



**Erarbeitung von wissenschaftlichen Ansätzen
zur biologischen Kontrolle der Rebenperonospora
und für Strategien zu deren Regulierung
im ökologischen Weinbau**

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de

Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

Finanziert vom Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Auftragnehmer:

Staatliches Weinbauinstitut Freiburg

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Abschlußbericht

Forschungsvorhaben für das

**Programm des Bundesministeriums für Verbraucherschutz,
Ernährung und Landwirtschaft zur Förderung von Forschungs- und
Entwicklungsvorhaben sowie zum Technologie- und
Wissenstransfer im ökologischen Landbau**

**Innovationen zur Verbesserung der Rahmenbedingungen
für den ökologischen Weinbau**

**Erarbeitung von wissenschaftlichen Ansätzen
zur biologischen Kontrolle der Rebenperonospora
und**

**für Strategien zu deren Regulierung
im ökologischen Weinbau**

Projektnummer 02OE269



Staatliches Weinbauinstitut Freiburg

Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer

Abt. Biologie

AG Pflanzenschutz / Phytopathologie

Merzhauser Straße 119

D-79100 Freiburg im Breisgau

Tel.: 0761 40165 30

e-mail:Hanns-Heinz.Kassemeyer@wbi.bwl.de

Wir danken dem Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau

und der
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Projektträger Agrarforschung und -entwicklung
für die vertrauensvolle und engagierte Zusammenarbeit bei der
Projektdurchführung

1 Ziel und Aufgabenstellung des Forschungsvorhabens

Das Gesamtziel des Forschungsvorhabens war, biologische Verfahren zum Schutz der Weinrebe vor der Rebenperonospora zu entwickeln. Diese biologischen Verfahren bieten im ökologischen Weinbau eine Alternative zu Kupferpräparaten.

Die Rebenperonospora verursacht in den deutschen Weinbaugebieten erhebliche Schäden durch Ertrags- und Qualitätsverluste. Vor allem bei warmer und feuchter Witterung im Frühsommer kann die Krankheit einen großen Teil der Blätter und Blüten einer Rebanlage erfassen. Blattverluste vermindern die Assimilatbildung und beeinträchtigen somit die Qualität der Beeren. Bei starkem Blattbefall wird das Triebwachstum beeinflusst und es werden weniger Reservestoffe in die einjährigen Triebe eingelagert. Als Folge jahrelanger Schädigung der Laubwand durch die Krankheit werden Leistungsfähigkeit und Lebensdauer der Pflanzen herabgesetzt.

Abb.1:

Ertrags- und Qualitätsverlust durch Blatt- und Traubenbefall



Unter den in den Mitteleuropa vorherrschenden klimatischen Verhältnissen ist in jedem Jahr mit Infektionen durch diese Krankheit zu rechnen. In welchem Umfang diese Infektionen zu Epidemien führen, hängt stark vom Verlauf der Jahreswitterung ab und ist zu Beginn der Vegetationsperiode noch nicht absehbar. Epidemien der Rebenperonospora können bei den hochanfälligen klassischen Traubensorten innerhalb weniger Regentage sehr heftig verlaufen. Daher muss diese Krankheit in einem frühen Stadium erfasst und kontrolliert werden. Ein nachträgliches Regulieren ist nicht mehr möglich, wenn der Befall bereits fortgeschritten ist. Aus diesem Grund ist wirtschaftlicher Qualitätsweinbau nur mit vorbeugenden Maßnahmen gegen die Rebenperonospora möglich. Ein Prognoseverfahren, mit dem diese vorbeugende

Kontrolle gezielt durchgeführt werden kann, wurde bereits am Staatlichen Weinbauinstitut entwickelt und in die Praxis eingeführt.

Für den ökologischen Weinbau bedeutet die Rebenperonospora eine Herausforderung, da sie hier unbedingt vorbeugend behandelt werden muss und derzeit nur kupferhaltige Präparate eine Zulassung besitzen. Wegen der bekannten ökotoxikologischen Bedenken gegenüber Kupfer ist es dringend erforderlich, dass Alternativen zu diesem Wirkstoff gefunden werden. Allerdings müssen diese Alternativen hinreichende Wirksamkeit auch unter hohem Befallsdruck aufweisen.

Seit Jahren haben Versuche gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der als Pflanzenstärkungsmittel aufgeführten Präparate keine befriedigende Wirkung gegen Rebenperonospora besitzt. Einige Pflanzenstärkungsmittel zeigen bei einem niedrigen Befallsdruck eine Wirkung gegen die Rebenperonospora, hier wäre aber eine Bekämpfungsmaßnahme nicht nötig gewesen. Bei einem höheren Befallsdruck, der eine Bekämpfung auch aus ökonomischen Überlegungen rechtfertigt, war die Wirkung der geprüften Präparate unzureichend. An diesen Versuchen ist zu erkennen, dass im ökologischen Weinbau derzeit keine biologische Bekämpfung der Rebenperonospora praktikabel ist. Gerade im ökologischen Weinbau mit der beschränkten Möglichkeit eine Epidemie zu stoppen, sind wirksame und praxistaugliche Konzepte zur biologischen Kontrolle von Epidemien durch die Rebenperonospora dringend erforderlich.

Die vorliegenden Erfahrungen mit den derzeit angebotenen Pflanzenstärkungsmitteln zeigen, dass wirksame biologische Präparate nur auf der Basis biologischer Grundlagen entwickelt werden können. Das vorliegende Forschungsvorhaben hat daher zum Ziel, Schwachstellen im Infektionskreislauf der Rebenperonospora zu charakterisieren, die Ansatz für eine biologische Kontrolle des Erregers bieten.

Der Infektionszyklus von der Rebenperonospora findet nur eine kurze Phase an der Oberfläche der Wirtspflanze statt, dagegen läuft er die meiste Zeit im Inneren von Blättern, Blütenständen (Gescheinen), Blüten und Beeren ab. Gerade aus der längeren Entwicklungsphase im Inneren der Weinrebe lässt sich ableiten, dass die Rebenperonospora durch Applikationen von außen schwierig zu erfassen ist. Daher ist es für Ansätze zur biologischen Bekämpfung der Rebenperonospora von größter Bedeutung, die einzelnen Infektions- und Entwicklungsstadien des Erregers genau zu kennen und Schwachstellen zu ermitteln. Eine gezielte Anwendung von Verfahren, die an Entwicklungsstadien mit Schwachstellen ansetzen, verspricht den größten Erfolg bei der biologischen Bekämpfung der Krankheit. Bisher lagen nur sehr

wenige Kenntnisse über die Entwicklung des Erregers vor. Diese Wissenslücke sollte mit dem vorliegenden Vorhaben geschlossen werden.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- Erweiterung der Kenntnisse über den Erreger der Rebenperonospora und dessen Infektionszyklus als Grundvoraussetzung für eine biologische Bekämpfung,
- Charakterisierung der einzelnen Stadien des Infektionszyklus und Ermittlung von Schwachstellen,
- Entwicklung von Ansätzen, um mit biologischen Verfahren in diese Schwachstellen einzugreifen,
- Erarbeitung von Testverfahren zur Prüfung biogener Hemmstoffe

2 Ergebnisse

2.1 Allgemeine Einführung

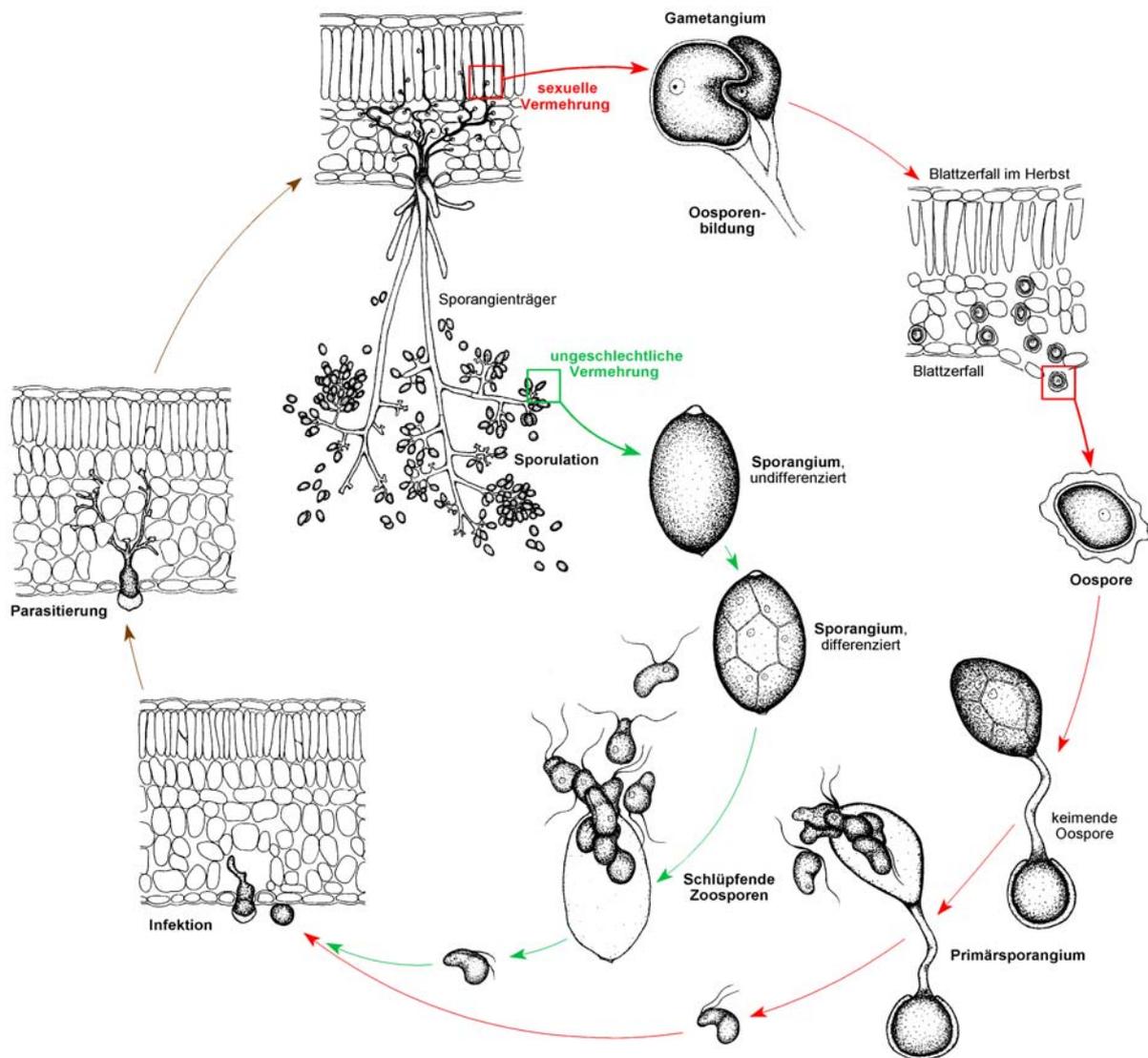
Die Rebenperonospora wird durch *Plasmopara viticola* verursacht. Es ist ein Vertreter der Oomyceten und gehört zur Familie der Peronosporaceen. Die Oomyceten besitzen zwar einige Gemeinsamkeiten mit den Pilzen, z.B. einen Vegetationskörper aus Hyphen, der ein Mycel bildet. Sie unterscheiden sich aber in anderen, wesentlichen Merkmalen von Pilzen z.B. Zellwand aus Glukanen und begeißelte Zoosporen. Daher werden nach neueren Untersuchungen die Oomyceten, einschließlich *Plasmopara viticola*, nicht zu den Echten Pilzen (Mycota), sondern zu dem Organismenreich der Chromista gezählt. Zu diesem Reich gehörten auch zweigeißelige Algen (heterokont begeißelte Chrysophyta). *Plasmopara viticola* ist ein biotropher Parasit, der ausschließlich an grünen Organen mit Spaltöffnungen von Arten der Gattung *Vitis* lebt. Der Erreger besiedelt mit seinem Mycel die Interzellularen des Wirtsgewebes und nimmt mit kurzen Verzweigungen der Hyphen Kontakt mit den Zellen des Parenchyms auf. Diese Hyphen dringen durch die Zellwand und bilden an der Zellmembran der Wirtszelle Haustorien, die den Wirtszellen Nahrung entziehen.

Plasmopara viticola ist im Süd-Osten von Nordamerika heimisch und befällt dort einheimische Wildarten von *Vitis*. Diese nordamerikanischen Arten der Weinrebe haben gegen den Erreger Resistenz entwickelt, so dass sie nur schwach befallen und nicht in ihrem Bestand gefährdet werden. *Plasmopara viticola* wurde gegen Ende des 19. Jahrhunderts nach Europa eingeschleppt und hat im europäischen Weinbau Epidemien großen Ausmaßes mit immensen wirtschaftlichen Schäden verursacht. Dieser bestandsgefährdende Befall der europäischen Weinrebe (*Vitis*

vinifera) und ihrer Sorten beruht auf fehlender Resistenz gegenüber *Plasmopara viticola*.

Eine wesentliche Grundlage für eine gezielte Bekämpfung der Rebenperonospora ist der Kreislauf von *Plasmopara viticola* (Abb.2). Er gliedert sich in zwei Abschnitte von unterschiedlicher epidemiologischer Bedeutung. Im sexuellen Abschnitt wird die Oospore gebildet, die der Überwinterung des Erregers dient. Im asexuellen Sommerkreislauf werden in großer Menge Sporangien freigesetzt.

Abb. 2: Kreislauf von *Plasmopara viticola*



Plasmopara viticola überdauert den Winter als Oosporen am Boden in Resten stark befallener Blätter. Die Oosporen werden im Lauf des Spätwinters keimbereit und erhalten ihre Keimfähigkeit bis in den Frühsommer hinein. Sobald sich der Boden erwärmt und ausreichend Niederschläge gefallen sind, keimen sie und bilden

Primärsporangien. Bis Mitte Juni können bei starkem Regen immer wieder Oosporen keimen. Ein Teil der Oosporen kann auch über ein Jahr ruhen und erst im darauffolgenden Jahr zur Keimung kommen. In der Regel findet die Keimung und die Freisetzung der Zoosporen aus dem Primärsporangium statt, wenn die Temperaturen über 10 °C ansteigen und mehr als 8 mm Niederschlag gefallen sind. Unter diesen Voraussetzungen sind meist die ersten Blättchen der Weinrebe entfaltet, so dass die Primärinfektion stattfinden kann. Für die Primärinfektion durch die gekeimten Zoosporen müssen die Blätter ausreichend mit Wasser benetzt sein. Die Primärinfektion ist der Startpunkt des Sommerkreislaufs von *Plasmopara viticola*, bei dem sich der Erreger mit Sporangien asexuell vermehrt und unter günstigen Vermehrungsbedingungen Epidemien verursachen kann.

An die Primärinfektion schließt sich die Inkubationszeit an, während der sich der Erreger im Blattinneren entwickelt, ohne dass sichtbare Symptome zu erkennen sind. Wachstum und Entwicklung des Erregers sind sehr stark von der Temperatur abhängig, so dass bei höheren Temperaturen das Gewebe schneller vom Mycel durchdrungen wird und die Ölflecke eher erscheinen als bei tieferen Temperaturen. Am Ende der Inkubationszeit erscheinen sogenannte Ölflecke als sichtbares Zeichen der Krankheit (Abb. 3).

Abb.3 : A: Ölflecke auf einem Blatt;



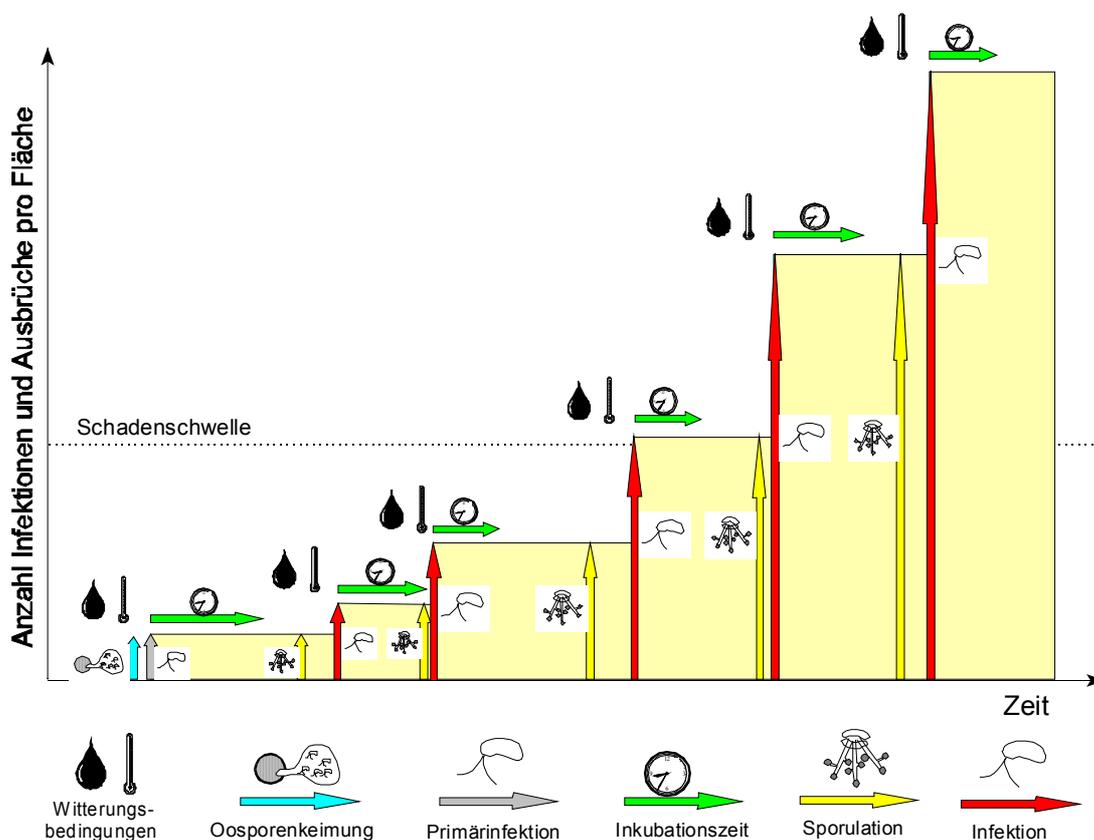
B: Ausbruch der Sporangien



Sobald nachts die relative Luftfeuchtigkeit über 95 % ansteigt und Temperaturen über 12 °C herrschen, treten die Sporangienträger aus den Spaltöffnungen der infizierten Blattfläche hervor (Abb.3 B). Die Verbreitung der Sporangien erfolgt durch

Luftbewegung oder Wassertropfen. Gelangen diese in einen Wassertropfen auf einem grünen Organ ihrer Wirtspflanze, so schlüpfen die Zoosporen. Der Schlupf der Zoosporen und die darauffolgende Infektion geschieht unter optimalen Bedingungen bei 24 °C innerhalb von vier Stunden. Herrschen tiefere oder höhere Temperaturen schlüpfen die Zoosporen verzögert und der Infektionsprozess ist verlängert. *Plasmopara viticola* kann Blätter, Gescheine samt Stielgerüst, Beeren und Triebspitzen infizieren, wenn diese Spaltöffnungen aufweisen und benetzt sind. Bereits kleine Wassertropfen reichen für die Infektion aus, aber die Infektionsbedingungen sind günstiger, wenn die Benetzung mit Wasser großflächig ist und lange andauert. Nach jeder Infektion folgt wiederum eine Inkubationszeit und im Anschluss daran der Ausbruch der Sporangien, sobald nachts ausreichend Feuchtigkeit herrscht. *Plasmopara viticola* zählt zu den polyzyklischen Erregern und kann während einer Vegetationsperiode eine Reihe von Entwicklungszyklen durchlaufen. Wenn über längere Zeit optimale Bedingungen für den Ausbruch der Sporangien und für Infektionen herrschen und die Inkubationszeiten aufgrund der Temperaturverhältnisse kurz sind, kann sich sehr rasch eine Epidemie entwickeln (Abb. 4). Trockenheit verzögert die Ausbreitung von *Plasmopara viticola* und hemmt den Verlauf von Epidemien.

Abb. 4: Verlauf der Epidemie von *Plasmopara viticola*



2.2 Erstes Arbeitspaket: Infektionsbiologie von *Plasmopara viticola*

2.2.1 Ziele

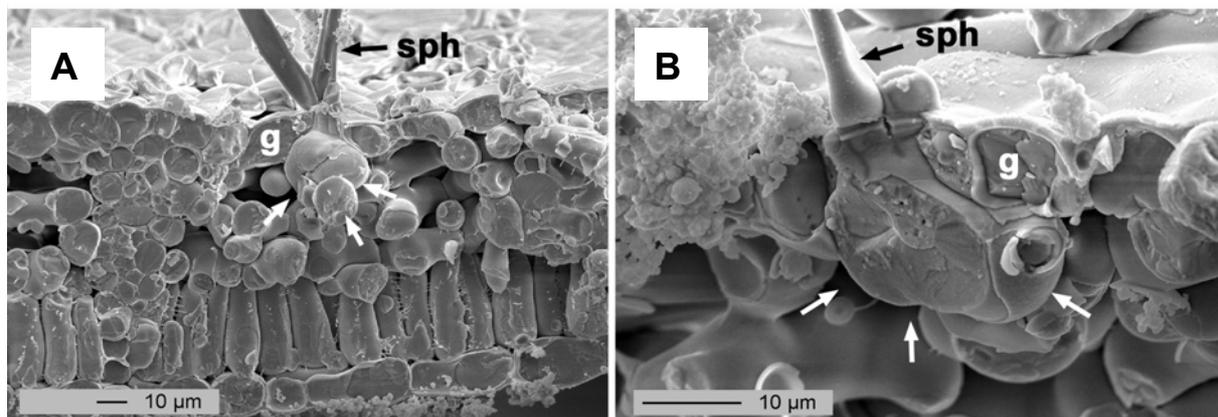
Der zeitliche und räumliche Ablauf des Infektionsprozesses und früher Stadien der Besiedelung des Wirtsgewebes werden ermittelt. Hierdurch sollen die einzelnen Phasen des Infektionsvorganges dargestellt werden. Insbesondere wird der Übergang vom heterokont begeißelten Protoplasten zur, von einer Zellwand umgebenen, Spore charakterisiert. Die Ausbildung von Infektionsstrukturen ergibt einen Einblick in die Vorgänge während der Infektion. Dazu gehören auch strukturelle Untersuchungen des Zytoskeletts und des Vesikeltransports während der Infektion. Hierdurch können Phasen während des Infektionsprozesses ermittelt werden, die Ansatzpunkte für eine biologische Bekämpfung bieten, da sie Schwachstellen im Infektionszyklus darstellen.

2.2.2 Ergebnisse

2.2.2.1 Sporulation

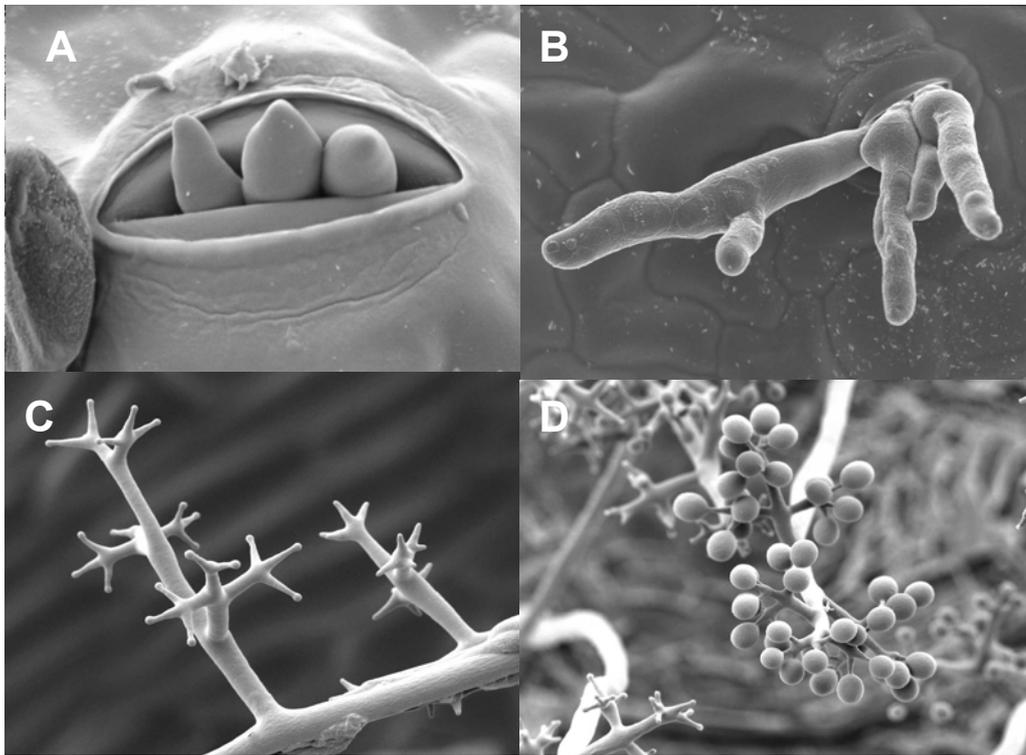
Für die asexuelle Vermehrung werden Sporangienträger gebildet, die aus den Spaltöffnungen an die Oberfläche treten und an Traghyphen zitronenförmige Sporangien entwickeln. Aus jeder Spaltöffnung brechen mehrere Sporangienträger aus, so dass bereits bei einer kleinen Infektionsstelle eine Menge davon gebildet werden, die als weißer Rasen sichtbar sind. Die Sporangien, die büschelweise an den Traghyphen sitzen, lösen sich ab und werden durch Luftbewegung verbreitet. Der Sporulationsprozess findet am Ende der Inkubationszeit in den Nachtsstunden statt, wenn die rel. Luftfeuchte über 92% beträgt. Bereits am Tag vor dem Ende der Inkubationszeit bildet sich in der Atemhöhle ein sekundäres Vesikel, aus dem sich Hyphen entwickeln, die aus den Spaltöffnungen austreten (Abb. 5 A, B).

Abb. 5: Sekundäres Vesikel (Pfeile) mit austretenden Sporangienträger (sph); g: Schließzellen der Spaltöffnungen; Gefrierbruch im Tieftemperatur-Rasterelektronenmikroskop



Nach Eintritt der Dunkelheit wachsen und verzweigen sich die Sporangienträger. Innerhalb von sieben Stunden haben sich an den Spitzen der Traghyphen reife Sporangien entwickelt (Abb. 6 A, B, C, D).

Abb. 6: Stadien der Sporulation vom Austreten der Sporangienträger bis zur Entwicklung reifer Sporangien; Tieftemperatur-Rasterelektronenmikroskop

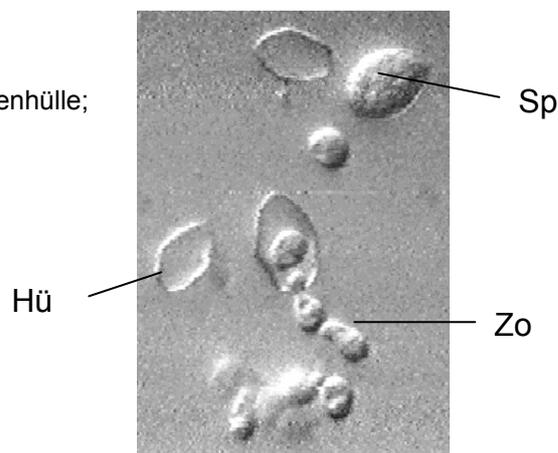


2.2.2.2 Erste Stadien des Infektionsprozesses

Die reifen Sporangien werden durch Wind oder Wasser abgelöst und verbreitet. In Wasser werden aus den Sporangien vier bis zehn Zoosporen entlassen (Abb. 7), die mit zwei Geißeln versehen sind. Die Zoosporen besitzen keine Zellwand, sondern sie sind nur von einer Membran umgeben und ausschließlich in Wasser lebensfähig.

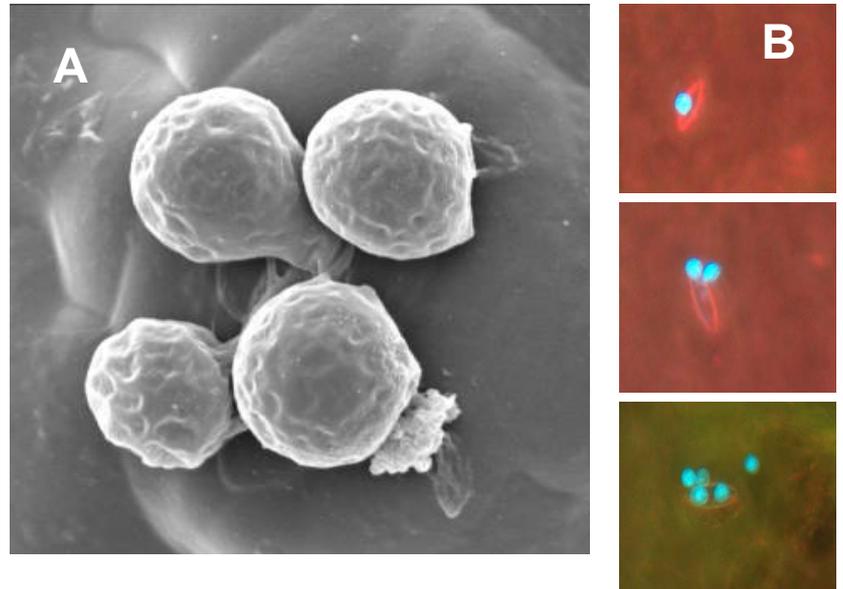
Abb. 7

Schlupf der Zoosporen aus den Sporangien;
Sp: reifes Sporangium); Hü: leere Sporangienhülle;
Zo: schlüpfende Zoosporen



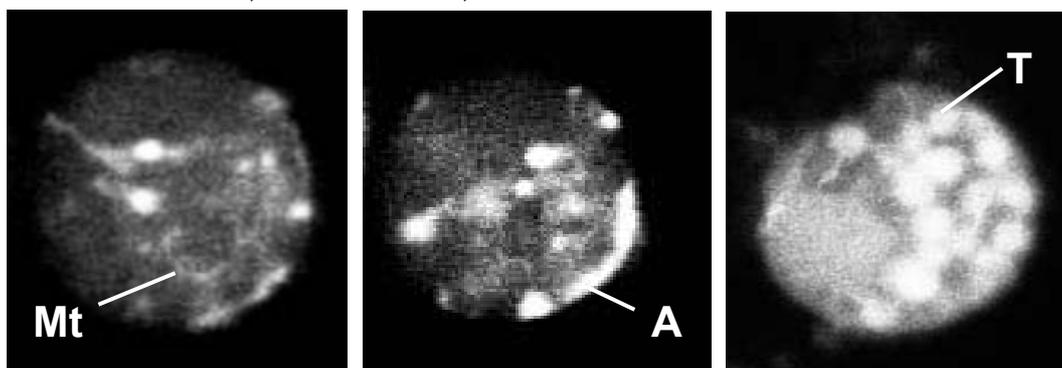
Die schwärmenden Zoosporen sind nur von einer Membran umgeben und äußerst empfindlich gegen äußere Einflüsse. Nach einer Schwärmphase lagern sie sich an den Spaltöffnungen an, verlieren ihre Geißeln und enzystieren indem sie eine Zellwand bilden. Im mikroskopischen Bild ist zu sehen, dass sich die Zoosporen gezielt an die Spaltöffnungen anlagern (Abb.8).

Abb. 8: Enzystierte Zoosporen, angelagert an eine Spaltöffnung;
A: Tieftemperatur-Rasterelektronenmikroskop;
B: Fluoreszenzmikroskop, Anfärbung mit Blankophor



Der Prozess der Enzystierung ist mit einer hohen Stoffwechselaktivität in der Zoospore verbunden. Die Untersuchungen zur Dynamik des Zytoskeletts in den Zoosporen ergab, dass ein intensiver Transport von Vesikeln an die Peripherie der Zoosporen stattfindet und dass Zellwandmaterial an die Membran angelagert wird (Abb. 9). Auffallend war eine Kappe aus akkumuliertem Actin an einem Pol der Zoospore. Hier wird die Auskeimung einer Hyphe vorbereitet. Die einzelnen Elemente des Zytoskeletts z.B. Actin und Tubulin sowie die Mikrotubuli wurden mit spezifischen Antikörpern oder spezifischen Reagentien z.B. Phalloidin, die mit Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert waren, angefärbt.

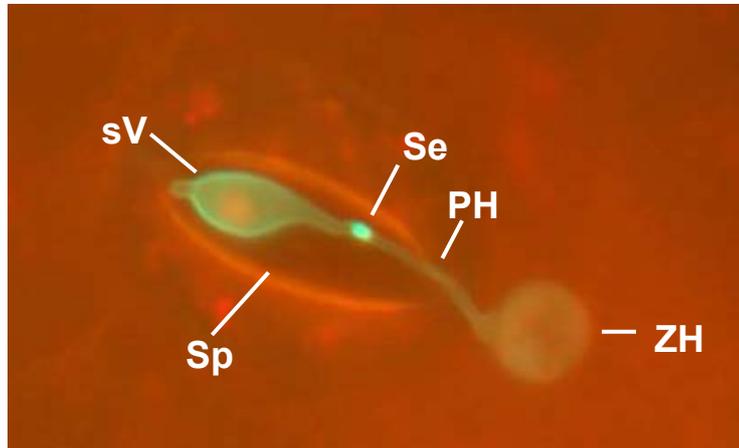
Abb. 9: Spezifische Anfärbung des Zytoskeletts in einer Zoospore während der Enzystierung;
T: Akkumulation von Tubulin; MTM Mikrotubuli; A: Akkumulation von Actin an einem Pol



Sobald die Zoospore an die Spaltöffnung angelagert ist und eine Zellwand ausgebildet wurde, beginnt die Ausbildung einer Hyphe. Die Hyphe tritt aus der Zoospore und bildet eine Penetrationshyphe, die durch die Spaltöffnung in die Atemhöhle eindringt. Dort bildet sie das substomatäre Vesikel (Abb. 10).

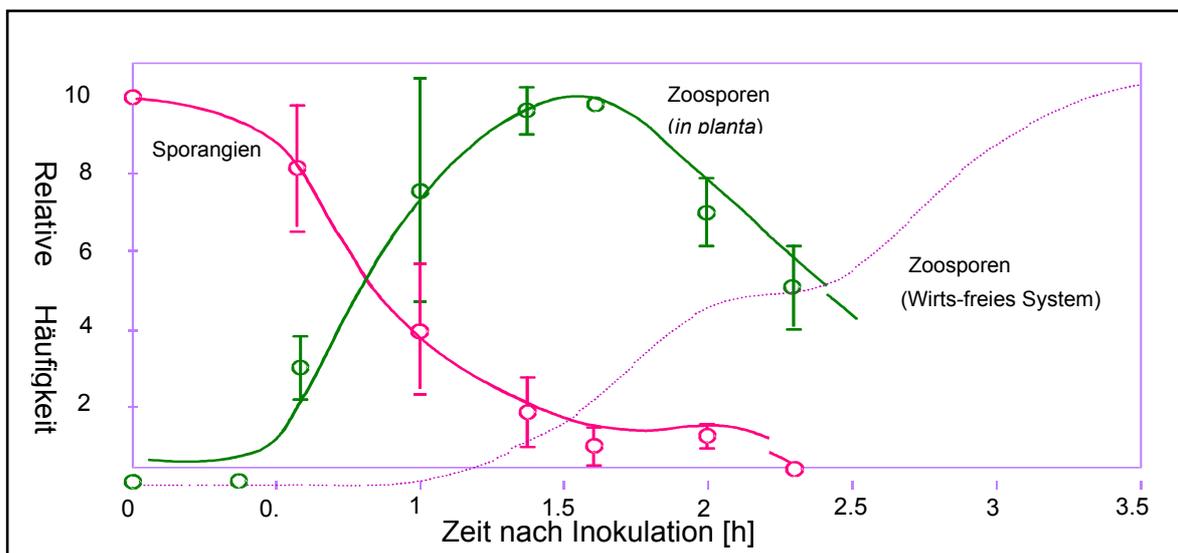
Abb. 10:

Substomatäres Vesikel (sV);
 ZH: Hülle der Zoospore;
 PH: Penetrationshyphe;
 Se: Septum



Während des ganzen Penetrationsprozesses konnte ebenfalls die Aktivität des Zytoskeletts dargestellt werden. Wobei hier nicht nur eine Ausbildung der Zellwand der Hyphe beobachtet wurde, sondern ein Transport des gesamten Zellinhaltes an die Spitze der Penetrationshyphe. Die leere Zoospore und Penetrationshyphe werden durch ein Septum (Abb. 8) von dem substomatären Vesikel abgetrennt. Aus dem substomatären Vesikel wächst eine primäre Hyphe, die in die Interzellularen des Mesophylls eindringt. Mit diesem Vorgang ist der eigentliche Infektionsprozess abgeschlossen. Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Infektion haben gezeigt, dass unter optimalen Bedingungen (Blattbenetzung, 20°C bis 24°C Lufttemperatur) der Schlupf der Zoosporen innerhalb von 90 min ablaufen kann (Abb. 11).

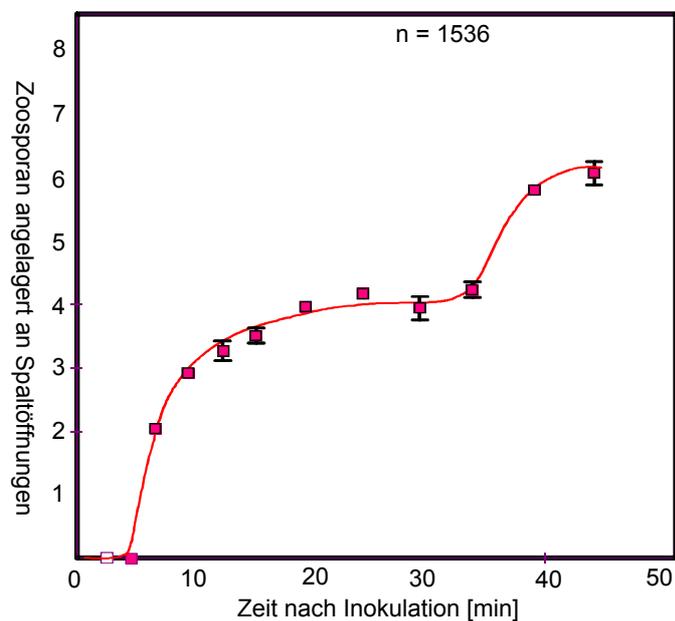
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf des Schlupf der Zoosporen auf der Pflanze und im wirtsfreien System



Geschlüpfte Zoosporen gelangen dann innerhalb von 45 min an die Spaltöffnungen und enzystieren sich dort (Abb. 12). Unmittelbar anschließend an die Enzystierung beginnt der Penetrationsprozess, der mit der Etablierung von *Plasmopara viticola* im Inneren der Wirtspflanze abschließt. Mit diesen Untersuchungen direkt auf lebenden Blättern konnten die seitherigen Vorstellungen zum Ablauf des Infektionsprozesses präzisiert werden, da bisher nur Untersuchungen zum Schlupf der Zoosporen *in vitro* vorlagen. Die bisherigen Untersuchungen zum Schlupf der Zoosporen im wirtsfreien System zeigten einen sehr viel längeren Verlauf. Daher wurde bisher angenommen, dass bei optimalen Temperaturen die ersten Phasen der Infektion erst nach vier Stunden abgeschlossen sind.

Abb. 12:

Zeitlicher Ablauf der Anlagerung der Zoosporen an die Spaltöffnungen



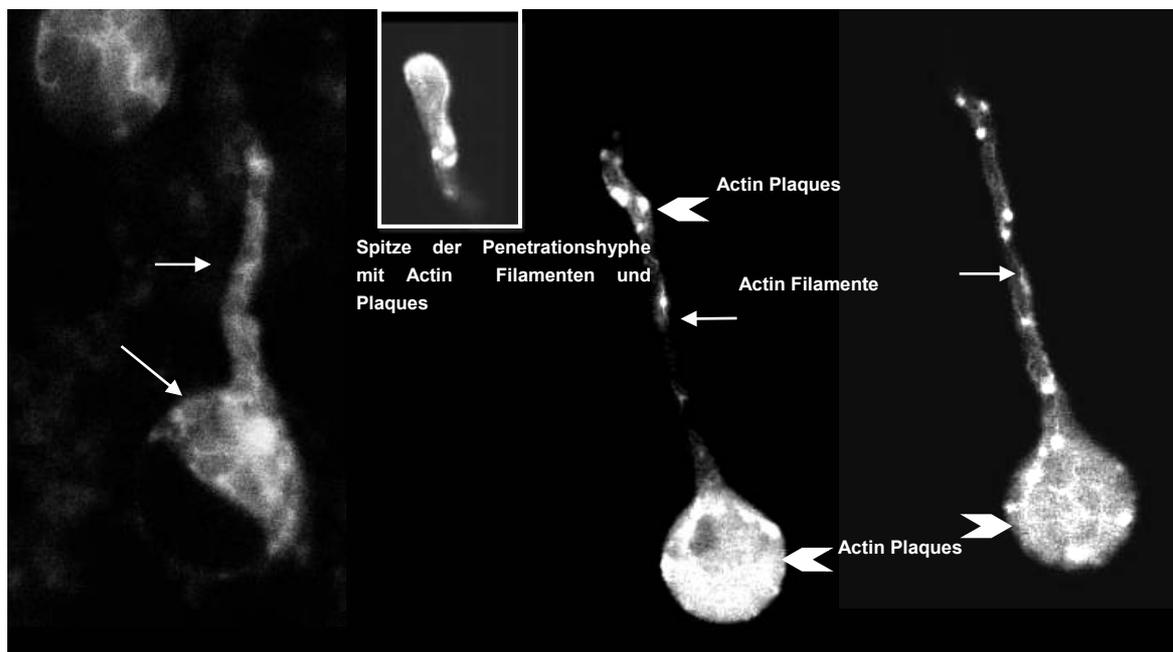
Die nun vorliegenden Untersuchungen zur zeitlichen Dynamik der ersten Stadien des Infektionsprozesses zeigen, dass Schlupf der Zoosporen und deren Anlagerung an die Spaltöffnungen sowie die Enzystierung innerhalb eines kurzen Zeitraums stattfindet. Bei den Zoosporen handelt es sich um Protoplasten, die lediglich von einer dünnen Membran umgeben sind. Daher ist dieser rasche Ablauf eine Strategie, um das Überleben des Erregers während dieses empfindlichen Entwicklungsstadiums zu sichern.

2.2.2.3 Besiedelung

Mit der Ausbildung des substomatären Vesikels ist der erste Schritt der Infektion beendet und der Erreger beginnt sich im Inneren der Wirtspflanze zu etablieren. Das substomatäre Vesikel ist der Ausgangspunkt für die Besiedelung des Wirtsgewebes.

Von hier aus breiten sich die Hyphen von *Plasmopara viticola* in den Interzellularen des Parenchyms aus, wo sie mit zahlreiche Haustorien die Wirtszellen parasitieren. Das erste Haustorium wird bereits unmittelbar nach dem ersten Kontakt der primären Hyphe mit einer Wirtszelle gebildet. Bis zu diesem Stadium ist *Plasmopara viticola* auf die Nährstoffreserven aus der Zoospore angewiesen. Aus diesem Grund wird vor der Ausbildung des ersten Haustorium der gesamte Zellinhalt an die Spitze der primären Hyphe transportiert. Die Hyphenspitze ist somit das aktive Zentrum des Erregers während dessen Etablierung im Wirtsgewebe (Abb. 13).

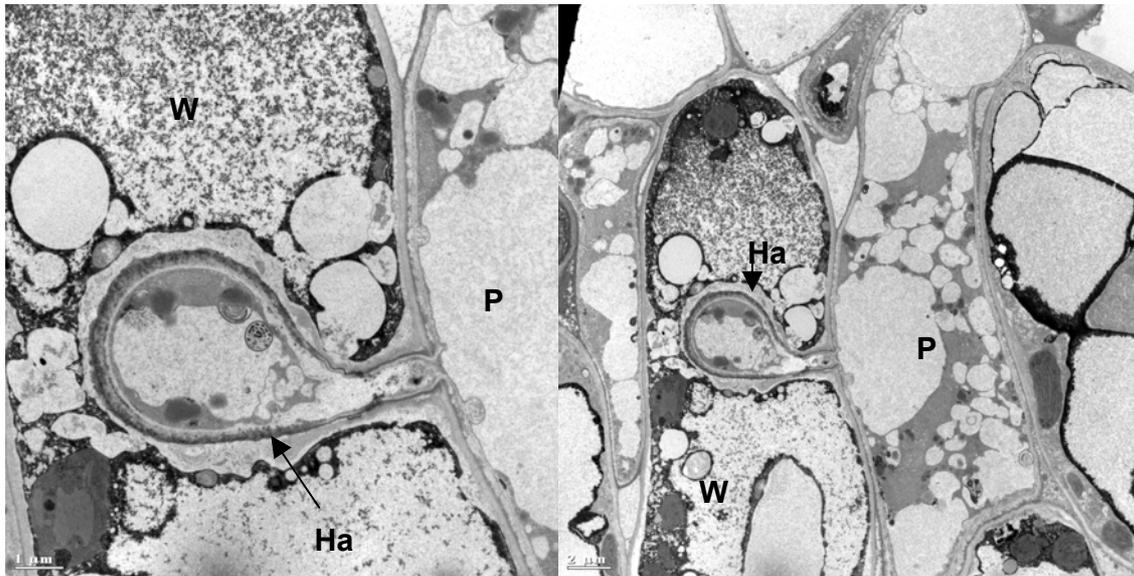
Abb. 13: Aktivitäten des Zytoskeletts während der Etablierung von *Plasmopara viticola*



Das von der primären Hyphe gebildete erste Haustorium spielt eine entscheidende Rolle für den weiteren Fortgang des Infektionszyklus. Die Haustorien von *Plasmopara viticola* wurden in Ultradünnschnitten im Transmissions-Elektronenmikroskop dargestellt (Abb. 14). Deutlich sichtbar wird, dass der Erreger zwar durch die Zellwand eindringt, nicht aber in die Zelle. Die Nährstoffe werden aktiv über die intakte Zellmembran der Wirtszelle aufgenommen.

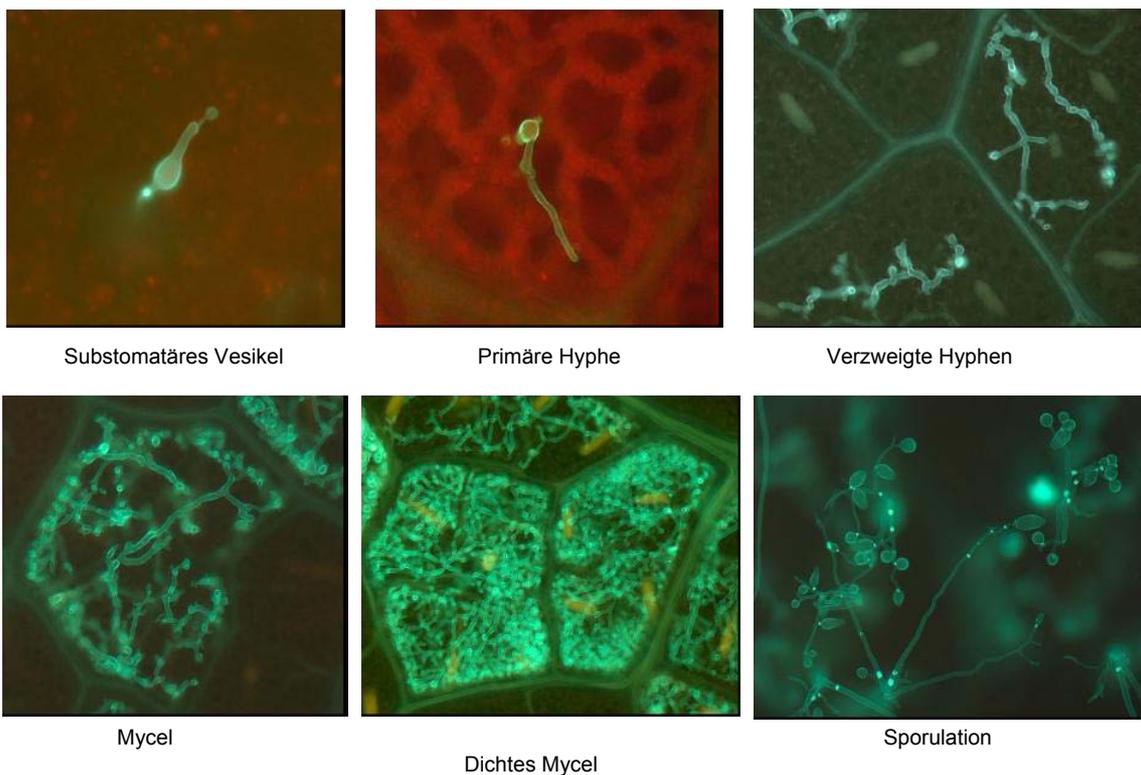
Nur wenn *Plasmopara viticola* sehr rasch Nährstoffe aus den Wirtszellen bezieht, kann das Wirtsgewebe weiter besiedelt werden. Aus diesem Grund verlaufen die ersten Infektionsstadien sehr gezielt und rasch ab. Wenn der Erreger das erste Haustorium gebildet hat, bevor die Nährstoffreserven aus der Spore erschöpft sind, hat er sich erfolgreich im Wirtsgewebe etabliert.

Abb. 14: Haustorium von *Plasmopara viticola*, Ultradünnschnitt, Transmissions-Elektronenmikroskop; P: Hyphe von *Plasmopara viticola*; Zelle von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau; Ha: Haustorium



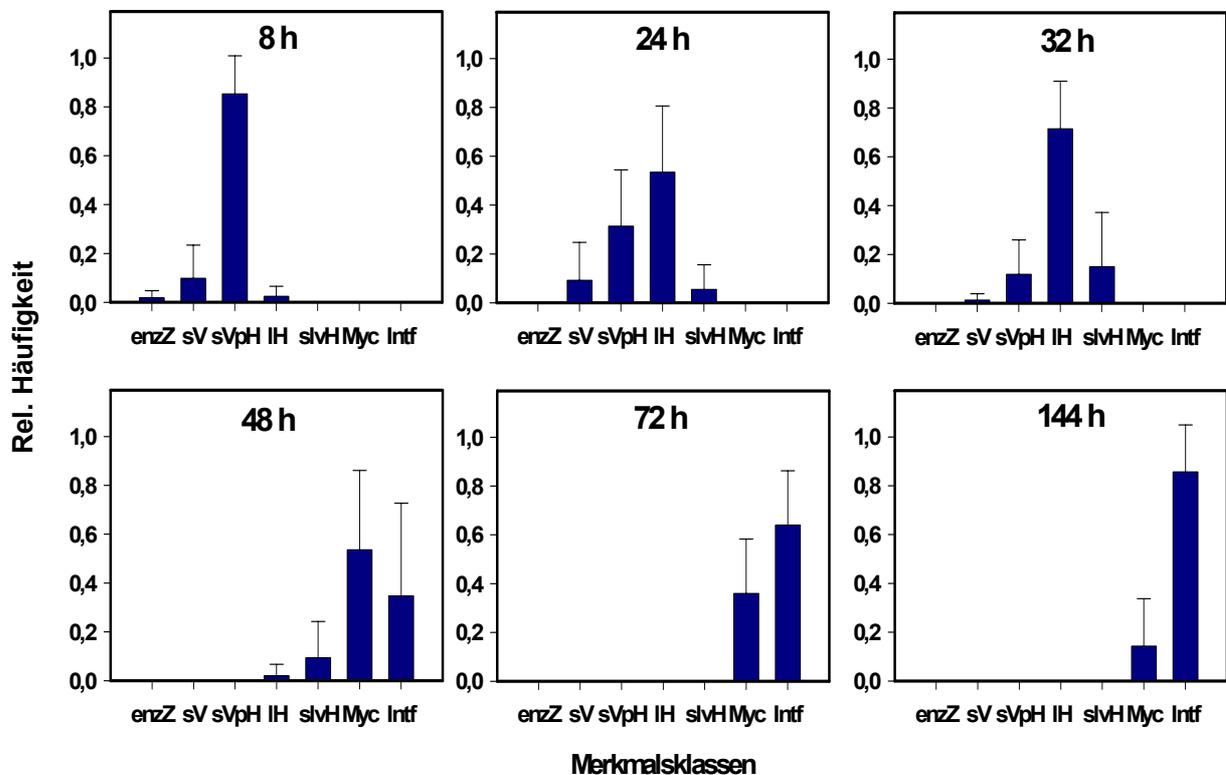
Die Primäre Hyphe wächst in den Interzellularen des Wirtsgewebes. Dort verzweigt sie sich und besiedelt den interzellularen Raum um die Infektionsstelle. Es bildet sich ein Myzel, dessen Ausbreitung in den Blättern durch die Blattadern begrenzt wird. Sobald sich ein dichtes Myzel gebildet hat, das den gesamten interzellularen Raum ausfüllt, beginnt *Plasmopara viticola* mit der Sporulation (Abb. 15).

Abb. 15: Stadien des Besiedelung des Wirtsgewebes; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen



Der zeitliche Ablauf der einzelnen Stadien wurde charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass sich die primäre Hyphe verzögert entwickelt. Erst 24 h nach Inokulation beginnt sich die Hyphe zu verzweigen. Auch nach 32 h ist die Entwicklung von *Plasmopara viticola* noch nicht so zügig vorangeschritten. Nach 48 h beginnt dann eine sehr rasche Besiedelung und es bildet sich innerhalb kurzer Zeit ein dichtes Myzel (Abb. 16).

Abb. 16: Zeitliche Abfolge der Entwicklung von *Plasmopara viticola*; dargestellt ist die relative Häufigkeit der einzelnen Stadien; enzZ: enzystierte Zoospore; sV: substomatäres Vesikel; sVpH: substomatäres Vesikel mit primärer Hyphe; slvH: sehr lange verzweigte Hyphe; Myc: Myzel; Intf: sehr dichtes Myzel



Das zeitliche Muster der Entwicklung von *Plasmopara viticola* korreliert mit der Inkubationszeit. Wenn der Zeitpunkt einer Infektion bekannt ist, kann die Entwicklung von *Plasmopara viticola* im Wirtsgewebe jederzeit auch im Freiland ohne mikroskopische Analyse verfolgt werden. Dies ist möglich, da die einzelnen Entwicklungsschritte dem Ablauf der Inkubationszeit zugeordnet wurden. Die Inkubationszeit wiederum wird anhand des Temperaturverlaufes bestimmt.

2.2.3 Beitrag der Ergebnisse aus Arbeitspaket 1 für das Gesamtprojekt

Die einzelnen Stadien des Infektionszyklus von *Plasmopara viticola* sind charakterisiert. Damit sind die Grundlagen für das zweite Arbeitspaket, die Charakterisierung von Schwachstellen, vorhanden.

2.3 Zweites Arbeitspaket: Charakterisierung von Schwachstellen von *P. viticola* für den Einsatz biogener Wirkstoffe

2.3.1 Ziele

Es werden Schwachstellen im Infektionszyklus von *Plasmopara viticola* ermittelt, die Ansatzpunkte für eine biologische Regulierung ergeben.

Aus der Dynamik der Entwicklungsvorgänge und den strukturellen Eigenschaften des Erregers während der Infektion und Besiedelung können die Schwachstellen des Erregers dargestellt werden. Es ist zu erwarten, dass *Plasmopara viticola* vor allem in den Phasen, in denen strukturelle Veränderungen ablaufen, besonders sensitiv für potentielle biologische Inhibitoren ist.

2.3.2 Ergebnisse

2.3.2.1 Sporulation

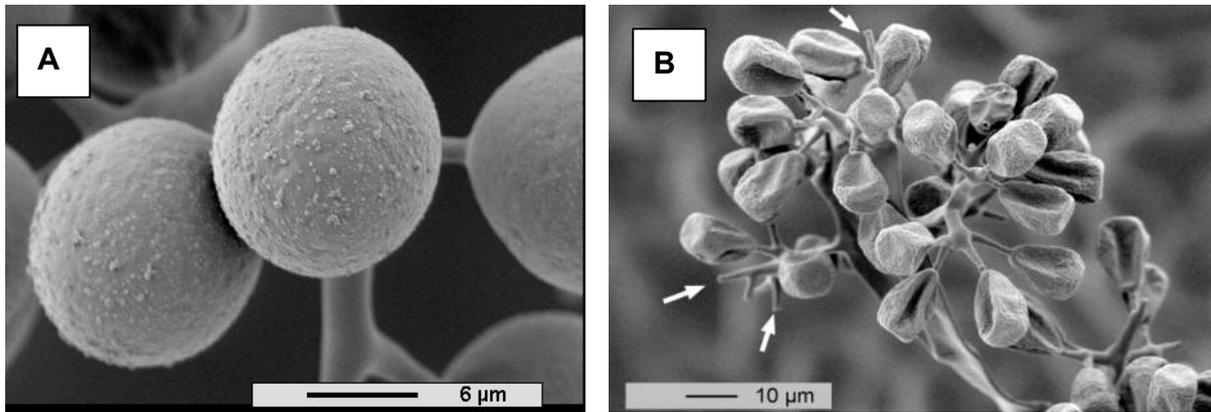
Die Sporulation, das heißt der Austritt der Sporangienträger aus den Spaltöffnungen und die Bildung der Sporangien, verläuft während der Nachtstunden und ist innerhalb von sieben Stunden beendet. Dieser Prozess kann durch äußere Einflüsse gehemmt werden. Durch Variation der Belichtungsverhältnisse oder drastische Verminderung der rel. Luftfeuchtigkeit bilden sich deformierte Sporangien. In der Praxis sind aber derartige Eingriffe nicht zu realisieren.

2.3.2.2 Sporangien

Nach dem Ablösen der Sporangien unmittelbar im Anschluss an die Sporulation sind diese in einem Ruhestadium. Sie sind von einer dichten Zellwand umgeben, die eine Aufnahme von Hemmstoffen erschwert. Die Sporangien scheinen sogar gegen kurzfristige Exposition von Kupfer-Ionen widerstandsfähig zu sein. Diese Widerstandsfähigkeit ist biologisch sinnvoll und kann auf ihre Aufgabe als Verbreitungsorgan zurückgeführt werden. Während des Verbreitungsvorgangs sind Sporangien zahlreichen schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die sie überstehen müssen, damit sich *Plasmopara viticola* erfolgreich verbreiten kann.

Erste Ergebnisse zeigen, dass die Sporangien sogar Austrocknung überstehen. Es scheint, dass die reversibel De- und Rehydrierung der Sporangien eine Überlebensstrategie des Erregers ist, mit der er kurz- bis mittelfristig ungünstige Bedingungen überdauern kann (Abb. 15).

Abb. 15: A: Reife, turgeszente Sporangien; B: Dehydrierte Sporangien; Pfeile: Ablösungsstellen



Aufgrund der Funktion als Ausbreitungsorgan weisen die Sporangien keine Schwachstellen auf, die Ansatz für eine biologische Bekämpfung bieten

2.3.2.3 Zoosporen

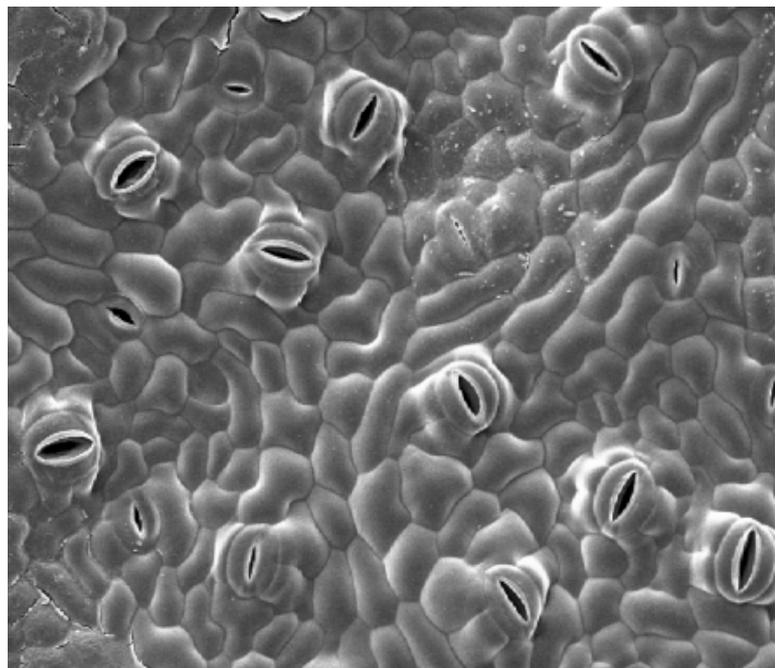
Mit dem Schlupf der Zoosporen ändert sich die Struktur von *Plasmopara viticola* vollständig. Vorher waren die Sporangien von einer Zellwand aus Glucan umgeben, die den Zellinhalt vor Austrocknung und schädlichen Einwirkungen von außen geschützt hat. Die geschlüpften Zoosporen dagegen sind nur von einer Membran umgeben. Dies ermöglicht zwar die Bewegung im Wasserfilm mittels der Geißeln, die Zoosporen sind aber dadurch sehr empfindlich gegen Austrocknung. Außerdem können über die Zellmembran Hemmstoffe sehr viel leichter in die Zoosporen eindringen. Versuche zur Aufnahme von Molekülen haben gezeigt, dass diese von den Zoosporen sehr rasch aufgenommen werden und auch die entsprechende physiologische Wirkung zeigen.

Die Zoosporen sind wegen des Fehlens einer Zellwand nur in Wasser lebensfähig. Austrocknen führt zum sofortigen Absterben der Zoosporen. Unter den im Wasserfilm auf der Pflanzenoberfläche herrschenden osmotischen Verhältnissen sind Zoosporen über länger Zeit stabil. Es konnte gezeigt werden, dass die Zoosporen mittels der Ionen-Kanäle in der Membran gewisse Änderungen in der Ionen Konzentration bzw. des osmotischen Drucks ausgleichen können. Drastische Änderungen des osmotischen Drucks im Medium führen aber zur sofortigen Desintegration der Zelle. Insgesamt sind die Zoosporen sehr empfindlich und nach

den vorliegenden Ergebnissen bieten sie einen guten Wirkort für biogene Hemmstoffe.

Als biotropher Erreger muss *Plasmopara viticola* die Wirtszellen so schnell als möglich parasitieren, da die Nährstoffreserven aus der Spore begrenzt sind. Die Infektionsstrategie des Erregers zielt daher darauf ab, nach dem Schlupf der Zoosporen durch die geöffneten Spaltöffnungen unverzüglich in das Innere der Wirtspflanze einzudringen. Für die Penetration ist kein aufwändiger Satz Zellwandauflösender Enzyme erforderlich, hierdurch werden Stoffwechselaktivitäten eingespart. Allerdings erfordert die Bewegung der Geißeln und das aktive Anlagern an die Spaltöffnungen einen Energieaufwand. Da aber die Dichte der Stomata auf den anfälligen Organen der Weinrebe (junge Blätter, Gescheine, Blüten, junge Beeren) hoch ist (Abb. 16), werden diese innerhalb eines kurzen Zeitraums (Abb. 12) erreicht.

Abb. 16: Spaltöffnungen auf der Blattoberfläche;
Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme



Die Mechanismen der aktiven, gezielten Anlagerung der Zoosporen sind noch nicht geklärt. Möglicherweise spielen Ionen oder organische Verbindungen, die aus den Spaltöffnungen austreten hierbei eine Rolle. Die Anlagerung scheint ein sensibler Prozess zu sein, die für eine Hemmung zugänglich ist.

Die Enzystierung der Zoospore ist mit einer hohen Aktivität der Zelle verbunden. Ausdruck dafür ist die Dynamik des Zytoskeletts, vor allem der Transport von

Vesikeln zur Zellmembran und der Aufbau der Zellwand. Auch dieser Vorgang kann Zielort für biogene Hemmstoffe sein.

2.3.2.4 Penetration der Wirtspflanze

Für das Eindringen in das Wirtsgewebe wird eine Penetrationshyphe gebildet, die ein charakteristisches, intensives Spitzenwachstum aufweist. Hierbei werden Zellkern und der gesamte Zellinhalt an die Hyphenspitze transportiert. Die an der Pflanzenoberfläche übrigbleibende leere Sporenhülle wird durch ein Septum abgetrennt. Dadurch entzieht sich *Plasmopara viticola* allen äußeren Einflüssen. Von diesem Stadium an können weder Austrocknen noch von außen einwirkende Hemmstoffe das Wachstum des Erregers beeinflussen.

2.3.2.5 Etablierung und Besiedelung des Wirtsgewebes

Zur Etablierung des Erregers wird zuerst ein substomatäres Vesikel gebildet, das ein Reservoir für den Zellinhalt und somit auch die Reservestoffe bildet. Die aus dem Vesikel austretende primäre Hyphe muss nun sehr rasch eine Wirtszelle parasitieren, damit *Plasmopara viticola* lebensfähig bleibt. Wachstum der primären Hyphe und Ausbildung des ersten Haustoriums sind durch Hemmstoffe nicht mehr zu beeinflussen. Die Untersuchungen zur zeitlichen Dynamik der Entwicklung von *Plasmopara viticola* zeigen, dass dieses Stadium, im Gegensatz zu den vorhergegangenen, verzögert abläuft. Ein Vergleich mit resistenten *Vitis*-Arten deutet daraufhin, dass in dieser Phase Resistenzreaktionen ablaufen. Bei den anfälligen klassischen Sorten von *Vitis vinifera* setzen die Abwehrreaktionen aber verzögert ein, so dass der Erreger schneller ist. Die Verzögerungsphase des Erregers, die auch bei den anfälligen Sorten auftritt, könnte einen Ansatz für die Induktion der Resistenzantwort durch Resistenzaktivatoren bieten.

Sobald sich die primäre Hyphe verzweigt und weitere Haustorien bildet, beginnt *Plasmopara viticola* mit der Besiedelung des Wirtsgewebes. Dabei wird der gesamte interzelluläre Raum um die Infektionsstelle in kürzester Zeit mit Myzel angefüllt. In diesem Stadium hat sich der Erreger soweit etabliert, dass er selbst von kurativen Fungiziden nicht mehr erfasst wird.

2.3.3 Beitrag der Ergebnisse aus Arbeitspaket 2 für das Gesamtprojekt

Die Zoosporen stellen eine eindeutige Schwachstelle von *Plasmopara viticola* dar. Vom Schlupf bis zur Enzystierung sind sie biogenen Hemmstoffen zugänglich. Sehr wahrscheinlich sind aber auch die Ausbildung der Penetrationshyphe und deren Wachstum ein Ansatzpunkt für die Hemmung. Sobald sich das substomatäre Vesikel ausgebildet und sich durch ein Septum von der Spore auf der Oberfläche abgetrennt

hat, ist keine Wirkung von oberflächlich applizierten biogenen Hemmstoffen mehr zu erwarten. Eine andere Schwachstelle ist die Phase, in der das erste Haustorium gebildet wird und die Parasitierung der Wirtszelle beginnt. Während dieser Zeit ist die Weiterentwicklung des Erregers verzögert. In dieser Zeit scheinen auch anfällige Sorten empfänglich für Resistenzinduktoren zu sein.

2.4 Drittes Arbeitspaket: Prüfung von biogenen Wirkstoffen

2.4.1 Ziele

Pflanzliche Naturstoffe mit potentiell hemmender Wirkung auf *P. viticola* werden ermittelt. Daraus sollen Wirkstoffe ausgewählt werden, die für eine praktische Anwendung geeignet sind.

2.4.2 Ergebnisse

2.4.2.1 Auswahl von Naturstoffen

Es wurde eine Reihe von Verbindungen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und eine Stoffgruppe aus tierischen Zellen betrachtet. Wegen der Kürze der Zeit konzentrierten sich die Arbeiten auf zwei Stoffgruppen:

- Sesquiterpenlactone
- Membranfraktionen

Sesquiterpenlactone (Abb. 17 A) sind Produkte des Isopropanoid-Stoffwechsels; sie kommen in einigen Pflanzenfamilien z.B. in Asteraceen (Korbblütlern) in höheren Konzentrationen vor. Sie besitzen antimikrobielle Wirkung und werden in der Medizin derzeit intensiv erforscht, da sie an entscheidender Stelle in Entzündungsprozesse eingreifen. In dieser Eigenschaft aktivieren sie die Immunantwort, da sie auf Transkriptionsfaktoren, in erster Linie NF- κ B, einwirken. Dieses Element der Signalkaskade als Antwort auf Infektionen liegt auch in Pflanzen vor. Sesquiterpenlactone sind derzeit im klinischen Bereich sehr gut untersucht und eignen sich auch für den Einsatz gegen Erreger von Pflanzenkrankheiten. Erste Wirkungen gegen Oomyceten wurden bereits nachgewiesen. Sesquiterpenlactone sind in Pflanzen weitverbreitet und können in größerem Umfang gewonnen werden.

Einige Bestandteile von Mikroorganismen können Eigenschaften von Membranen verändern, wenn sie auf ein Membransystem gegeben werden. Ihre Wirkung beruht möglicherweise auf einer Veränderung der Eigenschaften von Membranbausteinen. Mit den Membranfraktionen wird eine ganz neuartige Stoffgruppe in die biologische Kontrolle von Erregern von Pflanzenkrankheiten eingebracht. Derzeit werden sie vor

allem für alternative Heilmethoden bei bestimmten Tumorzellen untersucht. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften und ihres Umweltprofils könnten sie aber auch als biogene Hemmstoffe auf *Plasmopara viticola* wirken. Membranfraktionen besitzen eine potentielle Wirkung gegen Mikroorganismen, insbesondere ist eine Wirkung auf die Membran der Zoosporen zu erwarten. Die Stoffgruppe kann leicht aus einer Vielzahl bakterieller Membranen isoliert werden.

Abb. 17: A: Sesquiterpenlacton



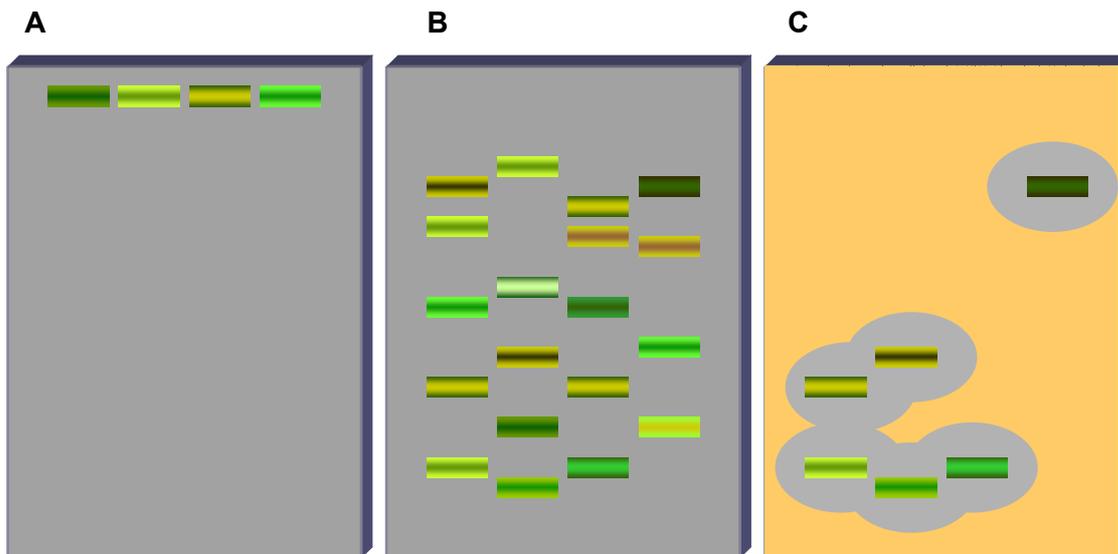
Neben den oben genannten Stoffgruppen wurden noch Lipopolysaccharide bakteriellen Ursprungs, Terpenoide, Flavonoide und weitere Produkte des pflanzlichen Phenylpropanstoffwechsels für die Untersuchungen zusammengestellt. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Substanzen aber nicht näher untersucht werden. Derzeit werden verschiedene Pflanzenarten kultiviert, um daraus Inhaltsstoffe zu extrahieren.

2.4.2.2 Isolierung und Testung von biogenen Hemmstoffen

Aus *Inula viscosa* (Asteraceen) und weiteren Pflanzenarten wurden Rohextrakte hergestellt, die Sesquiterpenlactone enthielten. Dazu wurde getrocknetes Material homogenisiert und mit Äthanol extrahiert. Für den Biotest wurde ein System entwickelt, das Rohextrakte auftrennt und gleichzeitig die Hemmwirkung der einzelnen Fraktionen zeigt. Hierzu wurden die Rohextrakte auf eine Platte mit Kieselgel für Dünnschichtchromatographie aufgebracht. Nach chromatographischer Auftrennung in einem geeigneten Laufmittel wurden die aufgetrennten Fraktionen mit Hilfe von Markersubstanzen detektiert. Anschließend wurden die Platte mit einem Film aus Malzextrakt-Agar beschichtet und mit homogenisiertem Myzel von *Botrytis*

cinerea gleichmäßig beimpft. Nach Inkubation der Platten wurden vorhandene Hemmhöfe um die aufgetrennten Fraktionen ermittelt (Abb. 18).

Abb. 18: Biotest für potentielle Hemmstoffe; A: Auftrag der Rohextrakte; B: Fraktionen nach chromatographischer Auftrennung; C: Hemmhöfe nach Bewuchs der Platten durch den Testorganismus



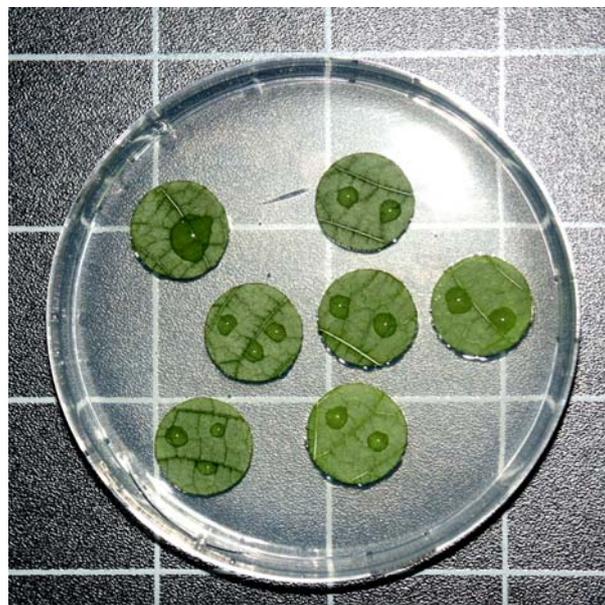
Das Testsystem konnte erfolgreich etabliert werden. Aufgrund der zeitlichen Begrenztheit des Vorhabens liegen noch keine abschließenden Ergebnisse vor. Die Untersuchungen werden aber außerhalb des Vorhabens fortgeführt.

Für die Ermittlung der direkten Wirkung potentieller Hemmstoffe auf die Zoosporen wurde ein mikroskopisches Testverfahren entwickelt. Dafür wurde ein Bildanalyseverfahren installiert und eine spezielle Software entwickelt, mit deren Hilfe die Bewegungsaktivität der Zoosporen (Zoosporen-Motilität) gemessen werden kann. Eine definierte Menge an frisch geschlüpften Zoosporen (Messung der Zoosporendichte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Messkammer) wird mit der Testsubstanz inkubiert. Vom Probeansatz werden mehrere Bildausschnitte mit Hilfe digitaler Videoaufnahmen dokumentiert. Die Ausschnitte werden mit Hilfe der Bildanalyse ausgewertet und die Motilität der Zoosporen als zurückgelegte Strecke in μm je Sekunde gemessen. Mit diesem Verfahren können geringe Änderungen der Motilität erfasst werden und es kann die EC_{50} (effektive Wirkstoff-Konzentration, die eine 50%-ige Änderung hervorruft) gemessen werden. Mit diesem System wurden Membranfraktionen auf ihre Wirkung auf Zoosporen untersucht. Hierzu wurden schwärmende Zoosporen mit verschiedenen Membranfraktionen inkubiert. Unter

dem Mikroskop wurden die Bewegungsaktivität und Veränderung der Zoosporen ermittelt. Alle getesteten Verbindungen führten zum Absterben der Zoosporen. Die Wirkung beruht möglicherweise auf einer Veränderung der Membranstruktur der Zoosporen. Exaktversuche zur Ermittlung der EC_{50} werden fortgeführt.

Als ein weiteres Testsystem für biogene Hemmstoffe wurden Blattscheiben der Sorte Müller-Thurgau verwendet. Die Blattscheiben von 1 cm Durchmesser wurden auf Wasser-Agar gelegt (Abb. 19), darauf wurde eine definierte Menge an Testsubstanz appliziert. Anschließend erfolgte eine Inokulation mit Sporangien von *Plasmopara viticola*, die Dichte betrug 20.000 Sporangien/ml.

Abb. 19: Blattscheiben mit Inokulationstropfen



Nach fünf Tagen wurde die Sporulation hinsichtlich der Dichte des Sporangienrasens bewertet. Die ersten Versuche mit Membranfraktionen auf Blattscheiben zeigten eine Wirkung auf den Erreger.

2.4.2.3 Untersuchungen mit anorganischen Hemmstoffen

Die Untersuchungen zu den Schwachstellen von *Plasmopara viticola* zeigten deutlich auf, dass das Zytoskelett eine zentrale Rolle beim Infektionsprozess spielt. Die Synthese der Elemente des Zytoskeletts und deren Aktivität werden maßgeblich von Ionen, in erster Linie Ca^{++} und Mg^{++} , bestimmt. Überschuss an diesen Ionen, vor allem an Ca^{++} hemmt die Aktivität des Zytoskeletts. Es war zu erwarten, dass dadurch auch die Motilität der Zoosporen und dieENZYSTIERUNG gehemmt wird. Mit der oben (2.4.2.3) beschriebenen mikroskopischen Testmethode und der Auswertung durch Bildanalyse wurden verschiedene Ca- und Mg-Verbindungen geprüft. Es zeigt sich, dass Konzentrationen ab 100 mM den Infektionsprozess

beeinflussen. Allerdings sind diese Verbindungen wasserlöslich, so dass die Ionenkonzentration durch die Blattbenetzung verdünnt bzw. die Verbindungen abgewaschen werden. Derzeit wird versucht, die Ca- bzw. Mg-Verbindungen in organische Träger z.B. pflanzliche Öle, zu verpacken.

2.4.3 Beitrag der Ergebnisse aus Arbeitspaket 3 für das Gesamtprojekt

Es wurden biogene und anorganische Hemmstoffe zusammengestellt, die eine potentiell Wirkung gegen *Plasmopara viticola* aufweisen. Mit den etablierten Testsystemen kann nun eine große Palette an sekundären Pflanzenstoffen und anorganischen Verbindungen getestet werden. Ein weiterer Aspekt ist die Verpackung der Hemmstoffe, insbesondere der wasserlöslichen, um die Wirkung zu verbessern.

3 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

3.1 Arbeitspaket 1

Die Aufgaben des ersten Arbeitspakets, Untersuchungen zur Infektionsbiologie von *Plasmopara viticola*, um Schwachstellen im Infektionszyklus des Erregers zu definieren, konnten erfüllt werden. Mit diesen Arbeiten konnte das erste Mal Einblick in die Vorgänge gewonnen werden, die im Inneren der Wirtspflanze während der Infektion und Besiedelung ablaufen. Außerdem ergaben die cytologischen Studien neue Einblicke in zelluläre Abläufe während der Infektion. Die Untersuchungen waren arbeits- und zeitaufwändig und erforderten den Einsatz neuester Methoden z.B. Immunofluoreszenz, Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie und elektronenmikroskopischer Verfahren wie Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie. Die Ergebnisse bieten eine solide Grundlage für die Definition von Schwachstellen des Erregers, die für biologische Bekämpfungsverfahren genutzt werden können

3.2 Arbeitspaket 2

Im Arbeitspaket zwei wurden Schwachstellen definiert, die einen Ansatz für biogene Hemmstoffe bieten. Es wurden aber auch bestimmte Stadien von *Plasmopara viticola* gefunden, die durch anorganische Verbindungen gehemmt werden können. Die Definition der Schwachstellen hat aber nicht nur für die gezielte Suche nach Hemmstoffen und deren Prüfung eine große Bedeutung, sondern auch für die praktische Anwendung wirksamer Substanzen. Wegen des begrenzten Zeitrahmens des Vorhabens waren weitergehende Untersuchungen zu den Schwachstellen nicht mehr möglich. Die zeitliche Einordnung der einzelnen Entwicklungsschritte von *Plasmopara viticola* erlaubt nun auch die gezielte Anwendung von biologischen

Bekämpfungsverfahren, um die Schwachstellen des Erregers zu treffen. Dieses Schema ist auch für den praktischen ökologischen Weinbau für die termingerechte Bekämpfung der Rebenperonospora von großer Bedeutung und kann nun zusammen mit dem vorhandenen Prognosesystem genutzt werden.

3.3 Arbeitspaket 3

Es konnten drei unterschiedliche Testverfahren etabliert werden, die es erlauben, biogene und anorganische Hemmstoffe zu prüfen. Insbesondere das erste Verfahren zum Auftrennen und gleichzeitigem Testen der Wirkung ist geeignet, eine Vielzahl von Substanzen zu prüfen. Es hat sich gezeigt, dass nicht nur eine Reihe verschiedener Vertreter einer Stoffgruppe geprüft werden muss, sondern von jeder Substanz muss die wirksame Dosis (EC_{50}) ermittelt werden. Nur dann liegen ausreichend Ergebnisse vor, die als Grundlage für eine Weiterentwicklung für die Praxis notwendig sind. Außerdem ist es sinnvoll, potentielle Hemmstoffe in mehreren Testsystemen, wie sie nun vorliegen, zu prüfen. Auf diese Weise ist es möglich, die Wirkungsweise und den Wirkort der Hemmstoffe näher zu ermitteln. Neben der reinen Wirksamkeit spielt aber auch die Stabilität und die Haftung der Hemmstoffe auf der Oberfläche bzw. die Aufnahme durch den Erreger eine Rolle. Hier wurden verschiedene Verfahren z.B. die Formulierung mit pflanzlichen Ölen geprüft. Die Methodenentwicklung und die Auswahl geeigneter Naturstoffe einschließlich der Formulierungssubstanzen nahmen einige Zeit in Anspruch. Daher konnte aus zeitlichen Gründen die Prüfung von Substanzen nicht zum Abschluss gebracht werden.

3.4 Zeitlicher Rahmen

Der zeitliche Rahmen des Projektes von 16 Monaten war zu knapp, um alle potentiellen Hemmstoffe ausreichend zu prüfen. Dennoch kann von einem erfolgreichen Abschluss des Vorhabens gesprochen werden, da nun eine Basis für weiterführende Arbeiten vorhanden ist.

4 Aufarbeitung und Darstellung der Ergebnisse für die beabsichtigte Zielgruppe

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden für die Ausarbeitung von Präsentationen verwendet. Diese Präsentationen wurden bereits für Schulungen von Praktikern und Beratern des ökologischen Weinbaus genutzt. Außerdem ist eine Reihe von Veröffentlichungen zu diesem Thema geplant. Im Laufe des Jahres ist ein Seminar für Betriebsleiter und Führungspersonal aus dem ökologischen Weinbau

vorgesehen. Zu diesem Anlass werden die Ergebnisse aus dem Vorhaben vorgestellt und die weiterführenden Arbeiten besprochen.

Im Verlauf des Vorhabens hat sich gezeigt, welche Bedeutung die potentiellen biologischen Verfahren bzw. Hemmstoffe für die Praxis des ökologischen Weinbaus haben. Daher werden die begonnenen Versuche und Prüfungen in Absprache mit Vertretern des ökologischen Weinbaus und dem Beratungsdienst ökologischer Weinbau fortgeführt.

5 Konsequenzen des Projektes

5.1 Ansätze zur biologischen Bekämpfung

Die Ausnutzung von Schwachstellen des Erregers ist ein ganz neuer Ansatz bei der biologischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten. Vorbedingung hierfür ist aber eine eingehende wissenschaftliche Untersuchung des Erregers. Die gewonnenen Erkenntnisse werden bereits der Praxis im ökologischen Weinbau vermittelt. Die im Rahmen des Vorhabens gewonnenen Erkenntnisse einschließlich des Bildmaterials sind bestens für Praxisschulungen geeignet.

5.2 Testsystem für Hemmstoffe

Es hat sich gezeigt, dass ein dreistufiges Testsystem für biogene und anorganische Hemmstoffe die Voraussetzung für die Entwicklung von biologischen Verfahren zur Bekämpfung von Krankheiten im ökologischen Weinbau ist. Mit diesen Testsystemen lassen sich kostspielige Freilandversuche mit ungeprüften Substanzen vermeiden. Neben den im Vorhaben entwickelten Verfahren zur Prüfung der Hemmwirkung stehen zusätzlich noch Verfahren zur Prüfung der Resistenzinduktion zur Verfügung. Mit der Kombination der Testsysteme können nun Pflanzenstärkungsmittel von solchen Präparaten mit reiner Hemmwirkung unterscheiden.

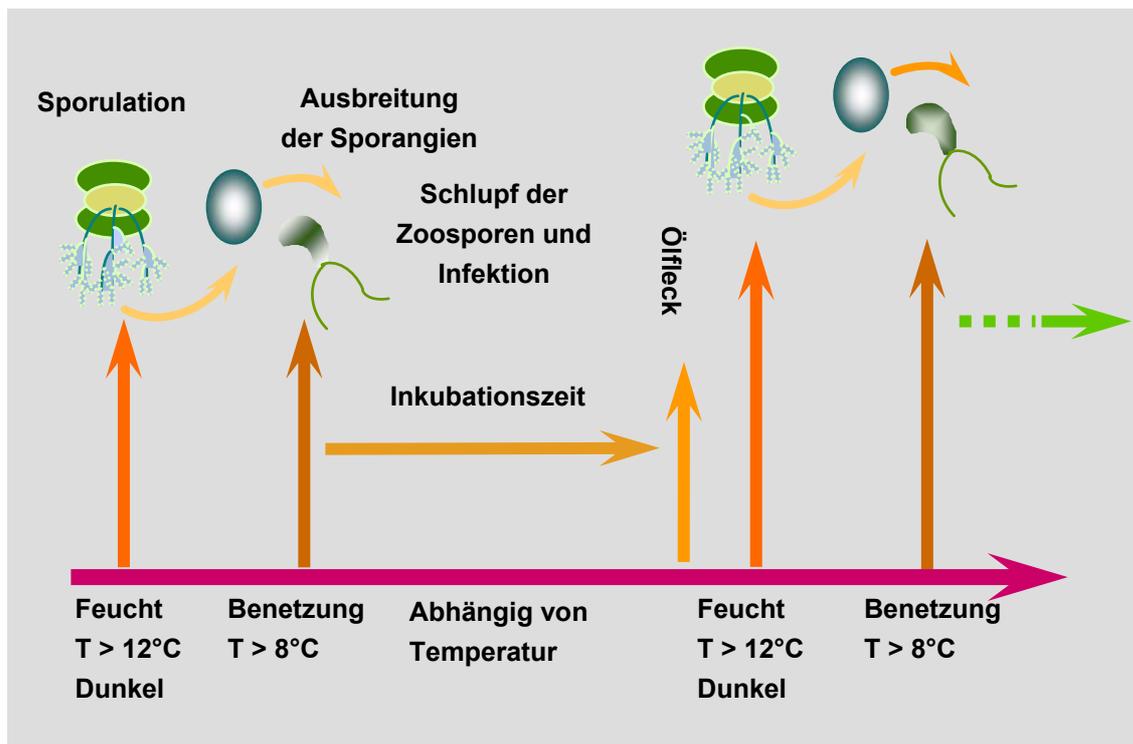
5.3 Potentielle Hemmstoffe

Die aufgeführten Substanzen sollten unbedingt weiterverfolgt werden, da sie ein Potential als biologische Präparate aufweisen. Allerdings ist es unbedingt erforderlich, diese Substanzen zu formulieren. Nach den in dem Vorhaben gewonnenen Erkenntnissen ist eine eingehende Prüfung dieser Substanzen im Labor und Freiland erforderlich, bevor sie zur Praxisreife kommen können.

5.4 Anwendung von potentiellen Hemmstoffen

Für die zukünftige Anwendung potentieller Hemmstoffe liegt nun ein Verfahren vor, den optimalen Zeitpunkt der Applikation zu ermitteln. Dies ist in Kombination mit dem am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg entwickelten Prognosemodell und dem Infektionszyklus mit den Schwachstellen möglich (Abb. 20).

Abb. 20: Infektionszyklus mit den einzelnen Stadien



Dabei werden Wetterdaten aus einem Netz von Wetterstationen über eine Datenbank erfasst. Aus den Daten werden die in Abb. 20 aufgeführten Bedingungen für die einzelnen Phasen des Infektionszyklus und der Ablauf der Inkubationszeit ermittelt. Die Datenbank und das Programm zur Berechnung von Infektions- und Sporulationsbedingungen sowie der Inkubationszeit sind Bestandteil des am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg entwickelten Prognoseverfahrens. Aus den Informationen des Prognoseprogramms kann der Stand der einzelnen Phasen des Infektionskreislaufs und somit die Schwachstellen abgeleitet werden.

Datenbank und Prognosemodell sind zur Praxisreife entwickelt und stehen ab Frühjahr 2004 dem ökologischen Weinbau in Baden-Württemberg in einer ersten Erprobungsphase zur Verfügung.

6 Entscheidungsbedarf

Bisher werden Präparate für die biologische Bekämpfung von Krankheiten der Weinrebe nicht unter kontrollierten Bedingungen geprüft. Es erfolgt lediglich, und das nicht in allen Fällen, eine Freilandprüfung. Hierbei werden keine Kenntnisse darüber gewonnen, ob es sich um einen Hemmstoff, der gegen den Erreger gerichtet ist, handelt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird für Präparate für den biologischen Pflanzenschutz im Weinbau folgendes Prüfschema vorgeschlagen:

1. Prüfung der Hemmwirkung nach dem im Vorhaben entwickelten Prüfverfahren
2. Zusätzliche Prüfung der resistenzinduzierenden Wirkung nach dem am Staatlichen Weinbauinstitut erarbeiteten Testsystem für Resistenzinduktoren

Mit diesem Prüfschema kann eindeutig eingeordnet werden, ob es sich um einen Hemmstoff oder Resistenzinduktor („Pflanzenstärkungsmittel“) handelt. Außerdem wird hierdurch die Grundlage für gezielte weitere Prüfungen der Wirksamkeit unter Praxisbedingungen geschaffen.

7 Zusammenfassung

Im ökologischen Weinbau sind Alternativen für Kupfer zur Bekämpfung der Rebenperonospora dringend erforderlich. Verfahren zur biologischen Bekämpfung sind erwartungsgemäß dann am erfolgreichsten, wenn sie an einer Schwachstelle des Erregers ansetzen. Zur Charakterisierung von Schwachstellen im Infektionszyklus der Rebenperonospora (*Plasmopara viticola*) wurden mikroskopische und zellbiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnten die einzelnen Phasen des Zyklus dargestellt und ihr zeitlicher Ablauf ermittelt werden. Schwachstellen wurden vor allem während des Infektionsprozess vor dem Eindringen des Erregers in die Pflanze gefunden. In dieser Phase liegen Zoosporen vor, die sehr empfindlich auf natürliche Hemmstoffe reagieren. Die cytologischen Untersuchungen wiesen auf die bedeutende Rolle des Zytoskeletts während des Schwärmvorgangs der Zoosporen, deren Anlagerung an die Spaltöffnung und bei der Ausbildung einer Penetrationshyphe hin. Dieser Vorgang kann ebenfalls durch Naturstoffe inaktiviert werden.

Es wurden Testsysteme erarbeitet, mit deren Hilfe Naturstoffe und anorganische Verbindungen auf ihre hemmende Wirkung gegenüber *Plasmopara viticola* untersucht werden können. Die Testsysteme erlauben eine Quantifizierung der Hemmwirkung und ermöglichen die Prüfung von Substanzen in größerem Umfang.

Schwerpunkt der Suche nach potentiellen Hemmstoffen waren Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze und Bestandteile von tierischen und bakteriellen Membransystemen. Von den pflanzlichen Substanzen erwies sich die Stoffklasse der Sesquiterpenlactone als äußerst interessant. Bei den Bausteinen von Membransystemen sind Membranfraktionen und Lipopolysaccharide erfolgversprechend. Aufgrund der Arbeiten zum Zytoskelett zeigte sich, dass Calcium- und Magnesium-Verbindungen potentielle Hemmstoffe sein können. Hier bereitet die Wasserlöslichkeit noch einige Schwierigkeiten für die praktische Anwendung.

Für die Registrierung von Präparaten zur biologischen Bekämpfung der Rebenperonospora wurde ein Prüfschema vorgeschlagen, das eine Differenzierung in Hemmstoffe, die auf den Erreger einwirken, und in Resistenzinduktoren („Pflanzenstärkungsmittel“) ermöglicht.