hingewiesen werden. Die damit verbundenen Erfordernisse bilden einen weiteren Bereich offener Fragen, die während des Forschungsvorhabens neu aufgeworfen wurden. Bei einer getrennten Betrachtung von Unterlagen und Edelreisern zeigt sich vor allem für erstere die Notwendigkeit von Kontrollmaßnahmen.

### **6. Während der Projektlaufzeit publizierte Beiträge zur Thematik Esca:**

- Fischer, M. 2007. Esca und Fungizide. **Der Badische Winzer** 10 (07): 17-19.
- Fischer, M. 2008. Die Weinrebe als Zielobjekt der Esca-Erreger. **Der Deutsche Weinbau** (7/08): 22-25.
- Fischer, M. 2008. Stress fördert auch die Esca-Symptome. **Der Badische Winzer** (10): 15-17.
- Fischer, M. 2009. Über den Nutzen von 8-Hydroxychinolinsulfat (Chinosol, Chinoplant) während der Pflanzguterzeugung. **Der Deutsche Weinbau** 4/09: 48-51.
- Fischer, M. 2009. Esca im Freiland. Erfahrungen mit weinbaulichen Maßnahmen. **Obstbau & Weinbau**: 280-282.
- Fischer, M. 2009. Nischengebundene Sippenbildung bei Holz bewohnenden Pilzen - experimentelle Befunde. Bayerische Akademie der Wissenschaften, **Rundgespräche der Kommission für Ökologie** 37: 53-61.