

Nicolai Haag
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau
Geilweilerhof

Grapevine Trunk Diseases:
Epidemiologie und
Molekulardiagnose wichtiger
Esca-Erreger während der
Pflanzguterzeugung



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Nicolai Walter Haag
Rheinstraße 12
76829 Landau in der Pfalz

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.julius-kuehn.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-074-6
DOI 10.5073/dissjki.2018.006

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



Aus dem Institut für Phytomedizin
Universität Hohenheim
Fachgebiet Phytopathologie
Prof. Dr. Ralf T. Vögele

**Grapevine Trunk Diseases:
Epidemiologie und Molekulardiagnose wichtiger
Esca-Erreger während der Pflanzguterzeugung**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt
der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Nicolai Walter Haag
aus Bad Neustadt an der Saale

2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 18.05.2018 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2018

Dekan: Prof. Dr. Ralf T. Vögele
Leiter der Prüfung: Prof. Dr. Thilo Streck
Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Ralf T. Vögele
Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. Michael Fischer
3. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Claus P. W. Zebitz

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte am Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, im Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau am Standort Siebeldingen. Die Arbeit wurde über das Forschungsprojekt „Pflanzmaterial als eine mögliche Infektionsquelle der Esca-Krankheit der Weinrebe: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie des Erregers *Phaeomonelia chlamydospora* im Bereich Rebschule“ vom Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) finanziell gefördert.



INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung.....	VII
Summary.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Weinreben (<i>Vitis</i>).....	1
1.1.1 Kulturrebe (<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>).....	1
1.1.2 Bedeutung weiterer <i>Vitis</i> -Arten für den Weinbau.....	2
1.2 Holzkrankheiten der Weinrebe („Grapevine Trunk Diseases“).....	3
1.3 Esca-Krankheit der Weinrebe.....	5
1.3.1 Bedeutung im Weinbau.....	5
1.3.2 Symptomatik, Ätiologie und Epidemiologie.....	6
1.3.3 Esca an Jungreben („Petri disease“).....	11
1.4 Pflanzguterzeugungsprozess & Vorkommen von GTD-Erregern.....	13
1.5 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Probenmaterial aus den Rebschulen.....	18
2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Puffer.....	21
2.1.3 Geräte & Software.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Probennahmen in den Rebschulen.....	22
2.2.2 Visuelle Bonitur des Unterlagen- und Edelreisholzes.....	25
2.2.3 Probenaufbereitung für den PCR-basierten Erregernachweis.....	26
2.2.3.1 Unterlagenholz.....	26

2.2.3.2	Tauchbäder.....	26
2.2.3.3	Vortriebssubstrate.....	27
2.2.3.4	Sporenfallen.....	28
2.2.4	PCR-basierter Erreger-Nachweis	29
2.2.4.1	<i>Pch</i> -spezifische nested PCR	30
2.2.4.2	Multiplex nested PCR.....	31
2.2.5	Einfluss der Erreger auf die Symptomentwicklung im Unterlagenholz	34
2.2.6	Einfluss der Witterung auf den Sporenflug in Freilandflächen	34
2.2.7	Statistische Auswertung & Darstellung des Symptom- /Erregerauftretens.....	35
2.2.8	Pilzisolierung und Identifikation der Isolate aus Rebschulproben.....	36
2.2.8.1	Herstellung des Nährmediums	36
2.2.8.2	Isolierung und Kultivierung auf Nährmedium	36
2.2.8.3	Identifikation der Pilzisolate	38
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Visuelle Befallsituation des Unterlagen- und Edelreisholzes	40
3.1.1	Unteralagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess	40
3.1.2	Unteralagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts.....	47
3.1.3	Edelreisholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess und des verkaufsfertigen Pflanzguts	49
3.2	Pathogen-Nachweis in Unterlagenholz	52
3.2.1	<i>Pch</i> -Nachweis mittels nested PCR.....	52
3.2.1.1	Unteralagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess	52
3.2.1.2	Unteralagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts.....	54
3.2.2	Nachweis von <i>Pch</i> und anderer GTD-Erreger durch multiplex nested PCR.....	54
3.2.2.1	Unteralagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess	56
3.2.2.2	Unteralagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts.....	63
3.3	Erregereinfluss auf die Symptomentwicklung in Unterlagenholz	65
3.4	Infektionsquellen während der Pflanzguterzeugung.....	66
3.4.1	Tauchbäder.....	66

3.4.2	Vortriebssubstrate.....	68
3.4.3	Sporenfallen.....	70
3.5	Identifikation von Pilzisolaten.....	74
4	Diskussion	79
4.1	Symptomentwicklung und Erregernachweis in Rebholz.....	79
4.1.1	Symptom- vs. Erregerauftreten	79
4.1.2	Einfluss der Erreger auf die Entwicklung von Holzsymptomen	81
4.1.3	GTD-Erreger in asymptomatischem Rebholz	82
4.1.4	Symptomauftreten ohne Nachweis der GTD-Erreger	83
4.1.5	Symptomauftreten – Apikal- vs. Basalbereich der Unterlagen.....	84
4.1.6	Sortenunterschiede im Symptom- und Erregerauftreten.....	84
4.2	Betriebsbedingte Einflüsse auf den Erregerbefall in Unterlagen	86
4.2.1	Abläufe in den Betrieben.....	86
4.2.1.1	Tauchbäder.....	86
4.2.1.2	Vortriebssubstrate.....	87
4.2.2	Freilandphase	88
4.2.2.1	Luft.....	88
4.2.2.2	Rebschulboden	89
4.3	Molekularbiologischer Nachweis vs. Lebendnachweis.....	90
4.4	Mögliche Bekämpfungsmaßnahmen in der Pflanzguterzeugung	91
4.4.1	Vermehrungsmaterial.....	92
4.4.2	Tauchen.....	92
4.4.3	Vortreiben und Einschulen	94
4.4.4	Freilandphase und Ausschulen	95
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	95
5	Literaturverzeichnis	97
6	Anhang.....	110
	Danksagung.....	119
	Eidesstattliche Versicherung	121
	Lebenslauf	123

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Esca-typische Symptome an Ertragsreben	9
Abbildung 2: Esca bzw. „Petri disease“-Symptome im Holzquerschnitt	13
Abbildung 3: Schema der Pflanzguterzeugung	15
Abbildung 4: Probennahmen in den Rebschulen.....	24
Abbildung 5: Pflanzguterzeugungsprozess und Zeitpunkte der Probennahmen	25
Abbildung 6: Symptomatisches und asymptomatisches Unterlagenholz.....	40
Abbildung 7: Anteil der Unterlagenproben mit Esca-typischen Holzsymptomen während der Pflanzguterzeugung	42
Abbildung 8: Anteil der Unterlagenproben mit Esca-typischen Holzsymptomen bei verkaufsfertigem Pflanzgut	47
Abbildung 9: Anteil der Edelreisproben mit Esca-typischen Holzsymptomen vom Vortreiben bis zum Verkauf des Pflanzguts	50
Abbildung 10: <i>Pch</i> -Nachweis im Unterlagenholz während der Pflanzguterzeugung	53
Abbildung 11: <i>Pch</i> -Nachweis im Unterlagenholz verkaufsfertiger Pfropfreben	54
Abbildung 12: Sensitivität der multiplex nested PCR	55
Abbildung 13: Nachweis von <i>Pch</i> , <i>Pm</i> spp. und <i>Clo</i> im Unterlagenholz während der Pflanzguterzeugung.....	57
Abbildung 14: Nachweis von <i>Pch</i> , <i>Pm</i> spp. und <i>Clo</i> im Unterlagenholz verkaufsfertiger Pfropfreben.....	63
Abbildung 15: Sporenflug 2014 mit Klimadiagramm	71
Abbildung 16: Sporenflug 2015 mit Klimadiagramm	72
Abbildung 17: Sporenflug 2016 mit Klimadiagramm	73
Abbildung 18: Pilzisolat verschiedener GTD-Erreger auf PDA-Medium	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auswahl weinbaulich relevanter Unterlagensorten in Europa.....	2
Tabelle 2: Primer für den Nachweis von <i>Pch</i> , <i>Clo</i> und <i>Pm</i> spp.....	29
Tabelle 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - SuperHot Taq PCR Kit.....	30
Tabelle 4: PCR-Programme - <i>Pch</i> -spezifische nested PCR	31
Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit....	32
Tabelle 6: PCR-Programme - multiplex nested PCR	32
Tabelle 7: Proben aus den Rebschulen und das jeweils angewandte PCR-Verfahren	33
Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - KAPA HiFi™ HotStart PCR Kit	38
Tabelle 9: PCR-Programm - Amplifikation der ITS-Region	38
Tabelle 10: Vergleich des Symptomauftritts im Unterlagenholz zwischen den Rebschulen sowie zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich während der Pflanzguterzeugung	43
Tabelle 11: Vergleich des Symptomauftritts zwischen Unterlagensorten im apikalen und basalen Unterlagenbereich während der Pflanzguterzeugung	45
Tabelle 12: Vergleich des Symptomauftritts im Unterlagenholz zwischen den Rebschulen sowie zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich bei verkaufsfertigem Pflanzgut.....	48
Tabelle 13: Vergleich des Symptomauftritts zwischen Unterlagensorten im apikalen und basalen Bereich bei verkaufsfertigem Pflanzgut.....	48
Tabelle 14: Vergleich des Symptomauftritts im Edelreisholz zwischen den Rebschulen vom Vortreiben bis zum Verkauf des Pflanzguts	50
Tabelle 15: Nachweisrate von <i>Clo</i> , <i>Pch</i> und <i>Pal</i> und deren möglichen Kombinationen.....	55
Tabelle 16: Vergleich des Erregervorkommens im Unterlagenholz zwischen und innerhalb der Rebschulen während der Pflanzguterzeugung	59
Tabelle 17: Vergleich des Erregervorkommens zwischen Unterlagensorten während der Pflanzguterzeugung.....	61
Tabelle 18: Vergleich des Erregervorkommens im Unterlagenholz zwischen und innerhalb der Rebschulen bei verkaufsfertigem Pflanzgut.....	63
Tabelle 19: Vergleich des Erregervorkommens zwischen Unterlagensorten bei verkaufsfertigem Pflanzgut	64
Tabelle 20: Symptomentwicklung in Abhängigkeit verschiedener Befallssituationen	65
Tabelle 21: Vorkommen von <i>Pch</i> , <i>Pm</i> spp. und <i>Clo</i> in Tauchbädern	67
Tabelle 22: Vorkommen von <i>Pch</i> , <i>Pm</i> spp. und <i>Clo</i> in Vortriebssubstraten	69
Tabelle 23: Pilzisolat aus den Rebschulen	75
Tabelle 24: Detailübersicht über die Proben der Rebschulen in den Jahren 2014-2016.....	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BP	<u>B</u> odenprobe
bp	engl.: <u>b</u> ase <u>p</u> airs (Basenpaare)
<i>Clo</i>	<u>C</u> adophora <u>l</u> uteo- <u>o</u> livacea
ddH ₂ O	engl.: <u>d</u> ouble <u>d</u> istilled H ₂ O (zweifach destilliertes Wasser)
DNA	engl.: <u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	engl.: Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EF	<u>E</u> nde der <u>F</u> reilandphase
ER	<u>E</u> del <u>r</u> eis
<i>Fmed</i>	<u>F</u> omitiporia <u>m</u> editerranea
GTD	engl.: <u>g</u> rapevine <u>t</u> runk <u>d</u> isease (Holzkrankheit der Weinrebe)
ITS	<u>i</u> nternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pac <u>e</u> r
MF	<u>M</u> itte der <u>F</u> reilandphase
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation
<i>Pal</i>	<u>P</u> haeoacrem <u>o</u> nium <u>a</u> leophilum
<i>Pch</i>	<u>P</u> haeomoniella <u>c</u> hlamydosp <u>o</u> ra
PCR	engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	engl.: <u>p</u> otato <u>d</u> extrose <u>a</u> gar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
<i>Pm</i>	<u>P</u> haeoacrem <u>o</u> nium
rDNA	engl.: <u>r</u> ibosomal <u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
rpm	engl.: <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	engl.: <u>r</u> ibosomal <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RS	<u>R</u> eb <u>s</u> chule
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SF	<u>S</u> poren <u>f</u> alle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cet <u>a</u> t- <u>E</u> DTA
TB	<u>T</u> auch <u>b</u> ad
U	<u>U</u> nit (Enzymeinheit)
UH	<u>U</u> nterlagen <u>h</u> olz
UL	<u>U</u> nter <u>l</u> age
VE	<u>V</u> erkauf des Pflanzguts
VM	<u>V</u> ermehrungs <u>m</u> aterial
VT	<u>V</u> ort <u>r</u> eiben
VTS	<u>V</u> ort <u>r</u> iebs <u>s</u> ubstrat

ZUSAMMENFASSUNG

Esca gehört weltweit zu den bedeutendsten Holzkrankheiten (engl. grapevine trunk diseases (GTDs)) der Weinrebe. In Europa werden die holzbewohnenden Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pch*) und *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) als Hauptverursacher der Krankheit betrachtet. Bereits junge Rebanlagen und Pflanzgut können von Erregern der Esca betroffen sein. Bisherige Kontrollmöglichkeiten beschränken sich hauptsächlich auf vorbeugende Maßnahmen wie Vermeidung größerer Schnittwunden, Stressreduktion erkrankter Stöcke und Vernichtung von Totholz. Eine biologische Bekämpfung ist mittlerweile prinzipiell möglich, ihre Wirksamkeit ist in der Praxis bislang jedoch nicht eindeutig belegt.

In Bezug auf die Befallssituation in Pflanzmaterial, wiesen bisherige Untersuchungen in Deutschland auf *Pch* als womöglich wichtigsten Verursacher einer Frühinfektion in der Pflanzguterzeugung hin. Ziel dieser Arbeit war daher eine umfassende Erfassung des Vorkommens von *Pch* und weiterer GTD-Erreger in Rebholz, von potenziellen Infektionsquellen sowie die Bonitur Esca-typischer Symptome in Unterlagen und Edelreiser während der Pflanzgutproduktion; sowohl während der innerbetrieblichen Abläufe als auch in der bisher kaum erfassten Freilandphase. Anhand der gewonnenen Daten sollten schließlich mögliche Kontrollmaßnahmen aufgezeigt werden.

Im Zeitraum von 2014 bis 2016 wurden hierfür regelmäßig visuelle Bonituren von Esca-assoziierten Symptomen im Rebholz dreier Rebschulen über den gesamten Pflanzguterzeugungsprozess bis hin zu verkaufsfertigem Pflanzgut durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen zum Erregervorkommen mittels nested PCR und Kulturmaßnahmen konzentrierten sich auf das erfahrungsgemäß stärker betroffene Unterlagenholz und beschränkten sich zunächst auf den Erreger *Pch*. In allen Untersuchungsjahren zeigte sich im Laufe der Pflanzguterzeugung in Edelreisern und Unterlagen eine starke Zunahme des visuellen Befalls. Im Vergleich dazu lagen die PCR- und kultivierungsbasierten Nachweise von *Pch* im Unterlagenholz wesentlich niedriger, sodass hier eine deutliche Diskrepanz zwischen sichtbarem Befall und der tatsächlichen Erregerpräsenz zu beobachten war. Interessanterweise ließ sich ein anfänglich unberücksichtigter Pilz, *Cadophora luteo-olivacea* (*Clo*), der mittlerweile als ein weiterer GTD-Erreger vermutet wird, auffällig häufig aus symptomatischen Unterlagen isolieren. Darauf basierend wurde daher ein multiplex nested PCR-Verfahren entwickelt, das den Nachweis von *Pch*, *Clo* sowie Vertretern der Esca-

relevanten Gattung *Phaeoacremonium* (*Pm*) ermöglicht. Mit diesem Verfahren konnten *Pch* und *Pm* spp. im Bereich Unterlagen bei ca. 9% bzw. 15% der Proben festgestellt werden (Durchschnitt aus allen Rebschulen und Untersuchungsjahren), wohingegen *Clo* mit einer durchschnittlichen Nachweisrate von ca. 78% vergleichsweise sehr häufig nachzuweisen war. Dadurch war es möglich, die bislang beobachteten Unstimmigkeiten zwischen Symptom- und Erregervorkommen größtenteils miteinander in Einklang zu bringen. In Bezug auf Pathogenbefall und Holzsymptomatik konnten zu einzelnen Zeitpunkten der Probennahme zwar signifikante Unterschiede zwischen den Rebschulen beobachtet werden, insgesamt stellten sich die Befallssituationen aber recht ähnlich dar.

Im Laufe der Pflanzguterzeugung wurden darüber hinaus Untersuchungen zur Identifikation potenzieller Infektionsquellen vorgenommen. Einbezogen wurden unterschiedliche Tauchbäder und Vortriebssubstrate, Bodenproben aus Freilandflächen sowie dort angebrachte Sporenfallen zur Überwachung des Sporenflugs. Die verwendeten Untersuchungsmethoden umfassten hierbei das multiplex nested PCR-Verfahren und Kultivierungsmaßnahmen. Den Befunden zufolge waren *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* sowohl in der Luft als auch in Tauchbädern und Vortriebssubstraten zu finden, wobei *Clo* in allen Bereichen durchweg dominierte.

Lebendnachweise für *Pch* und *Pm* spp. konnten des Weiteren aus Unterlagenholz, für *Clo* zusätzlich aus Tauchbädern, Vortriebssubstraten und Rebschulboden erbracht werden. Diese entsprachen für *Pch* und *Clo* jedoch gerade einmal etwa 9% der Nachweisrate des multiplex nested PCR-Verfahrens, für *Pm* spp. sogar nur ca. 2%.

Die Untersuchungen ermöglichten einen umfassenden und in Teilen bislang unbekanntem Einblick in die Befallssituation von Rebenpflanzgut bezüglich *Pch* und anderen Esca-relevanten Erregern und liefern konkrete Hinweise auf die möglichen Infektionsquellen während der Pflanzguterzeugung. Insgesamt unterstreichen sie die mögliche Rolle von vorinfiziertem Pflanzgut bei der Entstehung und Ausbreitung der Esca-Krankheit.

Im Sinne einer gezielten Kontrolle von Esca und assoziierten Krankheiten bilden die gewonnenen Ergebnisse eine wichtige Grundlage zur Überprüfung der Wirksamkeit und Praxistauglichkeit bereits bestehender bzw. neu zu entwickelnder Bekämpfungsmaßnahmen.

SUMMARY

Esca is one of the most important grapevine trunk diseases (GTDs) worldwide. In Europe, the wood-inhabiting fungi *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pch*) and *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) are considered the main causal agents of this disease. Even young vineyards and planting material can be affected by pathogens of Esca. So far, control possibilities were mainly limited to prophylactic measures, such as prevention of overly large pruning wounds, minimizing stress of affected grapevines and elimination of dead wood. By now, biological control is basically possible; its efficacy however, still remains to be fully proven under practical conditions.

According to previous studies in Germany investigating the infection status of planting material, *Pch* is considered the most important causal agent for an early infection in grapevine nursery propagation. Based on this, the objective of the present study was to comprehensively assess the occurrence of *Pch* and other GTD-pathogens in grapevine wood and potential inoculum sources and to visually evaluate Esca-associated symptoms in rootstocks and scions during the propagation process including indoor working steps and the outdoor rooting phase. The results should then be used to point up possible control measures.

For this purpose, from 2014 to 2016 visual ratings of Esca-associated wood symptoms were conducted on grapevine material collected from three different nurseries over the entire propagation process as well as from planting material ready for sale. Further assessments on pathogen occurrence by nested PCR and traditional culturing methods focused on rootstock material, which is more affected from experience, and were at first limited to the detection of *Pch*. For each year, a strong increase of wood symptoms, both in rootstocks and scions, was observed in the course of the production process. Compared to that, PCR- and culture-based detection rates of *Pch* in rootstock wood were considerably lower revealing a marked discrepancy between symptom incidence and the actual presence of the pathogen. Interestingly, a previously unconsidered fungus, *Caophora luteo-olivacea* (*Clo*), which is suspected to be a further GTD-pathogen, was frequently isolated from symptomatic rootstocks. Based on this observation, a multiplex nested PCR method was subsequently developed to specifically detect *Pch*, *Clo* as well as species of the Esca-relevant genus *Phaeoacremonium* (*Pm*). By using this method, *Pch* and *Pm* spp. were detected in ~9% and ~15% of tested rootstocks, respectively (average of all nurseries and years

of observation), whereas detection rates of *Clo* were comparatively high at ~78%. This way, it was possible to harmonize previously observed discrepancies between symptom and pathogen incidence to a great extent. Regarding the occurrence of pathogens and expression of wood symptoms significant differences between nurseries were noticed at single sampling dates, in general however, infestation situations were quite similar.

Further investigations were conducted to identify potential inoculum sources in the propagation process. Herefore, sampling was done from various hydration tanks, callusing media and nursery soil. In addition, spore traps were installed in nursery fields in order to monitor airborne inoculum. Samples were subsequently analysed by multiplex nested PCR and/or fungal isolation. PCR-based detections of *Pch*, *Pm* spp. and *Clo* were obtained from hydration tanks as well as from callusing media and air with *Clo* being the most common species in every respect.

Furthermore, viable inoculum of *Pch* and *Pm* spp. were found in rootstock wood only, whereas *Clo* could be additionally isolated from hydration tanks, callusing media and nursery soil. However, isolation rates of *Pch*, *Clo* and *Pm* spp. respectively corresponded to only ~9%, ~9% and ~2% of the detection frequencies when using multiplex nested PCR.

The present study allowed for a comprehensive and in part previously unknown insight into the infestation situations of planting material regarding *Pch* and further *Esca*-associated pathogens. It provides specific information on potential inoculum sources in grapevine nursery propagation and emphasizes the possible role of pre-infected planting in the development and spread of *Esca*.

With respect to a targeted control of *Esca* and associated diseases, the obtained results provide an important basis to verify efficacy and practicability of existing or yet to be developed control measures.

1 EINLEITUNG

1.1 WEINREBEN (*VITIS*)

1.1.1 Kulturrebe (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*)

Unsere heutige Kulturrebe (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*), auch Edle oder Echte Rebe genannt, gehört zu den bedeutendsten Obstkulturen weltweit. Neben der Wildrebe *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* ist sie eine von zwei Unterarten der Spezies *Vitis vinifera*. Im Gegensatz zur fremdbefruchtenden diözischen Wildform, sind die meisten heutigen Kultursorten aufgrund kontinuierlicher Domestikation monözische Pflanzen mit zwittrigen Blüten (This et al. 2006). Als Domestikationszentrum wurde lange Zeit der Südkaukasus und das östliche Anatolien angesehen (Arroyo-García et al. 2006). Mittlerweile geht man davon aus, dass die ersten Domestikationen zur Weinproduktion vor etwa 7.000 bis 8.000 Jahren im Nahen Osten stattfanden (Keller 2015). Daneben wird der westliche Mittelmeerraum als zweites Domestikationszentrum und Ursprung vieler unserer heutigen westeuropäischen Weinsorten angesehen (Arroyo-García et al. 2006; Arroyo-García & Revilla 2013). Basierend auf der geographischen Herkunft wird die Gattung *Vitis* (Weinreben) oftmals in zwei große Gruppen untergliedert: die eurasische Gruppe, der unsere Kulturrebe entstammt, und die amerikanische Gruppe, in der sich weitere *Vitis*-Arten befinden, die für den Weinbau ebenfalls von sehr großer Bedeutung sind (Keller 2015) (siehe Kapitel 1.1.2).

Weltweit wurde die Kulturrebe 2016 mit einer Jahresproduktion von 75,8 Mio. t auf insgesamt 7,5 Mio. ha angebaut (International Organisation of Vine and Wine 2017). Verwendet wird die Kulturrebe in erster Linie als Keltertraube zur Herstellung von Wein (47% in 2015), als Tafeltraube für den frischen Verzehr (36% in 2015) oder in getrockneter Form als Rosinen (8% in 2015) (International Organisation of Vine and Wine 2017). Bekannte Weinanbaugebiete liegen u.a. in Italien, Frankreich, Spanien, USA, Australien, Südafrika, Chile, Argentinien und Deutschland. Diese Länder gehören gleichzeitig zu den zehn größten Weinproduzenten der Welt (International Organisation of Vine and Wine 2017).

1.1.2 Bedeutung weiterer *Vitis*-Arten für den Weinbau

Durch die Einschleppung des Echten Mehltaus (*Erysiphe necator*) und des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) sowie der Reblaus (*Viteus vitifoliae*) aus Nordamerika durchlebte der europäische Weinbau im 19. Jahrhundert mehrere Krisen und war gegen Ende des Jahrhunderts sogar in seiner Existenz bedroht (This et al. 2006; Keller 2015). Einige der in Amerika beheimateten *Vitis*-Arten besitzen eine natürliche Widerstandsfähigkeit oder Resistenz gegenüber den Mehltaupilzen und der Wurzelreblaus und gewannen im europäischen Weinbau durch die Verwendung als Wurzelunterlage oder in der Züchtung von Hybriden und neuen Sorten rasch an Bedeutung (This et al. 2006). Die meisten heutzutage verwendeten Unterlagen sind Hybride aus den amerikanischen Spezies *V. riparia*, *V. rupestris* und *V. berlandieri* (Galet 1998). Eine Auswahl weinbaulich relevanter Unterlagensorten in Deutschland und Europa ist in Tabelle 1 dargestellt. Sie dienen als Wurzelteil für die heutigen Weinsorten, die als sogenanntes Edelreis auf die Unterlage gepfropft werden. Dadurch werden die geschmacklichen Vorzüge der europäischen Kulturrebe und die Widerstandsfähigkeit amerikanischer Reben gegenüber der Wurzelreblaus kombiniert. Weitere weinbaulich wichtige Eigenschaften von Unterlagensorten sind z.B. ihre Fähigkeit, Einfluss auf die Wüchsigkeit oder Beerenreife des Edelreises zu nehmen sowie verschiedene Bodentypen, z.B. trocken, sauer, salin oder kalkreich, zu tolerieren (Keller 2015).

Tabelle 1: Auswahl weinbaulich relevanter Unterlagensorten in Europa

Unterlagen	Eltern-Spezies
Kober 5BB ('5BB')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Selektion Oppenheim 4 ('SO4')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Kober 125AA ('125AA')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Teleki 5C ('5C')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Binova (Mutation von 'SO4')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Richter 110 ('110R')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>
Paulsen 1103 ('1103P')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>
140 Ruggeri ('140Ru')	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>
'Börner'	<i>V. riparia</i> x <i>V. cinerea</i>
1616 Couderc ('1616C')	<i>V. solonis</i> x <i>V. riparia</i>
'Gravesac' (161-49 Couderc x 3309 Couderc)	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>

Quelle: Hochschule Geisenheim (o. J.)

1.2 HOLZKRANKHEITEN DER WEINREBE („GRAPEVINE TRUNK DISEASES“)

Allgemein kommt den pilzlichen Krankheitserregern, vor allem dem Echten und Falschen Mehltau sowie dem Grauschimmelerreger *Botrytis cinerea*, im Weinbau die größte wirtschaftliche Bedeutung zu (Blaich 2000). In keiner anderen Kulturart werden flächenbezogen mehr Fungizide eingesetzt als bei der Weinrebe (Eurostat 2007). Neben Pilzkrankheiten, die durch Fungizide gut zu behandeln sind, gewinnen Holzkrankheiten (engl. „Grapevine Trunk Diseases“ (GTDs)) der Weinrebe in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung und stellen mittlerweile eine der größten Herausforderungen im Weinbau dar (Fontaine et al. 2016). Allein die Kosten für notwendige Neuanpflanzungen können weltweit auf etwa 1,1 Mrd € pro Jahr geschätzt werden (Hofstetter et al. 2012).

Grundsätzlich unterscheidet man vier wichtige GTDs im Weinbau (Fontaine et al. 2016): Esca (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.2), „*Eutypa dieback*“ (dt. Eutypiose), „*Botryosphaeria dieback*“ und „*Phomopsis dieback*“. Weitere GTDs, die in jungen Rebanlagen Probleme bereiten, sind die sogenannte „Petri disease“ (siehe Kapitel 1.3.3) und die „black foot disease“.

„*Eutypa dieback*“

Die Eutypiose wird hauptsächlich durch den Ascomyzeten *Eutypa lata* aus der Familie der *Diatrypaceae* verursacht. Daneben spielen weitere *Diatrypaceae*-Arten ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung dieser Holzkrankheit (Fontaine et al. 2016). Äußerlich zeigen die Triebe einen verkümmerten Wuchs mit verkürzten Internodien. Kleine chlorotische Blätter, die u.a. an den Rändern nekrotisieren und/oder sich becherförmig einrollen können, sind ebenfalls charakteristisch für diese Krankheit (Moller et al. 1974; Pearson & Burr 1981; Carter 1988). Blattsymptome können am deutlichsten im Frühling beobachtet werden, wenn die Triebe ein Länge von etwa 30-60 cm aufweisen (Pearson & Burr 1981). Die Symptome werden von Jahr zu Jahr deutlicher, bis die betroffenen Triebe schließlich absterben (Pearson & Burr 1981). Die Gescheine vertrocknen oftmals noch vor der Blüte und die Beeren an sich entwickelnden Trauben sind klein, werden meist nicht gleichmäßig reif und können in Extremfällen eintrocknen und komplett absterben (Moller et al. 1974; Moller & Kasimatis 1981; Sosnowski & Wicks 2010). Die Infektion und Besiedelung des Holzes durch *E. lata* erfolgt über Schnittwunden und führt zu sogenannten „cankers“ am Stamm und

an den Kordonen, die als keilförmige Nekrosen im Holzquerschnitt erscheinen (Moller & Kasimatis 1981; Pearson & Burr 1981).

„*Botryosphaeria dieback*“

Diese GTD wird durch Pilzarten der Familie *Botryosphaeriaceae* verursacht. Bislang sind 21 Arten bekannt, die als Pathogene an der Weinrebe vorkommen (Úrbez-Torres 2011). Weltweit am häufigsten isoliert werden dabei u.a. *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea* oder *Lasiodiplodia theobromae* (Bertsch et al. 2013). Die Symptome von *Botryosphaeria dieback* sind sehr vielfältig und reichen von Blattchlorosen, Traubenfäule und einem verzögerten Austrieb über das Absterben von Knospen und kompletten Trieben (Bogreben) bis hin zu keilförmigen „cankers“ im Holz (Lehozcky 1974; Kummuang et al. 1996a, 1996b; Phillips 1998, 2002; Larignon & Dubos 2001).

„*Phomopsis dieback*“

Phomopsis viticola ist der Erreger der sog. „*Phomopsis dieback*“ und kommt in Weinanbaugebieten auf der ganzen Welt vor (Cucuzza 1982; Hewitt & Pearson 1988). Die Krankheit tritt verstärkt in Anbaugebieten mit gemäßigtem und feuchtem Klima während der Wachstumsphase auf (Úrbez-Torres et al. 2013) und kann Ertragseinbußen bis zu 30% verursachen (Pscheidt & Pearson 1989; Erincik et al. 2001). *P. viticola* ist in der Lage, alle grünen Pflanzenteile zu infizieren (Úrbez-Torres et al. 2013). Dabei können sich an den unteren 3-6 Internodien der jungen Triebe braunschwarze Flecken bilden, die im weiteren Wachstumsverlauf aufbrechen und verschorfen (Hewitt & Pearson 1988). Im Winter bilden sich Pyknidien an den befallenen Bereichen der Triebe, die diesen durch Anheben der Epidermis einen weißen bis silbernen Schimmer verleihen (Hewitt & Pearson 1988). Des Weiteren können an Blättern kleine chlorotische Flecken auftreten, die im Zentrum nekrotisieren (Hewitt & Pearson 1988). Bei starkem Befall können zudem Nekrosen an Rhachis, Blattstiel, Ranken und Blüten sowie ein Braunfärben und Eintrocknen der Beeren beobachtet werden (Hewitt & Pearson 1988; Kast 2012). In den letzten Jahren wird *P. viticola* zunehmend mit der Entstehung von „cankers“ und Gefäßverfärbungen im Holz, ähnlich wie bei *E. lata* und *Botryosphaeriaceae* spp., in Verbindung gebracht (Úrbez-Torres et al. 2013). Daneben konnte ein mangelndes Wachstum im Frühling sowie

ein Absterben der Knospen auf den Erreger zurückgeführt werden (Úrbez-Torres et al. 2006, 2009, 2012). Demzufolge wurde kürzlich die Aufnahme von *P. viticola* als ein am GTD-Komplex beteiligter Pilz sowie die Einführung des Begriffs „*Phomopsis dieback*“ vorgeschlagen (Úrbez-Torres et al. 2013).

„Black foot disease“

Nach aktuellem Stand wird diese Krankheit durch verschiedene Pilzarten der Gattungen *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria* und *Neonectria* verursacht (Lombard et al. 2014). Sie befällt sowohl Pflanzgut in Rebschulen als auch jüngere Weinstöcke in Ertragsanlagen (Halleen et al. 2006). An jungen Reben können im Stamm schwarzbraune Streifen entlang der Leitgefäße und ein kompaktes verfärbtes Mark sowie eine reduzierte Wurzelbiomasse mit vertieften Nekrosen an den Wurzelhaaren beobachtet werden. Äußerlich zeigen sich eine verringerte Wuchskraft mit kurzen Stämmen, verkürzten Internodien, eine ungleichmäßige Holzreife sowie eine lichte Belaubung und kleine Blätter mit Interkostalchlorosen und -nekrosen (Scheck et al. 1998a). Nach Entfernen der Rinde werden im Unterlagenbereich betroffener Rebstöcke schwarzbraune Verfärbungen und Nekrosen sichtbar, die sich von der Basis aufwärts und von der Rinde markwärts entwickeln (Larignon 1999; Fourie & Halleen 2001). Zudem kann sich eine zweite Wurzelkrone weiter oben an der Unterlage bilden, um den Verlust von funktionsfähigen Wurzeln zu kompensieren (Larignon 1999; Fourie et al. 2000). Grundsätzlich betrifft diese Holzkrankheit vor allem jüngere Weinreben bis etwa 10 Jahre (Larignon 1999; Gubler et al. 2004). Werden junge Reben infiziert, sterben diese sehr schnell ab, während sie mit zunehmendem Alter nach erfolgter Infektion nur langsam verfallen und erst nach über einem Jahr absterben (Gubler et al. 2004).

1.3 ESCA-KRANKHEIT DER WEINREBE

1.3.1 Bedeutung im Weinbau

Neben „*Eutypa dieback*“ und „*Botryosphaeria dieback*“ gehört Esca zu den vorherrschenden Holzkrankheiten weltweit (Bertsch et al. 2013). Bei der Esca-Krankheit handelt es sich um keine neue Krankheit der Weinrebe; erste Berichte über Esca-ähnliche Symptome gehen auf griechische und lateinische Arbeiten der Antike zurück (Mugnai et al. 1999). Einführende Erforschungen dieser Krankheit erfolgten bereits

Ende 19./Anfang 20. Jahrhundert in Frankreich und Italien (Ravaz 1898; Petri 1912; Viala 1926) und wurden in den 1960ern für wenige Jahre in Kalifornien von Hewitt (1957) und Chiarappa (1959) wieder aufgenommen (Mugnai et al. 1999). Lange betrachtete man Esca als eine „einfache Krankheit“ an alten Weinstöcken, die durch sanitäre Maßnahmen und die Anwendung von Arseniten im Weinberg unter Kontrolle zu bringen sei (Graniti et al. 2000). In den 1990er Jahren kam es jedoch zu einem plötzlichen Anstieg der Krankheit in Europa (Mugnai et al. 1999; Graniti et al. 2000). Vor allem in südeuropäischen Ländern wurde verstärkt von Esca-typischen Symptomen berichtet (Mugnai et al. 1999; Rego et al. 2000; Surico et al. 2000a; Armengol et al. 2001; Redondo et al. 2001; Rumbos & Rumbou 2001). Aber auch in Frankreich (Larignon & Dubos 1997) und in den bis dahin weitestgehend verschonten nördlicheren Anbaugebieten wie Deutschland (Kassemeyer 1998; Fischer & Kassemeyer 2002, 2003; Kassemeyer et al. 2002) und Österreich (Reisenzein et al. 2000) war ein Anstieg der Holzkrankheit zu beobachten. Gründe für die rapide Zunahme befallener Rebstöcke Ende des 20. Jhs. waren womöglich die Veränderungen in der Bewirtschaftungsweise der Weinberge, die nachlassende sanitäre Pflege von Unterlagen und Vermehrungsmaterial, ein mangelnder Schutz von Schnittwunden aufgrund der steigenden Arbeitskosten sowie das Verbot von Arseniten in mehreren Ländern (Graniti et al. 2000), das seit 2003 sogar europaweit gilt (International Organisation of Vine and Wine 2015). Die Kontrolle der Esca-Krankheit gestaltet sich nach dem Verbot von Natriumarsenit, das einzig wirksame Fungizid, äußerst schwierig und viele Kontrollmöglichkeiten, darunter chemische, biologische und sanitäre, wurden bislang erprobt. Trotz alledem scheint deren Wirksamkeit begrenzt und um ein Auftreten der Krankheit zu reduzieren, müssen mehrere dieser Maßnahmen simultan angewandt werden (Bertsch et al. 2013).

1.3.2 Symptomatik, Ätiologie und Epidemiologie

Grundsätzlich handelt es sich bei Esca um eine hochkomplexe Holzkrankheit mit einer Reihe unterschiedlicher Symptomausprägungen, die nicht nach einem einfachen „Ursache-Wirkungs-Prinzip“ durch einzelne biotische oder abiotische Faktoren zu erklären ist (Mugnai et al. 1999; Graniti et al. 2000).

Bei der sog. „esca proper“ (Graniti et al. 1999), die vor allem in älteren Ertragsanlagen vorkommt, unterscheidet man allgemein zwei Verlaufsformen: eine akute und eine chronische (Viala 1926; Chiarappa 1959; Dubos & Larignon 1988). Bei der

akuten bzw. apoplektischen Form beginnen Rebstöcke, die zuvor völlig gesund erschienen, plötzlich zu welken und sterben innerhalb sehr kurzer Zeit (wenige Tage bis Wochen) teilweise oder komplett ab (siehe Abbildung 1a) (Larignon & Dubos 1997; Mugnai et al. 1999; Surico et al. 2000b). Die chronische Verlaufsform ist u.a. durch äußere Symptome an den Blättern und Beeren, deren Auftreten von Jahr zu Jahr schwanken oder völlig ausbleiben kann, gekennzeichnet (Chiarappa 1959; Mugnai et al. 1999). Dabei können Blatt- und Beerensymptome gemeinsam oder unabhängig voneinander am selben Rebstock vorkommen (Chiarappa 1959; Larignon & Dubos 1997; Mugnai et al. 1999). Symptome an den Blättern äußern sich durch ein auffälliges und sehr charakteristisches Tigerstreifenmuster („tiger stripes“) (siehe Abbildung 1b-d) (Mugnai et al. 1999). Beginnend mit chlorotischen (bei Weißweinsorten, siehe Abbildung 1c) oder rötlichen (bei Rotweinsorten, siehe Abbildung 1d) Flecken, die unregelmäßig zwischen den Blattadern oder entlang des Blattrandes auftreten, sich vergrößern und verschmelzen, nekrotisieren und vertrocknen die Interkostalstellen, bis schließlich nur noch die Blattadern und deren Säume grün bleiben (Dubos & Larignon 1988; Mugnai et al. 1999). Daneben können an Beeren dunkelbraune, violette oder purpurfarbene Flecken, sog. „black measles“, auftreten, die unregelmäßig oder in längsverlaufenden Streifen angeordnet sein können (siehe Abbildung 1e) (Chiarappa 1959; Mugnai et al. 1999). Bei stark betroffenen Beeren können z.T. tiefe Risse in der Beerenhaut entstehen. Auch ein Schrumpfen (siehe Abbildung 1f und g) und vollständiges Eintrocknen der Beeren ist möglich (siehe Abbildung 1h). Die genannten Symptome können einzelne Beeren einer Traube, alle Trauben eines Triebs oder mehrere Triebe betreffen (Mugnai et al. 1999).

Auch wenn betroffene Rebstöcke äußerlich oft völlig gesund erscheinen, können typische Symptome im Holz beobachtet werden (siehe Abbildung 1i). Dabei zeigen sich u.a. dunkelbraune oder schwarze Verfärbungen im Holz, die sich im Längsschnitt als Streifen („brown wood streaking“) und im Querschnitt als kleine Punkte darstellen. Diese punktförmigen Verfärbungen können einzeln verstreut auftreten oder ringförmig entlang der Jahresringe sowie um das Mark angeordnet sein (siehe Abbildung 1i, links; Abbildung 2a und b). Davon ausgehend entwickeln sich oftmals, vor allem im Kernbereich des Stammes und an den Rändern nekrotischer Stellen, pink- oder dunkelrot-braune Bereiche (siehe Abbildung 2b) (Mugnai et al. 1999; Surico et al. 2000a). Im Xylem kann es darüber hinaus zum Verschluss der Leitgefäße durch Thyllen oder eine dunkelgefärbte und gummiartige Masse kommen (siehe

Abbildung 2c und e), wobei letztere Symptomatik auch als sog. „Gummosis“ oder „black goo“ bezeichnet wird (Morton 1995; Mugnai et al. 1999). Mit fortschreitender Krankheitsentwicklung kommt es neben dunklen Verfärbungen und „Gummosis“ verstärkt zu einer Weißfäule im Holzkörper. Diese ist insbesondere im Stammkopfbereich, ausgehend von Schnittwunden, durch ein weißes und schwammiges Holzgewebe, das durch dunkle Zonen vom gesunden Holz abgegrenzt sein kann, zu erkennen (siehe Abbildung 1i, Mitte) (Mugnai et al. 1999).

Zwischen externer und interner Symptomatik ist generell eine deutliche Diskrepanz festzustellen: Symptome sind im Holz wesentlich häufiger als an Blättern und Beeren zu beobachten. Das äußere Erscheinungsbild spiegelt daher nur sehr unvollständig die Situation im Innern der Rebe wider (Fischer 2012).



Abbildung 1: Esca-typische Symptome an Ertragsreben: Apoplexie an ‘Dornfelder’ (a), Tigerstreifenmuster an Blättern der Weißweinsorte ‘Phoenix’ (b und c) und der Rotweinsorte ‘Dornfelder’ (d), „Black Measles“ an Beeren der Sorte ‘Phoenix’ (e), eingeschrumpfte Beeren an ‘Phoenix’ (f) und ‘Portugieser’ (g), vertrocknete Beeren an ‘Phoenix’ (h), „brown wood streaking“ (i links) und Weißfäule (i Mitte und rechts) im Stamm eines Rieslingstocks.

Hervorgehoben wird die Esca-Krankheit durch verschiedene holzbewohnende Pilze. In Europa werden die beiden tracheomykotischen Ascomyceten *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) (Teleomorphe: *Togninia minima*) sowie der Basidiomycet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*), ein Weißfäulepilz, als Hauptverursacher der Krankheit betrachtet (Crous et al. 1996; Larignon & Dubos 1997; Mugnai et al. 1999; Fischer 2002). Während als Weißfäule-Erreger in Europa hauptsächlich *Fmed* zu finden ist (Fischer & González-García 2015), konnten außerhalb Europas überwiegend andere sog. Stellvertreter-Arten wie z.B. *F. polymorpha* in Nordamerika, *F. australiensis* in Australien und *Inocutis jamaicensis* in Südamerika, aus Esca-betroffenen Rebstöcken isoliert werden (Fischer 2006). Neuere Untersuchungen zeigten zudem die Beteiligung einer ganzen Reihe weiterer *Phaeoacremonium*-Arten an der Esca-Symptomatik (Mostert et al. 2006; Gramaje et al. 2015). Als Begleitpilze der Esca sind in Deutschland u.a. die GTD-Erreger *E. lata*, *P. viticola*, *Botryosphaeria obtusa* und *Cylindrocarpon destructans* (siehe Kapitel 1.2) zu finden (Fischer & Kassemeyer 2003; Fischer et al. 2016). Während *Pch* und *Pal* bereits in jüngeren Rebstöcken vorkommen und mit der Entstehung von „brown wood streaking“, „Gummosis“, „black measles“ und Blattchlorosen assoziiert werden (Petri 1912; Larignon & Dubos 1997; Mugnai et al. 1999; Bertsch et al. 2013), ist „esca proper“ vorwiegend in älteren Rebanlagen zu finden und immer durch eine zusätzliche Weißfäule im Holz gekennzeichnet (Graniti et al. 1999).

Die bereits erwähnten Schwankungen in Bezug auf das Auftreten der äußerlichen Symptome legen die Vermutung nahe, dass neben den pilzlichen Erregern weitere Faktoren eine Rolle bei deren Entwicklung spielen (Bertsch et al. 2013). So scheinen beispielsweise regenreiche kühlere Sommer oder Regenfälle im Allgemeinen die chronische und heiße trockene Sommer die apoplektische Form zu begünstigen (Surico et al. 2000a; Marchi et al. 2006). Mehrere Studien in den letzten Jahren deuten darauf hin, dass weitere Faktoren wie Rebsorte (Fussler et al. 2008; Borgo et al. 2016), Bodentyp und -gefälle (Surico et al. 2000a; Robotic & Bosancic 2007), Erziehungssystem und Rebschnitt (Lecomte et al. 2011) eine Rolle spielen. Auch Stressfaktoren wie z.B. eine unzureichende Wasserversorgung vor allem in Junganlagen (Fischer & Kassemeyer 2012) oder eine unausgewogene Nährstoffversorgung bzw. exzessive Düngung können der Entstehung von Esca zuträglich sein (Calzarano et al. 2007, 2009; Zanzotto et al. 2008).

Pch, *Pal* und *Fmed* können sich durch asexuell oder sexuell gebildete Sporen über die Luft verbreiten und sind so in der Lage, über jegliche Art von Verletzungen die Reben zu infizieren (Fischer 2012). Als Eintrittspforten dienen dabei hauptsächlich durch den Rebschnitt erzeugte Wunden, aber auch Verletzungen, die durch Frost, Hagel oder das Entfernen von Wasserschossen entstehen (Mugnai et al. 1999; Eskalen & Gubler 2001; Surico 2001; Surico et al. 2006; Fischer 2009a; Makatini et al. 2014). Eine Übertragung der Erreger von Stock zu Stock während des Rebschnitts ist zwar denkbar, jedoch aufgrund der beobachteten genetischen Unterschiede in der Population von *Fmed* innerhalb von Rebanlagen sowie des Auftretens von Mehrfachinfektionen durch *Pch* und *Pal* eher unwahrscheinlich (Cortesi et al. 2000; Fischer 2002; persönliche Mitteilung, Fischer).

Ausgangspunkt des Inokulums sind bei *Fmed* kissenförmige Fruchtkörper, die vor allem im Kopfbereich abgestorbener Rebstöcke entstehen und unter entsprechenden klimatischen Bedingungen Basidiosporen ausbilden (Fischer 2012). Konidien von *Pch* und *Pal* werden aller Wahrscheinlichkeit nach während der saprobischen Phase an totem Rebholz oder anderen Pflanzenresten gebildet (Mugnai et al. 1999). Die beide Letzteren konnten in den vergangenen Jahren auch im Boden festgestellt werden (Eskalen et al. 2001b; Rooney et al. 2001) und es wird vermutet, dass durch bodenbürtiges Inokulum zusätzliche Infektionsereignisse an Schnittwunden und Wurzeln möglich sind (Mugnai et al. 1999; Surico et al. 2000b; Mostert et al. 2006). Eine natürliche Infektion durch *Pch*, *Pal* und andere GTD-Erreger über die Rebwurzeln konnte erstmalig durch Agustí-Brisach et al. (2013a) demonstriert werden. Darüber hinaus können bereits befallene Unterlagen oder Edelreis-Mütterstöcke sowie vorinfiziertes Pflanzgut eine Quelle von GTD-Erregern darstellen (Bertelli et al. 1998; Ferreira et al. 1999; Pascoe & Cottral 2000; Edwards & Pascoe 2004; Fourie & Halleen 2004a; Giménez-Jaime et al. 2006; Retief et al. 2006; Aroca et al. 2010; Gramaje et al. 2011) (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.4).

1.3.3 Esca an Jungreben („Petri disease“)

Beginnend in den 1990er Jahren konnten verstärkt Esca-ähnliche Absterbeerscheinungen auch in sehr jungen Rebanlagen in Südafrika (Ferreira et al. 1994, 1999), Kalifornien (Scheck et al. 1998b) und nachfolgend in Australien (Pascoe & Cottral 2000) sowie in mediterranen Ländern wie Portugal (Rego et al. 2000) und Griechenland (Rumbos & Rumbou 2001) beobachtet werden. Dieses Phänomen ist in

Deutschland erstmalig 2002 und dann vor allem während des klimatisch extremen Jahres 2003 aufgetreten (Fischer 2003; Fischer & Kassemeyer 2012). Mittlerweile ist das Phänomen, ausgehend vom südwestdeutschen Raum, in weitere Anbaugelände Deutschlands vorgedrungen, wobei mit einer weiteren Zunahme und Ausbreitung zu rechnen ist (persönliche Mitteilung, Fischer). In der Vergangenheit wurden verschiedene Bezeichnungen wie z.B. „young vine decline“, „Petri grapevine decline“ oder „black goo“ für diese Absterberscheinungen vorgeschlagen (Chiarappa 1959; Morton 1995; Scheck et al. 1998b; Mugnai et al. 1999). Diese wurden 2001 im Rahmen des „2nd International Workshop of Grapevine Trunk Diseases“ schließlich unter dem Namen „Petri disease“ zusammengefasst (Fourie et al. 2001; Rumbos & Rumbou 2001; Stamp 2001), die mittlerweile als Vorläuferkrankheit der Esca angesehen wird (Mugnai et al. 1999; Surico 2001). Der Name geht auf den italienischen Phytopathologen Lionell Petri zurück, der 1912 als erster einen Zusammenhang zwischen den inneren Holzsymptomen betroffener Reben und *Phaeoconiella chlamydospora* („*Cephalosporium* Stamm α “ bei Petri) und *Phaeoacremonium aleophilum* („*Acremonium* sp.“ bei Petri) erkannte (Mugnai et al. 1999).

Verursacht wird diese Krankheit hauptsächlich durch *Pch* und mehrere *Phaeoacremonium*-Arten einschließlich *Pal*, auf die, wie bei der Esca-Krankheit, die inneren Holzsymptome „brown wood streaking“ und „Gummosis“ zurückzuführen sind (siehe Abbildung 2a-e) (Scheck et al. 1998b; Pascoe & Cottral 2000; Rego et al. 2000; Sidoti et al. 2000; Rumbos & Rumbou 2001; Fischer 2003; Mostert et al. 2006; Úrbez-Torres et al. 2014; Gramaje et al. 2015). Äußerlich können an betroffenen Reben u.a. Blattchlorosen, Wuchsdepressionen sowie ein allmähliches Absterben beobachtet werden (Scheck et al. 1998b; Rego et al. 2000; Rumbos & Rumbou 2001). Weitere Pilze, wie z.B. *Cadophora luteo-olivacea* (*Clo*), werden in den letzten Jahren ebenfalls mit Symptomen der „Petri disease“ in Verbindung gebracht. *Clo* ist dabei in der Lage, ähnliche Symptome wie *Pch* und *Phaeoacremonium* spp. im Holz hervorzurufen (Halleen et al. 2007b; Gramaje et al. 2011; Úrbez-Torres et al. 2014; Travadon et al. 2015).

Wie unter Kapitel 1.4 näher beschrieben, können u.a. vorinfiziertes Vermehrungsmaterial aus Muttergärten und Pflanzgut, in dem bereits erste charakteristische Holzsymptome beobachtet werden können (Abbildung 2d und e), eine mögliche Rolle bei der Entstehung und Verbreitung der „Petri disease“ und damit auch Esca (siehe Kapitel 1.3.2) spielen.

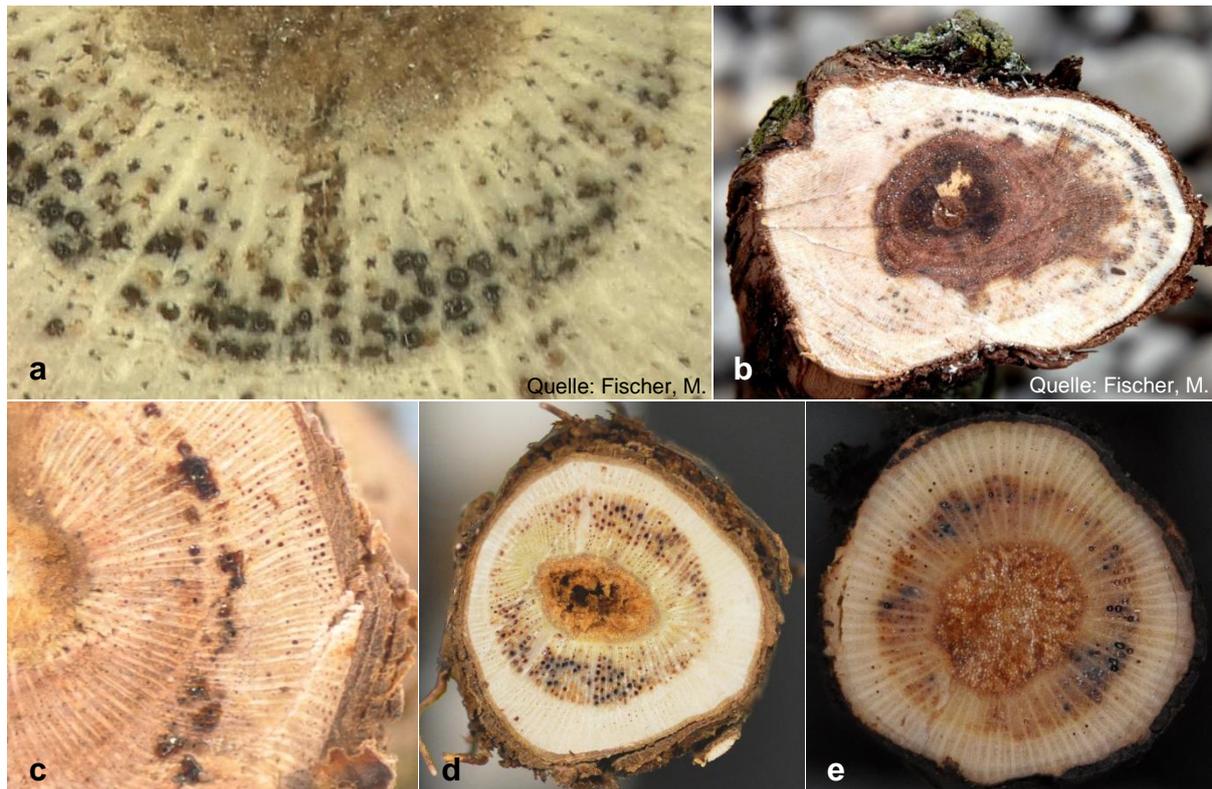


Abbildung 2: Esca bzw. „Petri disease“-Symptome im Holzquerschnitt. „brown wood streaking“ im Holz junger Reben (a und b) und im Unterlagenbereich einer Pfropfrebe aus der Rebschule (d), „Gummosis“ im Holz einer jungen Rebe (c) und im Unterlagenbereich einer Pfropfrebe aus der Rebschule (e).

1.4 PFLANZGUTERZEUGUNGSPROZESS & VORKOMMEN VON GTD-ERREGERN

In Deutschland werden heute fast ausschließlich veredelte Reben, sogenannte Pfropfreben, angepflanzt. Wurzelechte Reben sind vor allem noch in alten Rebanlagen an der Mosel zu finden (Porten & Hoffmann o. J.). Im Gegensatz zu wurzelechten Reben, bei denen Wurzelstock und die oberen, fruchtragenden Teile derselben Pflanze entstammen (Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Mosel o. J.), wird bei der Pfropfrebe ein Holzstück des sog. Edelreises (fruchtragender Teil) mit dem Holz einer Unterlagsrebe (Wurzelstock bildender Teil) durch Pfropfung bzw. Veredlung miteinander verbunden. Der Anbau veredelter Reben ist aus mehreren Gründen sinnvoll (siehe Kapitel 1.1.2) und im Zuge der Reblausbekämpfung ist mittlerweile die Anpflanzung wurzelechter Reben in Deutschland mit einzelnen Ausnahmen sogar verboten (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz in Zusammenarbeit mit der juris GmbH 2012).

Die Produktion von Pfropfreben erfolgt in spezialisierten Veredlungsbetrieben, auch Rebschulen genannt, die das erzeugte Pflanzgut nachfolgend an die Winzer verkau-

fen. Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Pflanzguterzeugung (siehe Abbildung 3) näher erläutert. Einzelne Schritte können dabei von Betrieb zu Betrieb variieren.

Am Beginn der Pflanzgutproduktion stehen die sogenannten Muttergärten, aus denen das Unterlagen- und Edelreisholz für die Veredlung bezogen wird. Dieses Vermehrungsmaterial stammt entweder aus der betriebseigenen Produktion oder aus externen Muttergärten. Unterlagenholz wird dabei häufig aus Italien (hauptsächlich Südtirol) oder Frankreich bezogen.

Nach Anlieferung des Vermehrungsmaterials (Januar/Februar) werden in den Veredlungsbetrieben zunächst die Geiztriebe und beim Unterlagenholz zusätzlich die Knospen (Augen) entfernt (Fachbegriff: Blenden). Danach wird das Rebholz auf eine Länge von etwa 30 cm zugeschnitten, in Bündel gepackt und zuerst in Tauchbecken mit Wasser und anschließend in Tauchbecken mit Wasser + Fungiziden (z.B. Chinosol ®W (Bayer CropScience, Monheim, Deutschland) oder Beltanol-L (Probelte S.A., Murcia, Spanien); Wirkstoff: 8-Hydroxychinolinsulfat) für mehrere Stunden gewässert. Dabei werden die Tauchbecken für das Unterlagen- und Edelreisholz je nach Betrieb gemeinsam oder getrennt genutzt. Nach dem Tauchen wird das Holz bis zur Veredlung im Kühlraum bei etwa 2-4 °C eingelagert. Kurz vor dem Veredeln wird das Holz häufig nochmals kurz gewässert. Im Anschluss wird das Edelreis auf die Unterlage gepfropft und der obere Teil der Pfropfrebe einschließlich der Veredlungsstelle paraffiniert. Oftmals enthält das Paraffin Fungizide und/oder Wachstumsregulatoren um einen Pilzbefall zu vermeiden und die Kallusbildung an der Veredlungsstelle zu fördern. Die veredelten Reben werden nachfolgend in Kisten mit Vortriebssubstrat (meist Torf oder ein Torf-Sägespäne-Gemisch) gepackt und mit Perlit bedeckt. In Vortriebräumen werden die Pfropfreben bei ca. 30 °C und 80-100% rel. Luftfeuchte für 2 bis 3 Wochen vorgetrieben (April/Mai). Diese Bedingungen begünstigen die Kallus- und Wurzelbildung sowie den Austrieb. Häufig werden während des Vortreibens die Temperaturen langsam heruntergefahren, um die Reben für das Freiland abzu härten. Das Einschulen der vorgetriebenen Pfropfreben erfolgt sobald keine Nachtfrostgefahr mehr besteht im Mai/Juni. Dabei werden die Reben in Freilandflächen (Rebschulen) meist in einem Abstand von ca. 1 m zwischen und ca. 6 cm innerhalb der Reihen unter Folie gepflanzt. Bis zum Ausschulen (Roden) verbleiben die Pfropfreben im Freiland, um ausreichend zu verwachsen und zu bewurzeln. Während dieser Zeit werden die Reben mehrmals zurückgeschnitten, gegen Schadinsekten, Milben-

und Pilzbefall gespritzt und von Unkräutern befreit. Nach dem Ausschulen (Ende Oktober/Anfang November) werden die Wurzel- und Triebbildung sowie die Verwachsung der Veredlungsstelle überprüft. Die Triebe werden erneut auf wenige Zentimeter zurückgeschnitten und die Wurzeln gestutzt. Die Pfropfreben werden mit dem Kopfbereich nochmals in ein Chinosol- bzw. Beltanol-Bad getaucht und im Kühlraum eingelagert, bis sie schließlich für die kommende Pflanzsaison im darauffolgenden Jahr in den Verkauf gehen.

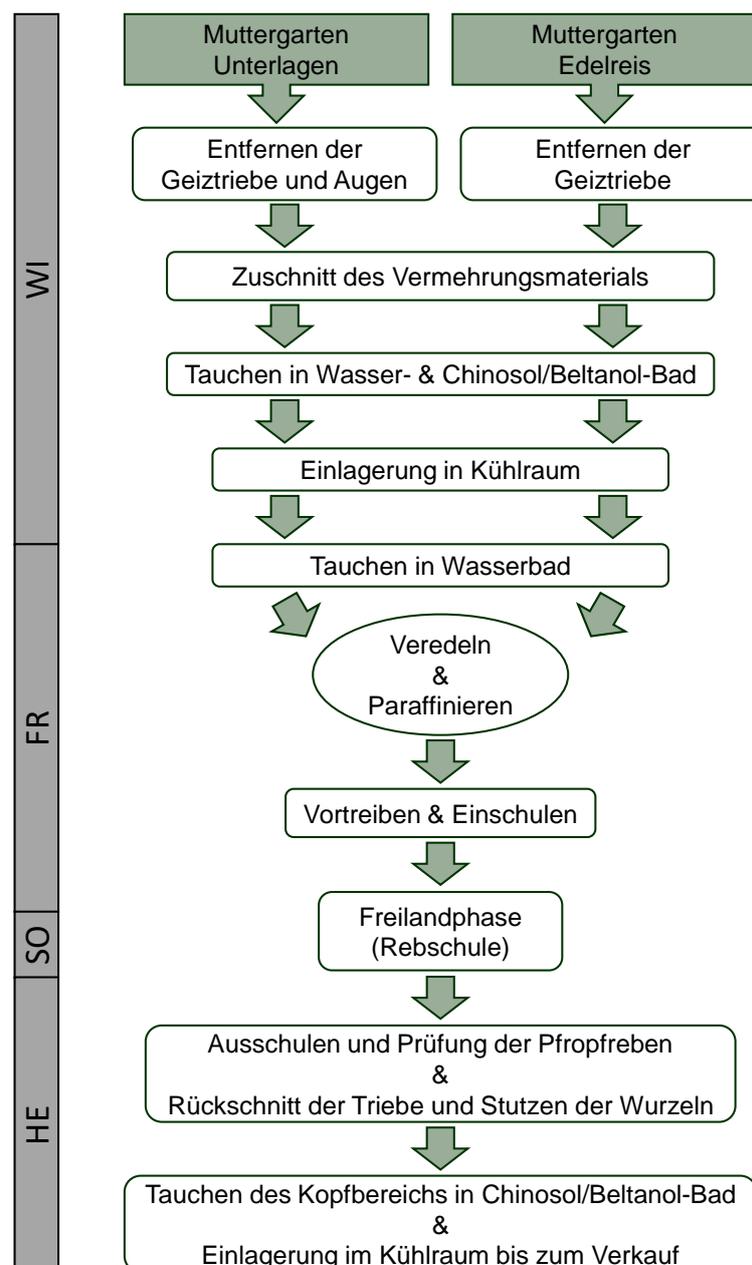


Abbildung 3: Schema der Pflanzguterzeugung mit den durchzuführenden Arbeitsschritten im Winter (WI), Frühling (FR) Sommer (SO) und Herbst (HE); bezogen auf die nördliche Hemisphäre (Schema modifiziert nach Gramaje & Armengol 2011).

Sowohl das aus den Muttergärten stammende Unterlagen- und Edelreisholz als auch die einzelnen Arbeitsschritte können Infektionsquellen von GTD-Erregern darstellen. Untersuchungen hierzu erfolgten verstärkt in den letzten 10 bis 15 Jahren. Nachweise von *Botryosphaeriaceae* spp., *Cylindrocarpon* spp., *N. parvum*, *P. viticola*, *Ilyonectria liriodendri*, *Pch*, *Pal* sowie *Clo* während der Pflanzguterzeugung und z.T. auch in Mutterstöcken wurden dabei u.a. in Südafrika (Fourie & Halleen 2002, 2004a, Halleen et al. 2003, 2007b), Kalifornien (Gubler et al. 2004), Frankreich (Viguès et al. 2009), Portugal (Rego et al. 2009) oder Spanien (Aroca et al. 2010; Gramaje et al. 2011; Agustí-Brisach et al. 2013b) erbracht. Diese Problematik ist seit Längerem auch in Deutschland bekannt. So wurden hier *Pch* und *Pal* ebenfalls an Mutterstöcken und Pflanzgut festgestellt, wobei das Vorkommen von *Pch* während der Pflanzguterzeugung deutlich dominierte (Fischer & Kassemeyer 2010). Seit Kurzem existieren aus Rebschulen in Deutschland zudem Nachweise von GTD-assoziierten Arten wie *B. dothidea*, *Neofusicoccum luteum* und *Clo* (Fischer et al. 2016).

Systematisch erhobene Daten, auch mit Bezug auf Sorten oder Herstellungsverfahren, zum Vorkommen von GTD-Erregern in deutschen Rebschulen liegen darüber hinaus nicht vor.

1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT

Esca und ihre Vorläuferkrankheit „Petri disease“ gewinnen in den letzten Jahren weltweit immer mehr an Bedeutung. Bereits Pflanzgut kann von den damit verbundenen Erregern befallen sein. Kontrollmöglichkeiten beschränken sich bis dato vor allem auf präventive Maßnahmen wie Vermeiden größerer Schnittwunden, Entfernen und Verbrennen von Totholz und Stressreduktion befallener Stöcke durch Ertragsbegrenzung und angepasste Nährstoffversorgung. Biologische Präparate zum Schutz von Schnittwunden sind zwar grundsätzlich verfügbar; eindeutige Daten zu deren Nutzeffekt im Freiland liegen allerdings nicht vor.

In der Frage nach der Befallssituation in Pflanzmaterial beschränken sich bisherige Untersuchungen in Deutschland hinsichtlich Artenspektrum, Vorkommen, Ausbreitungs- und Infektionsverhalten weitgehend auf die beiden Erreger *Pch* und *Pal* (Fischer & Kassemeyer 2010). Diese beziehen sich überwiegend auf die innerbetrieblichen Abläufe der Pflanzguterzeugung, ohne definierten Bezug zu Sorten oder Herstellungsverfahren. Auch der Bereich Freiland und dort mögliche Infektionsereignisse waren bislang nur ansatzweise untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher eine umfassende Erfassung des Vorkommens und der epidemiologischen Faktoren von Esca- bzw. „Petri disease“-Erregern im Verlauf der Pflanzguterzeugung verschiedener Rebschulen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf dem Pilz *Pch*, der aufgrund von Vorarbeiten als wichtigster Verursacher einer Frühinfektion in Rebschulen eingeschätzt wurde (Fischer & Kassemeyer 2010). Mit Hinblick auf mögliches Erregervorkommen sollten im Rahmen der Arbeit in systematischer Weise alle wichtigen Arbeits- und Bearbeitungsschritte während der Pflanzgutproduktion erfasst werden: von der Anlieferung, dem Zuschneiden und Tauchen des Vermehrungsmaterials sowie dem Veredeln und Vortreiben über die Standzeit der veredelten Reben im Freiland bis hin zum Ausschulen und Verkauf der Pfropfreben.

Konkret sollte der Pflanzguterzeugungsprozess dreier Rebschulen, die sich hinsichtlich ihres Standortes, ihres Herstellungsverfahrens und der betriebswirtschaftlichen Größe unterscheiden, näher beleuchtet werden. Für jede Rebschule galt es, hierzu regelmäßig visuelle Befallsbonituren an verschiedenen Rebholzsorten durchzuführen und anhand des ausgewählten Referenzorganismus *Pch* den Befall mithilfe weiterführender PCR-basierter Verfahren und Kulturmaßnahmen zu untersuchen. Der Fokus hierzu sollte auf dem erfahrungsgemäß stärker von Infektionen betroffenen Bereich Unterlagenholz liegen (Fischer & Kassemeyer 2010). Im Rahmen dieses Monitorings waren außerdem potenzielle Infektionsquellen des Erregers (Inokulum in Tauchbädern, Vortriebsubstraten, Freilandboden und in der Luft) durch Isolierung auf Kulturmedium und molekularbiologische Methoden zu identifizieren. Grundsätzlich sollten über *Pch* hinaus weitere in der Literatur diskutierte GTD-Erreger erfasst und im Sinne einer Diagnose charakterisiert werden.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten einen tieferen Einblick in die allgemeine Befalls-situation von Rebenpflanzgut in Bezug auf *Pch* und weitere GTD-Erreger geben und die Identifizierung potenzieller Sortenunterschiede in der Anfälligkeit gegenüber den Erregern ermöglichen. Darüber hinaus sollten sie dazu dienen das Befallsrisiko durch vorkommende Infektionsquellen einzuschätzen und darauf basierend mögliche Kontrollansätze aufzuzeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Probenmaterial aus den Rebschulen

Probennahme-Zeitpunkt	Jahr	Rebschule	Probe*	n	
Vermehrungsmaterial					
Unterlagensorten					
Vermehrungsmaterial Jan / Feb	2014	1	'5BB', '125AA', 'SO4'	46	
		2	'5BB', 'Binova'	20	
		3	'5BB', '125AA'	29	
	2015	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		3	'125AA', 'SO4', 'Börner'	34	
	2016	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40	
	Tauchbäder				
	Tauchen des Vermehrungsmaterials Jan / Feb / Mrz	2014	1	H ₂ O-/Chinosol-Tauchbecken	4
			2	H ₂ O ₂ -Tauchbecken	1
3			H ₂ O-/Chinosol-Tauchbecken	4	
2015		1		6	
		2	H ₂ O-/Beltanol-Tauchbecken	2	
		3		4	
2016		1		6	
		2	H ₂ O-/Beltanol-Tauchbecken	2	
		3		5	
Pfropfreben					
Unterlagenkomponente (Sorte)					
Vortreiben Apr / Mai	2014	1	'5BB', '125AA', 'SO4'	8	
		2	'5BB', 'Binova'	8	
		3	'125AA'	4	
	2015	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		3	'125AA', 'SO4', 'Börner'	30	

Probennahme-Zeitpunkt	Jahr	Rebschule	Probe*	n
Pfropfreben				
Unterlagenkomponente (Sorte)				
Vortreiben Apr / Mai	2016	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40
Vortriebssubstrat				
Vortreiben Apr / Mai	2014	1	Torf	4
		2	Torf + Sägespäne	4
		3	Torf + Sägespäne	2
	2015	1	Torf	4
		2	Torf + Sägespäne	4
		3	Torf + Sägespäne	3
	2016	1	Torf	4
		2	Torf + Sägespäne	4
		3	Torf + Sägespäne	4
Bodenprobe				
Beginn Freilandphase Jun	2014	1	Mischprobe aus den Parzellen der beprobten Pfropfreben	4
Pfropfreben				
Unterlagenkomponente (Sorte)				
Mitte Freilandphase Aug / Sep	2014	1	'5BB', '125AA', 'SO4'	41
		2	'5BB', 'Binova'	40
		3	'5BB', '125AA'	39
	2015	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40
	2016	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40
Bodenprobe				
	2014	2	Mischprobe aus den Parzellen der beprobten Pfropfreben	4
		3	Mischprobe aus den Parzellen der beprobten Pfropfreben	4
	2015	1	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben	4
		2	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben	4
		3	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben	4

Probennahme-Zeitpunkt	Jahr	Rebschule	Probe*	n	
Bodenprobe					
Mitte Freilandphase Aug / Sep	2016	1	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen	4	
		2		4	
		3		4	
Pflanzreihen Unterlagenkomponente (Sorte)					
Ende Freilandphase Sep / Okt	2014	1	'5BB', '125AA', 'SO4'	41	
		2	'5BB', 'Binova'	40	
		3	'5BB', '125AA'	40	
	2015	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40	
	2016	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		3	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Börner'	40	
	Bodenprobe				
	2014	1	Mischprobe aus den Parzellen der beprobten Pflanzreihen		4
			Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen		
Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen					
2015	1	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen		4	
		Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen			
		Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen			
2016	1	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen		4	
		2	Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen		
			3		Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pflanzreihen
verkaufsfertige Pflanzreihen Unterlagenkomponente (Sorte)					
Verkauf Apr / Mai (Folgejahr)	2015	1	'5BB', 'SO4'	20	
		2	'5BB', 'Binova'	30	
		3	'125AA'	20	
	2016	1	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	
		2	'5BB', '125AA', 'SO4', 'Binova'	40	

n=Probenumfang

*für eine detaillierte Probenübersicht siehe Anhang

2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Puffer

Chemikalie/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cloramphenicol für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA Ladder 100 bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main
innuPREP Plant DNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
innuSPEED Soil DNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
KAPA HiFi™ HotStart PCR Kit	KAPA Biosystems, Wilmington, USA
KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit	KAPA Biosystems, Wilmington, USA
Kartoffelextrakt-Glucose-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Oligonukleotide	Metabion international AG, Planegg
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SERVA DNA Stain G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SuperHot Taq PCR Kit mit dNTP Mix	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Tween® 80	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasser, Bioscience-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zellulosemischester-Membran Filter (0,45 µm)	Advantec, Dublin, USA
Puffer	Hersteller
TAE-Puffer:	
Tris-HCl pH 7,4 10 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA pH 8,0 1 mM	Merck KGaA, Darmstadt
XS-Puffer:	
Tris-HCl pH 7,4 100 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA pH 8,0 20 mM	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat 1 %	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumacetat 800 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliummethylxanthogenat 1 %	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3 Geräte & Software

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 6-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode

Kugelmühle Tissue Lyser II	Qiagen GmbH, Hilden
Mahlbecher (25 ml)	Retsch GmbH, Haan
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Inkubationsschüttler KS 3000 I control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sicherheitswerkbank HERAsafe™ KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator KB115	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Spektrophotometer NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentation ST4	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Autoklav DX-45	Systec GmbH, Linden
SimpliAmp™ Thermal Cycler	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
Software	Hersteller
Basic Local Alignment Tool (BLAST)	NCBI, Bethesda, USA
CLC Workbench	Qiagen Bioinformatics, Qiagen GmbH, Hilden
R Statistik-Software v. 3.4.0	R Core Team (2017), Wien, Österreich
RStudio Benutzeroberfläche v. 1.0.143.	RStudio Team (2016), Boston, USA

2.2 METHODEN

2.2.1 Probennahmen in den Rebschulen

In den Jahren 2014 bis 2016 wurden in drei ausgewählten Rebschulen in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg gezielt Proben während des Pflanzguterzeugungsprozesses entnommen (siehe Abb. 4 und 5). Zur Bewahrung der Anonymität der beteiligten Rebschulen werden diese in der vorliegenden Arbeit nicht namentlich genannt sondern als Betrieb bzw. Rebschule (RS) 1, 2 und 3 bezeichnet.

Die entnommenen Proben umfassten:

1. Rebholz zu verschiedenen Bearbeitungsstadien

- i) Vermehrungsmaterial aus Unterlagenmuttergärten (Abbildung 4a)
- ii) frisch veredelte Pfropfreben zum Zeitpunkt des Vortreibens (Abbildung 4b und c)
- iii) Pfropfreben zur Mitte und zum Ende der Freilandphase (Abbildung 4d und e)
- iv) verkaufsfertiges Pflanzgut (Abbildung 4f)

2. Flüssigproben aus Tauchbädern

Flüssigproben (100-200 ml) wurden während bzw. nach dem Tauchen des zuge-schnittenen Edelreis- und Unterlagenholzes aus verschiedenen Bereichen der jewei-ligen Tauchbäder (Abbildung 4g) entnommen. Beprobte wurden Wasserbäder und Fungizidbäder (ca. 0,5% Chinosol/Beltanol bzw. H₂O₂ in Wasser).

3. Vortriebssubstrate aus Vortreibkisten

Die Vortriebssubstratproben bestanden entweder aus Torf oder einem Torf-Sägespäne-Gemisch. Pro Probe wurden ca. 15 g während des Vortreibens aus Vor-treibkisten (Abbildung 4h) der jeweils zu untersuchenden Pflanzreben entnommen.

4. Bodenproben aus Freilandflächen

Während der Bewurzelungsphase der Pflanzreben im Freiland (Mai/Juni bis Okto-ber/November) wurde in den Parzellen der zu untersuchenden Pflanzreben ca. 50 g Bodenmaterial (Abbildung 4i) als Mischprobe genommen. Im Jahr 2014 geschah dies randomisiert (Zick-Zack-Gang), 2015 und 2016 erfolgte die Probenentnahme gezielt aus der Wurzelzone der parallel entnommenen Pflanzreben.

5. Sporenfallen im Freiland

Während der Freilandphase 2014, 2015 und 2016 wurden Sporenfallen (Abbil-dung 4j) zur Überwachung des Sporenflugs in drei verschiedenen Freilandflächen des Betrieb 1 aufgestellt. Die Sporenfallen bestanden dabei aus Objektträgern, die mit Vaseline beschichtet (Methode nach Eskalen & Gubler 2001) und an Bambusstä-ben befestigt wurden. Die Fallen wurden in einer Höhe von ca. 30 cm über dem Bo-den installiert und nach Möglichkeit im Wochenrhythmus ausgetauscht. In den Jah-ren 2014 und 2015 erstreckte sich die Überwachungsphase von Mitte/Ende Juni bis Ende Oktober, in 2016 von Ende Februar bis Ende Oktober. Die Anzahl der beprob-ten Sporenfallen (Objektträger) betrug insgesamt 175 (47 in 2014, 54 in 2015 und 74 in 2016).



Abbildung 4: Probennahmen in den Rebschulen. Unterlagenruten aus Muttergärten für die Vermehrung (a), frisch veredelte Pfropfreben aus Vortreibkisten (b), exemplarische Darstellung der Unterlage- und Edelreiskomponente einer Pfropfrebe (c), aus den Freilandflächen (d) entnommene bewurzelte Pfropfreben (e), verkaufsfertige Pfropfreben (f), Wässern des zugeschnittenen Vermehrungsmaterials im Tauchbad (g), Vortreiben der frisch veredelten Reben in Vortreibkisten (h), Rebschulden aus dem Freiland (i), Sporenfalle im Freiland (j).

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden Holz-, Tauchbad-, Vortriebssubstrat- und Bodenproben bei +4 °C, Sporenfallen bei -20 °C gelagert. Die Entnahme der Proben erfolgte mit Ausnahme von Rebholz in sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen.

Eine detaillierte Übersicht zu den oben genannten Proben (Ausnahme: Sporenfallen) sowie der jeweiligen Probenanzahl und den Zeitpunkten der Probennahme sind im Anhang dargestellt.



Abbildung 5: Pflanzguterzeugungsprozess und Zeitpunkte der Probennahmen

2.2.2 Visuelle Bonitur des Unterlagen- und Edelreisholzes

Das Vermehrungsmaterial aus den Unterlagenmuttergärten und die Unterlagen-Komponenten der Pfropfreben wurden in den Untersuchungsjahren 2014 bis 2016 auf das Auftreten Esca-typischer Symptome überprüft. Hierzu wurden die Ruten des Vermehrungsmaterials basal und apikal sowie die Unterlagenbereiche der Pfropfreben oberhalb der Wurzelzone (basal) und unterhalb der Veredlungsstelle (apikal) angeschnitten und visuell begutachtet. In den Jahren 2015 und 2016 erfolgte ab dem Vortreiben zusätzlich eine visuelle Bonitur der Edelreis-Komponente im Bereich unmittelbar oberhalb der Veredlungsstelle. Je nach Auftreten der Esca-typischen Verfärbungen wurden die bonitierten Bereiche als „symptomatisch“ oder „asymptomatisch“ bewertet.

Das Unterlagenholz wurde im Anschluss für weitere Untersuchungen zum Erregervorkommen durch PCR- und kultivierungsbasierte Verfahren entsprechend Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.8.2 aufbereitet.

2.2.3 Probenaufbereitung für den PCR-basierten Erregernachweis

Das Vorkommen von *Pch* und weiteren GTD-Erregern in Unterlagenholz und Proben aus möglichen Infektionsquellen in der Pflanzguterzeugung, d.h. Tauchbäder, Vortriebssubstrate und Luft (Sporenfallen), wurde durch molekularbiologische Verfahren näher untersucht (siehe Kapitel 2.2.4). Zu diesem Zweck wurden die Proben wie im Folgenden beschrieben vorbereitet.

2.2.3.1 Unterlagenholz

Für die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde zumeist der basale, in ausgewählten Fällen der apikale, Bereich der Unterlagen gewählt. Dazu wurden 5-10 cm des zu untersuchenden Bereichs nach dem Anschnitt (siehe 2.2.2) mithilfe eines Skalpells entrindet und durch kurzes Abflammen oberflächensterilisiert. Mit einer sterilen Rebschere wurde ein Stück Holz (1-2 cm) oberhalb bzw. unterhalb des basalen bzw. apikalen Endes entnommen und bei -80 °C schockgefroren. Die Proben wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mahlbechern bei 30 Hz für 20 sec in einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver vermahlen. Davon wurden 80-100 mg für die anschließende DNA-Extraktion verwendet. Diese erfolgte mit dem Analytik Jena innuPREP Plant DNA Kit gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.3.2 Tauchbäder

METHODE 1

Für die Extraktion von DNA aus Tauchbädern wurden 45 ml der jeweiligen Proben über einen Filter (Zellulosemischester-Membran) der Porengröße 0,45 µm filtriert. Die Filter wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 30 Hz für 20 sec in einer Kugelmühle zerkleinert. Nach Zugabe von 400µl Lysis-Puffer (innuPREP Plant DNA Kit) wurden die Proben erneut bei 30 Hz für 2 min in einer Kugelmühle homogenisiert. Die weiteren Schritte der DNA-Extraktion wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

METHODE 2

Ein kostengünstigeres und weniger zeitaufwendiges Aufbereitungsverfahren wurde parallel zu *Methode 1* (s.o.) an Tauchbad-Proben aus 2016 getestet: Hierfür wurden 45 ml der Proben bei 15.000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, erneut bei 15.000 x g und 4 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspendierung des Pellets in 400 µl Lysis-Puffer wurde, analog zu *Methode 1*, gemäß den Herstellerangaben verfahren.

2.2.3.3 Vortriebssubstrate

Bei den Vortriebssubstraten aus 2014 wurden zwischen 250 mg und 3 g für die nachfolgende DNA-Extraktion eingesetzt. Um ein potenziell breiteres Erreger-Spektrum erfassen zu können, wurde in den Jahren 2015 und 2016 eine erhöhte Probenmenge von 5 g verwendet.

Die Proben wurden in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) in 40 ml sterilem ddH₂O suspendiert und auf einem Inkubationsschüttler für 30 min bei 300 rpm und RT geschüttelt. Anschließend wurden die Suspensionen über eine sterile Mullbinde grob filtriert. Das Filtrat wurde bei 15.000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in der vorhandenen Restflüssigkeit resuspendiert, die Suspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, und nochmals für 5 min bei 15.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 600 µl Lysis Puffer des innuSPEED Soil DNA Kits aufgenommen und die DNA nach den Vorgaben des Herstellers extrahiert. Als interne Negativkontrolle wurde steriles ddH₂O, das dem Suspendieren der Vortriebssubstrate diente, in der Probenaufbereitung mitgeführt.

2.2.3.4 Sporenfallen

METHODE 1

Die DNA-Extraktion aus Sporenfallen erfolgte mithilfe des innuPREP Plant DNA Kits. Die Fallen aus 2014 und 2015 wurden mit einer modifizierten Methode nach Eskalen & Gubler (2001) wie folgt bearbeitet: die Objektträger wurden in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) zunächst mit 20 ml sterilem ddH₂O + Tween® 80 (1 Tropfen/500 ml) bei 300 rpm und RT für 30 min auf einem Inkubationsschüttler geschüttelt, um die darauf befindlichen Sporen abzuwaschen. Das Waschwasser wurde daraufhin über einen Filter (Porengröße: 0,45 µm) filtriert und der Filter in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte bis hin zur DNA-Extraktion erfolgten wie unter Kapitel 2.2.3.2 (Tauchbäder, *Methode 1*) beschrieben. Als interne Negativkontrolle wurde das Waschwasser (ohne Probe) in der Probenaufbereitung mitgeführt.

METHODE 2

An Sporenfallen aus dem Jahr 2016 wurde ein kostengünstigeres und zeitsparendes Verfahren zur Probenaufbereitung erprobt. Bei dieser Methode wurde die Vaseline mit einem sterilen Skalpell von den Objektträgern abgekratzt und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Lysis-Puffer (innuPREP Plant DNA Kit) wurde die DNA nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

Nach Bestimmung der DNA-Konzentrationen mithilfe eines Spektrophotometers wurden Arbeitslösungen unterschiedlicher Konzentrationen mit „BioScience-Grade“-Wasser hergestellt: für Holzproben wurden die Arbeitslösungen auf 100 ng/µl eingestellt; die DNA aus Tauchbädern, Vortriebssubstraten und Sporenfallen wurde entweder auf 40 ng/µl eingestellt oder bei geringeren DNA-Ausbeuten direkt in der PCR eingesetzt.

Generell wurden Arbeitslösungen für die unmittelbare Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Langfristig erfolgte die Lagerung der Arbeits- und Stocklösungen bei -20 °C.

2.2.4 PCR-basierter Erreger-Nachweis

Holzproben, Tauchbäder, Vortriebssubstrate sowie Sporenfallen wurden molekularbiologisch auf das Vorkommen von *Pch* untersucht. Dazu wurde ein *Pch*-spezifisches nested PCR-Verfahren (geschachtelte PCR) entwickelt (Kapitel 2.2.4.1). Zur Erfassung weiterer GTD-Erreger wurde darauf basierend ein multiplex nested PCR-Verfahren (Kapitel 2.2.4.2) etabliert, das neben *Pch* die Detektion von *Clo* und verschiedenen Vertretern der Esca-relevanten Gattung *Phaeoacremonium* (*Pm* spp.) ermöglicht. Bei der nested bzw. multiplex nested PCR handelt es sich um ein hochspezifisches und -sensitives Nachweisverfahren. Dabei wird das PCR-Produkt aus einer ersten Reaktion als Template für eine nachfolgende Reaktion verwendet, bei der ein bzw. mehrere Primerpaar(e) innerhalb des gewünschten Amplifikats der ersten Reaktion binden.

Die Sequenzen der in den jeweiligen Reaktionen verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Primer für den Nachweis von *Pch*, *Clo* und *Pm* spp.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Amplikongröße	Referenz
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	650-750 bp	White et al. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Pch5H	GTGACGTCTGAACGGTTCCATC	357 bp	modifiziert nach Buchholz & Fischer (unveröffentlicht)
Pch3H	GAGAGTTCTGCAACAAAACAATAG		
Pch1H	CCCGATCTCCAACCCTTTGTTT	381 bp	Haag (unveröffentlicht)
Pch2H	CGGGCCTATCTTCTATGAAAG		
CLO1F	TACTAGAGCAAAGGACAGGCAGC	433 bp	Navarette et al. (2011) Haag (unveröffentlicht)
Clo3H	GAACCCAATACCAAGCGAGAG		
Pm5H	GGAGGGCACAGACTCTGTATT	ca. 330 bp	Haag (unveröffentlicht)
Pm3H	GTAAACTACTGCGCTCGGAG		

2.2.4.1 *Pch*-spezifische nested PCR

Reaktion 1

Unter Verwendung der Primer ITS5 und ITS4 (siehe Tabelle 2), die spezifisch für die meisten Asco- und Basidiomyceten sind, wurde in einer ersten Reaktion ein Fragment der nukleären rDNA amplifiziert. Dieses erstreckt sich über die ITS1-Region, das 5.8S rRNA-Gen und die ITS2-Region.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 3 dargestellt. Für Unterlagenproben wurden 2 µl DNA (100 ng/µl), für Tauchbad- und Vortriebssubstratproben sowie Sporenfallen je 5 µl DNA (≤ 40 ng/µl) als Template eingesetzt. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit dem SuperHot Taq PCR Kit und den in Tabelle 4 aufgeführten Parametern durchgeführt.

Reaktion 2

Die in Reaktion 1 erhaltenen PCR-Produkte wurden mit „BioScience-Grade“-Wasser 1:50 verdünnt und anschließend 1 µl als Template in Reaktion 2 eingesetzt. Die Reaktion wurde unter Verwendung der *Pch*-spezifischen Primer Pch5H und Pch3H (siehe Tabelle 2) mit dem SuperHot Taq PCR Kit durchgeführt. Zur Zusammensetzung der Reaktionsansätze und den verwendeten Reaktionsparametern siehe Tabelle 3 und 4.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - SuperHot Taq PCR Kit

Reagenz	Präparationsvolumen			Endkonzentration	
Wasser (Bioscience-Grade)	ad	25	µl	-	
Puffer E* (10 x)		2,5	µl	1	x
MgCl ₂		-		2,5	mM
dNTP Mix		0,5	µl	200	µM
ITS5 / Pch5H		0,5	µl	0,2	µM
ITS4 / Pch3H		0,5	µl	0,2	µM
SuperHot DNA-Polymerase		0,2	µl	1	U
DNA		2 ¹ /5 ²	µl	1. Reaktion	8 ¹ /≤5 ² ng/µl
		1 ³	µl	2. Reaktion	variabel ³

*enthält MgCl₂

¹ für Unterlagenholz

² für Tauchbäder, Vortriebssubstrate und Sporenfallen

³ 50⁻¹-Verdünnung des PCR-Produktes aus der 1. Reaktion

Tabelle 4: PCR-Programme - *Pch*-spezifische nested PCR

Reaktion 1		Reaktion 2	
Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
95 °C	10 min	95 °C	10 min
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
57 °C	30 sec	62 °C	30 sec
72 °C	30 sec	72 °C	30 sec
72 °C	10 min	72 °C	10 min
5 °C	∞	12 °C	∞

2.2.4.2 Multiplex nested PCR

Reaktion 1

Die erste Reaktion erfolgte analog zu Kapitel 2.2.4.1 mit den Primern ITS5 und ITS4 (siehe Tabelle 2).

Reaktion 2

Das PCR-Produkt aus Reaktion 1 wurde 1:50 mit „BioScience-Grade“-Wasser verdünnt und in einer nachfolgenden multiplex PCR eingesetzt. Hierfür wurden die spe-zies-spezifischen Primerpaare *Pch*1H/*Pch*2H für *Pch*, *CLO*1/*Clo*3H für *Clo*, sowie das für verschiedene *Pm*-Arten spezifische Primerpaar *Pm*5H/*Pm*3H verwendet (siehe Tabelle 2). Mit Ausnahme von *CLO*1F wurden alle Primer eigens für das Multi-plex-Verfahren neu entworfen. Die Amplifikation der DNA erfolgte durch eine multi-plex touchdown PCR mit dem KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit in einem Gesamtvo-lumen von 10 µl. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die entsprechen- den Reaktionsbedingungen sind dabei in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Im Anschluss an die 2. Reaktion der nested PCR und der multiplex nested PCR wur- den je 10 µl des PCR-Produktes in 1 x TAE-Puffer auf einem 2% Agarosegel (3 µl SERVA DNA Stain G/100 ml) bei 6 V/5 cm Gel für 1,5 h bis 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweiligen DNA-Fragmente wurden danach unter UV-Licht visuali- siert und ihre Länge bestimmt. Proben mit Fragmenten der erwarteten Größe (siehe Tabelle 2) wurden schließlich den jeweiligen Erregern zugeordnet.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit

Reagenz	Präparationsvolumen		Endkonzentration	
Wasser (Bioscience-Grade)	ad	10 µl	-	
KAPA2G Fast Multiplex Mix* (2 x)		5 µl	1	x
KAPA2G Puffer A		-	1,5	x
MgCl ₂		-	3	mM
dNTP Mix		-	200	µM
Pch1H		0,2 µl	0,2	µM
Pch2H		0,2 µl	0,2	µM
CLO1F		0,2 µl	0,2	µM
ClO3H		0,2 µl	0,2	µM
Pm5H		0,2 µl	0,2	µM
Pm3H		0,2 µl	0,2	µM
KAPA2G Fast HotStart Polymerase		-	0,4	U
DNA		1 ¹ µl	variabel ¹	

*enthält KAPA2G Fast HotStart Polymerase, KAPA2G Puffer A , dNTPs und MgCl₂
¹50⁻¹-Verdünnung des PCR-Produktes aus der 1. Reaktion

Tabelle 6: PCR-Programme - multiplex nested PCR

1. Reaktion	2. Reaktion	
	Temperatur	Dauer
	95 °C	3 min
	95 °C	15 sec
	69 °C - 60 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
siehe Tabelle 4	95 °C	15 sec
	60 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
	72 °C	3 min
	12 °C	∞

Tabelle 7 zeigt für die Untersuchungsjahre 2014-2016, welche Proben mit welchem PCR-Verfahren untersucht wurden (für eine detaillierte Übersicht der Proben, Probenanzahl und Probennahme-Zeitpunkte siehe Anhang):

Tabelle 7: Proben aus den Rebschulen und das jeweils angewandte PCR-Verfahren

Jahr	Probe	<i>Pch</i> -spezifische nested PCR	multiplex nested PCR
2014	UH-VM	symptomatische Proben	-
	UH-VT		
	UH-MF	drei deutlich symptomatische Proben je Unterlagensorte	
	UH-EF		
	TB	alle Tauchbad- und Vortriebssubstratproben	
	VTS		
	SF	alle Sporenfallen aus dem Freiland von Betrieb 1	
2015	UH-VM	symptomatische Proben	
	UH-VT		
	UH-MF	alle Proben	
	UH-EF		
	UH-VE	-	alle Proben
	TB	alle Tauchbad- und Vortriebssubstratproben	
	VTS		
SF	alle Sporenfallen aus dem Freiland von Betrieb 1		
2016	UH-VM	-	symptomatische Proben
	UH-VT		
	UH-MF		alle Proben
	UH-EF		
	UH-VE		alle Proben
	TB	alle Tauchbad- und Vortriebssubstratproben	
	VTS		
SF	alle Sporenfallen aus dem Freiland von Betrieb 1		

UH-VM Unterlagenholz-Vermehrungsmaterial
UH-VT Unterlagenholz-Vortreiben
UH-MF Unterlagenholz-Mitte der Freilandphase
UH-EF Unterlagenholz-Ende der Freilandphase

UH-VE Unterlagenholz-verkaufsfertiges Pflanzgut
TB Tauchbad
VTS Vortriebssubstrat
SF Sporenfallen

2.2.5 Einfluss der Erreger auf die Symptomentwicklung im Unterlagenholz

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Erregerbefall und der Symptomentwicklung im Unterlagenholz zu untersuchen, wurde zunächst ermittelt wie oft die möglichen Erregerszenarien im Unterlagenholz vorkamen. Die Erregerszenarien, die im Holz vorkommen können, ergeben sich dabei aus einer Dreierkombination, drei Zweierkombinationen sowie den Einzelnachweisen der Erreger:

- | | | | |
|----------|--|----------|----------------|
| a | <i>Pch</i> + <i>Pm</i> spp. + <i>Clo</i> | e | <i>Pch</i> |
| b | <i>Pch</i> + <i>Clo</i> | f | <i>Clo</i> |
| c | <i>Pch</i> + <i>Pm</i> spp. | g | <i>Pm</i> spp. |
| d | <i>Clo</i> + <i>Pm</i> spp. | | |

Daran anschließend wurde der Anteil symptomatischer Unterlagen für die jeweiligen Erregerszenarien (a-g) bestimmt. Hierbei wurden alle Unterlagen der Pfropfreben vom Vortriebstadium bis zum Ende der Freilandphase sowie des verkaufsfertigen Pflanzguts aus den Jahren 2015 und 2016 untersucht. Die Holzproben aus 2014 und das Vermehrungsmaterial aus 2015 und 2016 wurden nicht berücksichtigt, da hier ausschließlich in symptomatischen Unterlagen die Erregersituation überprüft wurde (siehe Tabelle 7).

2.2.6 Einfluss der Witterung auf den Sporenflug in Freilandflächen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Witterung und Sporenflug in Freilandflächen von Betrieb 1 zu erfassen, wurden Klimadiagramme mit den Wetterparametern Temperatur, Niederschlag und rel. Luftfeuchte (automatisch erstellt über www.wetter.rlp.de) von der nächstgelegenen Wetterstation für den Überwachungszeitraum in den jeweiligen Jahren bezogen. Diese wurden anschließend, zeitlich entsprechend, den Nachweisen von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* aus der Luft gegenüber gestellt.

2.2.7 Statistische Auswertung & Darstellung des Symptom- /Erregerauftretens

Die statistische Auswertung des Symptom- und Erregerauftretens wurde mithilfe der Statistik-Software R v. 3.4.0 (R Core Team, 2017) und der grafischen Benutzeroberfläche RStudio v. 1.0.143. (RStudio Team, 2016) durchgeführt.

Es erfolgte eine Auswertung folgender möglicher Unterschiede/Zusammenhänge:

- Unterschiede zwischen Rebschulen, apikalen und basalen Unterlagenbereichen sowie Rebsorten hinsichtlich des Symptomauftrittens im Holz
- Unterschiede zwischen Rebschulen und Unterlagensorten hinsichtlich des Erregervorkommens in Unterlagenholz
- Unterschiede im Erregervorkommen innerhalb der Rebschulen
- Zusammenhang verschiedener Erregerszenarien im Unterlagenholz und Symptomentwicklung

Hierfür wurde zunächst ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit durch den exakten Fisher-Test (zweiseitig, 5% Irrtumswahrscheinlichkeit) durchgeführt. Bei einem allgemeinen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) erfolgte zur genaueren Auswertung *post-hoc* ein paarweiser exakter Fisher-Test mit angepassten p-Werten für multiple Vergleiche nach Benjamini & Hochberg (1995) (5% Irrtumswahrscheinlichkeit signifikanter Unterschiede).

Ergebnisse der Signifikanztests wurden entweder unter Angabe der jeweiligen Signifikanzen (n.s.=nicht signifikant ($p \geq 0,05$); *=signifikant ($p < 0,05$); **=hochsignifikant ($p < 0,01$); ***=höchstsignifikant ($p < 0,001$)) in Kreuztabellen dargestellt oder durch Kleinbuchstaben (unterschiedliche Buchstaben bei signifikanten Unterschieden) gekennzeichnet.

Balkendiagramme zur Darstellung des Symptom- und Erregerauftretens im Holz wurden mit Ausnahme von horizontalen Balkendiagrammen (erstellt mit Microsoft Excel 2013) mithilfe von RStudio unter Verwendung des Pakets „ggplot2“ erstellt. Dabei geben die Balkenhöhen den prozentualen Anteil symptomatischer bzw. befallener Holzproben aus dem jeweiligen Stichprobenumfang und die Fehlerbalken das 95% Bootstrap Vertrauensintervall des errechneten Prozentwertes an.

2.2.8 Pilzisolierung und Identifikation der Isolate aus Rebschulproben

2.2.8.1 Herstellung des Nährmediums

Als Nährmedium wurde durchwegs Kartoffelextrakt-Glucose-Agar (Potato dextrose agar, PDA) verwendet. Zur Herstellung wurden 19,5 g Kartoffelextrakt-Glucose-Agar (4 g/l Kartoffel-Infus, 20 g/l Glucose, 15 g/l Agar, pH-Wert: $5,6 \pm 0,2$) auf 500 ml mit ddH₂O aufgefüllt, bei 121 °C für 20 min autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Für die Isolation der Pilze wurde dem Nährmedium vor dem Gießen das Antibiotikum Chloramphenicol (Endkonzentration 25 µg/ml) zugegeben. Zur Herstellung und Erhaltung der Reinkulturen wurde PDA ohne Antibiotikum verwendet.

2.2.8.2 Isolation und Kultivierung auf Nährmedium

Unterlagenholz

Die Isolation der Pilze erfolgte überwiegend aus dem Basalbereich der Unterlagen. Welche der Unterlagenproben untersucht wurden ist im Folgenden aufgelistet:

2014

- symptomatische Proben des Vermehrungsmaterials aus Unterlagenmuttergärten und der Pfropfreben zum Zeitpunkt des Vortreibens
- drei deutlich symptomatische Proben je Sorte & Rebschule während der Freilandphase (Mitte der Freilandphase (MF) und Ende der Freilandphase (EF))

2015/2016

- symptomatische Proben des Vermehrungsmaterials aus Unterlagenmuttergärten
- eine stark-, eine schwach- und eine nicht-symptomatische Probe (sofern möglich) je Sorte & Rebschule zum Zeitpunkt des Vortreibens und während der Freilandphase (MF und EF)

Der beprobte Holzbereich wurde zunächst wie unter Kapitel 2.2.3.1 beschrieben entrinde und oberflächensterilisiert. Daraufhin wurden vier Holzchips je Probe mit einem sterilen Skalpell entnommen und auf PDA mit Chloramphenicol überführt.

Tauchbäder

Für jeweils 100 µl der Tauchbadproben wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} - 10^{-4}) mit sterilem Leitungswasser hergestellt. Jeweils 50 µl der unverdünnten und verdünnten Proben wurden anschließend auf PDA mit Chloramphenicol ausplattiert. Eine Ausplattierung von 50 µl des sterilen Leitungswassers diente als Negativkontrolle.

Vortriebssubstrate

Für die Jahre 2014 und 2015 wurden je Probe 300 mg Substrat in einem sterilen Reaktionsgefäß (2 ml) mit 500 µl sterilem Leitungswasser versetzt und bei RT auf einem Vibrationsschüttler für ca. 10 sec durchmischt. Das Beprobungsvolumen der Vortriebssubstrate aus 2016 wurde erhöht, sodass jeweils 5 g Substrat in einem sterilen Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit 20 ml sterilem Leitungswasser für 10 min bei 300 rpm und RT auf einem Inkubationsschüttler geschüttelt wurden. Von einem Teilvolumen (100µl) der Proben wurden mit sterilem Leitungswasser 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen hergestellt. Jeweils 50 µl der unverdünnten und verdünnten Suspensionen wurden auf PDA mit Chloramphenicol ausplattiert. 50 µl des sterilen Leitungswassers wurden als Negativkontrolle ausplattiert.

Bodenproben

Jeweils 300 mg der Bodenproben aus 2014 und 2015 wurden mit 500 µl sterilem Leitungswasser in einem sterilen Reaktionsgefäß (2 ml) versetzt und anschließend auf einem Vibrationsschüttler bei RT für ca. 10 sec gemischt. Auch hier wurde das Beprobungsvolumen im Jahr 2016 erhöht, wobei 3 g Bodenmaterial in 20 ml sterilem Leitungswasser geschüttelt wurden (300 rpm für 30 min bei RT). Die weiteren Bearbeitungsschritte erfolgten analog zu denen der Vortriebssubstrate (s.o.).

Sowohl die Holzchips als auch die Ausplattierungen der Tauchbad-, Vortriebssubstrat- und Bodenproben (inkl. Negativkontrollen) wurden bei 25 °C und Dunkelheit inkubiert und das Wachstum der Kolonien unter einem Stereomikroskop über vier Wochen mindestens einmal täglich kontrolliert. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden die Hyphenspitzen der Pilzkolonien mit einer sterilen Impflanzette auf frisches PDA-Medium überimpft.

Die Arbeitsschritte zur Isolation der Pilze sowie zur Herstellung und Erhaltung der Reinkulturen erfolgten an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen.

2.2.8.3 Identifikation der Pilzisolat

DNA-Extraktion und PCR

Die DNA-Extraktion aus Reinkulturen (Kapitel 2.2.8.2) erfolgte nach dem Protokoll von Tillet and Neilan (2000). Die DNA-Konzentrationen wurden mithilfe eines Spektrophotometers bestimmt und anschließend mit „BioSciences-Grade“-Wasser auf eine Konzentration zwischen 10 und 100 ng/μl eingestellt. Daraufhin erfolgte unter Verwendung der Primer ITS5 und ITS4 (siehe Tabelle 2) die Amplifikation eines Fragments der nukleären rDNA (siehe 2.2.4.1), das sich u.a. aufgrund seiner interspezifischen Variation besonders gut zur Artbestimmung eignet. Die Reaktionen wurden mit dem KAPA HiFi™ HotStart PCR Kit und der in Tabelle 8 dargestellten Zusammensetzung in einem Gesamtvolumen von 25 μl durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsparameter sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionsansätze - KAPA HiFi™ HotStart PCR Kit

Reagenz	Präparationsvolumen			Endkonzentration	
Wasser (Bioscience-Grade)	ad	25	μl	-	
KAPA HiFi Fidelity Puffer* (5 x)		5	μl	1	x
MgCl ₂		-		2	mM
dNTP Mix		0,75	μl	300	μM
ITS5		0,75	μl	0,3	μM
ITS4		0,75	μl	0,3	μM
SuperHot DNA-Polymerase		0,5	μl	0,5	U
DNA		1	μl	0,4-4	ng/μl

*enthält MgCl₂

Tabelle 9: PCR-Programm - Amplifikation der ITS-Region

Temperatur	Dauer	
95 °C	5 min	
98 °C	20 sec	
57 °C	15 sec	25 Zyklen
72 °C	20 sec	
72 °C	1 min	
12 °C	∞	

Sequenzierung und BLAST

Fünf µl der Amplifikate wurden in 1 x TAE Puffer auf einem 1,5% Agarosegel (3 µl SERVA DNA Stain G/100 ml) bei 6 V/5 cm Gel für 30-45 min aufgetrennt. Nach erfolgreicher Amplifikation wurde das restliche PCR-Produkt mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und die Konzentration mit einem Spektrophotometer bestimmt. Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte durch ein externes Sequenzierlabor (Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland). Die Sequenzierung wurde in beide Richtungen mit den Primern ITS5 und ITS4 (siehe Tabelle 2) in einem Applied Biosystems 3130XL DNA Analyzer unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits durchgeführt.

Nach Qualitätsüberprüfung und Assemblierung der DNA-Sequenzen mithilfe der Software CLC Main Workbench 7.8.1 wurden die Konsensus-Sequenzen durch das „Basic Local Alignment Tool“ (BLAST, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in den Nukleotid-Datenbanken abgeglichen und die Identität der Isolate bestimmt.

Eine Auswahl der Pilzisolat wird zur Aufrechterhaltung in der Kultursammlung des Instituts für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau am Julius Kühn-Institut, Geilweilerhof, in Kulturröhrchen bei +4 °C aufbewahrt.

3 ERGEBNISSE

3.1 VISUELLE BEFALLSSITUATION DES UNTERLAGEN- UND EDELREISHOLZES

3.1.1 Unterlagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess

In den Jahren 2014 bis 2016 wurden insgesamt 456 Unterlagenproben der Rebschule 1 (RS 1), 428 Proben der Rebschule 2 (RS 2) und 416 Proben der Rebschule 3 (RS 3) während des Pflanzguterzeugungsprozesses hinsichtlich des Auftretens Esca-typischer Symptome („symptomatisch“ vs. „asymptomatisch“) untersucht (siehe Abbildung 6). Dadurch sollte ein allgemeiner Einblick in die visuelle Befallssituation der Unterlagen während der Pflanzguterzeugung gewonnen und potenzielle Unterschiede zwischen Rebschulen, Apikal- und Basalbereichen von Unterlagen sowie verschiedenen Unterlagensorten aufgezeigt werden.



Abbildung 6: Symptomatisches und asymptomatisches Unterlagenholz. Exemplarische Darstellung einer Unterlage mit stark ausgeprägten „brown wood streaking“- und „Gummiosis“-Symptomen (links) und einer optisch gesunden Unterlage (rechts).

Die Ergebnisse der visuellen Befallsbonitur sind, aufgetrennt nach Apikal- und Basalbereich, in Abbildung 7 dargestellt. Der Anteil symptomatischer Unterlagen bezieht sich dabei unabhängig von der Sorte auf die Gesamtheit der untersuchten Unterlagensorten in den jeweiligen Betrieben.

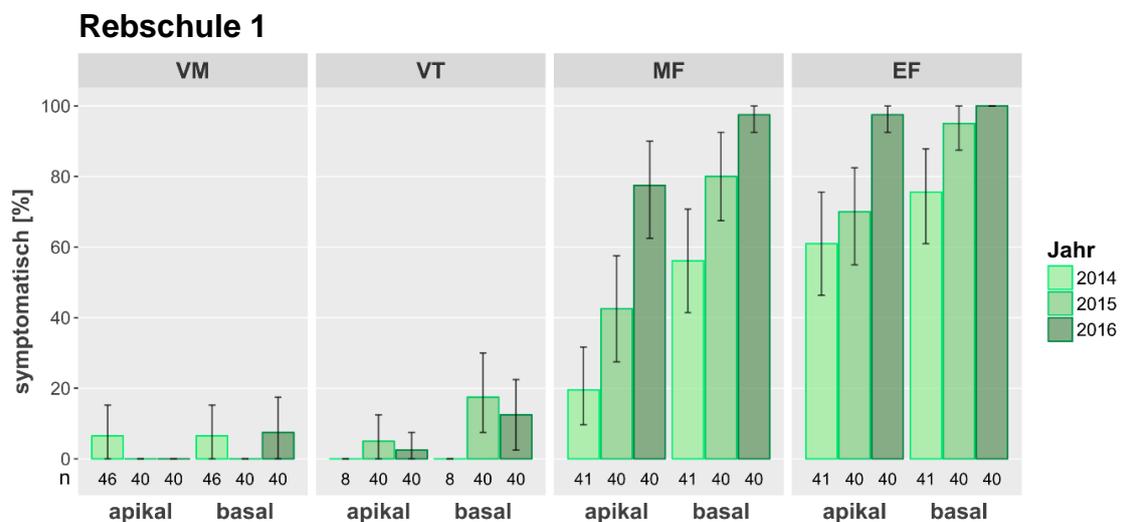
Generell war in allen Untersuchungsjahren und Rebschulen eine deutliche Zunahme der Symptomatik über das Jahr hinweg festzustellen (siehe Abbildung 7). Während das Vermehrungsmaterial zu Beginn des Jahres noch weitestgehend unauffällig war,

zeigten Unterlagen gegen Ende der Pflanzguterzeugung in bis zu 100% der Fälle Symptome im basalen Bereich (siehe Abbildung 7, EF 2016). Zudem konnte ein Anstieg der Symptome von Jahr zu Jahr, insbesondere während der Standzeit der Pfropfreben im Freiland (MF und EF), beobachtet werden.

Vergleich der Symptomatik zwischen den Rebschulen

Im Vergleich der einzelnen Rebschulen zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf das Symptomaufreten sowohl im Apikalbereich (■ in Tabelle 10) als auch im Basalbereich (■ in Tabelle 10) der Unterlagen. Allerdings beschränkten sich diese auf einzelne Probennahmen-Zeitpunkte in den Jahren 2014 und 2016. So waren zur Mitte der Freilandphase 2014 Unterlagen der RS 1 im Basalbereich deutlich häufiger symptomatisch als solche aus RS 2, deren Unterlagen wiederum signifikant öfter betroffen waren als diejenigen aus RS 3. Zum Ende der Freilandphase 2014 war das Symptomaufreten im Apikalbereich der Unterlagen aus RS 1 am höchsten, gefolgt von RS 3 und 2. Für den Basalbereich waren zu diesem Zeitpunkt in RS 3 signifikant seltener Symptome als in den beiden anderen Rebschulen zu beobachten (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10, 2014).

In 2016 waren signifikante Unterschiede lediglich zum Zeitpunkt des Vortreibens erkennbar: während in RS 3 die Apikalbereiche öfter Symptome zeigten als in den beiden anderen Rebschulen, waren bei RS 2 die Basalbereiche signifikant häufiger symptomatisch (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10, 2016).



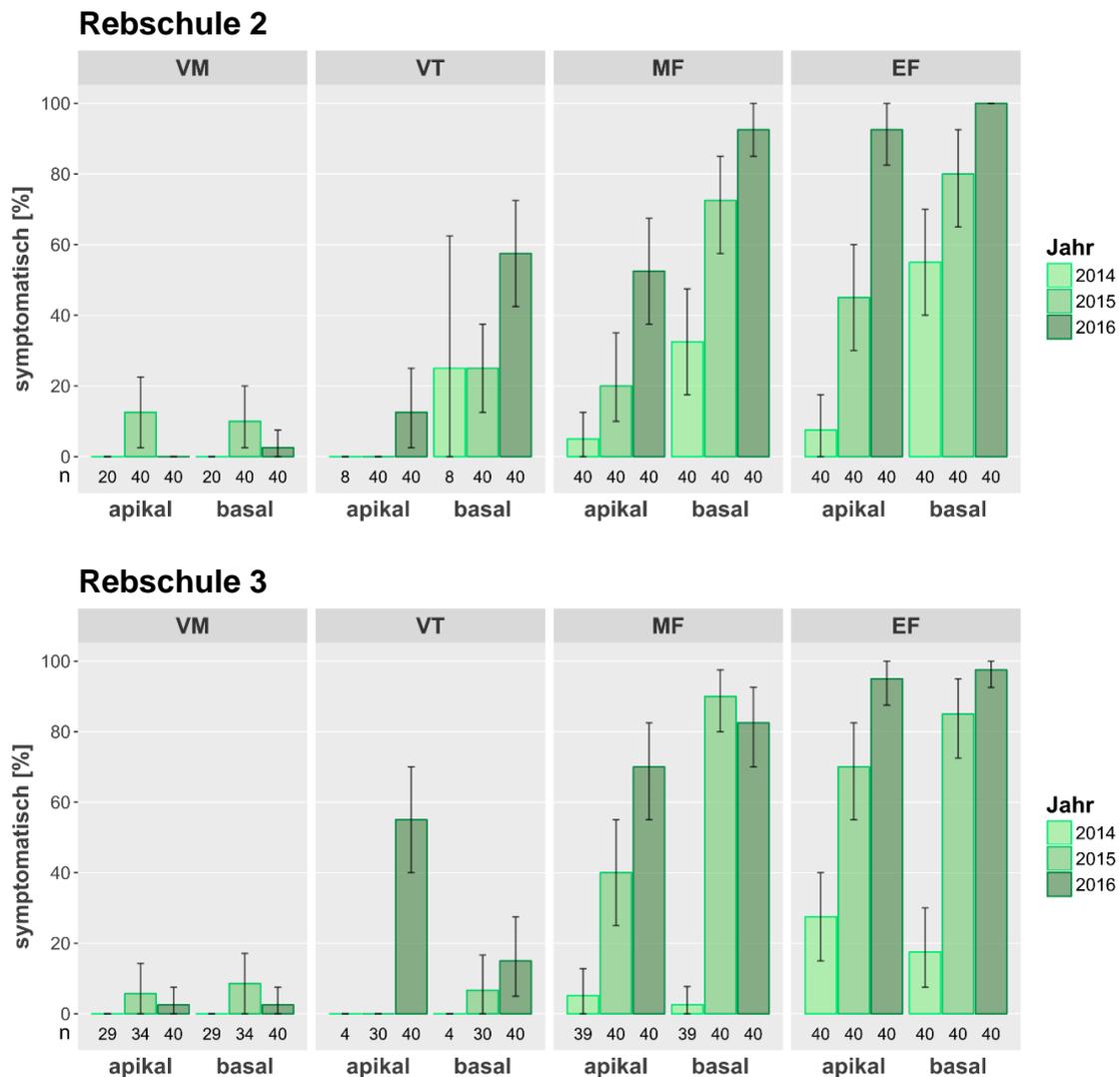


Abbildung 7: Anteil der Unterlagenproben mit Esca-typischen Holzsymptomen während der Pflanzguterzeugung in den Jahren 2014-2016 (n: Probenumfang). Untersucht wurden das Vermehrungsmaterial (VM) und Pfropfreben zum Vortreiben (VT) sowie zur Mitte und zum Ende der Freilandphase (MF und EF).

Vergleich der Symptomatik zwischen Apikal- und Basalbereich

Bis auf wenige Ausnahmen fanden sich Esca-typische Holzsymptome verstärkt im Basalbereich der Unterlagen. Signifikante Unterschiede (■ in Tabelle 10) waren in 2014 zur Mitte der Freilandphase in den Betrieben 1 und 2, und gegen Ende der Freilandphase in Betrieb 2 festzustellen (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10, 2014). In 2015 war ein signifikant höheres Symptomaufreten im Basalbereich bereits zum Vortreiben in RS 2 zu verzeichnen, und konnte im weiteren Verlauf der Pflanzguterzeugung zur Mitte der Freilandsaison (MF) in allen Rebschulen sowie kurz vor dem Ausschulen (EF) in den Rebschulen 1 und 2 beobachtet werden (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10, 2015). Signifikante Unterschiede bestanden darüber hinaus in 2016 während des

Vortreibens in RS 2 und 3 und zur Mitte der Freilandphase in RS 1 und 2 (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10, 2016).

Tabelle 10: Vergleich des Symptomauftritts im Unterlagenholz zwischen den Rebschulen sowie zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich während der Pflanzguterzeugung

2014			VM			VT			MF			EF			
			RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a
VM	RS 1	a													
		b	n.s.												
	RS 2	a	n.s.												
b		n.s.	n.s.n.s.												
RS 3	a	n.s.	n.s.												
	b	n.s.	n.s.n.s.												
VT	RS 1	a													
		b	n.s.												
	RS 2	a	n.s.												
b		n.s.	n.s.n.s.												
RS 3	a	n.s.	n.s.												
	b	n.s.	n.s.n.s.												
MF	RS 1	a													
		b	**												
	RS 2	a	n.s.	*	**										
b		n.s.	n.s.												
RS 3	a	n.s.	***	**	n.s.										
	b	n.s.	n.s.												
EF	RS 1	a													
		b	n.s.												
	RS 2	a	***	n.s.	***										
b		n.s.	*												
RS 3	a	**	***	**	n.s.										
	b	***	**	n.s.											
2015			VM			VT			MF			EF			
RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	
a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
VM	RS 1	a													
		b	n.s.												
	RS 2	a	n.s.												
b		n.s.	n.s.n.s.												
RS 3	a	n.s.	n.s.												
	b	n.s.	n.s.n.s.												
VT	RS 1	a													
		b	n.s.												
	RS 2	a	n.s.	n.s.	**										
b		n.s.	n.s.	n.s.n.s.											
RS 3	a	n.s.	n.s.	n.s.n.s.											
	b	n.s.	n.s.n.s.												
MF	RS 1	a													
		b	**												
	RS 2	a	n.s.	n.s.	**										
b		n.s.	n.s.	n.s.											
RS 3	a	n.s.	n.s.	**											
	b	n.s.	n.s.	n.s.											
EF	RS 1	a													
		b	**												
	RS 2	a	n.s.	n.s.	**										
b		n.s.	n.s.	n.s.											
RS 3	a	n.s.	n.s.	n.s.n.s.											
	b	n.s.	n.s.n.s.												

2016			VM			VT			MF			EF		
			RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
VM	RS 1	a	n.s.											
	RS 2	a	n.s.											
		b	n.s.n.s.											
RS 3	a	n.s.												
	b	n.s.n.s.												
VT	RS 1	a	n.s.											
	RS 2	a	n.s.											
		b	***											
RS 3	a	***												
	b	n.s. ***												
MF	RS 1	a	n.s.											
	RS 2	a	n.s.											
		b	* n.s. ***											
RS 3	a	n.s. n.s.												
	b	n.s. n.s.n.s.												
EF	RS 1	a	n.s.											
	RS 2	a	n.s.											
		b	n.s.n.s.											
RS 3	a	n.s. n.s.												
	b	n.s. n.s.n.s.												

- signifikante Unterschiede im apikalen Unterlagenbereich zwischen den Rebschulen
- signifikante Unterschiede im basalen Unterlagenbereich zwischen den Rebschulen
- signifikante Unterschiede zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich innerhalb der Rebschulen

VM	Vermehrungsmaterial	RS 1	Rebschule 1	<u>paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$</u>
VT	Vortreiben	RS 2	Rebschule 2	n.s. nicht signifikant ($p \geq 0,05$)
MF	Mitte Freilandphase	RS 3	Rebschule 3	* signifikant ($p < 0,05$)
EF	Ende Freilandphase			** hochsignifikant ($p < 0,01$)
a	apikal			*** höchstsignifikant ($p < 0,001$)
b	basal			

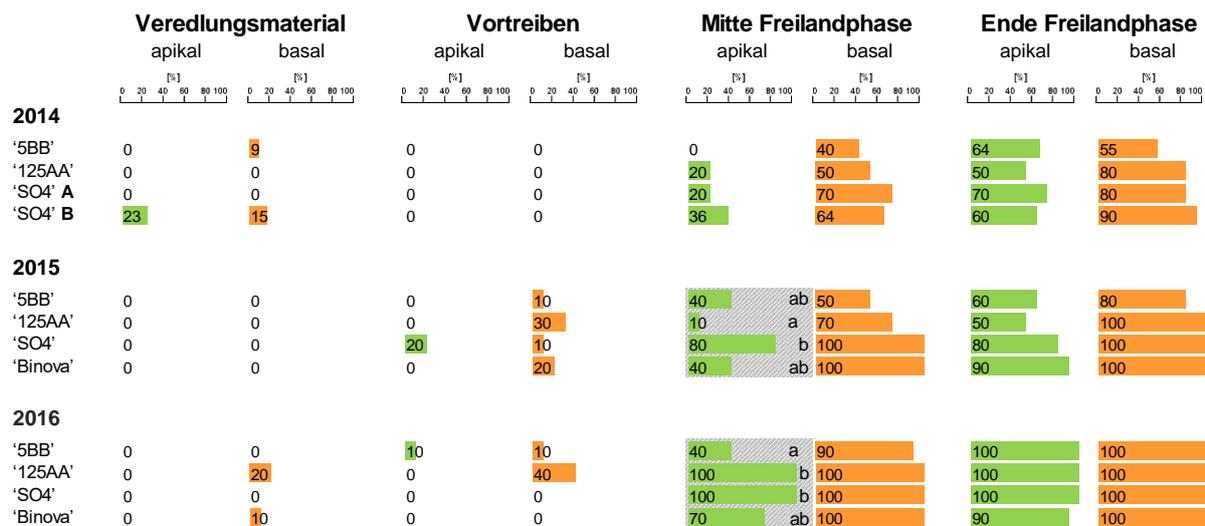
Vergleich der Symptomatik zwischen den Unterlagensorten

Ein Vergleich der beprobten Unterlagensorten ‘5BB’, ‘125AA’, ‘SO4’, ‘Binova’ und ‘Börner’ zeigte, dass sich die visuelle Befallssituation im Allgemeinen sehr ähnlich darstellte und signifikante Unterschiede (⚡ in Tabelle 11) zwischen den Sorten vereinzelt für die Apikalbereiche (■ in Tabelle 11) festzustellen waren. So z.B. bei RS 1 zur Mitte der Freilandphasen in 2015 und 2016: hier war in 2015 die Sorte ‘SO4’ mit 80% signifikant häufiger von Symptomen betroffen als ‘125AA’ mit 10%, während ‘5BB’- und ‘Binova’-Unterlagen mit jeweils 40% dazwischen lagen und sich nicht signifikant von den beiden anderen Sorten unterschieden (siehe Tabelle 11, RS 1 in 2015). In 2016 hingegen waren alle Proben der Sorten ‘SO4’ und ‘125AA’ symptomatisch, während ‘5BB’ mit 40% am seltensten Symptome zeigte. ‘Binova’ unterschied sich mit 70% nicht signifikant von den restlichen Sorten (siehe Tabelle 11, RS 1 in 2016).

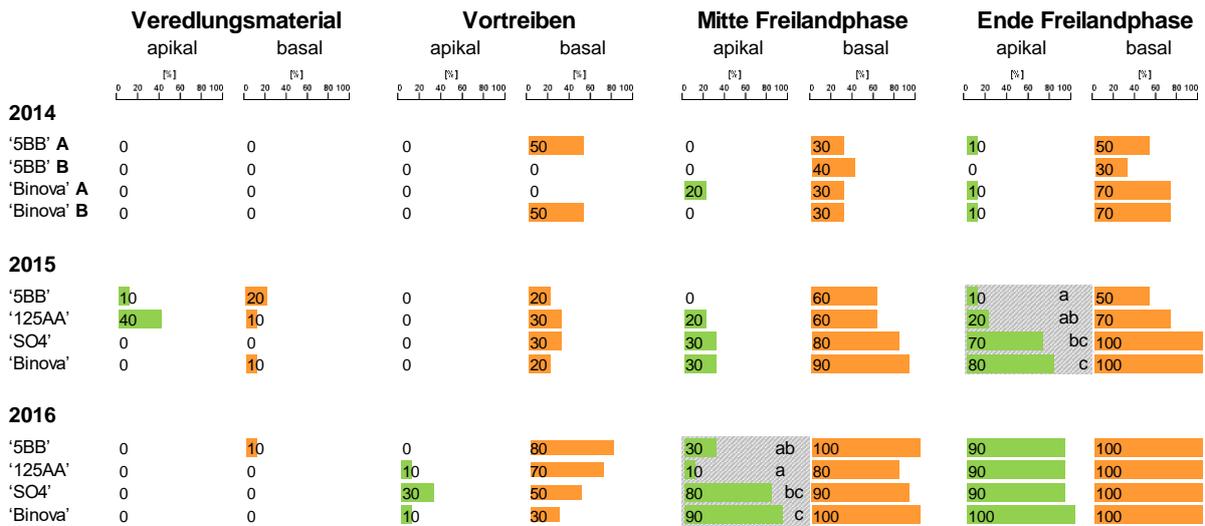
Weitere Unterschiede konnten 2015 in RS 2 gegen Ende der Freilandsaison beobachtet werden. Am häufigsten war hier die Sorte 'Binova' (80%) von Symptomen betroffen, gefolgt von 'SO4' mit 70%, '125AA' mit 20% und '5BB' mit 10%, wobei sich hier '5BB' signifikant von 'Binova' und 'SO4', und '125AA' signifikant von 'Binova' unterschied (siehe Tabelle 11, RS 2 in 2015). Ähnliches war zur Mitte der Freilandphase in 2016 festzustellen. Auch zu diesem Zeitpunkt waren 'Binova' mit 90% und 'SO4' mit 80% in RS 2 am auffälligsten, '5BB' und '125AA' waren mit 30 bzw. 10% vergleichsweise selten betroffen. Signifikant waren dabei die Unterschiede zwischen '125AA' und 'Binova' sowie 'SO4', und zwischen '5BB' und 'Binova' (siehe Tabelle 11, RS 2 in 2016).

Tabelle 11: Vergleich des Symptomauftritts zwischen Unterlagensorten im apikalen und basalen Unterlagenbereich während der Pflanzguterzeugung

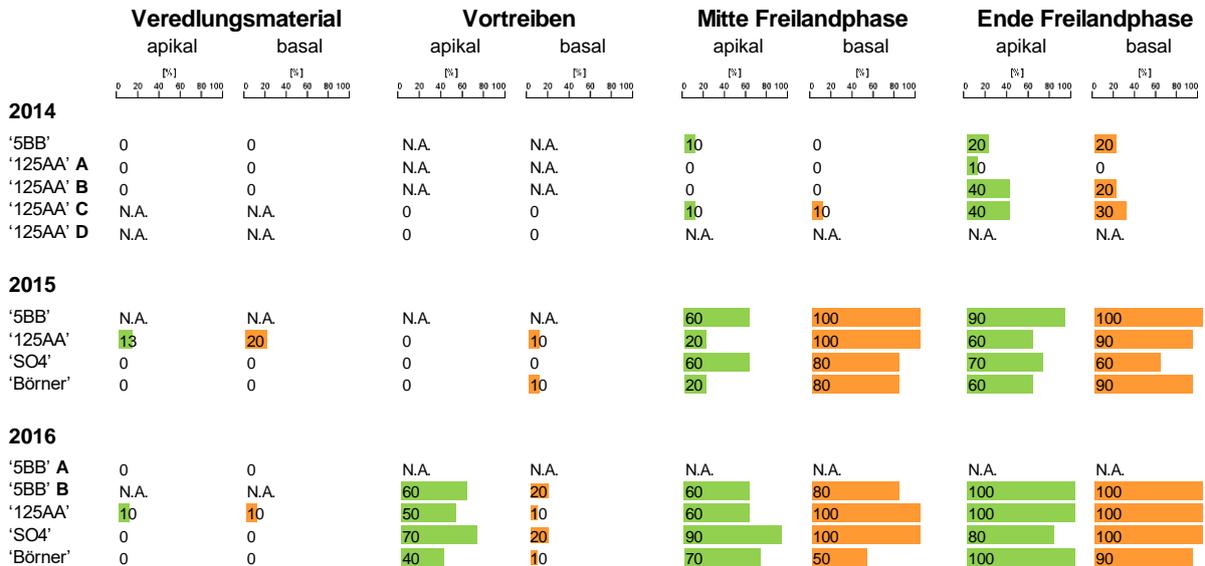
Rebschule 1



Rebschule 2



Rebschule 3



■ Symptomaufreten im apikalen Unterlagenbereich

■ Symptomaufreten im basalen Unterlagenbereich

▨ signifikante Unterschiede (Sorten mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant voneinander verschieden; paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$; Probenumfang siehe Anhang)

N.A.: nicht verfügbar

Grundsätzlich ließ sich durch die visuelle Befallsbonitur der Unterlagen in allen Untersuchungs Jahren und Rebschulen ein deutlicher Anstieg der Symptome im Verlauf der Pflanzguterzeugung und über die Jahre hinweg beobachten. Unterschiede im Symptomaufreten zeigten sich vor allem zwischen dem apikalen und basalen Unterlagenbereich, wobei die Basalbereiche meist stärker betroffen waren. Unterschiede zwischen Rebschulen und Unterlagensorten waren vergleichsweise seltener festzustellen.

3.1.2 Unterlagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts

Nach der Pflanzguterzeugung durchlaufen die Pfropfreben eine Qualitätskontrolle bevor sie im darauffolgenden Frühjahr in den Verkauf gehen. Um die Symptom-Situation im Pflanzgut, das schließlich bei den Winzern ankommt, näher zu beleuchten, wurden in 2015 und 2016 die Unterlagenbereiche verkaufsfertiger Pfropfreben visuell bonitiert (Abbildung 8). Nach Möglichkeit wurden die gleichen Pfropfkombinationen beprobt die schon im Vorjahr während der Pflanzguterzeugung untersucht wurden. Waren diese bereits ausverkauft, wurden, sofern verfügbar, Pfropfkombinationen gewählt bei denen die Unterlagenkomponente derjenigen aus dem Vorjahr entsprach (siehe hierzu Anhang). Insgesamt wurden 60 Proben aus RS 1, 70 Proben aus RS 2 und 20 Proben aus RS 3 untersucht. Eine Probennahme war bei RS 3 in 2016 nicht möglich, sodass hier lediglich Ergebnisse aus 2015 vorliegen.

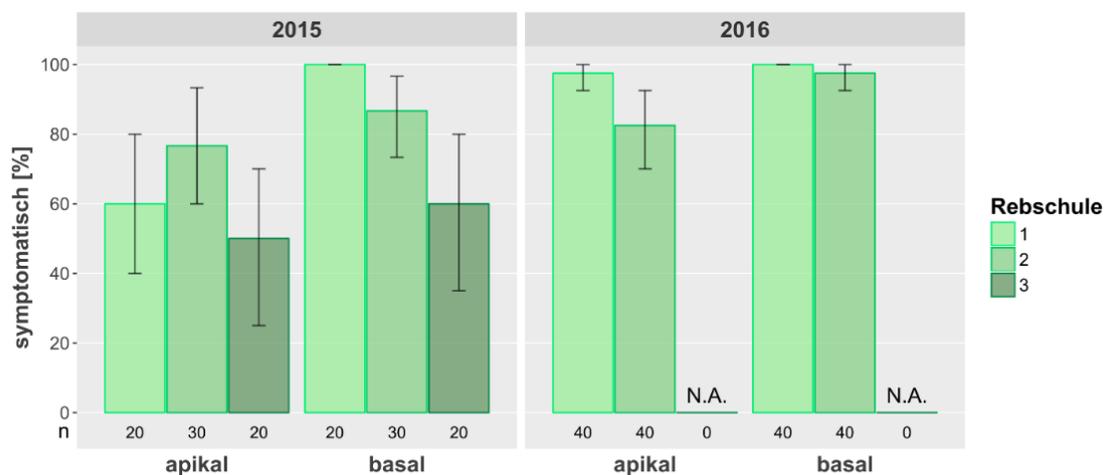


Abbildung 8: Anteil der Unterlagenproben mit Esca-typischen Holzsymptomen bei verkaufsfertigem Pflanzgut in den Jahren 2015 und 2016 (n: Probenumfang). **N.A.:** nicht verfügbar

Generell war ein sehr hoher Anteil der untersuchten Unterlagen symptomatisch. Unterlagen der RS 1 und 2 waren besonders stark betroffen und wiesen in allen bzw. nahezu allen Proben typische Verfärbungen im Basalbereich auf (siehe Abbildung 8, RS 1 und 2). Die Unterlagen der RS 3 waren in 2015 vergleichsweise weniger häufig auffällig (Abbildung 8) und unterschieden sich im Basalbereich dabei deutlich von denen der RS 1 (■ in Tabelle 12).

Zwischen Apikal- und Basalbereich unterschieden sich die Unterlagen äußerst selten. Lediglich bei RS 1 zeigten die basalen Bereiche im Jahr 2015 signifikant häufiger Symptome (vgl. Abbildung 8 und Tabelle 12 (■)).

Tabelle 12: Vergleich des Symptomauftritts im Unterlagenholz zwischen den Rebschulen sowie zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich bei verkaufsfertigem Pflanzgut

			2015						2016				
			RS 1		RS 2		RS 3		RS 1		RS 2		
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
2015	RS 1	a											
		b	**										
	RS 2	a	n.s.										
		b		n.s.	n.s.								
	RS 3	a	n.s.		n.s.								
		b		**		n.s.	n.s.						
2016	RS 1	a						n.s.					
		b							n.s.				
	RS 2	a							n.s.				
		b								n.s.	n.s.		

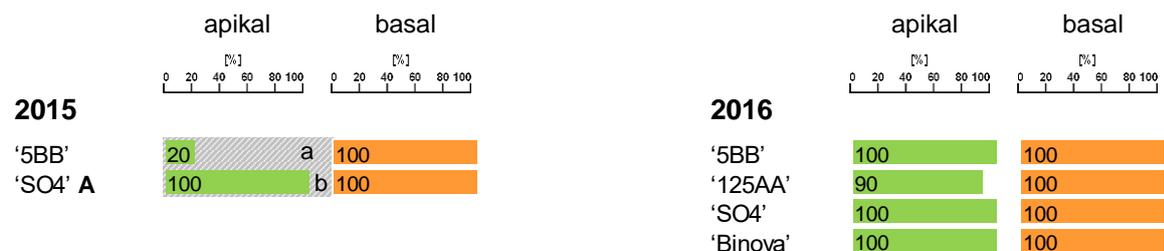
■ signifikante Unterschiede im basalem Unterlagenbereich zwischen den Rebschulen
■ signifikante Unterschiede zwischen apikalem und basalem Unterlagenbereich innerhalb der Rebschulen

RS 1 Rebschule 1 paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$
 RS 2 Rebschule 2 n.s. nicht signifikant ($p \geq 0,05$)
 RS 3 Rebschule 3 * signifikant ($p < 0,05$)
 a apikal ** hochsignifikant ($p < 0,01$)
 b basal *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)

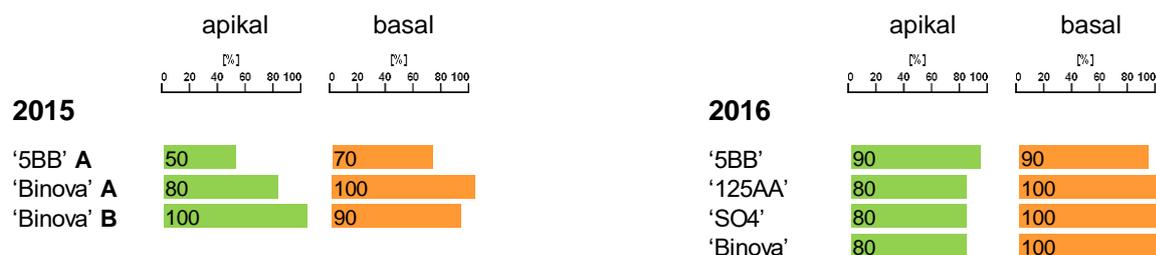
Signifikante Unterschiede zwischen Unterlagensorten waren ausschließlich in 2015 bei RS 1 im Apikalbereich erkennbar (■ in Tabelle 13, RS 1). Hier war die Sorte 'SO4' (Herkunft **A**: Italien, vgl. Anhang) wesentlich häufiger symptomatisch als '5BB' (/// in Tabelle 13, RS 1). Daneben zeigten sich bei RS 3 in 2015 deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen geographischen Herkünften der gleichen Sorte (/// in Tabelle 13, RS 3): '125AA'-Unterlagen aus Italien (Herkunft **A**, vgl. Anhang) waren apikal (■ in Tabelle 13, RS 3) signifikant seltener von Holzsymptomen betroffen als solche aus Deutschland (Herkunft **B**, vgl. Anhang).

Tabelle 13: Vergleich des Symptomauftritts zwischen Unterlagensorten im apikalen und basalen Bereich bei verkaufsfertigem Pflanzgut

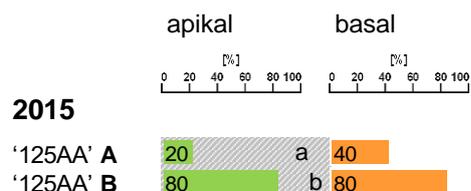
Rebschule 1



Rebschule 2



Rebschule 3



■ Symptomaufreten im apikalen Unterlagenbereich

■ Symptomaufreten im basalen Unterlagenbereich

▨ signifikante Unterschiede (paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$; Probenumfang siehe Anhang)

3.1.3 Edelreisholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess und des verkaufsfertigen Pflanzguts

Um einen Einblick in das Auftreten Esca-typischer Symptome im Edelreisholz zu ermöglichen sowie mögliche Unterschiede zwischen Rebschulen und Sorten zu identifizieren, wurden in den Jahren 2015 und 2016 ab dem Vortriebstadium visuelle Befallsuntersuchungen zusätzlich im Edelreisbereich der Pfropfreben durchgeführt. Das in Abbildung 9 dargestellte Symptomaufreten bezieht sich hierbei auf die Gesamtheit der Edelreissorten aus den jeweiligen Rebschulen.

Wie schon beim Unterlagenholz beobachtet, ließ sich auch bei den Edelreisern insgesamt ein deutlicher Anstieg symptomatischer Proben im Laufe der Zeit erkennen (vgl. Abbildung 7 und 9). Im Vergleich der beiden Pfropfkomponenten waren die Unterlagen, vor allem zur Mitte und zum Ende der Freilandphase 2015, meist häufiger symptomatisch. Im Gegensatz dazu waren die Edelreiser und Unterlagen zum Ende der Freilandphase 2016 bei allen Betrieben etwa gleich stark betroffen (vgl. Abbildung 7 und 9). Die Edelreisbereiche des verkaufsfertigen Pflanzguts aus 2015 zeigten im Vergleich zu den Apikalbereichen der Unterlagen sogar öfter typische Holzsymptome (vgl. Abbildung 8 und 9).

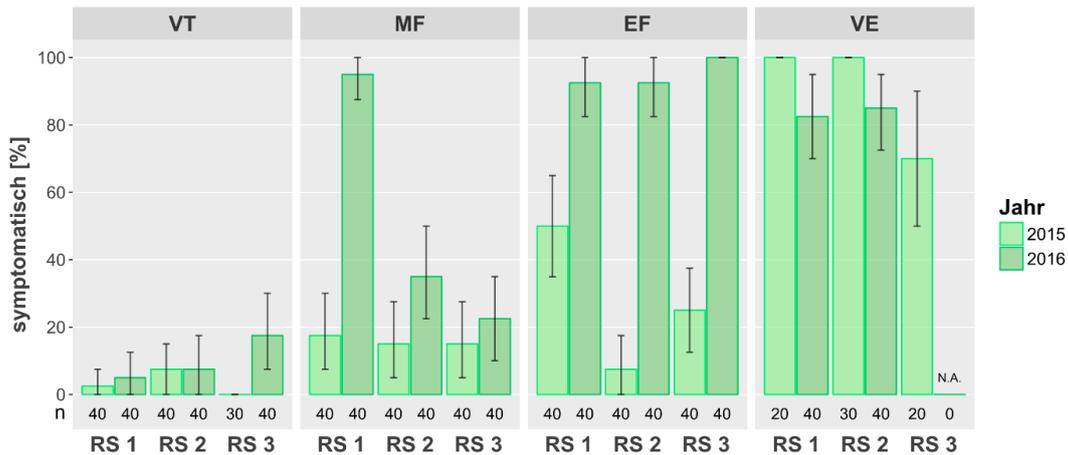


Abbildung 9: Anteil der Edelreisproben mit Esca-typischen Holzsymptomen vom Vortreiben bis zum Verkauf des Pflanzguts in den Jahren 2015 und 2016 (n: Probenumfang; N.A.: nicht verfügbar). Untersucht wurden Pfropfreben zum Vortreiben (VT), zur Mitte und zum Ende der Freilandphase (MF und EF) sowie vor dem Verkauf des Pflanzguts (VE).

Beim Vergleich der Rebschulen (Tabelle 14) waren in RS 2 gegenüber RS 1 zum Ende der Freilandphase 2015 signifikant weniger symptomatische Edelreisproben zu finden. Darüber hinaus zeigten sich bei RS 3 im verkaufsfertigen Pflanzgut aus 2015 deutlich seltener Symptome im Edelreisbereich als bei RS 1 und RS 2 (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 14 (■)). In 2016 war die Symptomatik in allen Rebschulen sehr ähnlich und lag lediglich zum Zeitpunkt MF bei RS 1 signifikant höher (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 14 (■)). Signifikante Unterschiede zwischen Edelreissorten waren mit einer Ausnahme (‘Ruländer’ war bei RS 1 zum Ende der Freilandphase 2015 stärker betroffen als ‘Dornfelder’) nicht festzustellen (nicht dargestellt).

Tabelle 14: Vergleich des Symptomauftritts im Edelreisholz zwischen den Rebschulen vom Vortreiben bis zum Verkauf des Pflanzguts

2015		VT			MF			EF			VE		
		RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3
VT	RS 1												
	RS 2	n.s											
	RS 3	n.s	n.s										
MF	RS 1												
	RS 2				n.s								
	RS 3				n.s	n.s							
EF	RS 1												
	RS 2							***					
	RS 3							n.s	n.s				
VE	RS 1												
	RS 2												
	RS 3										n.s	*	**

2016		VT			MF			EF			VE	
		RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2	RS 3	RS 1	RS 2
VT	RS 1											
	RS 2	n.s.										
	RS 3	n.s.	n.s.									
MF	RS 1											
	RS 2				***							
	RS 3				***	n.s.						
EF	RS 1											
	RS 2							n.s.				
	RS 3							n.s.	n.s.			
VE	RS 1											
	RS 2										n.s.	

■ signifikante Unterschiede zwischen den Rebschulen

VT	Vortreiben	RS 1	Rebschule 1	<u>paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$</u>	
MF	Mitte Freilandphase	RS 2	Rebschule 2	n.s.	nicht signifikant ($p \geq 0,05$)
EF	Ende Freilandphase	RS 3	Rebschule 3	*	signifikant ($p < 0,05$)
VE	Verkauf des Pflanzguts			**	hochsignifikant ($p < 0,01$)
				***	höchstsignifikant ($p < 0,001$)

3.2 PATHOGEN-NACHWEIS IN UNTERLAGENHOLZ

3.2.1 *Pch*-Nachweis mittels nested PCR

Da das Auftreten Esca-typischer Symptome im Rebholz kein eindeutiger Beleg für einen Befall durch die pilzlichen Krankheitserreger ist, wurde das Unterlagenmaterial aus den Jahren 2014 bis 2016 zusätzlich durch ein nested PCR-Verfahren in Bezug auf das Vorkommen des Esca-Erregers *Pch* näher untersucht (siehe Kapitel 2.2.4.1).

3.2.1.1 Unterlagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess

Die Befallssituation durch *Pch* ist für die Unterlagenproben aus dem Pflanzguterzeugungsprozess der jeweiligen Rebschulen in Abbildung 10 dargestellt. Die prozentualen Anteile beziehen sich dabei sortenunabhängig auf die Gesamtanzahl der Proben, die durch die nested PCR überprüft wurden.

Mithilfe des nested PCR-Verfahrens konnte der Esca-Erreger über alle Untersuchungsjahre hinweg im Unterlagenholz der drei Rebschulen nachgewiesen werden. Die Nachweise fanden sich dabei vorwiegend in Proben, die aus dem Freiland entnommen wurden. Abgesehen vom Jahr 2014, in dem lediglich sichtbar befallene Proben untersucht wurden und die prozentualen Anteile mit 41,7% bis 83,3% vergleichsweise hoch waren (siehe Abbildung 10, MF und EF in 2014), bewegten sich die Nachweisraten während der Freilandphase 2015 zwischen 2,5% und 7,5% und 2016 zwischen 0% und 20% (siehe Abbildung 10, 2015 und 2016). Im Gegensatz dazu waren das Vermehrungsmaterial und die Proben aus dem Vortriebsstadium äußerst selten befallen (siehe Abbildung 10, RS 1 (VT 2015 & VM 2016) und RS 2 (VT 2016)). Trotz der höheren Nachweisraten von *Pch* nach dem Einschulen war im Vergleich zu den Ergebnissen aus den visuellen Bonituren keine klare Steigerungstendenz innerhalb der einzelnen Jahre und über die Jahre hinweg zu beobachten. Besonders auffällig war dabei die deutliche Diskrepanz zwischen Symptomauftreten und Erregernachweis: die Anzahl sichtbar symptomatischer Unterlagen lag insgesamt deutlich höher als die Anzahl der Unterlagen, die per Molekularnachweis mit *Pch* befallen waren (vgl. Abbildung 7 und 10).

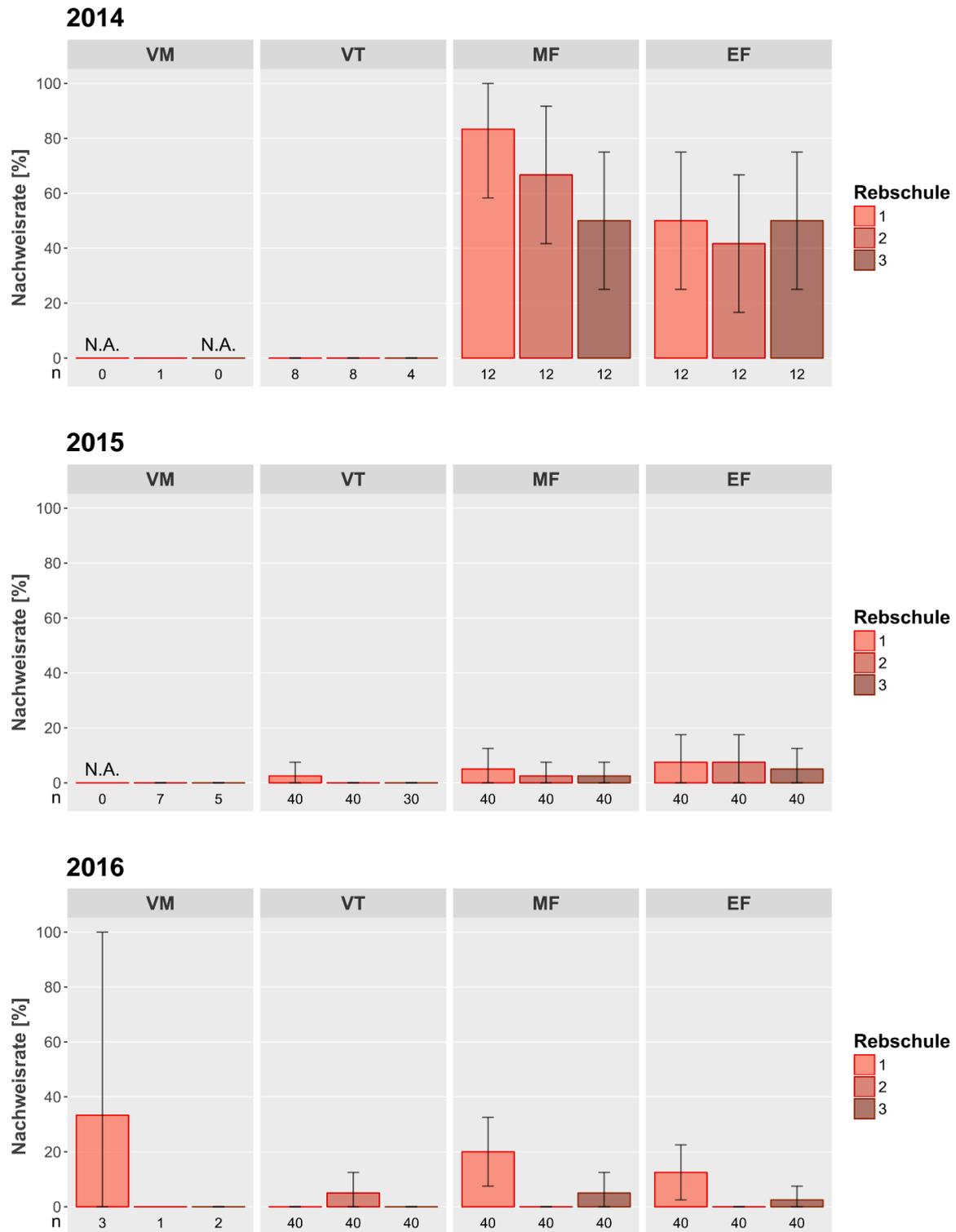


Abbildung 10: *Pch*-Nachweis im Unterlagenholz während der Pflanzguterzeugung in den Jahren 2014 - 2016 (n: Probenumfang; N.A.: nicht verfügbar). Untersucht wurden das Vermehrungsmaterial (VM) und Pfropfreben zum Vortreiben (VT) sowie zur Mitte und zum Ende der Freilandphase (MF und EF). Die Untersuchung des Vermehrungsmaterials (VM) beschränkte sich in allen Untersuchungsjahren auf sichtbar symptomatische Proben. In 2014 wurden während der Freilandphase (MF und EF) pro Rebschule jeweils 12 Unterlagenproben getestet (4 Sorten á 3 sichtbar symptomatischen Proben).

3.2.1.2 Unterlagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts

Um das Auftreten von *Pch* auch in Unterlagen des verkaufsfertigen Pflanzguts zu untersuchen, wurden diese durch das nested PCR-Verfahren getestet (Abbildung 11).

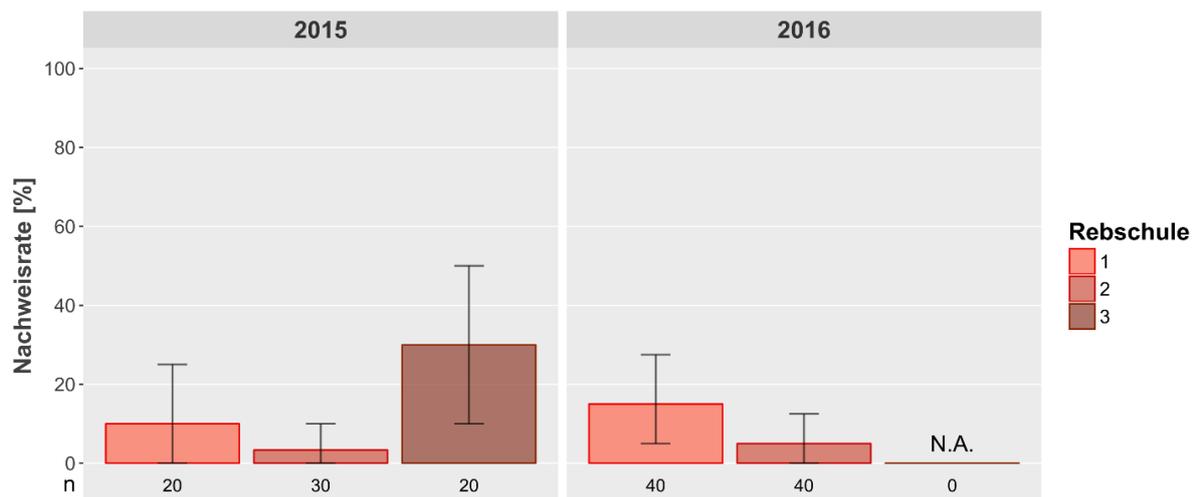


Abbildung 11: *Pch*-Nachweis im Unterlagenholz verkaufsfertiger Pfropfreben in den Jahren 2015 und 2016 (n: Probenumfang; N.A.: nicht verfügbar).

Hier lag der Anteil *Pch*-befallener Unterlagen im Jahr 2015 für die Rebschulen 1, 2 und 3 bei jeweils 10%, 3,3% und 30% und im Jahr 2016 für RS 1 und 2 bei jeweils 15% und 5% (siehe Abbildung 11). Entsprechend zu den Beobachtungen bei Unterlagenproben aus der Pflanzguterzeugung waren die Nachweisraten im Vergleich zum Auftreten der sichtbaren Symptome deutlich geringer (vgl. Abbildung 8 und 11).

3.2.2 Nachweis von *Pch* und anderer GTD-Erreger durch multiplex nested PCR

Aufgrund der beobachteten Diskrepanzen zwischen sichtbarer Symptomatik (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) und Erregernachweis (siehe Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2) wurde das Unterlagenholz der Rebschulen neben *Pch* auf weitere GTD-Erreger getestet. Zur Anwendung kam hierfür ein eigens entwickeltes multiplex nested PCR-Verfahren für den simultanen Nachweis von *Pch*, *Clo* und *Pm* spp. (Kapitel 2.2.4.2). Dabei lag die Sensitivität des Verfahrens für die Erreger *Clo*, *Pch* und *Pal* und deren möglichen Kombinationen bei 1 pg DNA, die aus Myzelkulturen der jeweiligen Erreger isoliert wurde (siehe Abbildung 12 und Tabelle 15). Für *Pch* war sogar ein zuverlässiger Nachweis (Nachweisrate: 3/3) von 100 fg/Reaktion möglich (siehe Tabelle 15).

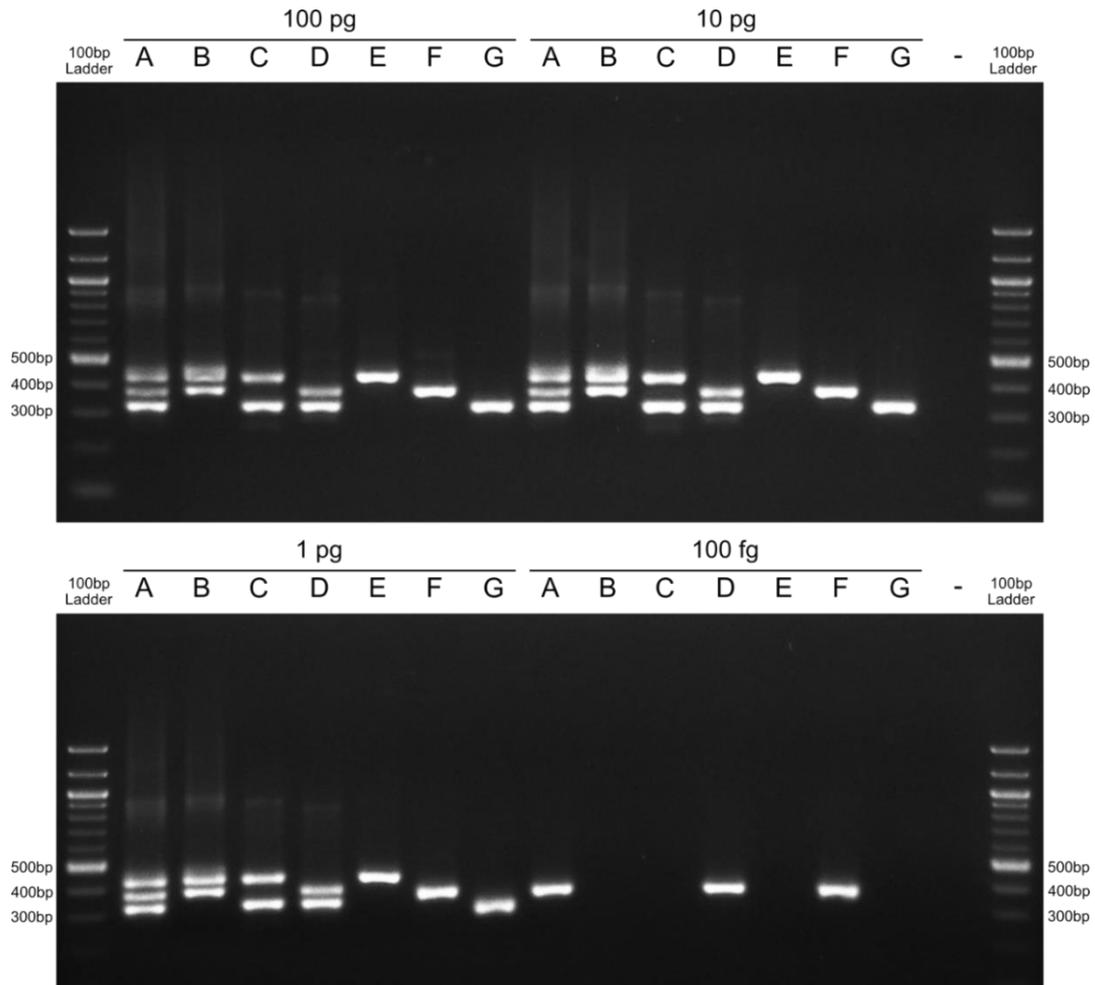


Abbildung 12: Sensitivität der multiplex nested PCR. Die PCR wurde gemäß Kapitel 2.2.4.2 mit den Primerpaaren CLO1F/Clo3H, Pch1H/Pch2H und Pm5H/Pm3H durchgeführt. Jeweils 100pg, 10pg, 1pg und 100fg gDNA der Erreger wurden in den Kombinationen A (*Clo/Pch/Pal*), B (*Clo/Pch*), C (*Clo/Pal*) und D (*Pch/Pal*) und einzeln (E (*Clo*), F (*Pch*) und G (*Pal*)) in der ersten Reaktion eingesetzt. 50⁻¹-Verdünnungen der PCR-Produkte dienten als Template in der zweiten Reaktion. (-) Wasserkontrolle.

Tabelle 15: Nachweisrate von *Clo*, *Pch* und *Pal* und deren möglichen Kombinationen

DNA-Menge pro Reaktion [pg]	Anzahl der Nachweise / Gesamtanzahl der Reaktionen						
	Erreger DNA*						
	A	B	C	D	E	F	G
100	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
0.1	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3

* A (*Clo/Pch/Pal*), B (*Clo/Pch*), C (*Clo/Pal*), D (*Pch/Pal*), E (*Clo*), F (*Pch*), G (*Pal*)

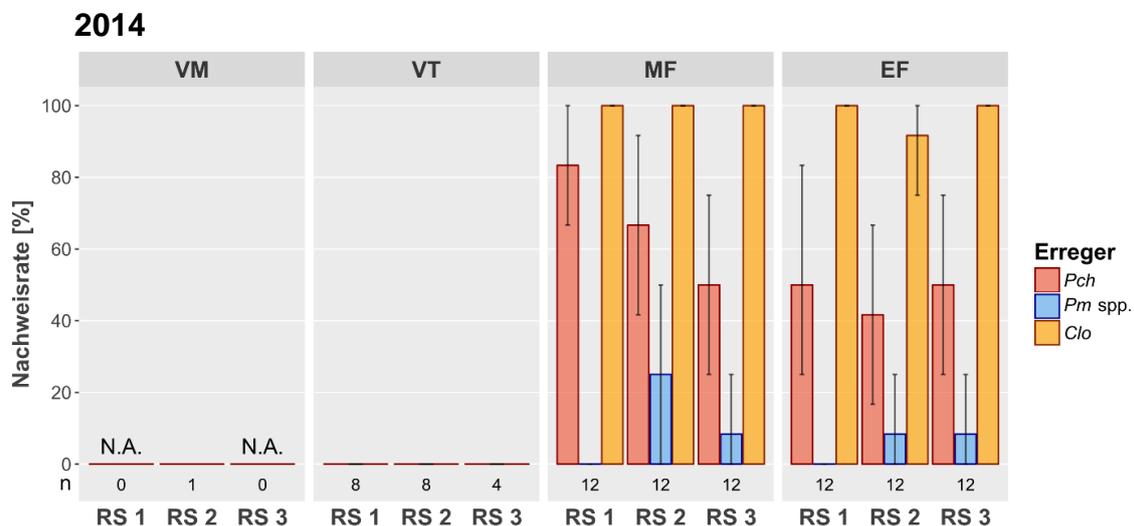
Die Untersuchungen des Unterlagenholzes aus dem Pflanzguterzeugungsprozess und der verkaufsfertigen Pfropfreben durch das multiplex nested PCR-Verfahren sollten einen Einblick in die Befallssituation durch *Pch*, *Clo* und *Pm* spp. ermöglichen und dadurch zur Erklärung des hohen Symptomauftretens im Holz beitragen. Daneben sollten in Bezug auf das Vorkommen der jeweiligen Erreger mögliche Unterschiede zwischen und innerhalb der Rebschulen sowie zwischen verschiedenen Unterlagenarten identifiziert werden.

3.2.2.1 Unterlagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess

Die Nachweisraten der jeweiligen GTD-Erreger im Unterlagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess der einzelnen Rebschulen können Abbildung 13 entnommen werden und beziehen unabhängig von der Sorte auf die Gesamtheit der Unterlagen, die durch das multiplex nested PCR-Verfahren untersucht wurden.

Grundsätzlich ließen sich neben *Pch* in allen Rebschulen *Pm* spp. und *Clo* in unterschiedlichem Ausmaß finden. Während *Phaeoacremonium*-Arten im Jahr 2014 insgesamt am seltensten nachgewiesen werden konnten (bis zu 25%), waren diese 2015 und 2016 im Vergleich zu *Pch* meist häufiger zu finden: 2015 in bis zu 32,5% (EF in RS 3), 2016 in bis zu 50% (MF in RS 2) der Fälle (siehe Abbildung 13).

Clo war mit wenigen Ausnahmen (siehe Abbildung 13, RS 2 (MF und EF in 2016)) der dominierende Erreger. Die Nachweise beliefen sich in 2014 zwischen 91,7% und 100%, in 2015 zwischen 65% und 100% und in 2016 auf einem z.T. deutlich niedrigeren Niveau zwischen 22,5% und 95%. Vor allem Unterlagen der RS 2 und 3 waren 2016 im Vergleich zu den beiden Vorjahren weitaus seltener mit *Clo* befallen.



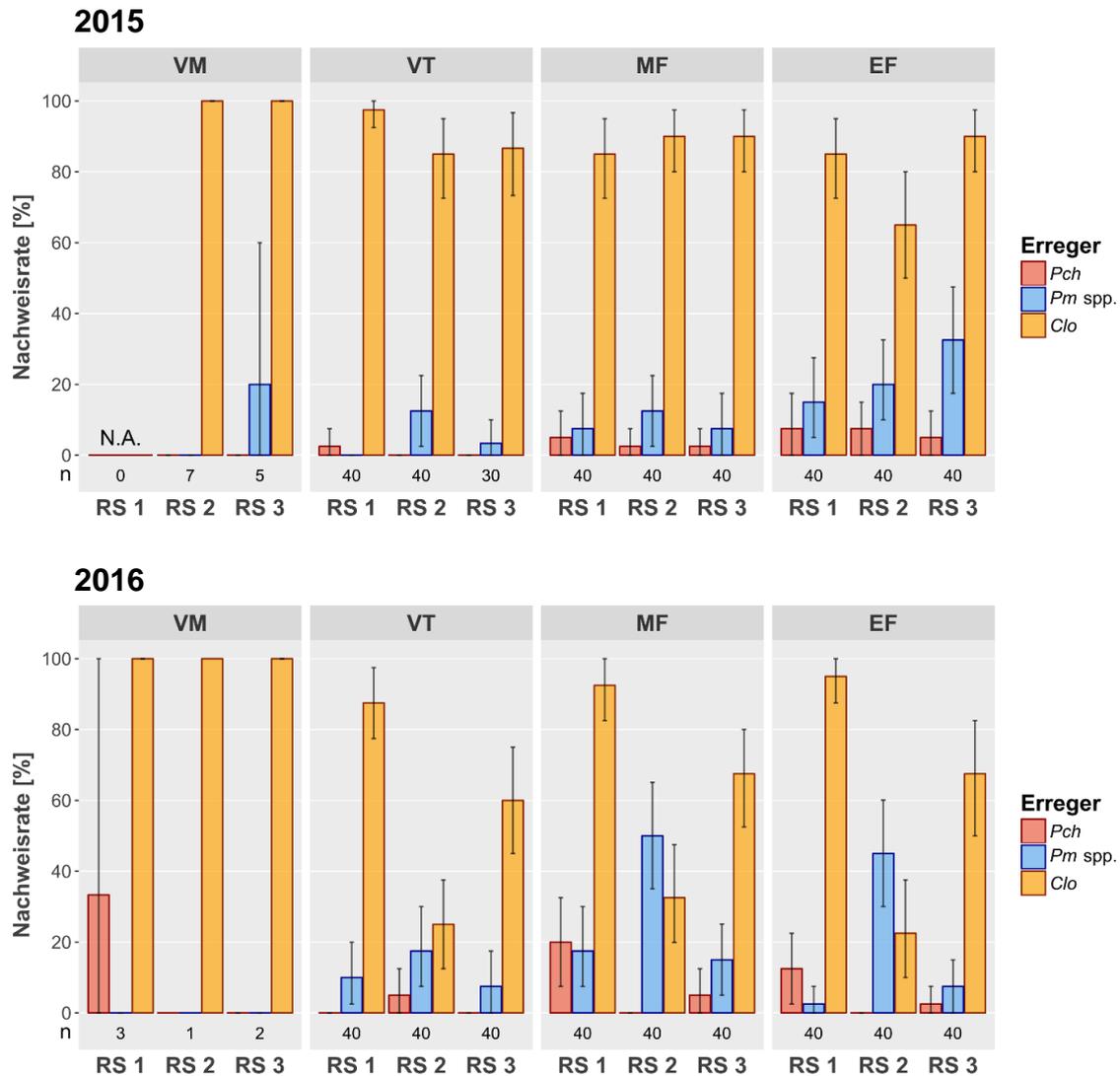


Abbildung 13: Nachweis von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* im Unterlagenholz während der Pflanzguterzeugung in den Jahren 2014 - 2016. Untersucht wurden das Vermehrungsmaterial (VM) und Pfropfreben zum Vortreiben (VT) sowie zur Mitte und zum Ende der Freilandphase (MF und EF). Die Untersuchung des Vermehrungsmaterials (VM) beschränkte sich in allen Untersuchungsjahren auf sichtbar symptomatische Proben. In 2014 wurden während der Freilandphase (MF und EF) pro Rebschule jeweils 12 Unterlagenproben getestet (4 Sorten á 3 sichtbar symptomatischen Proben).

Vergleich der Erregernachweise zwischen den Rebschulen

Für den Vergleich des Erreger-Auftretens zwischen den Rebschulen wurden diejenigen Unterlagenproben herangezogen, die zum Vortriebstadium und während der Freilandphase beprobt wurden. Vermehrungsmaterial wurde nur exemplarisch beprobt (ausschließlich symptomatische Unterlagen) und daher an dieser Stelle nicht berücksichtigt.

Der Vergleich der Erreger-Nachweise zwischen den Rebschulen zeigte, dass hier in den Jahren 2014 und 2015 in der Regel keine wesentlichen Unterschiede bestanden. Lediglich zum Ende der Freilandphase 2015 konnte *Clo* bei RS 3 signifikant häufiger nachgewiesen werden als bei RS 2 (siehe Tabelle 16, EF in 2015 (■)).

In 2016 hingegen waren über den gesamten Untersuchungszeitraum deutliche Unterschiede zu erkennen (■ in Tabelle 16, 2016). So waren für *Clo* zu jedem Zeitpunkt signifikant unterschiedliche Nachweisraten zwischen den jeweiligen Rebschulen zu verzeichnen, wobei diese in RS 1 stets am höchsten (87,5% (VT), 92,5% (MF), 95% (EF)) und in RS 2 am niedrigsten (25% (VT), 32,5% (MF), 22,5% (EF)) waren. RS 3 lag mit 60% (VT) und 67,5% (MF und EF) dazwischen (vgl. Abbildung 13 und Tabelle 16, 2016). Das Vorkommen von *Pm* spp. unterschied sich zwischen RS 1 und 3 nur geringfügig, wohingegen die Nachweise bei RS 2 während der Freilandphase signifikant höher lagen. *Pch* war lediglich zum Zeitpunkt MF deutlich häufiger in RS 1 gegenüber RS 2 nachzuweisen.

Tabelle 16: Vergleich des Erregervorkommens im Unterlagenholz zwischen und innerhalb der Reb-
schulen während der Pflanzguterzeugung

2014			VT									MF									EF														
			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3								
			Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo						
VT	RS 1	Pch Pm Clo	N.A.																																
	RS 2	Pch Pm Clo	N.A.																																
	RS 3	Pch Pm Clo	N.A.																																
MF	RS 1	Pch Pm Clo										***			n.s.	***																			
	RS 2	Pch Pm Clo										n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	**															
	RS 3	Pch Pm Clo										n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.	*	***									
EF	RS 1	Pch Pm Clo																			*			*	***										
	RS 2	Pch Pm Clo																			n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	***						
	RS 3	Pch Pm Clo																			n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***			
2015			VT									MF									EF														
			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3								
			Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo	Pch	Pm	Clo						
VT	RS 1	Pch Pm Clo	n.s.			***	***																												
	RS 2	Pch Pm Clo	n.s.			n.s.	n.s.		n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.								
	RS 3	Pch Pm Clo	n.s.			n.s.	n.s.		n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.			n.s.								
MF	RS 1	Pch Pm Clo										n.s.			***	***																			
	RS 2	Pch Pm Clo										n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	***	***															
	RS 3	Pch Pm Clo										n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.			n.s.								
EF	RS 1	Pch Pm Clo																			n.s.			***	***										
	RS 2	Pch Pm Clo																			n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	***	***						
	RS 3	Pch Pm Clo																			n.s.			n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	**	*	***	***			

2016			VT									MF									EF																				
			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2			RS 3														
			Pch	Pm	Clo																																				
VT	RS 1	Pch																																							
		Pm	n.s.																																						
		Clo	***			***																																			
	RS 2	Pch	n.s.																																						
		Pm	n.s.			n.s.																																			
		Clo	***			*			n.s.																																
	RS 3	Pch	n.s.																																						
		Pm	n.s.			n.s.			n.s.																																
		Clo	*			**			***			***																													
MF	RS 1	Pch																																							
		Pm	n.s.																																						
		Clo	***			***																																			
	RS 2	Pch	n.s.																																						
		Pm	**			***			n.s.																																
		Clo	***			***			n.s.																																
	RS 3	Pch	n.s.																																						
		Pm	n.s.			n.s.			**			n.s.																													
		Clo	*			**			***			***																													
EF	RS 1	Pch																																							
		Pm	n.s.																																						
		Clo	***			***																																			
	RS 2	Pch	n.s.																																						
		Pm	***			***			n.s.																																
		Clo	***			**			n.s.																																
	RS 3	Pch	n.s.																																						
		Pm	n.s.			n.s.			***			n.s.																													
		Clo	**			***			***			***																													

■ signifikante Unterschiede im Auftreten der jeweiligen Pathogene zwischen den Rebschulen
 ■ signifikante Unterschiede im Auftreten der unterschiedlichen Pathogene innerhalb der Rebschulen

VT	Vortreiben	RS 1	Rebschule 1	paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$
MF	Mitte Freilandphase	RS 2	Rebschule 2	n.s. nicht signifikant ($p \geq 0,05$)
EF	Ende Freilandphase	RS 3	Rebschule 3	* signifikant ($p < 0,05$)
Pch	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	N.A.	nicht verfügbar	** hochsignifikant ($p < 0,01$)
Pm	<i>Phaeoacremonium</i> -Arten			*** höchstsignifikant ($p < 0,001$)
Clo	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>			

Vergleich der Erregerachweise innerhalb der Rebschulen

Grundsätzlich waren signifikante Unterschiede im Vorkommen der jeweiligen GTD-Erreger **innerhalb** der Rebschulen (■) weitaus häufiger zu beobachten als **zwischen** den Rebschulen (■) (siehe Tabelle 16).

In 2014 lag die Nachweishäufigkeit von *Clo* in allen Rebschulen in der Regel signifikant über der von *Pch* und *Pm* spp., wobei in RS 1 während der Freilandphase auch Unterschiede zwischen *Pch* und *Pm* spp. bestanden (siehe Tabelle 16, MF und EF in 2014 (■)).

Die vergleichsweise hohen Nachweisraten von *Clo* waren in 2015 noch ausgeprägter. Hier war das Unterlagenholz in allen Rebschulen ab dem Vortreiben durchweg signifikant häufiger von *Clo* als von *Pch* und *Pm* spp. betroffen. Das Vorkommen von

Pch und *Pm* spp. unterschied sich in 2015 mit einer einzigen Ausnahme (EF in RS 3) dabei nicht wesentlich voneinander (siehe Tabelle 16, 2015 (■)).

Ähnliches konnte auch in 2016 für RS 1 und 3 beobachtet werden (siehe Tabelle 16, 2016 (■)). In RS 2 hingegen waren *Phaeoacremonium*-Arten während der Freilandphase am häufigsten nachzuweisen, unterschieden sich in ihrem Auftreten jedoch nicht signifikant von *Clo* (vgl. Abbildung 13 und Tabelle 16, RS 2 (MF und EF in 2016)). *Pch* kam in RS 2 während der Freilandphase 2016 nicht vor (siehe Abbildung 13).

Vergleich der Erregernachweise zwischen den Rebsorten

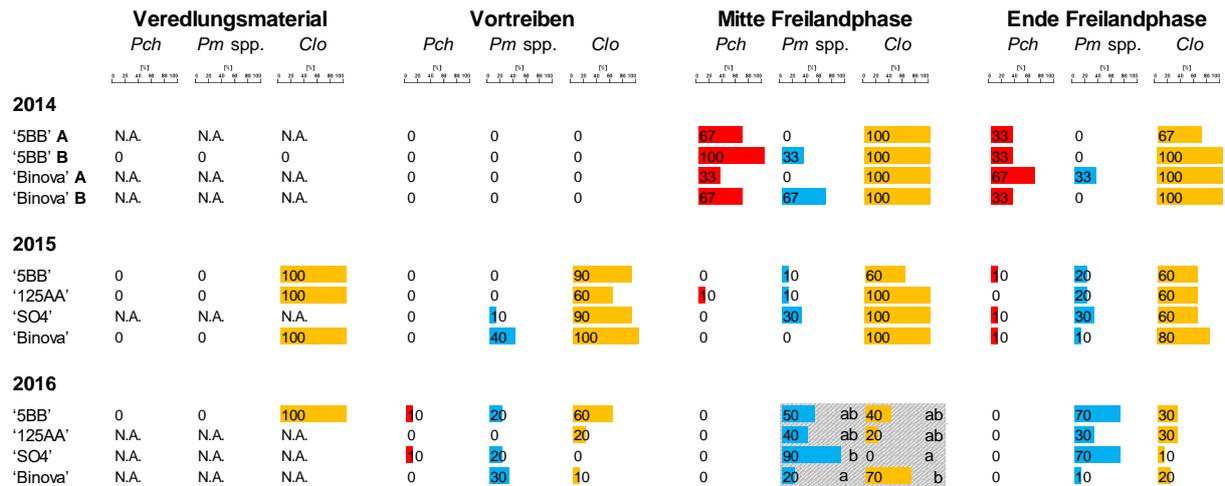
In Unterlagen verschiedener Sorten konnten *Pch* (■), *Pm* spp. (■) und *Clo* (■) regelmäßig in unterschiedlichem Ausmaß gefunden werden, jedoch waren diese Unterschiede in den wenigsten Fällen signifikant (siehe Tabelle 17). Dementsprechend waren lediglich bei RS 2 zur Mitte der Freilandphase 2016 Unterlagen der Sorte ‘Binova’ signifikant seltener von *Pm* spp. befallen als Unterlagen der Sorte ‘SO4’, wohingegen diese wiederum signifikant seltener von *Clo* befallen waren als ‘Binova’-Unterlagen (▨ in Tabelle 17). Klare Tendenzen in Bezug auf eine unterschiedliche Sortenanfälligkeit gegenüber den GTD-Erregern ließen sich allerdings in keinem der Betriebe erkennen (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Vergleich des Erregervorkommens zwischen Unterlagensorten während der Pflanzguterzeugung

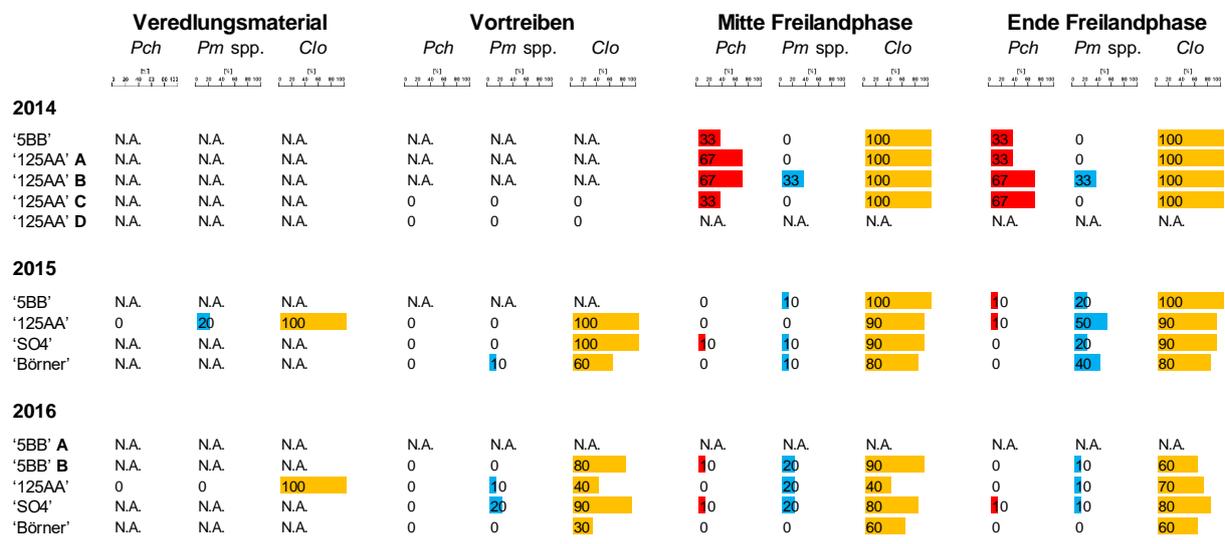
Rebschule 1

	Veredlungsmaterial			Vortreiben			Mitte Freilandphase			Ende Freilandphase		
	<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>
2014												
'5BB'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	0	100	0	100	67	0	100
'125AA'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	0	100	0	100	67	0	100
'SO4' A	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	0	67	0	100	33	0	100
'SO4' B	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	0	67	0	100	33	0	100
2015												
'5BB'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	100	0	0	100	10	10	100
'125AA'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	100	0	20	100	10	40	90
'SO4'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	90	0	10	70	0	10	80
'Binova'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	100	0	0	70	0	0	70
2016												
'5BB'	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	70	0	10	90	30	10	100
'125AA'	0	0	100	0	20	90	60	50	100	20	0	100
'SO4'	N.A.	N.A.	N.A.	0	10	100	0	0	100	0	0	80
'Binova'	100	0	0	0	10	80	0	10	80	0	0	100

Rebschule 2



Rebschule 3



- Nachweisrate von *Pch* in den einzelnen Unterlagensorten
- Nachweisrate von *Pm spp.* in den einzelnen Unterlagensorten
- Nachweisrate von *Clo* in den einzelnen Unterlagensorten
- signifikante Unterschiede (Sorten mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant voneinander verschieden; paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$; Probenumfang siehe Anhang)
- N.A.: nicht verfügbar

Die Ergebnisse der multiplex nested PCR zeigten, dass der Erreger *Clo* mit wenigen Ausnahmen wesentlich häufiger als *Pch* und *Pm spp.* in Unterlagenholz aus dem Pflanzguterzeugungsprozess nachzuweisen war. Signifikante Unterschiede in der Nachweishäufigkeit bestanden vorwiegend innerhalb der Rebschulen, während Unterschiede zwischen den Rebschulen fast ausschließlich im Jahr 2016 zu beobachten waren. Eindeutige Sortenunterschiede im Auftreten der Erreger waren darüber hinaus nicht ersichtlich.

3.2.2.2 Unterlagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts

Ähnlich zu den Beobachtungen aus dem Pflanzguterzeugungsprozess stellte sich die Befallssituation im Unterlagenbereich der verkaufsfertigen Reben dar (Abbildung 14). Sowohl 2015 als auch 2016 war *Clo* durchweg die dominierende Art mit Nachweisraten zwischen 75% und 100% und war damit signifikant häufiger vertreten als *Pch* (3,3-30%) und *Pm* spp. (10-20%) (vgl. Abbildung 14 und Tabelle 18 (■)). Signifikante Unterschiede zwischen *Pch*- und *Pm* spp.-Befall waren nicht erkennbar.

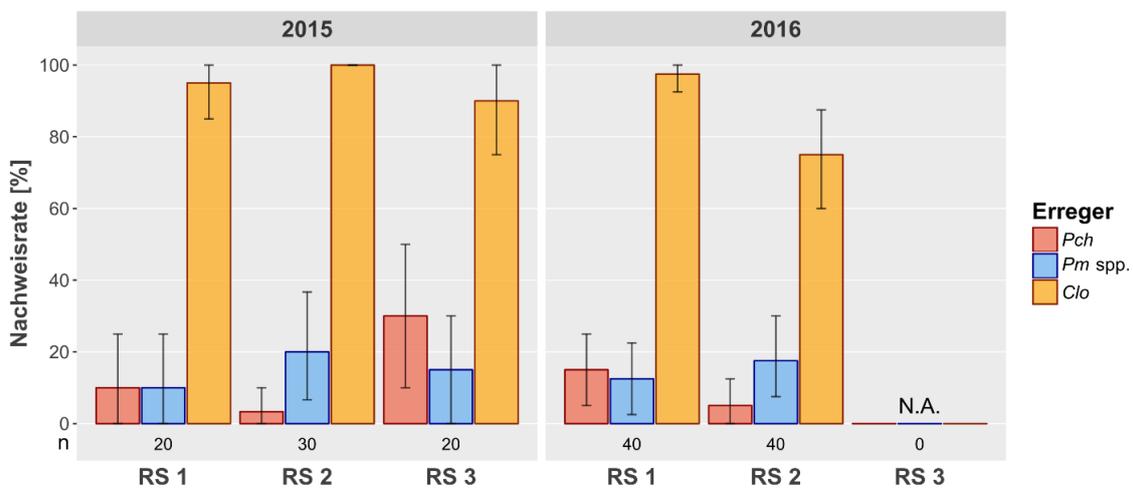


Abbildung 14: Nachweis von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* im Unterlagenholz verkaufsfertiger Pfropfreben in den Jahren 2014 - 2016 (n: Probenumfang; N.A.: nicht verfügbar).

Zwischen den Rebschulen war das Erregervorkommen in zwei Fällen signifikant verschieden: in 2015 war *Pch* in Unterlagen der RS 3 weitaus häufiger nachzuweisen als in RS 2 und in 2016 lag die Nachweisrate von *Clo* in RS 1 deutlich über der in RS 2 (vgl. Abbildung 14 und Tabelle 18 (■)).

Tabelle 18: Vergleich des Erregervorkommens im Unterlagenholz zwischen und innerhalb der Rebschulen bei verkaufsfertigem Pflanzgut

			2015									2016					
			RS 1			RS 2			RS 3			RS 1			RS 2		
			<i>Pch</i>	<i>Pm</i>	<i>Clo</i>												
2015	RS 1	<i>Pch</i>															
		<i>Pm</i>	n.s.														
		<i>Clo</i>	***	***													
	RS 2	<i>Pch</i>	n.s.														
		<i>Pm</i>		n.s.		n.s.											
		<i>Clo</i>			n.s.	***	***										
	RS 3	<i>Pch</i>	n.s.			*											
		<i>Pm</i>		n.s.		n.s.				n.s.							
		<i>Clo</i>			n.s.			n.s.	***	***							

3.3 ERREGEREINFLUSS AUF DIE SYMPTOMENTWICKLUNG IN UNTERLAGENHOLZ

Nach Erfassung von Symptomatik und Erregersituation im Unterlagenholz wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Erregerbefall und Symptomentwicklung näher untersucht (Kapitel 2.2.5). Das Symptomaufreten in Abhängigkeit verschiedener Befallssituationen im Holz ist hierzu in Tabelle 20 für die Jahre 2015 und 2016 dargestellt.

Tabelle 20: Symptomentwicklung in Abhängigkeit verschiedener Befallssituationen

Befall Ja/Nein	Anteil symptomatischer Unterlagen (n)			
	2015		2016	
Befall generell	65%	(375)	79% ^a	(336)
kein Befall	64%	(45)	67% ^b	(104)
Erregerszenario (ES)				
a <i>Pch + Clo + Pm spp.</i>	60% ^{ab}	(5)	100% ^{ab}	(5)
b <i>Pch + Clo</i>	100% ^a	(16)	100% ^a	(20)
c <i>Pch + Pm spp.</i>	-	(-)	-	(-)
d <i>Clo + Pm spp.</i>	77% ^{ab}	(44)	79% ^{ab}	(29)
e <i>Pch</i>	100% ^{ab}	(1)	0% ^{ab}	(1)
f <i>Clo</i>	61% ^b	(303)	77% ^{ab}	(234)
g <i>Pm spp.</i>	83% ^{ab}	(6)	79% ^{ab}	(47)
kein Befall	64% ^{ab}	(45)	67% ^b	(104)

Anteil symptomatischer Unterlagen ist bei Befallssituationen mit gleichen Buchstaben nicht signifikant verschieden (paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$); n: Gesamtanzahl der Unterlagenproben mit der jeweiligen Befallsituation.

In 2015 waren von insgesamt 420 Holzproben 273 Unterlagen symptomatisch (65%) und 147 asymptomatisch (35%) (nicht dargestellt). Der Anteil symptomatischer Proben, die mit mindestens einem der Erreger befallen waren lag bei 65% (siehe Tabelle 20, „genereller Befall“ (2015)), der Anteil in nicht befallenen bei 64% (siehe Tabelle 20, „kein Befall“ (2015)). Entsprechend war hier kein Zusammenhang zwischen Erregerbefall und Symptomentwicklung zu erkennen. Wurden die jeweiligen Erregerszenarien (ES) jedoch individuell betrachtet, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen ES b (*Pch + Clo*) und f (*Clo*). D.h. Unterlagen, die simultan mit *Pch* und *Clo* befallen waren, zeigten signifikant häufiger Symptome (100%) als solche, in denen *Clo* alleine nachzuweisen war (61%) (vgl. Tabelle 20, ES b und f in 2015).

In 2016 stellte sich die Symptomentwicklung und Erregersituation folgendermaßen dar: von insgesamt 440 Unterlagen waren 336 symptomatisch (76%) und 104 ohne Symptome (24%) (nicht dargestellt). Das Symptomauftreten bei Unterlagen mit einem generellen Befall lag dabei mit 79% (siehe Tabelle 20, „genereller Befall“ (2016)) signifikant höher als bei solchen ohne Befall mit 67% (siehe Tabelle 20, „kein Befall“ (2016)). Im Einzelvergleich der jeweiligen Erregerszenarien zeigte sich jedoch, dass lediglich Unterlagen, in denen *Pch* und *Clo* gemeinsam auftraten (100%), signifikant häufiger symptomatisch waren als unbefallene (vgl. Tabelle 20, ES b und „kein Befall“ in 2016). Abgesehen hiervon waren in den beiden Jahren keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Erregerszenarien in Bezug auf die Symptomentwicklung festzustellen.

3.4 INFektionsQUELLEN WÄHREND DER PFLANZGUTERZEUGUNG

Um potenzielle Infektionsquellen während der Pflanzguterzeugung zu identifizieren und die davon ausgehenden Risiken einschätzen zu können, wurden während der innerbetrieblichen Bearbeitungsschritte Proben aus unterschiedlichen Tauchbädern sowie aus Vortreibkisten entnommen. Zur Einschätzung des Sporenflugs wurden außerdem in einer der drei Rebschulen (RS 1) Sporenfallen im Freiland installiert. Die Proben wurden mit dem multiplex nested PCR-Verfahren hinsichtlich des Vorkommens von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* getestet (Kapitel 2.2.4.2).

3.4.1 Tauchbäder

In den Jahren 2014-2016 wurden in den Rebschulen 1, 2 und 3 insgesamt jeweils 16, 5 und 13 Tauchbäder beprobt. Dabei ergaben die Untersuchungen, dass sich die Tauchbäder der einzelnen Betriebe zum einen im vorhandenen Erregerspektrum und zum anderen in der Nachweishäufigkeit der jeweiligen Erreger unterschieden (vgl. Tabelle 21, RS 1, 2 und 3).

Im Durchschnitt war *Clo* während der drei Untersuchungsjahre in allen Rebschulen am häufigsten zu finden (75% in RS 1, 80% in RS 2 und 53,8% in RS 3). *Pch* war regelmäßig in Tauchbädern der RS 1 nachzuweisen (50%, Ø 2014-2016), hingegen in RS 3 mit insgesamt zwei positiven Proben in 2014 (n=4) vergleichsweise selten zu finden. In Tauchbädern der RS 2 konnte kein Nachweis für *Pch* erbracht werden. Zudem fanden sich *Pm* spp. bei RS 2 in jeweils einem Tauchbecken aus 2015 (n=2)

und 2016 (n=2) sowie in einem Tauchbad der RS 1 in 2016 (n=6) (vgl. Tabelle 21). Mit Ausnahme des H₂O₂-Bads für Unterlagen/Edelreiser in RS 2 (siehe Tabelle 21, 2014), waren die Erreger sowohl in H₂O- und Chinosol/Beltanol-Bädern für Unterlagen als auch für Edelreiser zu finden. Die Nachweisraten für *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* unterschieden sich dabei nicht signifikant zwischen Wasser- und Fungizidbädern bzw. Unterlagen- und Edelreisbädern (paarweiser exakter Fisher-Test, $\alpha=5\%$; nicht dargestellt).

Im Vergleich der beiden parallel getesteten Extraktionsverfahren in 2016 (siehe Kapitel 2.2.3.2) stellte sich darüber hinaus keine der beiden Methoden als überlegen heraus (nicht dargestellt).

Tabelle 21: Vorkommen von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* in Tauchbädern

Rebschule 1

Jahr	Tauchbad-Probe	Pathogen			
		<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	
2014	1	H ₂ O-Bad Unterlagen	+	-	+
	2	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	-
	3	Chinosol-Bad Unterlagen	+	-	-
	4	Chinosol-Bad Edelreiser	+	-	+
2015	1	H ₂ O-Bad Unterlagen 1	-	-	-
	2	H ₂ O-Bad Unterlagen 2	+	-	+
	3	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	-
	4	Beltanol-Bad Unterlagen 1	-	-	+
	5	Beltanol-Bad Unterlagen 2	+	-	+
	6	Beltanol-Bad Edelreiser	+	-	+
2016	1	H ₂ O-Bad Unterlagen 1	-	-	+
	2	H ₂ O-Bad Unterlagen 2	+	-	+
	3	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	+
	4	Beltanol-Bad Unterlagen 1	+	-	+
	5	Beltanol-Bad Unterlagen 2	-	+	+
	6	Beltanol-Bad Edelreiser	-	-	+

Rebschule 2

Jahr	Tauchbad-Probe	Pathogen			
		<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	
2014	1	H ₂ O ₂ -Bad Unterlagen / Edelreiser	-	-	-
2015	1	H ₂ O-Bad Unterlagen / Edelreiser	-	+	+
	2	Beltanol-Bad Unterlagen / Edelreiser	-	-	+
2016	1	H ₂ O-Bad Unterlagen / Edelreiser	-	-	+
	2	Beltanol-Bad Unterlagen / Edelreiser	-	+	+

Rebschule 3

Jahr	Tauchbad-Probe		Pathogen		
			<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>
2014	1	H ₂ O-Bad Unterlagen	+	-	+
	2	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	-
	3	Chinosol-Bad Unterlagen	-	-	-
	4	Chinosol-Bad Edelreiser	+	-	+
2015	1	H ₂ O-Bad Unterlagen	-	-	+
	2	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	-
	3	Beltanol-Bad Unterlagen	-	-	-
	4	Beltanol-Bad Edelreiser	-	-	-
2016	1	H ₂ O-Bad Unterlagen 1	-	-	+
	2	H ₂ O-Bad Unterlagen 2	-	-	-
	3	H ₂ O-Bad Edelreiser	-	-	+
	4	Beltanol-Bad Unterlagen / Edelreiser 1	-	-	+
	5	Beltanol-Bad Unterlagen / Edelreiser 2	-	-	+

Pch: *Phaeomoniella chlamydospora*; *Pm* spp.: *Phaeoacremonium* spp.; *Clo*: *Cadophora luteo-olivacea*

+: Erregernachweis; -: kein Erregernachweis

3.4.2 Vortriebssubstrate

Von 2014 bis 2016 wurden in den RS 1 und 2 jeweils 12 und in RS 3 insgesamt 9 Substrat-Proben aus Vortreibkisten überprüft. Dabei war *Clo* in allen Betrieben vorherrschend nachzuweisen (58,3% in RS 1, 66,6% in RS 2 und 100% in RS 3). Wie bereits für Tauchbad-Proben beobachtet, unterschied sich das Erregerspektrum in den Vortriebssubstrat-Proben zwischen den Rebschulen (vgl. Tabelle 22, RS 1, 2 und 3). Während bei RS 1 in 2014 (n=4) keiner der Erreger und in den beiden darauffolgenden Jahren ausschließlich *Clo* in den Proben vorkam (100% in 2015 (n=4), 75% in 2016 (n=4)), waren in RS 2 neben *Clo* auch *Pm* spp. zu finden. Dabei traten *Clo* und *Pm* spp. bei RS 2 in der Regel gemeinsam auf (75% in 2014 (n=4), 100% in 2015 (n=4), 25% in 2016 (n=4)) (vgl. Tabelle 22, RS 1 und 2). In RS 3 war *Clo* in allen Vortriebssubstraten aus den drei Untersuchungsjahren nachzuweisen. Darüber hinaus ließen sich hier *Pch* in einer der Proben aus 2014 (n=2) und *Pm* spp. in zwei der Proben aus 2016 (n=4) nachweisen (Tabelle 22, RS 3). Interessanterweise waren *Pm* spp. ausschließlich in solchen Vortriebssubstraten zu finden, die Sägespäne enthielten (vgl. Tabelle 22, RS 1, 2 und 3).

Während sich das Erregerspektrum zwar zwischen den Rebschulen unterschied, stellte sich die Erregersituation innerhalb der einzelnen Rebschulen über die Jahre hinweg allerdings weitgehend einheitlich dar (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Vorkommen von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* in Vortriebssubstraten

Rebschule 1

Jahr	Vortriebssubstrat-Probe (Torf)*	Pathogen			
		<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	
2014	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	-	-	-
	2	'125AA' / 'Merlot'	-	-	-
	3	'SO4' A / 'Riesling'	-	-	-
	4	'SO4' B / 'Spätburgunder'	-	-	-
2015	1	'5BB' / 'Dornfelder'	-	-	+
	2	'125AA' / 'Ruländer'	-	-	+
	3	'SO4' / 'Ruländer'	-	-	+
	4	'Binova' / 'Prior'	-	-	+
2016	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	-	-	+
	2	'125AA' / 'Chardonnay'	-	-	+
	3	'SO4' / 'Chardonnay'	-	-	-
	4	'Binova' / 'Chardonnay'	-	-	+

Rebschule 2

Jahr	Vortriebssubstrat-Probe (Torf+Sägespäne)*	Pathogen			
		<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	
2014	1	'5BB' A / 'Lemberger'	-	-	-
	2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	-	+	+
	3	'Binova' A / 'Riesling'	-	+	+
	4	'Binova' B / 'Lemberger'	-	+	+
2015	1	'5BB' / 'Regent'	-	+	+
	2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'	-	+	+
	3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'	-	+	+
	4	'Binova' / 'Spätburgunder'	-	+	+
2016	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'	-	+	+
	2	'125AA' / 'Chardonnay'	-	+	-
	3	'SO4' / 'Riesling'	-	-	-
	4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'	-	-	-

Rebschule 3

Jahr	Vortriebssubstrat-Probe (Torf+Sägespäne)*	Pathogen			
		<i>Pch</i>	<i>Pm</i> spp.	<i>Clo</i>	
2014	1	'125AA' C / 'Riesling'	+	-	+
	2	'125AA' D / 'Riesling'	-	-	+
2015	1	'125AA' / 'Ruländer'	-	-	+
	2	'SO4' / 'Riesling'	-	-	+
	3	'Börner' / 'Spätburgunder'	-	-	+
2016	1	'5BB' B / 'Müller-Thurgau'	-	-	+
	2	'125AA' / 'Spätburgunder'	-	+	+
	3	'SO4' / 'Spätburgunder'	-	-	+
	4	'Börner' / 'Ruländer'	-	+	+

Pch: *Phaeomoniella chlamydospora*; *Pm* spp.: *Phaeoacremonium* spp.; *Clo*: *Cadophora luteo-olivacea*

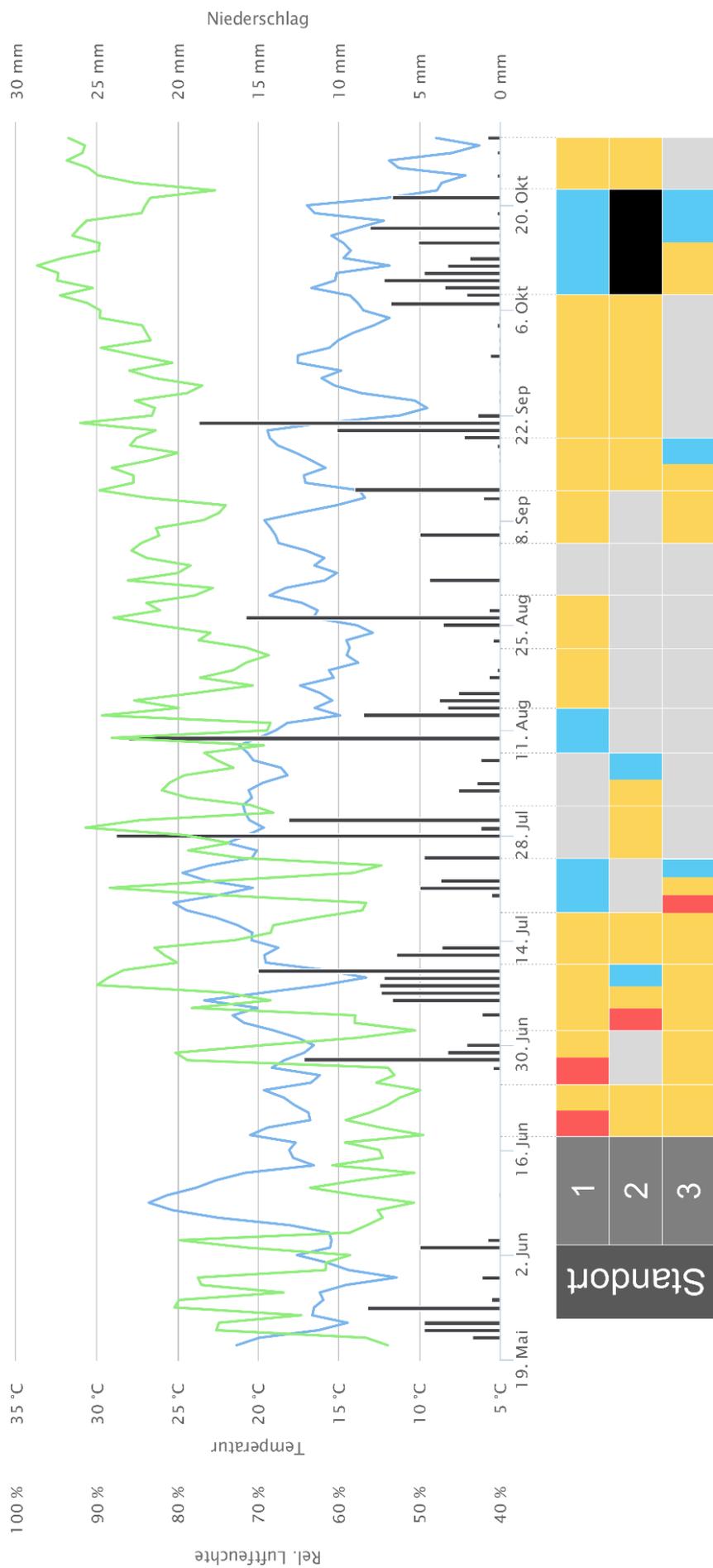
+: Erregernachweis; -: kein Erregernachweis; *Angaben beziehen sich auf die Pfropfkombination in den jeweiligen Vortreibkisten (für nähere Informationen siehe Anhang)

3.4.3 Sporenfallen

In den Jahren 2014, 2015 und 2016 wurden an jeweils drei Freilandstandorten der RS 1 zur Überwachung des Sporenflugs von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* Sporenfallen installiert. Um einen möglichen Einfluss der Witterung auf den Sporenflug zu erfassen, wurden Wetterdaten von der nächstgelegenen Wetterstation bezogen.

Die Auswertung der Sporenfallen sowie die dazugehörigen Klimadiagramme (Temperatur, Niederschlag, rel. Luftfeuchte) sind in den Abbildungen 15, 16 und 17 dargestellt. Die Darstellung der Klimadiagramme beginnt dabei bereits 4 Wochen vor der Monitoring-Phase (18. Juni bis 29. Oktober in 2014, 23. Juni bis 28. Oktober in 2015 und 25. Februar bis 31. Oktober in 2016).

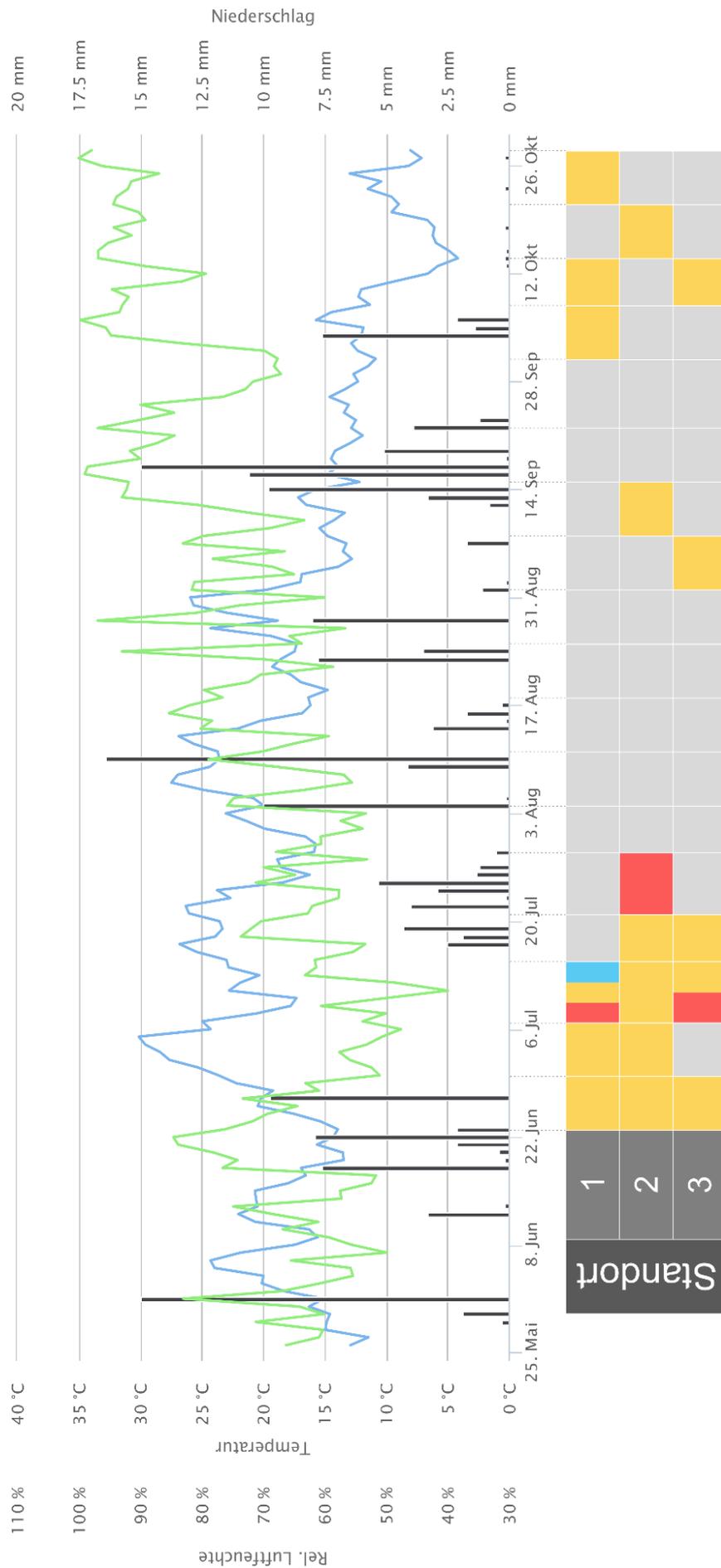
Grundsätzlich konnten in allen Untersuchungsjahren *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* nachgewiesen werden, wobei *Clo* mit 25 Nachweisen in 2014 (n=47), 17 in 2015 (n=54) und 13 in 2016 (n=74) der vorherrschende Erreger war. *Pch* und *Pm* spp. waren in 2014 mit 4 bzw. 8, in 2015 mit 3 bzw. 1 und in 2016 mit 3 bzw. 2 positiv getesteten Sporenfallen vergleichsweise seltener vertreten. Auffälligerweise wurde nach Beginn der heißen Sommerphase, d.h. bei regelmäßigen Durchschnittstemperaturen über 20 °C, bis Ende August/Mitte September ein verringerter Sporenflug in 2014 bzw. kein Sporenflug in 2015 und 2016 beobachtet. Die meisten Sporennachweise konzentrierten sich, insbesondere in 2014 und 2015, auf die Zeiträume von Mitte Juni bis Mitte/Ende Juli, d.h. kurz nach dem Einschulen der Reben, sowie von Anfang/Mitte September bis Ende Oktober, also kurz vor dem Ausschulen der Reben. Diese Zeiträume folgten dabei meist auf Wetterphasen, die größtenteils durch gemäßigte Temperaturen zwischen 10 °C und 20 °C im Tagesmittel geprägt waren. Im Jahr 2016, in dem ab Ende Februar Sporenfallen installiert waren, konnte ein Sporenflug von *Pch* und *Clo* bereits im Februar und März bei vorangegangenen Durchschnittstemperaturen zwischen 0 °C und 10 °C nachgewiesen werden.



Quelle Klimadiagramm: Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz

Abbildung 15: Sporenflug 2014 mit Klimadiagramm

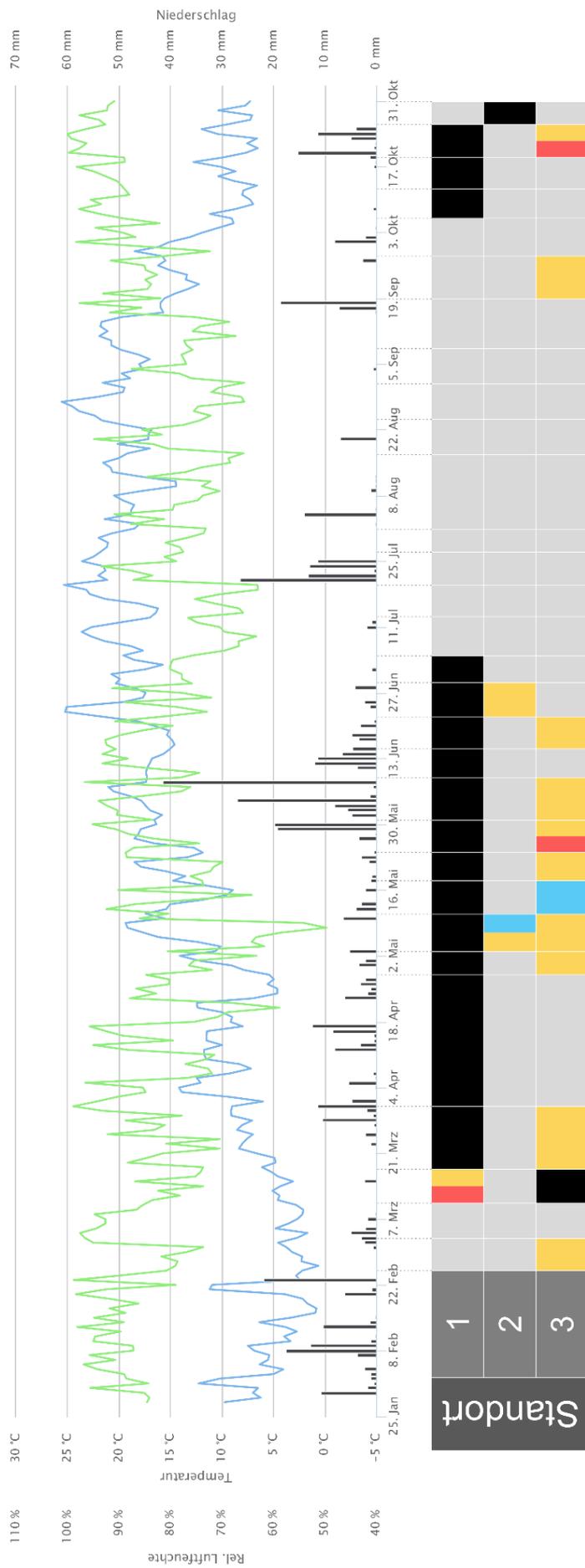
- Temperatur 2 m über dem Boden - Tagesmittel
- Niederschlag - Tagessumme
- rel. Luftfeuchte - Tagesmittel
- *Phaeoacremonium spp.*
- *Phaeoacremonium spp.*
- *Cadophora luteo-olivacea*
- kein Nachweis
- nicht verfügbar



Quelle Klimadiagramm: Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz

Abbildung 16: Sporenflug 2015 mit Klimadiagramm

- Temperatur 2 m über dem Boden - Tagesmittel
- Niederschlag - Tagessumme
- rel. Luftfeuchte - Tagesmittel
- *Phaeoacremonium spp.*
- *Phaeoacremonium spp.*
- *Cadophora luteo-olivacea*
- kein Nachweis



Quelle Klimadiagramm: Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz

Abbildung 17: Spottenflug 2016 mit Klimadiagramm

- Temperatur 2 m über dem Boden - Tagesmittel
- Niederschlag - Tagessumme
- rel. Luftfeuchte - Tagesmittel
- *Phaeoconiella chlamydospora*
- *Phaeoacremonium* spp.
- *Cadophora luteo-olivacea*
- kein Nachweis
- nicht verfügbar

3.5 IDENTIFIKATION VON PILZISOLATEN

Neben den bereits beschriebenen PCR-basierten Untersuchungen, die ausschließlich den Nachweis der vorhandenen Erreger-DNA jedoch keinen Lebendnachweis ermöglichen, wurden die in den Unterlagen-, Tauchbad-, Vortriebssubstrat- und Bodenproben befindlichen Pilze durch Kulturmaßnahmen auf Nährmedium isoliert und nachfolgend identifiziert (Kapitel 2.2.8). In Tabelle 23 finden sich hierzu alle Pilzisolatete, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden. Mehrfach-Nachweise pro Probe wurden dabei nicht berücksichtigt.

In Bezug auf GTD-Erreger konnten Lebendnachweise sowohl für *Pch* als auch *Clo* und *Pm* spp. erbracht werden. *Pch* wurde hierbei aus fünf Unterlagenproben, vier aus dem Pflanzguterzeugungsprozess und eine aus verkaufsfertigem Pflanzgut stammend, isoliert. Im Gegensatz dazu war *Clo* mit insgesamt 27 Isolierungen weitest häufiger zu finden. Am häufigsten kam der Erreger in Unterlagenholz (18x aus der Pflanzguterzeugung, 4x aus verkaufsfertigem Pflanzgut) vor und war darüber hinaus in jeweils einem Beltanolbad für Edelreiser und Unterlagen sowie einer Vortriebssubstratprobe und in zwei Bodenproben festzustellen. Zudem war *Phaeoacremonium angustius* aus dem Unterlagenbereich einer verkaufsfertigen Pfropfrebe zu isolieren (siehe Tabelle 23, Grapevine Trunk Disease-Erreger). Weitere Pilzarten wie z.B. die „black foot disease“-Erreger *Ilyonectria europaea* und *Ilyonectria liriodendri* konnten aus Unterlagenholz, das aus der Pflanzguterzeugung stammte, isoliert werden, wobei Letzterer zudem im Unterlagenbereich einer verkaufsfertigen Pfropfrebe zu finden war. *Sarocladium strictum*, eine Art, die kürzlich im Iran mit der Entstehung von Esca-Symptomen in Verbindung gebracht wurde (Arzanlou et al. 2013), war ebenfalls in Unterlagenholz sowie in zwei Vortriebssubstratproben per Kultivierung nachzuweisen (1x Torf und 1x Torf-Sägespäne-Gemisch) (siehe Tabelle 23, Grapevine Trunk Disease-Erreger). Die Isolate der genannten GTD-Erreger sind dabei exemplarisch in Abbildung 18 photographisch dargestellt.

Einem Großteil der im Laufe des Projekts isolierten Pilze konnte keine eindeutige Relevanz als GTD-Erreger oder Erreger anderer Pilzkrankheiten im Weinbau (Ausnahme: *Botrytis cinerea*) zugeschrieben werden. Des Weiteren war bei einigen Isolaten durch die Sequenzierung der ITS-Region lediglich die Gattung eindeutig bestimmbar (Tabelle 23, Pilze ohne GTD-Relevanz).

Tabelle 23: Pilzisolat aus den Rebschulen

Grapevine Trunk Disease-Erreger

Isolat (Spezies)	Herkunft (Anzahl Isolate)	Σ
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	UH-PE (18), UH-VE (4), BB-ER (1), BB-UL (1), VTS (1), BP (2)	27
<i>Ilyonectria europaea</i>	UH-PE (1)	1
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	UH-PE (1), UH-VE (1)	2
<i>Phaeoacremonium angustius</i>	UH-VE (1)	1
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	UH-PE (4), UH-VE (1)	5
<i>Sarocladium strictum</i>	UH-PE (1), VTS (2)	3

Pilze ohne GTD-Relevanz

Isolat (Spezies)	Herkunft (Anzahl Isolate)	Σ
<i>Acremonium alternatum/Acremonium sclerotigenum</i> *	WB-UL (1), BP (1)	2
<i>Acremonium furcatum</i>	BP (1)	1
<i>Acremonium persicinum</i>	BP (1)	1
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	BP (1)	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	SF (1)	1
<i>Botrytis cinerea</i>	SF (1)	1
<i>Cadophora americana</i>	BP (1)	1
<i>Candida fructus</i>	VTS (2)	2
<i>Candida mesenterica</i>	VTS (2)	2
<i>Coniochaeta canina</i>	BP (1)	1
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	BP (2)	2
<i>Didymella macrostoma</i>	BB-ER (1), BB-UL/ER (1)	2
<i>Emericellopsis minima</i>	BP (3)	3
<i>Eucasphaeria capensis</i>	WB-UL (1)	1
<i>Fusarium solani</i>	UH-PE (1)	1
<i>Geomyces auratus</i>	VTS (3)	3
<i>Geotrichum candidum</i>	UH-PE (1)	1
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	BP (2)	2
<i>Metarhizium anisopliae/Metarhizium robertsii</i> *	BP (1)	1
<i>Mortierella alpina</i>	UH-PE (1)	1
<i>Oidiodendron echinulatum</i>	UH-PE (7), UH-VE (1), VTS (2)	10
<i>Oidiodendron rhodogenum</i>	VTS (2)	2
<i>Ophiostoma breviusculum/Ophiostoma piceae</i> *	UH-PE (1)	1
<i>Ophiostoma dentifundum</i>	UH-PE (1)	1
<i>Paraphoma radicina</i>	WB-UL (2)	2
<i>Phialemonium atrogriseum</i>	BB-UL (1), VTS (1)	2
<i>Phialocephala dimorphospora</i>	VTS (1)	1

Ergebnisse

<i>Phialocephala humicola</i>	BP (1)	1
<i>Phialocephala trignonospora</i>	UH-PE (1)	1
<i>Phialophora dancoii</i>	UH-PE (1)	1
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	BP (1)	1
<i>Protoventuria alpina</i>	UH-PE (2)	2
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	UH-VE (1)	1
<i>Sporothrix inflata</i>	BP (1)	1
<i>Sporothrix variecibatus</i>	UH-PE (4)	4
<i>Sterigmatosporidium polymorphum</i>	UH-PE (4)	4
<i>Trichosporon xylopinii/Trichosporon porosum</i> *	UH-PE (1), VTS (7)	8
<i>Volutella rosea/Volutella ciliata</i> *	BB-UL (1)	1

Isolat (Gattung)	Herkunft (Anzahl Isolate)	Σ
<i>Blastobotrys</i> sp.	UH-PE (5), VTS (9)	14
<i>Cercophora</i> sp.	UH-PE (1)	1
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	BP (1)	1
<i>Chloridium</i> sp.	BP (2)	2
<i>Corticiales</i> sp.	UH-PE (1)	1
<i>Doratomyces</i> sp.	BP (1)	1
<i>Fusarium</i> sp.	BP (1)	1
<i>Hypocreales</i> sp.	BP (1)	1
<i>Oidiodendron</i> sp.	UH-PE (2), VTS (1)	3
<i>Ophiostoma</i> sp.	UH-PE (1)	1
<i>Paraphoma</i> sp.	WB-UL (1)	1
<i>Penicillium</i> sp.	VTS (1)	1
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	BP (3)	3
<i>Phialocephala</i> sp.	UH-PE (1)	1
<i>Pleosporales</i> sp.	BP (1)	1
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	WB-UL (1)	1
<i>Stachobotrys</i> sp.	BP (1)	1
<i>Torula</i> sp.	BP (1)	1
<i>Verticillium</i> sp.	BP (7)	1

UH-PE	Unterlagenholz aus der Pflanzguterzeugung
UH-PE	Unterlagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts
BB-ER	Beltanolbad für Edelreisholz
BB-UL	Beltanolbad für Unterlagenholz
WB-UL	Wasserbad für Unterlagenholz
BB-UL/ER	Beltanolbad für Edelreis- und Unterlagenholz gemeinsam genutzt
VTS	Vortriebssubstrat
BP	Bodenprobe
SF	Sporenfalle

*durch Sequenzierung der ITS-Region nicht unterscheidbar

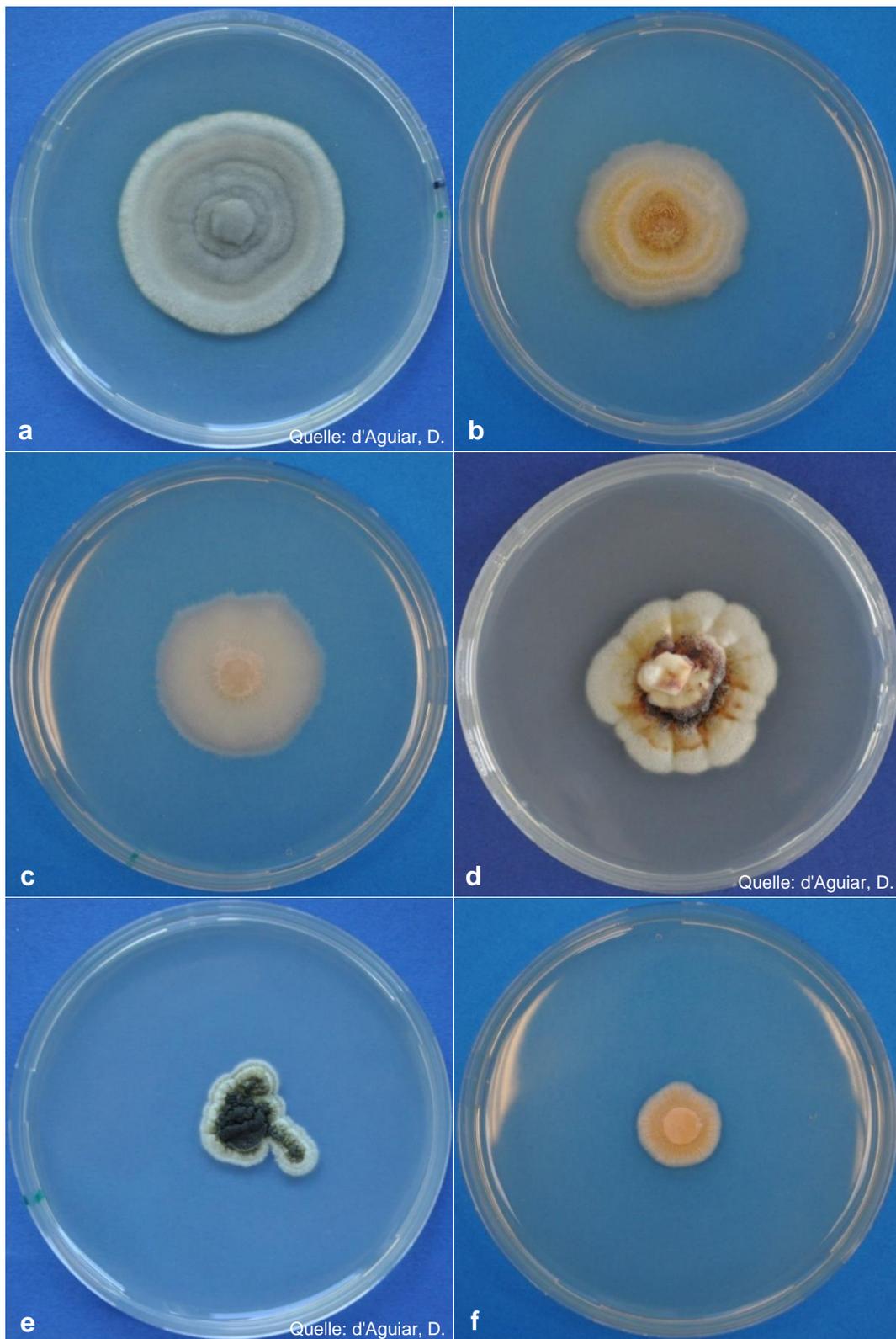


Abbildung 18: Pilzisolat verschiedener GTD-Erreger auf PDA-Medium nach 14-tägiger Inkubation bei ca. 23 °C. *Cadophora luteo-olivacea* (a), *Ilyonectria liriodendri* (b), *Ilyonectria europaea* (c), *Phaeoacremonium angustius* (d), *Phaeomoniella chlamydospora* (e) und *Sarocladium strictum* (f).

Ein Vergleich der beiden Nachweisverfahren, d.h. Isolierung vs. multiplex nested PCR, zeigte, dass *Pch*, *Clo* und *Pm* spp. durch das PCR-basierte Verfahren weitaus häufiger in den untersuchten Proben detektiert werden konnten. So waren aus insgesamt 324 Unterlagen, die mit beiden Verfahren getestet wurden, *Clo* in 251 (~78%), *Pch* in 54 (~17%) und *Pm* spp. in 51 Proben (~16%) mittels multiplex nested PCR nachzuweisen. Durch Kultivierung auf Nährmedium hingegen war *Clo* lediglich in 22 (~7%) und *Pch* in 5 Unterlagen (~2%) zu finden. *Pm* spp. konnten mit *P. angustius* aus einer Unterlagenprobe (0,3%) isoliert werden (s.o.). Dies entspricht für *Clo* und *Pch* jeweils ca. 9% und für *Pm* spp. ca. 2% derjenigen Nachweisrate, die durch die multiplex nested PCR erreicht wurde.

4 DISKUSSION

4.1 SYMPTOMENTWICKLUNG UND ERREGERNACHWEIS IN REBHOLZ

4.1.1 Symptom- vs. Erregerauftreten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem dreijährigen Untersuchungszeitraum Rebholz aus drei unterschiedlichen Pflanzguterzeugungsbetrieben regelmäßig auf Esca-typische Holzsymptome („brown-wood streaking“ und „Gummosis“) untersucht. Der Anteil symptomatischer Holzproben nahm dabei unabhängig von Rebschule und Jahr sowohl bei den Unterlagen als auch bei den Edelreisern im Laufe der Pflanzguterzeugung deutlich zu. Zeigten die Holzproben zu Beginn der Bearbeitung größtenteils noch keine Symptome, war in einzelnen Rebschulen und Jahren entweder schon vor dem Ausschulen oder vor dem Verkauf des Pflanzguts ein Anstieg auf bis zu 100% zu beobachten (siehe Abbildung 7, 8 und 9).

Parallel zur Erfassung der Symptome wurde zunächst das Vorkommen von *Pch* im Unterlagenholz mithilfe eines Spezies-spezifischen nested PCR-Verfahrens untersucht. Dabei zeigte sich vom Erregernachweis im Vergleich zur Holzsymptomatik generell eine weitaus geringere Befallssituation. Zwar waren die Nachweisraten von *Pch* während der Freilandphase in der Regel höher als noch vor dem Einschulen, jedoch lagen diese in den Jahren 2015 und 2016 zwischen 2,5% und 7,5% bzw. 0% und 20% und konnten einen sichtbaren Befall zwischen 20% und 97,5% bzw. 52,5% und 100% nicht ausreichend erklären (vgl. Abbildung 7 und 10). Im Vergleich dazu war in 2014 der Anteil *Pch*-positiver Unterlagen im selben Zeitraum mit 41,7-83,3% wesentlich höher (siehe Abbildung 10). Eine klare Aussage zur tatsächlichen Befalls-situation von *Pch* ist hier aber kaum möglich, da lediglich etwa ein Drittel der Unterla-gen mit dem PCR-basierten Verfahren getestet wurden. Es ist auch davon auszuge-hen, dass die erhöhten Befallszahlen im ersten Jahr zu einem gewissen Teil der ge-troffenen Vorselektion – nur stark symptomatische Unterlagenproben wurden über-prüft – geschuldet sind.

Die starke Diskrepanz zwischen verbreiteter Symptomatik und niedriger Befallsrate durch *Pch* konnte anfänglich nicht erklärt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde jedoch, auch bedingt durch eine gezielte Bearbeitung, ein anderer Pilz auffällig häufig aus symptomatischem Holz isoliert. Es handelte sich dabei um *Cadophora luteo-olivacea* (*Clo*), von dem in den letzten Jahren berichtet worden war, dass er in

Pathogenitätstests ähnliche Symptome wie *Pch* im Holz verursachen kann (Halleen et al. 2007b; Gramaje et al. 2011; Úrbez-Torres et al. 2014; Travadon et al. 2015). Aufgrund dessen wird *Clo* mittlerweile als ein weiterer möglicher Verursacher der „Petri disease“ betrachtet (Agustí-Brisach et al. 2011, 2013a; Úrbez-Torres et al. 2014; Travadon et al. 2015).

Auf diesen Erkenntnissen beruhend wurde ein multiplex nested PCR-Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe neben *Pch* auch die Erfassung von *Clo* und mehrerer *Pm*-Arten ermöglicht wurde. Nach Untersuchung der Unterlagenproben mit dem neu entwickelten Verfahren war eine hohe Nachweisrate von *Clo* zu verzeichnen, die in allen Untersuchungsjahren und Rebschulen deutlich über der von *Pch* lag (siehe Abbildung 13). Nahezu alle Unterlagen, die während der Freilandphase 2014 beprobt wurden, waren von *Clo* betroffen; auch hier ist aber zu beachten, dass nur stark symptomatische Unterlagen molekularbiologisch untersucht wurden. In den beiden Folgejahren beliefen sich die Nachweisraten für *Clo* über alle Rebschulen und den gesamten Pflanzguterzeugungsprozess hinweg zwischen 65% und 100% in 2015 und 22,5% und 95% in 2016. Auffallend war dabei, dass das Unterlagenholz bereits zum Vortreiben zu einem sehr hohen Prozentsatz betroffen sein konnte und sich die Befallsraten innerhalb der jeweiligen Rebschulen über das Jahr hinweg meist auf einem gleichbleibenden Niveau bewegten. Sogar schon zu Beginn des Jahres war *Clo* in 100% der symptomatischen Unterlagenproben des Vermehrungsmaterials nachzuweisen (siehe Abbildung 13). Die resultierenden PCR-Fragmente waren hier zwar durchweg klar erkennbar und eindeutig zuzuordnen, jedoch im Vergleich zu späteren Probennahmen-Zeitpunkten trotz der hohen Sensitivität des Verfahrens schwächer ausgeprägt (Ergebnisse nicht dargestellt). Obwohl durch das verwendete Nachweisverfahren keine klare quantitative Aussage getroffen werden kann, lässt diese Beobachtung vermuten, dass zu diesem frühen Stadium verhältnismäßig geringe Mengen von *Clo* im Unterlagenholz vorhanden waren.

Pm spp. waren in 2014 von den untersuchten Erregern am seltensten zu finden (0-25%). In 2015 und 2016 hingegen konnten *Pm* spp. mit Befallsraten zwischen 0% und 35% bzw. 2,5% und 50% in der Regel seltener als *Clo*, aber meist häufiger als *Pch* nachgewiesen werden. Auffällig war die Beobachtung, dass *Pm* spp. in RS 2 während der Freilandphase 2016 sogar dominierten (vgl. Abbildung 13).

Die Befallssituation im Unterlagenholz des verkaufsfertigen Pflanzguts stellte sich generell sehr ähnlich zu der während des Pflanzguterzeugungsprozesses dar (vgl.

Abbildung 13 und 14). *Clo* war auch hier mit einem Auftreten von 90-100% in 2015 und 75-97,5% in 2016 vorherrschend. Der Befall durch *Pch* und *Pm* spp. bewegte sich 2015 (3,3-30% für *Pch*, 10-20% für *Pm* spp.) und 2016 (5-15% für *Pch*, 12,5-17,5% für *Pm* spp.) auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau (vgl. Abbildung 14).

Während sich das hohe Auftreten der Esca-charakteristischen Symptome in den Unterlagenbereichen zu Beginn der Arbeiten nur sehr unvollständig alleine durch die Nachweisraten von *Pch* begründen ließ, war dieses mit den zusätzlich gewonnenen Informationen zum Vorkommen von *Clo* und *Pm* spp. weitaus besser in Einklang zu bringen. Dies trifft insbesondere auf Unterlagenholz zu, das von Pfropfreben aus dem Freiland oder dem Verkauf stammte, da hier sowohl Symptom- als auch Erregerauftreten sehr hoch waren. Weniger zutreffend war dies jedoch bei Unterlagen zum Zeitpunkt des Vortreibens: obwohl in 2015 und 2016 zu diesem Stadium bereits ein hoher Befallsgrad der Pathogene, vorwiegend durch *Clo*, festzustellen war, zeigten sich in den Unterlagen in der Regel vergleichsweise weniger sichtbare Symptome (vgl. Abbildung 7 und 13).

4.1.2 Einfluss der Erreger auf die Entwicklung von Holzsymptomen

Durch einen Vergleich der Erregersituation mit dem Symptomauftreten in den jeweiligen Unterlagenproben wurde überprüft, ob der Erregerbefall einen Einfluss auf die Symptomentwicklung hat (Tabelle 20). Hier zeigte sich, dass ein positiver Zusammenhang zwischen Symptomatik und einer Koinfektion durch *Pch* und *Clo* bestand. Für andere Erregerszenarien konnte dies jedoch statistisch nicht bestätigt werden. Da *Pch* fast ausschließlich in Kombination mit *Clo* nachzuweisen war und letztere Art sehr häufig auch in asymptomatischem Unterlagenholz gefunden werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass *Pch* zumindest in diesen Fällen als Hauptverursacher der Symptome angesehen werden kann.

4.1.3 GTD-Erreger in asymptomatischem Rebholz

Grundsätzlich konnten alle der gesuchten Erreger auch in gesund erscheinendem Unterlagenholz festgestellt werden. Dabei waren *Pch* in 3, *Pm* spp. in 29 und *Clo* in 189 asymptomatischen Unterlagenproben aus 2015 und 2016 zu finden (nicht dargestellt).

Entsprechendes war in der Vergangenheit auch in anderen Untersuchungen zu beobachten. So konnten von Halleen et al. (2003) beispielsweise *Pch* und *Pal* aus scheinbar gesundem Unterlagenmaterial vorgetriebener Pfropfreben isoliert werden. Durch PCR-basierte Verfahren waren darüber hinaus sowohl *Clo* in Pathogenitätstests aus zuvor infiziertem jedoch asymptomatischem Unterlagenholz (Navarrete et al. 2011) als auch *Pch* und *Pal* in asymptomatischem Holz von Rebschulpflanzen nachgewiesen worden (Abreo et al. 2011).

Mehrere Gründe für die zahlreichen Nachweise, insbesondere von *Clo*, aus asymptomatischem Holzgewebe sind denkbar: Navarrete et al. (2011) vermuteten, dass *Clo* entweder keine Pathogenität gegenüber den getesteten Rebsorten zeigte oder dass der Pilz längere Zeit benötigt, um sichtbare Läsionen hervorzurufen. Letzteres scheint unter Berücksichtigung weiterer Untersuchungen, die ein pathogenes (Halleen et al. 2007b; Gramaje et al. 2011) bzw. schwach-pathogenes Verhalten (Úrbez-Torres et al. 2014; Travadon et al. 2015) von *Clo* vermuten ließen, allerdings wahrscheinlicher. Wie bereits im Zusammenhang mit äußerlich asymptomatischen Mutterstöcken und Rebschulpflanzen, die durch „Petri disease“-Erreger befallen waren, diskutiert wurde (Gramaje & Armengol 2011; Úrbez-Torres et al. 2015), können sich die verantwortlichen Pilze als Endophyten oder als latente Pathogene verhalten. Externe Symptome äußern sich demnach erst, sobald die Pflanzen abiotischen oder biotischen Stress erfahren. Ähnliches ist daher auch in Bezug auf die Entwicklung der inneren Symptome denkbar. Womöglich konnten die Erreger in der vorliegenden Arbeit durch das hochsensitive multiplex nested PCR-Verfahren daher bereits in frisch infizierten Unterlagen nachgewiesen werden, noch bevor sichtbare Symptome im Holz erkennbar waren.

4.1.4 Symptomaufreten ohne Nachweis der GTD-Erreger

Im Rahmen der Untersuchungen zum Symptom- und Erregervorkommen war nicht nur zu beobachten, dass die Erreger in asymptomatischem Holz zu finden sind, sondern, dass umgekehrt in symptomatischem Holz häufig keiner der untersuchten Erreger nachzuweisen war (siehe Tabelle 20).

Bereits Rumbos und Rumbou (2001) hatten beobachtet, dass trotz eines hohen Auftretens (>50%) von Verfärbungen im Unterlagenholz nur geringe Isolationsraten der pathogenen Pilze festzustellen waren. Diese Diskrepanz war vermutlich auf abiotische Faktoren zurückzuführen; Holzverfärbungen könnten demnach mangelhaften Rebschulpraktiken oder Verletzungen während der Pflanzgutherstellung geschuldet sein (Rumbos & Rumbou 2001). Darüber hinaus wurde die Entwicklung von Holzsymptomen in der Vergangenheit u.a. auch mit Stress durch lange Lagerzeiten im Kühlraum, unsachgemäßes Anpflanzen oder unzureichende Bewässerung in Verbindung gebracht (Stamp 2001). Schwächere Verfärbungen im Bereich von Schnittwunden, die im Zuge der Veredlung zwangsläufig erzeugt werden, werden laut Stamp (2001) auch durch Oxidation natürlich vorkommender Tannine oder phenolischer Verbindungen im Holz hervorgerufen.

Neben abiotischen Einflussfaktoren kommen zudem weitere biotische Ursachen für die Entstehung der Symptome in Betracht: so ist u.a. von *Botryosphaeria* spp. (Phillips 2002; van Niekerk et al. 2006), *Cylindrocarpon* spp. (Scheck et al. 1998a; Rego et al. 2000; Halleen et al. 2006) und seit kurzem auch von *Sarocladium strictum* (Arzanlou et al. 2013) bekannt, dass diese in der Lage sind, Verfärbungen im Xylem zu verursachen.

Auch im Rahmen dieser Untersuchungen konnten *Sarocladium strictum* und Vertreter der Gattung *Cylindrocarpon* in Einzelfällen durch Isolation im Unterlagenholz nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5); eine eingehende Erfassung dieser Erreger durch molekularbiologische Verfahren wurde jedoch nicht durchgeführt.

4.1.5 Symptomaufreten – Apikal- vs. Basalbereich der Unterlagen

Die Ergebnisse zur Symptomentwicklung in Unterlagen zeigten, dass die Basalbereiche in der Regel deutlich häufiger symptomatisch waren als die Apikalbereiche; zudem waren die Symptome im Basalbereich meist stärker ausgeprägt, d.h. die Anzahl betroffener Xylemgefäße war erhöht und die Verfärbung intensiver (nicht numerisch erfasst).

Untersuchungen aus Griechenland, Kalifornien und Portugal konnten in diesem Zusammenhang verschiedene abiotische und biotische Einflüsse mit dem vornehmlichen Symptomaufreten im Basalbereich der Unterlagen in Verbindung bringen (Rumbos & Rumbou 2001; Stamp 2001; Rego et al. 2009). So beobachtete Stamp (2001) beispielsweise, dass sich Läsionen im basalen Bereich meist ausgehend von übermäßig großen Wunden, die durch das Blenden verursacht wurden, entwickeln. Zudem sind zum Pflanzzeitpunkt der Pfropfreben die basalen Enden der Unterlage noch nicht vollständig durch Kallusgewebe geschützt und daher der Infektion durch bodenbürtige Pathogene ausgesetzt; auch können die frisch gebildeten Kalluswurzeln während der Pflanzung beschädigt werden und dadurch als Eintrittsporten für Erreger dienen (Halleen et al. 2003). Des Weiteren ist es denkbar, dass die wärmespeichernde Eigenschaft des Rebschulbodens die Ausbreitung der Pathogene im unterirdischen Teil der Pfropfreben begünstigt und folglich zu einer stärkeren Ausprägung der Symptome im Basalbereich führt.

4.1.6 Sortenunterschiede im Symptom- und Erregeraufreten

Sortenunterschiede in Bezug auf das Symptomaufreten waren weder bei Unterlagen noch bei Edelreibern klar erkennbar (Kapitel 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3). Signifikante Unterschiede konnten im Apikalbereich der Unterlagen (Tabelle 11 und 13) und in Edelreibern zwar vereinzelt (einzelne Zeitpunkte & Rebschulen) festgestellt werden, ließen jedoch keine Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Anfälligkeit der beprobten Sorten zu. Ähnliches gilt für den PCR-basierten Nachweis von *Pch*, *Clo* und *Pm* spp. in den jeweiligen Unterlagensorten: lediglich in RS 2 war zu einem einzigen Zeitpunkt (MF 2016) eine signifikant unterschiedliche Befallsrate durch *Clo* und *Pm* spp. zwischen den Sorten zu beobachten (Tabelle 17).

Eine vollständige Resistenz gegenüber GTD-Erregern ist bis dato weder bei kultivierten Sorten noch bei Wildarten bekannt (Wagschal et al. 2008). In der Literatur be-

schriebene Untersuchungen von natürlich infiziertem Rebholz haben gezeigt, dass alle bedeutenden Unterlagen- und Edelreissorten anfällig gegenüber den beteiligten Erregern sind (Gramaje & Armengol 2011). Womöglich bestehen aber graduelle Unterschiede in der Anfälligkeit zwischen Unterlagen- und Edelreissorten. So konnte beispielsweise bei Unterlagen, die basal mit Sporensuspensionen von *Pch*, *Pal* und *Phaeoacremonium inflatipes* inokuliert, getopft und nach einem Jahr beprobt wurden, eine große sortenabhängige Variabilität in der akropetalen Ausbreitung der Läsionen beobachtet werden (Eskalen et al. 2001a). Gramaje et al. (2010) berichteten ebenfalls über unterschiedliche Anfälligkeiten von Unterlagensorten gegenüber *Pch*, *Clo* und *Pm* spp.: Unterlagen der Sorte 110R und 140Ru, beides Kreuzungen von *V. riparia* x *V. rupestris*, waren demnach am stärksten betroffen; Kreuzungen von *V. riparia* x *V. berlandieri* wie z.B. in 161-49C, waren am schwächsten betroffen und wurden als generell weniger anfällig gegenüber den genannten Erregern betrachtet.

Des Weiteren konnten in der Vergangenheit, basierend auf äußeren oder inneren Symptomen sowie auf Befallsraten in Ertragsanlagen nach Inokulation mit Esca-Erregern, Unterschiede in der Anfälligkeit auch zwischen Edelreissorten festgestellt werden (Marchi 2001; Sparapano et al. 2001; Edwards & Pascoe 2004; Feliciano et al. 2004; Quaglia et al. 2009; Murolo & Romanazzi 2014). Pouzoulet et al. (2014) stellten in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen dem Durchmesser von Xylemgefäßen und der Entwicklung von Esca-assoziiertes Symptomatik fest: Sorten mit größeren Leitgefäßen wären demnach anfälliger gegenüber den Erregern.

Generell ist eine Bezugnahme zu den Ergebnissen der oben genannten Untersuchungen an dieser Stelle allerdings äußerst schwierig, da sich diese oftmals nur auf äußere Symptome, Reben in Ertragsanlagen oder andere der hier untersuchten Sorten beziehen.

Während sich zwischen Unterlagen- und Edelreissorten in der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen Unterschiede im Symptomauftreten erkennen ließen, zeigte sich, dass Unterlagen im Jahr 2015 im Allgemeinen häufiger von Holzsymptomen betroffen waren als Edelreiser. In 2016 war dieser Unterschied wiederum weniger ersichtlich (vgl. Abbildung 7 und 9), sodass gegen Ende der Freilandphase Edelreiser und Unterlagen etwa gleich häufig befallen waren. Bei verkaufsfertigen Pfropfreben war der Edelreisbereich meist sogar häufiger betroffen (vgl. Abbildung 8 und 9).

Ähnlich zu den Beobachtungen in 2015, konnten in der Vergangenheit auch Fischer & Kassemeyer (2010) in verschiedenen deutschen Rebschulen einen deutlichen An-

stieg der Holzsymptomatik im Unterlagenbereich zwischen Ein- und Ausschulen festzustellen, während der Edelreisbereich weitestgehend symptomfrei blieb. Allerdings bewegte sich dort der Anteil symptomatischer Unterlagen auf einem deutlich geringeren Niveau. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Auftreten der Holzsymptome aufgrund einer allgemeinen Ausbreitung der ursächlichen Pathogene über die Jahre hinweg zunimmt. Außerdem bestehen keine offiziellen Richtlinien für die Bonitur Esca-typischer Holzsymptome. Die Beurteilung der Symptome beruht daher auf einer subjektiven Einschätzung, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

4.2 BETRIEBSBEDINGTE EINFLÜSSE AUF DEN ERREGERBEFALL IN UNTERLAGEN

Die Ergebnisse zum Erreger- und Symptom-Vorkommen im Unterlagenholz zeigten, dass *Pch*, *Clo* und *Pm* spp. in allen Rebschulen vorzufinden waren und die Holzsymptome im Laufe der Pflanzguterzeugung stark zunahmten. Auch wenn sich die Befallssituation zwischen den Rebschulen in Bezug auf die Holzsymptome und die beteiligten Pathogene im Allgemeinen ähnlich darstellte, waren dennoch zu einzelnen Zeitpunkten deutliche Unterschiede zwischen den Rebschulen erkennbar (siehe Tabelle 10, 12, 16 und 18).

Während Symptome im Holz sowohl durch abiotische und biotische Faktoren verursacht werden können (siehe Kapitel 4.1), war davon auszugehen, dass das Erregerauftreten im Holz selbst durch betriebsbedingte Faktoren bzw. Infektionsquellen während der Pflanzgutproduktion beeinflusst wird und somit zu einem unterschiedlichen Holzbefall zwischen den Betrieben führen kann. Dabei lag die Vermutung nahe, dass die Pathogene entweder i) schon über das Vermehrungsmaterial in die Betriebe gelangten oder ii) aus anderen Infektionsquellen während der innerbetrieblichen Abläufe oder iii) später im Freiland das Holz besiedeln. Um dies zu überprüfen, wurde ein möglicher Infektionsdruck durch *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* aus Tauchbädern, Vortriebssubstraten, Luft und Rebschulboden näher untersucht.

4.2.1 Abläufe in den Betrieben

4.2.1.1 Tauchbäder

Einer der ersten Arbeitsschritte in der Pflanzguterzeugung ist das Wässern des Vermehrungsmaterials. Zur Klärung der Frage, ob dieser Arbeitsvorgang ein mögliches Infektionsrisiko für das Vermehrungsmaterial durch Esca- bzw. „Petri disease“-

Erreger darstellt, wurden verschiedene Tauchbäder aus den Rebschulen mithilfe des nested multiplex-Verfahrens untersucht. Die Ergebnisse zeigten hierzu, dass die Erreger sowohl in Unterlagen- als auch in Edelreis-Tauchbädern mit und ohne zugefügtem Fungizid zu finden waren. Dabei war *Clo* mit 67,6% aus insgesamt 34 Tauchbadproben (2014-2016) am häufigsten vorhanden. *Pch* und *Pm* spp. hingegen waren mit jeweils 29,4% bzw. 8% weitaus seltener nachzuweisen (vgl. Tabelle 21). Darüber hinaus waren zwischen den Rebschulen Unterschiede hinsichtlich des Erregerspektrums und der Nachweisrate der jeweiligen Erreger erkennbar (siehe 3.4.1). Allerdings spiegelten sich diese in der Wiederfindungsrate der jeweiligen Erreger bei der nachfolgenden Beprobung des Unterlagenholzes nicht wider (vgl. Tabelle 21 und Abbildung 13), sodass im Rahmen dieser Arbeit kein unmittelbarer Einfluss der Tauchbäder auf den Befall in Unterlagen beobachtet werden konnte.

Es ist mittlerweile sehr gut bekannt, dass Tauchbäder eine bedeutende Rolle als Quelle bzw. Verbreitungsmedium von GTD-Erregern spielen können. Viele Untersuchungen in europäischen (Spanien, Italien, Frankreich) und außereuropäischen (Südafrika, Australien, Neuseeland) Rebschulen zeigten, meist basierend auf molekularbiologischen Verfahren, dass GTD-Erreger wie *Pch*, *Clo*, *Pm* spp. und/oder *Botryosphaeria* spp. in verschiedenen Tauchbädern während der Pflanzguterzeugung zu finden waren (Whiteman et al. 2004a, 2004b; Retief et al. 2006; Edwards et al. 2007; Pollastro et al. 2009; Viguès et al. 2009; Aroca et al. 2010; Gramaje et al. 2011). Das Tauchwasser kann hierbei selbst der Ursprung für Infektionen sein, vor allem wenn es sich um nicht aufbereitetes Wasser handelt, oder durch das Tauchen des Vermehrungsmaterials kontaminiert werden (Retief et al. 2006; Waite & Morton 2007).

4.2.1.2 Vortriebssubstrate

Das Vortreiben der frisch veredelten Reben kann eine weitere Infektionsquelle von Esca/“Petri disease“-Erregern für das Rebholz darstellen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Vortriebssubstrate der drei Rebschulen mit der multiplex nested PCR analysiert. Dies führte zu einem Nachweis von *Clo* in 72,7% der insgesamt 33 getesteten Vortriebssubstratproben (2014-2016). *Clo* war damit vorherrschend vertreten, gefolgt von *Pm* spp. mit 33,3% und *Pch* mit 3% (vgl. Tabelle 22). Die geringe Nachweisrate von *Pch* korreliert dabei mit den Ergebnissen von Whiteman et al. (2004a, 2004b), Retief et al. (2006) und Aroca et al. (2010), die ebenfalls von nur sehr weni-

gen Funden des Erregers in Vortriebssubstraten berichteten. Auch *Pm* spp. waren von Aroca et al. (2010) regelmäßig in Vortriebssubstraten mittels nested PCR nachzuweisen.

Die Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass sich das Erregerspektrum und die Nachweishäufigkeit der Erreger zwischen den Rebschulen z.T. unterschied (siehe 3.4.2). Eine Auswirkung dieser Unterschiede auf den Erregernachweis aus Unterlagenholz konnte im weiteren Produktionsverlauf jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Tabelle 22 und Abbildung 13). Auffällig war jedoch, dass in den Torf-Substraten aus RS1 im Vergleich zu den Torf-Sägespäne-Substraten aus RS 2 und RS 3 keine *Pm* spp. zu finden waren. Dies deutet darauf hin, dass auch die Zusammensetzung des Vortriebssubstrats einen Einfluss auf das Erregerspektrum haben könnte. Analog zum Wässern des Vermehrungsmaterials liegt die Vermutung nahe, dass das Vortriebssubstrat selbst Ausgangspunkt für Infektionen ist oder seinerseits durch vorinfiziertes Rebholz kontaminiert wird. Auch ist davon auszugehen, dass die hohe Temperatur und Luftfeuchtigkeit während des Vortreibens das Wachstum der Pathogene begünstigt und den Infektionsdruck zusätzlich erhöhen. Inwieweit Tauchbäder und Vortriebsstrate schon zu Beginn der Bearbeitung mit den Erregern belastet waren oder erst nach Kontakt mit dem Rebmateriale kontaminiert wurden, konnte hier allerdings nicht genau bestimmt werden, da Proben erst während des Tauchens bzw. Vortreibens entnommen wurden.

4.2.2 Freilandphase

4.2.2.1 Luft

Um einen möglichen Infektionsdruck aus der Luft zu überprüfen, wurden in einer der Rebschulen Sporenfallen in Freilandflächen installiert und diese durch das multiplex nested PCR-Verfahren getestet. *Clo* war in den drei Untersuchungsjahren hierbei in 55 von insgesamt 174 Sporenfallen (2014-2016) zu finden und damit am häufigsten vertreten. *Pch* und *Pm* spp. waren mit 10 bzw. 11 Nachweisen (2014-2016) weitaus seltener vorhanden. Die meisten Nachweise erfolgten insbesondere in 2014 und 2015 zu Beginn und gegen Ende der Freilandphase. Tendenziell war hierbei ein höheres Sporenaufkommen während und nach Perioden mit Durchschnittstemperaturen unter 20 °C zu beobachten. Nach Beginn der heißen Sommerphase war bis etwa Ende August ein deutlich geringerer (in 2014) bzw. kein (in 2015 und 2016) Sporen-

flug zu verzeichnen (siehe Abbildung 15, 16 und 17). Ein klarer Zusammenhang zwischen Regenereignissen oder relativer Luftfeuchte und dem Erregernachweis aus der Luft konnte hier nicht beobachtet werden. Diesbezüglich berichteten Eskalen & Gubler (2001) hingegen über ein gehäuftes Sporenauftreten von *Pch* und *P. inflatipes* vor allem während und nach Niederschlagsereignissen, wobei *Pal* auch in Phasen ohne Regen und später in den Sommer hinein nachgewiesen werden konnte. Ebenso luftbürtiges Inokulum von *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* war von Eskalen et al. (2005) hauptsächlich während Regenereignissen über die gesamte Vegetationsperiode zu finden. Quaglia et al. (2009) stellten neben einem Zusammenhang zwischen Niederschlag und der Sporenfreisetzung von *Pch*, wie auch in der vorliegenden Arbeit, einen möglichen Temperatureinfluss fest.

Wie bereits von Larignon & Dubos (2000) und Quaglia et al. (2009) beobachtet wurde, war ein Sporenflug auch im Rahmen dieser Untersuchungen verstärkt im Mai und Juni, d.h. zum Pflanzzeitpunkt der gepropften Reben, festzustellen. Dies könnte ein weiterer Grund für den starken Anstieg der Symptome im Unterlagenholz, vor allem im Basalbereich, sowie für die allgemein höheren Nachweisraten von *Pch* und *Pm* spp. während der Freilandphase sein (siehe Abbildung 7 und 13). Luftbürtiges Inokulum könnte demnach durch Niederschlag in den Boden eingebracht werden und die gerade in diesem Zeitraum besonders anfälligen Basalbereiche der Unterlagen infizieren (siehe Kapitel 4.1.5). Weitere Infektionsereignisse über unvollständig verheilte Veredlungsstellen und Verletzungen, die im Laufe der Freilandphase durch Kulturmaßnahmen wie z.B. Laubarbeiten, mechanische Unkrautbekämpfung oder Pesticidanwendungen entstehen können, sind ebenso denkbar.

4.2.2.2 Rebschulboden

Um zu klären, ob bodenbürtiges Inokulum von Esca- und „Petri disease“-Erregern ein potenzielles Infektionsrisiko für Pflanzgut während der Freilandphase darstellt, wurden in den Rebschulen Bodenproben aus den Freilandflächen entnommen und durch Kulturmaßnahmen auf das Vorhandensein von Pilzen untersucht. Dadurch war es möglich, zahlreiche Pilzarten und -gattungen aus dem Rebschulboden zu isolieren, wobei der Großteil der Isolate keine bekannte pathogene Bedeutung für den Weinbau hatte. Als einziger GTD-Erreger war *Clo* in zwei Bodenproben zu finden (Tabelle 23). Darüber hinaus war in zwei weiteren Bodenproben der Pilz *Coniochaeta hoffmannii* nachzuweisen. Von diesem ist bekannt, dass er in der Lage ist, Holzoberflä-

chen zu kolonisieren und Holzzellwände durch spezialisierte Hyphen und Enzyme zu durchdringen (Hale & Eaton 1985). An *Vitis vinifera* konnte der Pilz in der Vergangenheit in Schnittwunden und an den basalen Enden von Rebpfanzgut (Casieri et al. 2009) sowie in einem Rebstock (>15 Jahre), der schwache Esca-typische Blattsymptome zeigte, gefunden werden (Fischer et al. 2016). Ein gewisses pathogenes Potenzial dieses Pilzes ist somit durchaus vorstellbar.

Weitere GTD wie z.B. *Pch*, *Pal* und *P. inflatipes* konnten bereits in anderen Untersuchungen durch PCR-basierte Verfahren in Böden von Ertragsanlagen (Eskalen et al. 2001b; Rooney et al. 2001) und Muttergärten (Retief et al. 2006) gefunden werden. Agustí-Brisach et al. (2013) gelang es zudem, mithilfe von sog. Köderpflanzen *Pal*, *P. parasiticum* und *Clo* in Rebschulböden nachzuweisen. Mit dieser Methode fanden diese Autoren außerdem *Pch*, *Pal* und *Clo* in Böden von Muttergärten und zeigten damit erstmalig, dass eine Infektion durch diese Erreger aus natürlich befallenem Boden über die Wurzeln möglich ist.

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS VS. LEBENDNACHWEIS

In vielen der unter Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 genannten Untersuchungen stützen sich die Erregernachweise auf PCR-basierte Verfahren. Auch in dieser Arbeit wurde der Großteil der Nachweise von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* mittels multiplex nested PCR erbracht. Die alleinige Detektion der Pathogen-DNA ist jedoch noch kein Beleg dafür, dass es sich dabei um lebensfähiges und somit infektiöses Inokulum handelt. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Isolationen der Pilze aus Tauchbädern, Vortriebssubstraten, Boden und stichprobenartig aus Holz durchgeführt, die im Anschluss per ITS-Sequenzierung identifiziert wurden (siehe Kapitel 2.2.8.2 und 2.2.8.3). Auf diese Weise konnte *Pch* aus fünf und *Pm* spp. aus einer der insgesamt 324 Unterlagenproben isoliert werden. Am häufigsten war *Clo* in den untersuchten Proben per Kultivierung zu finden (in 22 Unterlagen, zwei Tauchbädern, einem Vortriebssubstrat und zwei Bodenproben) (siehe Tabelle 23). Daneben wurden die „black foot disease“-Erreger *Ilyonectria liriodendri* und *Ilyonectria europaea* sowie der als Esca-Erreger vermutete Pilz *Sarocladium strictum* (Arzanlou et al. 2013) in Unterlagenholz identifiziert, wobei letztere Art zudem in einer Vortriebssubstratprobe vorhanden war. Aus Bodenproben konnte darüber hinaus die bereits oben erwähnte Pilzart *Coniochaeta hoffmannii* isoliert werden (siehe Kapitel 4.2.2.2).

Diese Ergebnisse decken sich dabei größtenteils mit Untersuchungen aus anderen

Ländern. So konnten Lebendnachweise von *Pch*, *Pm* spp., *Clo* und/oder Pathogenen der „black foot disease“ in den vergangenen Jahren u.a. von Halleen et al. (2003), Aroca et al. (2010) und Gramaje et al. (2011) aus diversen Quellen und zu verschiedenen Stadien der Pflanzguterzeugung erbracht werden.

Im Vergleich zwischen PCR- und kultivierungsbasiertem Verfahren wurde deutlich, dass *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* per Isolation weitaus seltener zu finden waren (siehe Kapitel 3.5). So entsprach die Nachweisrate durch Isolation aus insgesamt 324 Unterlagenproben, die mit beiden Verfahren getestet wurden, für *Clo* und *Pch* weniger als ein Zehntel und für *Pm* spp. sogar weniger als ein Fünzigstel der Nachweisrate des multiplex nested PCR-Verfahrens. Zum einen kann dies daran liegen, dass die Erreger z.T. nicht mehr lebensfähig waren und dadurch seltener isoliert werden konnten. Zum anderen handelt es sich bei diesen Pathogenen um sehr langsam wachsende Pilze (Aroca & Raposo 2007; Aroca et al. 2010; Úrbez-Torres et al. 2015), die auf Nährmedium leicht durch andere Pilze überwachsen und somit nicht ohne Weiteres erfasst werden können. Des Weiteren ist zu bemerken, dass eine Identifikation aller im Laufe dieser Arbeit isolierten Pilze nicht zu realisieren war. Dementsprechend sind in Tabelle 23 lediglich diejenigen Isolate aufgeführt, die durch die Sequenzierdaten eindeutig auf Art- bzw. Gattungsebene bestimmt werden konnten. Basierend auf den makromorphologischen Untersuchungen der Isolate (Ergebnisse nicht dargestellt) ist jedoch davon auszugehen, dass insbesondere *Clo* weitaus häufiger als hier dargestellt aus Unterlagenholz isoliert werden konnte.

Alle per Kultivierung erbrachten Nachweise konnten ebenso durch das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte multiplex nested PCR Verfahren erbracht werden. Dieses ist demnach zuverlässig und in Bezug auf Sensitivität, Arbeitsaufwand sowie Zeiterparnis der konventionellen Isolationsmethode sogar deutlich überlegen; es kann jedoch lediglich eine Einschätzung der Befallssituation durch infektiöses Inokulum liefern.

4.4 MÖGLICHE BEKÄMPFUNGSMABNAHMEN IN DER PFLANZGUTERZEUGUNG

Aus den in dieser und anderen Untersuchungen hervorgehenden Erkenntnissen zum Vorkommen von Esca- und „Petri disease“-Erreger in Rebschulen ergeben sich mehrere Bekämpfungsmöglichkeiten, die zu den unterschiedlichen Stadien während der Pflanzguterzeugung angreifen:

4.4.1 Vermehrungsmaterial

Der erste und wohl wichtigste Schritt bei der Produktion von gesundem Pflanzgut ist die Bereitstellung von möglichst pathogenfreiem Vermehrungsmaterial. Nur dadurch kann ein Anfangsbefall des Holzes möglichst gering gehalten werden. Die Kontrolle der Pathogene sollte daher schon in den Muttergärten beginnen. Bereits Fourie & Halleen (2004) betonten die Notwendigkeit eines Schutzes der Schnittwunden, die im Rahmen des Rebschnitts in Muttergärten erzeugt werden. Untersuchungen zur Behandlung von Schnittwunden haben gezeigt, dass die Infektionsrate durch GTD-Erreger, darunter *Pch*, *Pal* und *P. parasiticum*, mit unterschiedlichen Fungiziden eingedämmt werden kann (Halleen et al. 2010; Rolshausen et al. 2010). Jedoch ist der Schutz von Schnittwunden durch Fungizide problematisch, da u.a. die Wirksamkeit von Pathogen zu Pathogen sehr unterschiedlich sein kann, die Anwendung teuer und kompliziert und ein Schutz über längere Zeit sehr schwer zu realisieren ist (Rolshausen et al. 2010).

Es ist bekannt, dass sich die Erreger bereits in Mutterstöcken befinden und sich von dort aus in die Ruten, die anschließend für die Vermehrung verwendet werden, ausbreiten können (Pascoe & Cottral 2000; Fourie & Halleen 2002; Ridgway et al. 2002; Whiteman et al. 2007). Darüber hinaus konnte ein gewisser Befallsgradient entlang der Ruten beobachtet werden. So waren von Fourie & Halleen (2002) *Phaeoacremonium*- und *Botryosphaeria*-Arten bevorzugt in basalen Internodien von Unterlagenruten, also in Stammkopfnähe, nachzuweisen. Whiteman et al. (2007) verzeichneten in Pflanzmaterial, das aus kopfnahen Bereichen der Unterlagenruten herrührte, acht Monate nach Pflanzung einen höheren *Pch*-Befall als in solchem, das aus kopffernen Bereichen stammte. Ein weiterer Kontrollansatz zur Verminderung des Ausgangsnokulums, der jedoch zwangsläufig mit Einkommenseinbußen für die Produzenten verbunden ist, wäre daher, den basalen Bereich der Unterlagenruten nicht für Produktion von Pflanzgut zu verwenden.

4.4.2 Tauchen

Anwendungen von Fungiziden in Tauchbädern vor der Kühlung des Vermehrungsmaterials oder vor der Veredlung konnten in der Vergangenheit den Holzbefall durch *Pch*, *Pm* spp. und andere GTD-Erreger reduzieren (Fourie & Halleen 2004b, 2006; Eskalen et al. 2007; Gramaje et al. 2009; Rego et al. 2009; Viguès et al. 2010)

und stellen somit eine Möglichkeit dar, die Erreger während dieses Arbeitsschrittes zu kontrollieren. Fungizide wie Chinosol oder Beltanol werden in Deutschland von den meisten Rebschulen bereits routinemäßig zur Bekämpfung des Grauschimmels in Tauchbädern eingesetzt. Deren Wirkstoff, 8-Hydroxychinolinsulfat, zeigte unter Laborbedingungen jedoch auch eine gewisse Wirksamkeit gegen die Esca-Erreger *Pch* und *Pal* (Fischer 2009b).

Gute Bekämpfungsergebnisse von „Petri disease“- und „black foot disease“-Erregern konnten auch durch Heißwasserbehandlungen von Unterlagenholz vor der Veredlung erzielt werden (Edwards et al. 2004; Fourie & Halleen 2004b; Eskalen et al. 2007). Dieses Verfahren ist jedoch umstritten, da es bei unsachgemäßer Anwendung zu Stress, Schäden und Verlust des Pflanzmaterials führen kann (Gramaje & Armengol 2011; Bertsch et al. 2013). Außerdem konnte das Tauchen des Vermehrungsmaterials in elektrolysiertem saurem Wasser ein Auskeimen von *Pch*- und *Pal*-Konidien vermindern, ohne einen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Pfropfreben im Freiland zu haben (Di Marco & Osti 2009). Eine biologische Kontrolle durch Pilzarten der Gattung *Trichoderma*, insbesondere durch *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma atroviride*, ist ebenfalls in Tauchbädern möglich. Von diesen Pilzen ist bekannt, dass sie als natürliche Antagonisten in der Lage sein können, Schnittwunden vor dem Eindringen verschiedener GTD-Erreger zu schützen (Hunt et al. 2001; Di Marco et al. 2004; John et al. 2004; Kotze et al. 2011). So konnte bei Fourie & Halleen (2004b) eine einstündige Tauchbehandlung mit *Trichoderma harzianum* das Auftreten von *Pch* und *Pm* spp. in Unterlagen reduzieren.

Untersuchungen von Waite et al. (2013) zeigten, dass Mikroorganismen schon nach kurzer Tauchzeit über das Pflanzenmaterial in das Wasser gelangen und an Oberflächen der Tauchbecken anhaften können. Daher ist es sinnvoll, das Wasser zwischen den Chargen zu wechseln und die Becken regelmäßig zu desinfizieren. Auch die Verwendung von Trinkwasser ist zu empfehlen, da sich in unaufbereitetem Wasser auch andere Mikroorganismen befinden, die nicht als Pathogene der Weinrebe bekannt sind, jedoch durch das Tauchen in das Holzgewebe eindringen und das Triebwachstum beeinträchtigen können (Cole & Waite 2006).

4.4.3 Vortreiben und Einschulen

Während des Vortreibens und vor der Pflanzung im Freiland bieten sich verschiedene Bekämpfungsmöglichkeiten von GTD-Erregern: z.B. ist die Verwendung von Vortreibkisten aus Plastik anstatt aus Holz aus phytosanitärer Sicht empfehlenswert (Becker & Hiller 1977), da sie einfacher zu säubern und zu desinfizieren sind, um Infektionen für nachfolgende Chargen zu verhindern. Eine Behandlung mit *Trichoderma*-Pilzen in Vortreibkisten ist ebenso möglich, z.B. durch das seit 2016 für Notfallsituationen (Indikation Esca) zugelassene Präparat Vintec®, dessen Wirksamkeit auf dem Pilzstamm *Trichoderma atroviride* SC1 beruht (Belchim Crop Protection, Londerzeel, Belgien). Dieses Präparat kann zum Besprühen der Vortreibkisten verwendet werden. Auch eine Anwendung in Tauchbädern vor der Kühlung und/oder vor dem Veredeln (siehe Kapitel 4.4.2) sowie beim Wässern der Unterlagenkomponente vor der Einschulung werden vom Hersteller empfohlen. Aktive Kontrollmöglichkeiten der Erreger während der Freilandphase in den Rebschulen sind sehr begrenzt; daher ist es wichtig, während des Vortreibens auf eine gute Kallusbildung an Veredlungsstelle und Basalbereich der Unterlage zu achten, damit Eintrittspforten für luft- und bodenbürtiges Inokulum aus dem Freiland schon von Beginn an gering gehalten werden.

Zum Zeitpunkt des Einschulens ist es wichtig, dass die anfälligen basalen Enden der Unterlagen geschützt sind (siehe Kapitel 4.1.5), gerade vor dem Hintergrund, dass in dieser Arbeit lebensfähiges Inokulum von *Clo* in Rebschulböden gefunden wurde und ein erhöhter Sporenflug von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* in dieser Zeit zu beobachten war (siehe 4.2.2). Bis zum vollständigen Verschluss der Wundstellen durch Kallusgewebe könnten Fungizidanwendungen vor dem Einschulen daher einen zusätzlichen Schutz bieten. Untersuchungen an Topfreben ergaben hierzu, dass durch die Anwendung verschiedener Fungizide vor der Pflanzung das Vorkommen von *Pch* und „black foot disease“-Erregern reduziert werden konnte (Rego et al. 2006; Nascimento et al. 2007; Alaniz et al. 2011). Entsprechendes ist somit auch für Pflanzungen im Freiland denkbar.

Um die natürliche Widerstandsfähigkeit der Pflanzen so gut wie möglich zu stärken, ist darauf zu achten, dass diese vor und während dem Einschulen möglichst wenig Stress durch zu lange Kühlung oder ungeeignete Pflanzbedingungen erfahren (siehe Kapitel 4.1.4). Auch eine angemessene Bewässerung der Pfropfreben sollte gewährleistet werden, da die Pflanzen durch Wasserstress anfälliger gegenüber ei-

nem Pathogenbefall sind, wie es bereits für den Erreger *Pch* beobachtet werden konnte (Ferreira et al. 1999; Fischer & Kassemeyer 2012).

4.4.4 Freilandphase und Ausschulen

Während der Freilandphase sollte darauf geachtet werden, dass die Bearbeitungsgereäte während der Laubarbeiten und Pflanzenschutzmaßnahmen korrekt eingestellt sind, um Verletzungen an verholzten Pflanzenteilen zu vermeiden. Darüber hinaus sollten, insbesondere in Flächen mit einer weinbaulichen Vorgeschichte oder bei denen ein Vorkommen von GTD-Erregern im Boden bereits bekannt ist, Maßnahmen zur Minimierung der bodenbürtigen Pathogene ergriffen werden. Arbeiten zur Biofumigation durch die Bodeneinarbeitung von Senf, entweder als Pflanze oder Senfmehl, konnten in den letzten Jahren beispielsweise vielversprechende Resultate zur Bekämpfung von „black foot disease“-Erregern erzielen (Bleach et al. 2010; Barbour et al. 2014; Whitelaw-Weckert et al. 2014). Die Kontrolle weiterer GTD-Erreger, wie z.B. *Pch*, *Pm* spp. oder *Clo*, mit diesem Verfahren ist somit durchaus vorstellbar.

Nach dem Ausschulen besteht zudem die Möglichkeit eine abschließende Heißwasserbehandlung des Pflanzguts durchzuführen, um eine weitere Reduktion von „Petri disease“- und „black foot disease“-Erregern zu erreichen. Die Wirksamkeit einer solchen Behandlung haben Untersuchungen in Südafrika, Spanien und Frankreich bereits bestätigt (Fourie & Halleen 2004b; Halleen et al. 2007a; Gramaje et al. 2010; Viguès et al. 2010).

4.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Die visuellen Bonituren des Rebholzes aus den drei Rebschulen ergaben, dass in allen Betrieben Esca-typische Holzsymptome in Unterlagen- und Edelreismaterial auftraten. Das Auftreten der Symptome nahm im Laufe der Pflanzguterzeugung in beiden Pfropfkomponenten stark zu. Auch im verkaufsfertigen Pflanzgut konnten die Unterlagen- und Edelreisbereiche zu einem hohen Prozentsatz symptomatisch sein. Der hohe Anteil sichtbar befallener Unterlagen war durch die per nested PCR erbrachten geringen Nachweisraten des Esca-Erregers *Pch* zunächst nicht zu erklären. Erst durch die Entwicklung eines multiplex nested PCR-Verfahrens zur Identifikation weiterer Esca- bzw. „Petri disease“-Erreger, nämlich *Pm* spp. und *Clo*, ließen sich Symptomatik und Erregernachweis weitaus besser miteinander in Einklang bringen.

Beruhend auf den PCR-basierten Nachweisen von *Pch*, *Pm* spp. und *Clo* in Vermehrungsmaterial, Tauchbädern, Vortriebssubstraten und Sporenfallen ist die Verbreitung dieser Erreger durch Rebholz aus Muttergärten und ein Infektionsdruck während der Pflanzguterzeugung sehr wahrscheinlich. Das Vorhandensein offener Schnittwunden während der innerbetrieblichen Arbeitsschritte und bei der Einschulung sowie der Nachweis von lebensfähigem Inokulum einzelner GTD-Erreger in Unterlagen, Tauchbad- und Vortriebssubstratproben sowie im Rebschuldboden unterstreichen ein solches Infektionsrisiko.

Unterschiede zwischen den Rebschulen ließen sich nicht eindeutig auf die jeweilige Erregersituation in den Tauchbädern und Vortriebssubstraten zurückführen. Um einen unmittelbaren Einfluss dieser Infektionsquellen auf das Vorkommen der Pathogene im Rebholz zu überprüfen, müssten für zukünftige Untersuchungen Holz-, Tauchbad- und Vortriebssubstratproben sowohl vor als auch nach diesen Bearbeitungsschritten getestet werden; auch wären gezielte Versuche unter kontrollierten Bedingungen mit unterschiedlichen Infektions- und Kontrollvarianten sinnvoll. In diesem Zusammenhang gilt es darüber hinaus weitere Infektionswege, wie z.B. über Schneidewerkzeuge und Veredlungsmaschinen, die in dieser Arbeit nicht eingehend untersucht werden konnten, zu identifizieren und nach Möglichkeit zu quantifizieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bilden eine wichtige Grundlage für eine gezielte Kontrolle von Esca- und anderen GTD-Erregern während der Pflanzguterzeugung. Mithilfe der hier entwickelten Verfahren könnten bereits bestehende bzw. neu zu erarbeitende Bekämpfungsmaßnahmen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Praxistauglichkeit in den Pflanzguterzeugungsbetrieben überprüft werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abreo E., Martínez S., Bettucci L. & Lupo S. (2011) *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea* 50S, 77–85.
- Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jiménez J. & Armengol J. (2013a) Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. *Plant and Soil* 364, 5–13.
- Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jiménez J. & Armengol J. (2013b) Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 137, 103–112.
- Agustí-Brisach C., Gramaje D., León M., García-Jiménez J. & Armengol J. (2011) Evaluation of Vineyard Weeds as Potential Hosts of Black-Foot and Petri Disease Pathogens. *Plant Disease* 95, 803–810.
- Alaniz S., Abad-Campos P., García-Jiménez J. & Armengol J. (2011) Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* in vitro, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 30, 489–494.
- Armengol J., Vicent A., Torné L., García-Figueres F. & García-Jiménez J. (2001) Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 325–329.
- Aroca Á., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez J. & Raposo R. (2010) Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126, 165–174.
- Aroca A. & Raposo R. (2007) PCR-Based Strategy To Detect and Identify Species of *Phaeoacremonium* Causing Grapevine Diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2911–2918.
- Arroyo-García R.A. & Revilla E. (2013) The Current Status of Wild Grapevine Populations (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) in the Mediterranean Basin. In *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, Hg. B. Sladonja. InTech, Rijeka, Kroatien, 51–72.
- Arroyo-García R., Ruiz-García L., Bolling L., Ocete R., López M.A., Arnold C., Ergul A., Söylemezoğlu G., Uzun H.I., Cabello F., Ibáñez J., Aradhya M.K., Atanassov A., Atanassov I., Balint S., Cenis J.L., Costantini L., Gorislavets S., Grando M.S., Klein B.Y., McGovern P.E., Merdinoglu D., Pejic I., Pelsy F., Primikirios N., Risovannaya V., Roubelakis-Angelakis K.A., Snoussi H., Sotiri P., Tamhankar S., This P., Troshin L., Malpica J.M., Lefort F. & Martinez-Zapater J.M. (2006) Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* 15, 3707–3714.

- Arzanlou M., Moshari S., Salari M. & Badali H. (2013) Molecular characterisation and pathogenicity of *Phaeoacremonium* spp. associated with esca disease of grapevine in Northern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46, 375–388.
- Barbour J.E., Ridgway H.J. & Jones E.E. (2014) Influence of mustard biofumigation on growth, conidial germination and propagule recovery of *Ilyonectria macrodidyma*-complex species. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 582 (abstract).
- Becker H. & Hiller M.H. (1977) Hygiene in modern bench grafting. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 113–118.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Bertelli E., Mugnai L. & Surico G. (1998) Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 37, 79–82.
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C. & Fontaine F. (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62, 243–265.
- Blaich R. (2000) Schäden und Krankheiten im mitteleuropäischen Weinbau. Biotische Schäden. URL: https://www.uni-hohenheim.de/lehre370/weinbau/weinbau/wbm_krkh.htm. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Bleach C.M., Jones E.E. & Jaspers M. V. (2010) Biofumigation using brassicaceous plant products to control *Cylindrocarpon* black foot disease in New Zealand soils. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 128 (abstract).
- Borgo M., Pegoraro G. & Sartori E. (2016) Susceptibility of grape varieties to esca disease. *BIO Web of Conferences* 7, e01041.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz in Zusammenarbeit mit der juris GmbH (2012) Verordnung zur Bekämpfung der Reblaus (Reblausverordnung). URL: http://pflanzengesundheit.jki.bund.de/dokumente/upload/b39c4_vo-reblaus-kons-juris.pdf. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Calzarano F., Amalfitano C., Seghetti L. & Cozzolino V. (2009) Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 20–31.
- Calzarano F., Amalfitano C., Seghetti L. & D'Agostino V. (2007) Foliar treatment of esca-proper affected vines with nutrients and bioactivators. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 207–217.
- Carter M. V. (1988) Eutypa Dieback. In *Compendium of Grape Diseases*, Hg. R.C. Pearson & A.C. Goheen. APS Press, St. Paul, USA, 32–34.

- Casieri L., Hofstetter V., Viret O. & Gindro K. (2009) Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 73–83.
- Chiarappa L. (1959) Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology* 49, 510–519.
- Cole M. & Waite H. (2006) An investigation of the role of endogenous and exogenous bacteria in grapevine propagation and development. Report MU01/01. *Wine Research and Development Corporation*. URL: <https://www.wineaustralia.com/getmedia/d98ace61-3b64-456d-8844-97aac80190eb/MU-01-0-1-final-report>. Zugriffsdatum: 30. Dezember 2017.
- Cortesi P., Fischer M. & Milgroom M.G. (2000) Identification and Spread of *Fomitiporia punctata* Associated with Wood Decay of Grapevine Showing Symptoms of Esca. *Phytopathology* 90, 967–972.
- Crous P.W., Gams W., Wingfield M.J. & van Wyk P.S. (1996) *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia* 88, 786–796.
- Cucuzza J.D. (1982) *Phomopsis* Cane and Leaf Spot Disease of Grapevine: Effects of Chemical Treatments on Inoculum Level, Disease Severity, and Yield. *Plant Disease* 66, 794–797.
- Di Marco S. & Osti F. (2009) Activity of electrolyzed acid water for the control of *Phaeomoniella chlamydospora* in the nursery. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 183 (abstract).
- Di Marco S., Osti F. & Cesari A. (2004) Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 108–115.
- Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Mosel (o.J.) Wurzelechte Reben. URL: http://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/se_quick/F978258C3F1E79EEC125732B003EA625?OpenDocument. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Dubos B. & Larignon P. (1988) Esca and Black Measles. In *Compendium of Grape Diseases*, Hg. R.C. Pearson & A.C. Goheen. APS Press, St. Paul, USA, 34–35.
- Edwards J., Constable F., Wiechel T. & Salib S. (2007) Comparison of the molecular tests - single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR® Green and TaqMan®) - for detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 58–72.
- Edwards J. & Pascoe I.G. (2004) Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* 33, 273–279.
- Edwards J., Pascoe I.G., Salib S. & Laukart N. (2004) Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 158–159 (abstract).

- Erincik O., Madden L. V., Ferree D.C. & Ellis M.A. (2001) Effect of Growth Stage on Susceptibility of Grape Berry and Rachis Tissues to Infection by *Phomopsis viticola*. *Plant Disease* 85, 517–520.
- Eskalen A. & Gubler W.D. (2001) Association of spores of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 429–432.
- Eskalen A., Gubler W.D. & Khan A. (2001a) Rootstock susceptibility to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp.. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 433–438.
- Eskalen A., Rooney-Latham S. & Gubler W.D. (2007) Identifying effective management strategies for esca and Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 125–126 (abstract).
- Eskalen A., Rooney S.N. & Gubler W.D. (2001b) Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. from soil and host tissue with nested-PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 480 (abstract).
- Eskalen A., Rooney S.N. & Gubler W.D. (2005) Occurrence of *Togninia fraxinopennsylvanica* on esca-diseased grapevines (*Vitis vinifera*) and declining ash trees (*Fraxinus latifolia*) in California. *Plant Disease* 89, 528.
- Eurostat (2007) The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-2003, Hg. P. Nadin. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.
- Feliciano A.J., Eskalen A. & Gubler W.D. (2004) Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 66–69.
- Ferreira J.H.S., van Wyk P.S. & Calitz F.J. (1999) Slow Dieback of Grapevine in South Africa: Stress-Related Predisposition of Young Vines for Infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20, 43–46.
- Ferreira J.H.S., van Wyk P.S. & Venter E. (1994) Slow dieback of grapevine: association of *Phialophora parasitica* with slow dieback of grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 15, 9–11.
- Fischer M. (2002) A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1, 315–324.
- Fischer M. (2003) Esca jetzt auch in Junganlagen?. *Der Badische Winzer* 11, 26–27.
- Fischer M. (2006) Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 30–42.

- Fischer M. (2009a) *Fomitiporia mediterranea* as a white rotter in esca-diseased grapevine: spores are produced in relation to temperature and humidity and are able to colonize young wood. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 174 (abstract).
- Fischer M. (2009b) Mit Chinopflanz auch Esca-Erreger kontrollieren?. *Der Deutsche Weinbau* 4, 48–51.
- Fischer M. (2012) Esca-Syndrom. In *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe - 2., aktualisierte und erweiterte Auflage*, Hg. H.D. Mohr. Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 144–148.
- Fischer M. & González-García V. (2015) An annotated checklist of European basidiomycetes related to white rot of grapevine (*Vitis vinifera*). *Phytopathologia Mediterranea* 54, 281–298.
- Fischer M. & Kassemeyer H.-H. (2002) Esca-Krankheit - Fragen und erste Antworten. *Der Badische Winzer* 4, 25–29.
- Fischer M. & Kassemeyer H.-H. (2003) Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* 42, 109–116.
- Fischer M. & Kassemeyer H.-H. (2010) Untersuchungen zu den Übertragungswegen der Esca-Erkrankung im Weinbau und Erarbeitung von Verfahren zur Erzeugung gesunden Rebenpflanzguts. Abschlussbericht Forschungsvorhaben 06HS022. URL: https://service.ble.de/ptdb/index2.php?detail_id=11025&site_key=141&stichw=06HS022&zeilenzahl_zaeher=1#newContent. Zugriffsdatum: 30. Dezember 2017.
- Fischer M. & Kassemeyer H.-H. (2012) Water regime and its possible impact on expression of Esca symptoms in *Vitis vinifera*: growth characters and symptoms in the greenhouse after artificial infection with *Phaeoconiella chlamydospora*. *Vitis* 51, 129–135.
- Fischer M., Schneider P., Kraus C., Molnar M., Dubois C., D'Aguiar D. & Haag N. (2016) Grapevine trunk disease in German viticulture: occurrence of lesser known fungi and first report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. fraxinopennsylvanicum*. *Vitis* 55, 145–156.
- Fontaine F., Gramaje D., Armengol J., Smart R., Nagy Z.A., Borgo M., Rego C. & Corio-Costet M.-F. (2016) Grapevine Trunk Diseases. A review. *International Organisation of Vine and Wine (OIV)*. URL: <http://www.oiv.int/public/medias/4650/trunk-diseases-oiv-2016.pdf>. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Fourie P.H. & Halleen F. (2001) Diagnosis of fungal diseases and their involvement in dieback disease of young vines. *Wynboer* 149, 19–23.
- Fourie P.H. & Halleen F. (2002) Investigation on the occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology* 31, 425–426.

- Fourie P.H. & Halleen F. (2004a) Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313–315.
- Fourie P.H. & Halleen F. (2004b) Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. *Plant Disease* 88, 1241–1245.
- Fourie P.H. & Halleen F. (2006) Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116, 255–265.
- Fourie P.H., Halleen F., Van der Vyver J. & Schreuder W. (2001) Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 473–478.
- Fourie P.H., Halleen F. & Volkmann A.S. (2000) Fungi associated with grape wood, root and trunk diseases: A summary of the 1999–2000 results from the diagnostic service at Nietvoorbij. In *Proceedings of the 2nd International Viticulture and Enology Congress, November 8-10, 2000*, Kapstadt, Südafrika, 12 (abstract).
- Fussler L., Kobes N., Bertrand F., Maumy M., Grosman J. & Savary S. (2008) A Characterization of Grapevine Trunk Diseases in France from Data Generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology* 98, 571–579.
- Galet P. (1998) Grape Varieties and Rootstock Varieties. Oenoplurimédia, Chaintré, Frankreich.
- Giménez-Jaime A., Aroca A., Raposo R., García-Jiménez J. & Armengol J. (2006) Occurrence of Fungal Pathogens Associated with Grapevine Nurseries and the Decline of Young Vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154, 598–602.
- Gramaje D. & Armengol J. (2011) Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Disease* 95, 1040–1055.
- Gramaje D., Aroca Á., Raposo R., García-Jiménez J. & Armengol J. (2009) Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 28, 1091–1097.
- Gramaje D., García-Jiménez J. & Armengol J. (2010) Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 512–520.
- Gramaje D., Mostert L. & Armengol J. (2011) Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 50S, 112–126.
- Gramaje D., Mostert L., Groenewald J.Z. & Crous P.W. (2015) *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology* 119, 759–783.

- Graniti A., Surico G. & Mugnai L. (1999) Considerazioni sul mal dell'esca e sulle venature brune del legno della vite. *Informatore Fitopatologico* 49, 6–12.
- Graniti A., Surico G. & Mugnai L. (2000) Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases?. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 16–20.
- Gubler W.D., Baumgartner K., Browne G.T., Eskalen A., Rooney Latham S., Petit E. & Bayramian L.A. (2004) Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33, 157–165.
- Hale M.D. & Eaton R.A. (1985) The ultrastructure of soft rot fungi. I. Fine hyphae in wood cell walls. *Mycologia* 77, 447–463.
- Halleen F., Crous P.W. & Petrini O. (2003) Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47–52.
- Halleen F., Fourie P.H. & Crous P.W. (2006) A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 55–67.
- Halleen F., Fourie P.H. & Crous P.W. (2007a) Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637–645.
- Halleen F., Fourie P.H. & Lombard P.J. (2010) Protection of Grapevine Pruning Wounds against *Eutypa lata* by Biological and Chemical Methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 125–132.
- Halleen F., Mostert L. & Crous P.W. (2007b) Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36, 277–285.
- Hewitt W.B. (1957) Some manifestations of black measles of grapevines. *Phytopathology* 47, 16 (abstract).
- Hewitt W.B. & Pearson R.C. (1988) *Phomopsis* Cane and Leaf spot. In *Compendium of Grape Diseases*, Hg. R.C. Pearson & A.C. Goheen. APS Press, St. Paul, USA, 17–18.
- Hochschule Geisenheim (o.J.) Kurzbeschreibung der in Europa verwendeten Unterlagssorten. URL: http://www.hs-geisenheim.de/fileadmin/Dateien_Hochschule_Geisenheim/Forschung/Angewandte_Biologie/Rebenzuechtung/Unterlagen/Kurzbeschreibung.pdf. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Hofstetter V., Buyck B., Croll D., Viret O., Couloux A. & Gindro K. (2012) What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity* 54, 51–67.
- Hunt J.S., Gale D.S.J. & Harvey I.C. (2001) Evaluation of *Trichoderma* as bio-control for protection against wood-invading fungi implicated in grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 485–486.
- International Organisation of Vine and Wine (2015) Grapevine trunk diseases. A real problem. URL: <http://www.oiv.int/public/medias/188/grapevine-trunk-diseases-oiv-2015.pdf>. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.

- International Organisation of Vine and Wine (2017) 2017 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. URL: <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- John S., Scott E.S., Wicks T.J. & Hunt J.S. (2004) Interactions between *Eutypa lata* and *Trichoderma harzianum*. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 95–104.
- Kassemeyer H.-H. (1998) Die Esca-Krankheit als eine häufige Ursache von Absterbeerscheinungen. *Der Badische Winzer* 4, 27–28.
- Kassemeyer H.-H., Buchholz G. & Fischer M. (2002) Esca - Pilzkrankheit gefährdet den Weinanbau. *Biospektrum* 8, 365–367.
- Kast W.K. (2012) Schwarzfleckenkrankheit (*Phomopsis*). In *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe - 2., aktualisierte und erweiterte Auflage*, Hg. H.D. Mohr. Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 127–130.
- Keller M. (2015) The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology - 2. Auflage. Elsevier Inc., Amsterdam, Niederlande, 1–57.
- Kotze C., Van Niekerk J., Mostert L., Halleen F. & Fourie P. (2011) Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea* 50S, 247–263.
- Kummuang N., Diehl S.V., Smith B.J. & Graves Jr. C.H. (1996a) Muscadine Grape Berry Rot Diseases in Mississippi: Disease Epidemiology and Crop Reduction. *Plant Disease* 80, 244–247.
- Kummuang N., Smith B.J., Diehl S. V. & Graves Jr. C.H. (1996b) Muscadine Grape Berry Rot Diseases in Mississippi: Disease Identification and Incidence. *Plant Disease* 80, 238–243.
- Larignon P. (1999) Black foot disease in France. In *Black Goo Occurrence and Symptoms of Grapevine Declines - IAS/ICGTD Proceedings 1998*, Hg. L. Morton. International Ampelography Society, Fort Valley, USA, 89–90.
- Larignon P. & Dubos B. (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147–157.
- Larignon P. & Dubos B. (2000) Preliminary studies on the Biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 184–189.
- Larignon P. & Dubos B. (2001) The villainy of Black Dead Arm. *Wines and Vines* 82, 86–89.
- Lecomte P., Darrietort G., Laveau C., Blancard G., Louvet G., Goutouly J.-P., Rey P. & Guérin-Dubrana L. (2011) Impact of biotic and abiotic factors on the development of Esca decline disease. In *Integrated protection and production in viticulture - IOBC/ wprs Bulletin, November 1-4, 2009*, Staufen im Breisgau, 171–180.

- Lehozcky (1974) Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9, 319–327.
- Lombard L., van der Merwe N.A., Groenewald J.Z. & Crous P.W. (2014) Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 515–532.
- Makatini G., Mutawila C., Halleen F. & Mostert L. (2014) Grapevine sucker wounds as infection ports for trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 573 (abstract).
- Marchi G. (2001) Susceptibility to esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 40, 27–36.
- Marchi G., Peduto F., Mugnai L., Di Marco S., Calzarano F. & Surico G. (2006) Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 117–126.
- Moller W.J. & Kasimatis A.N. (1981) Further Evidence that *Eutypa armeniacae* – not *Phomopsis viticola* – Incites Dead Arm Symptoms on Grape. *Plant Disease* 65, 429–431.
- Moller W.J., Kasimatis A.N. & Kissler J.J. (1974) A dying arm disease of grape in California. *Plant Disease Reporter* 58, 869–871.
- Morton L. (1995) Mystery diseases hit young vines. *Wines and Vines* 76, 46–47.
- Mostert L., Halleen F., Fourie P. & Crous P.W. (2006) A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 12–29.
- Mugnai L., Graniti A. & Surico G. (1999) Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Disease* 83, 404–418.
- Murolo S. & Romanazzi G. (2014) Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on esca disease. *Australasian Plant Pathology* 43, 215–221.
- Nascimento T., Rego C. & Oliveira H. (2007) Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 218–224.
- Navarrete F., Abreo E., Martínez S., Bettucci L. & Lupo S. (2011) Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 50S, 166–175.
- Pascoe I. & Cottral E. (2000) Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 68–75.

- Pearson R.C. & Burr T.J. (1981) eutypa dieback. Disease Identification Sheet No.1. *New York State Agricultural Experiment Station*. URL: <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/43093/eutypa-dieback-FS-NYSIPM.pdf?sequence=1>. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Petri L. (1912) Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. *Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane* 45, 501–547.
- Phillips A.J.L. (1998) *Botryosphaeria dothidea* and Other Fungi Associated with Excoriose and Dieback of Grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327–332.
- Phillips A.J.L. (2002) *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3–18.
- Pollastro S., Habib W., Pichierri A., Masiello N. & Faretra F. (2009) Potential sources of *Phaeoconiella chlamydospora* inoculum in grapevine nurseries in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 174 (abstract).
- Porten M. & Hoffmann C. (o.J.) Zunahme von Reblausschäden an der Mosel. URL: http://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/se_quick/89B9375441D32DBDC12570340040ABBA?OpenDocument. Zugriffsdatum: 20. Dezember 2017.
- Pouzoulet J., Pivovarov A.L., Santiago L.S. & Rolshausen P.E. (2014) Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science* 5, e253.
- Pscheidt J.W. & Pearson R.C. (1989) Time of Infection and Control of *Phomopsis* Fruit Rot of Grape. *Plant Disease* 73, 829–833.
- Quaglia M., Covarelli L. & Zizzerini A. (2009) Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 84–91.
- Ravaz L. (1898) Sur le folletage. *Revue de Viticulture* 10, 184–186.
- Redondo C., Tello M.L., Avila A. & Mateo-Sagasta E. (2001) Spatial distribution of symptomatic grapevines with esca disease in the Madrid region (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 439–442.
- Rego C., Farropas L., Nascimento T., Cabral A. & Oliveira H. (2006) Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 93–100.
- Rego C., Nascimento T., Cabral A., Silva M.J. & Oliveira H. (2009) Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 128–135.
- Rego C., Oliveira H., Carvalho A. & Phillips A. (2000) Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 76–79.

- Reisenzein H., Berger N. & Nieder G. (2000) Esca in Austria. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 26–34.
- Retief E., McLeod A. & Fourie P.H. (2006) Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115, 331–339.
- Ridgway H.J., Sleight B.E. & Stewart A. (2002) Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology* 31, 267–271.
- Robotic V. & Bosancic R. (2007) Notes on the relationship of manifest Esca disease to vineyard slope. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 124 (abstract).
- Rolshausen P.E., Úrbez-Torres J.R., Rooney-Latham S., Eskalen A., Smith R.J. & Gubler W.D. (2010) Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 113–119.
- Rooney S.N., Eskalen A. & Gubler W.D. (2001) Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevines tissue. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 351–356.
- Rumbos I. & Rumbou A. (2001) Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 330–335.
- Scheck H.J., Vasquez S.J. & Gubler W.D. (1998a) First Report of Black-Foot Disease, Caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of Grapevine in California. *Plant Disease* 82, 448.
- Scheck H.J., Vasquez S.J., Gubler W.D. & Fogle D. (1998b) First Report of Three *Phaeoacremonium* spp. Causing Young Grapevine Decline in California. *Plant Disease* 82, 590.
- Sidoti A., Buonocore E., Serges T. & Mugnai L. (2000) Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 87–91.
- Sosnowski M. & Wicks T. (2010) Eutypa dieback. Factsheet July 2010. *Grape and Wine Research and Development Corporation (GWRDC)*. URL: <http://www.mvwi.com.au/items/492/2010-07-FS-Eutypa-Dieback.pdf>. Zugriffsdatum: 30. Dezember 2017.
- Sparapano L., Bruno G. & Graniti A. (2001) Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 376–386.
- Stamp J.A. (2001) The contribution of imperfections in nursery stock to the decline of young vines in California. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 369–375.
- Surico G. (2001) Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 487–490.

- Surico G., Marchi G., Braccini P. & Mugnai L. (2000a) Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 190–205.
- Surico G., Marchi G., Ferrandino F.J., Braccini P. & Mugnai L. (2000b) Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 211–224.
- Surico G., Mugnai L. & Marchi G. (2006) Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 68–86.
- This P., Lacombe T. & Thomas M.R. (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22, 511–519.
- Tillett D. & Neilan B.A. (2000) Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology* 36, 251–258.
- Travadon R., Lawrence D.P., Rooney-Latham S., Gubler W.D., Wilcox W.F., Rolshausen P.E. & Baumgartner K. (2015) *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology* 119, 53–66.
- Úrbez-Torres J.R. (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50S, 5–45.
- Úrbez-Torres J.R., Adams P., Kamas J. & Gubler W.D. (2009) Identification, Incidence, and Pathogenicity of Fungal Species Associated with Grapevine Dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 497–507.
- Úrbez-Torres J.R., Haag P., Bowen P., Lowery T. & O’Gorman D.T. (2015) Development of a DNA Macroarray for the Detection and Identification of Fungal Pathogens Causing Decline of Young Grapevines. *Phytopathology* 105, 1373–1388.
- Úrbez-Torres J.R., Haag P., Bowen P. & O’Gorman D.T. (2014) Grapevine Trunk Diseases in British Columbia: Incidence and Characterization of the Fungal Pathogens Associated with Esca and Petri Diseases of Grapevine. *Plant Disease* 98, 469–482.
- Úrbez-Torres J.R., Leavitt G.M., Voegel T.M. & Gubler W.D. (2006) Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490–1503.
- Úrbez-Torres J.R., Peduto F., Smith R.J. & Gubler W.D. (2013) Phomopsis Dieback: A Grapevine Trunk Disease Caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease* 97, 1571–1579.
- Úrbez-Torres J.R., Peduto F., Striegler R.K., Urrea-Romero K.E., Rupe J.C., Cartwright R.D. & Gubler W.D. (2012) Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* 52, 169–189.
- van Niekerk J.M., Fourie P.H., Halleen F. & Crous P.W. (2006) *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 43–54.

- Viala P. (1926) Recherches sur les maladies de la vigne. Esca. *Annales des Épiphyties* 12, 5–108.
- Viguès V., Yobregat O., Barthélémy B., Dias F., Coarer M., Girardon K., Berud F., Muller M. & Larignon P. (2010) Wood decay diseases: Tests of disinfection methods in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 130 (abstract).
- Viguès V., Yobregat O., Barthélémy B., Dias F., Coarer M. & Larignon P. (2009) Fungi associated with wood decay diseases: Identification of the steps involving risk in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 177–178 (abstract).
- Wagschal I., Abou-Mansour E., Petit A.-N., Clément C. & Fontaine F. (2008) Wood diseases of grapevine: A review on eutypa dieback and esca. In *Plant-Microbe Interactions*, Hg. E. Ait Barka & C. Clément. Research Signpost, Kerala, India, 367–391.
- Waite H., Gramaje D., Whitelaw-Weckert M., Torley P. & Hardie W.J. (2013) Soaking grapevine cuttings in water: a potential source of cross contamination by micro-organisms. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 359–368.
- Waite H. & Morton L. (2007) Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 5–17.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Hg. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White. Academic Press, Inc., San Diego, USA, 315–322.
- Whitelaw-Weckert M., Rahman L., Cappello J. & Bartrop K. (2014) Preliminary findings on the grapevine yield response to Brassica biofumigation soil treatments. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 587 (abstract).
- Whiteman S.A., Jaspers M. V., Stewart A. & Ridgeway H.J. (2004a) Identification of potential sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in the grapevine propagation process. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 152–153 (abstract).
- Whiteman S.A., Jaspers M. V., Stewart A. & Ridgeway H.J. (2004b) *Phaeomoniella chlamydospora* detection in the grapevine propagation process by species-specific PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 156 (abstract).
- Whiteman S.A., Stewart A., Ridgeway H.J. & Jaspers M. V (2007) Infection of rootstock mother-vines by *Phaeomoniella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36, 198–203.
- Zanzotto A., Gardiman M. & Lovat L. (2008) Effect of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on *in vitro* grapevine plants. *Scientia Horticulturae* 116, 404–408.

6 ANHANG

Tabelle 24: Detailübersicht über die Proben der Rebschulen in den Jahren 2014-2016

Rebschule 1					
2014					
Monat	Art der Probe		Probe	n	
Jan	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB'	Herkunft: Italien	11
		2	'125AA'	Herkunft: Frankreich	11
		3	'SO4' A	Herkunft: Italien	11
		4	'SO4' B	Herkunft: Italien	13
	Tauchbäder (2x 50 ml)	1		H ₂ O-Bad für Unterlagen	1
		2		H ₂ O-Bad für Edelreiser	1
		3		Chinosol-Bad für Unterlagen	1
		4		Chinosol-Bad für Edelreiser	1
Apr/Mai	Pfropfreben	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	2	
		2	'125AA' / 'Merlot'	2	
		3	'SO4' A / 'Riesling'	2	
		4	'SO4' B / 'Spätburgunder'	2	
	Vortriebssubstrate Torf (50 ml)	1		'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	1
		2		'125AA' / 'Merlot'	1
		3		'SO4' A / 'Riesling'	1
		4		'SO4' B / 'Spätburgunder'	1
Jun	Bodenproben Mischprobe innerhalb der Parzellen (50 ml)	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	1	
		2	'5BB' / 'Palatina'	1	
		3	"X" (anonymisiert)	1	
		4	Hochstammreben	1	
Aug	Pfropfreben	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	10	
		2	'125AA' / 'Merlot'	10	
		3	'SO4' A / 'Riesling'	10	
		4	'SO4' B / 'Spätburgunder'	11	
Okt	Bodenproben Mischprobe innerhalb der Parzellen (50 ml)	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	1	
		2	'125AA' / 'Merlot'	1	
		3	'SO4' A / 'Riesling'	1	
		4	'SO4' B / 'Spätburgunder'	1	
	Pfropfreben	1		'5BB' / 'VB Cal. 6-04'	11
		2		'125AA'/'Merlot'	10
		3		'SO4' A / 'Riesling'	10
		4		'SO4' B / 'Spätburgunder'	10

Rebschule 1

2015

Monat	Art der Probe		Probe	n	
Jan/Feb	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB'	Herkunft: Frankreich	10
		2	'125AA'	Herkunft: Frankreich	10
		3	'SO4'	Herkunft: Italien	10
		4	'Binova'	Herkunft: Frankreich	10
	Tauchbäder (4x 50 ml)	1		H ₂ O-Bad für Unterlagen	2
		2		H ₂ O-Bad für Edelreiser	1
		3		Beltanol-Bad für Unterlagen	2
		4		Beltanol-Bad für Edelreiser	1
Apr/Mai	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Dornfelder'		10
		2	'125AA' / 'Ruländer'		10
		3	'SO4' / 'Ruländer'		10
		4	'Binova' / 'Prior'		10
	verkaufsfertiges Pflanzgut	1	'5BB' / 'VB Cal. 6-04'		10
		2	'SO4' A / 'Riesling'		10
	Vortriebssubstrate Torf (50 ml)	1	'5BB' / 'Dornfelder'		1
		2	'125AA' / 'Ruländer'		1
3		'SO4' / 'Ruländer'		1	
4		'Binova' / 'Prior'		1	
Aug	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Dornfelder'		1
		2	'125AA' / 'Ruländer'		1
		3	'SO4' / 'Ruländer'		1
		4	'Binova' / 'Prior'		1
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Dornfelder'		10
		2	'125AA' / 'Ruländer'		10
		3	'SO4' / 'Ruländer'		10
		4	'Binova' / 'Prior'		10
Okt	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Dornfelder'		1
		2	'125AA' / 'Ruländer'		1
		3	'SO4' / 'Ruländer'		1
		4	'Binova' / 'Prior'		1
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Dornfelder'		10
		2	'125AA' / 'Ruländer'		10
		3	'SO4' / 'Ruländer'		10
		4	'Binova' / 'Prior'		10

Rebschule 1					
2016					
Monat	Art der Probe		Probe	n	
Feb	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB'	Herkunft: Italien	10
		2	'125AA'	Herkunft: Italien	10
		3	'SO4'	Herkunft: Italien	10
		4	'Binova'	Herkunft: Frankreich	10
	Tauchbäder (4x 50 ml)	1		H ₂ O-Bad für Unterlagen	2
		2		H ₂ O-Bad für Edelreiser	1
		3		Beltanol-Bad für Unterlagen	2
		4		Beltanol-Bad für Edelreiser	1
Apr	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	10	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	10	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	10	
	verkaufsfertiges Pflanzgut	1	'5BB' / 'Dornfelder'	10	
		2	'125AA' / 'Ruländer'	10	
		3	'SO4' / 'Ruländer'	10	
		4	'Binova' / 'Prior'	10	
	Vortriebssubstrate Torf (50 ml)	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	1	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	1	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	1	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	1	
Sep	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	1	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	1	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	1	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	1	
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	10	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	10	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	10	
Okt	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	1	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	1	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	1	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	1	
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Birstaler Muskat'	10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'	10	
		3	'SO4' / 'Chardonnay'	10	
		4	'Binova' / 'Chardonnay'	10	

Rebschule 2

2014

Monat	Art der Probe		Probe	n
Jan	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB' A Herkunft: eigene Produktion	5
		2	'5BB' B Herkunft: Italien	5
		3	'Binova' A Herkunft: eigene Produktion	5
		4	'Binova' B Herkunft: Italien	5
	Tauchbäder (2x 50 ml)	1	H ₂ O ₂ -Bad für Unterlagen und Edelreiser	1
Apr	Pfropfreben	1	'5BB' A / 'Lemberger'	2
		2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	2
		3	'Binova' A / 'Riesling'	2
		4	'Binova' B / 'Lemberger'	2
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'5BB' A / 'Lemberger'	1
		2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	1
		3	'Binova' A / 'Riesling'	1
		4	'Binova' B / 'Lemberger'	1
Aug	Bodenproben Mischprobe innerhalb der Parzellen (50 ml)	1	'5BB' A / 'Lemberger'	1
		2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	1
		3	'Binova' A / 'Riesling'	1
		4	'Binova' B / 'Lemberger'	1
	Pfropfreben	1	'5BB' A / 'Lemberger'	10
		2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	10
		3	'Binova' A / 'Riesling'	10
		4	'Binova' B / 'Lemberger'	10
Nov	Pfropfreben	1	'5BB' A / 'Lemberger'	10
		2	'5BB' B / 'Spätburgunder'	10
		3	'Binova' A / 'Riesling'	10
		4	'Binova' B / 'Lemberger'	10

Rebschule 2						
2015						
Monat	Art der Probe			Probe	n	
Feb	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB'	Herkunft: Deutschland	10	
		2	'125AA'	Herkunft: eigene Produktion	10	
		3	'SO4'	Herkunft: Italien	10	
		4	'Binova'	Herkunft: Italien	10	
	Tauchbäder (4x 50 ml)	1	H ₂ O-Bad für Unterlagen und Edelreiser			1
		2	Beltanol-Bad für Unterlagen und Edelreiser			1
Mai	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Regent'		10	
		2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'		10	
		3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'		10	
		4	'Binova' / 'Spätburgunder'		10	
	verkaufsfertiges Pflanzgut	1	'5BB' A / 'Spätburgunder'		10	
		2	'Binova' A / 'Riesling'		10	
		3	'Binova' B / 'Lemberger'		10	
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'5BB' / 'Regent'		1	
		2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'		1	
		3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'		1	
		4	'Binova' / 'Spätburgunder'		1	
	Sep	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Regent'		1
2			'125AA' / 'Cabernet Cubin'		1	
3			'SO4' / 'Sauvignon blanc'		1	
4			'Binova' / 'Spätburgunder'		1	
Pfropfreben		1	'5BB' / 'Regent'		10	
		2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'		10	
		3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'		10	
		4	'Binova' / 'Spätburgunder'		10	
Nov	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Regent'		10	
		2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'		10	
		3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'		10	
		4	'Binova' / 'Spätburgunder'		10	

Rebschule 2

2016

Monat	Art der Probe		Probe	n		
Feb	Unterlagenholz	1	'5BB'	Herkunft: eigene Produktion	10	
		2	'125AA'	Herkunft: eigene Produktion	10	
		3	'SO4'	Herkunft: Italien	10	
		4	'Binova'	Herkunft: eigene Produktion	10	
	Ruten (1,20 m)	1				
		2				
	Tauchbäder (4x 50 ml)	1		H ₂ O-Bad für Unterlagen und Edelreiser	1	
		2		Beltanol-Bad für Unterlagen und Edelreiser	1	
Apr	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'		10	
		3	'SO4' / 'Riesling'		10	
		4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		10	
	verkaufsfertiges Pflanzgut	1	'5BB' / 'Regent'		10	
		2	'125AA' / 'Cabernet Cubin'		10	
		3	'SO4' / 'Sauvignon blanc'		10	
		4	'Binova' / 'Spätburgunder'		10	
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		1	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'		1	
		3	'SO4' / 'Riesling'		1	
		4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		1	
	Sep	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		1
			2	'125AA' / 'Chardonnay'		1
			3	'SO4' / 'Riesling'		1
			4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		1
Pfropfreben		1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'		10	
		3	'SO4' / 'Riesling'		10	
		4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		10	
Nov	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		1	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'		1	
		3	'SO4' / 'Riesling'		1	
		4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		1	
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Schwarzriesling'		10	
		2	'125AA' / 'Chardonnay'		10	
		3	'SO4' / 'Riesling'		10	
		4	'Binova' / 'Gelber Muskateller'		10	

Rebschule 3

2014

Monat	Art der Probe		Probe	n
Jan	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB' Herkunft: Italien	6
		2	'125AA' A Herkunft: Italien	10
		3	'125AA' B Herkunft: Deutschland	13
	Tauchbäder (2x 50 ml)	1	H ₂ O-Bad für Unterlagen	1
		2	H ₂ O-Bad für Edelreiser	1
		3	Chinosol-Bad für Unterlagen	1
		4	Chinosol-Bad für Edelreiser	1
Mai	Pfropfreben	1	'125AA' C (Italien) / 'Riesling'	2
		2	'125AA' D (Italien) / 'Riesling'	2
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'125AA' C (Herkunft: Italien) / 'Riesling'	1
		2	'125AA' D (Herkunft: Italien) / 'Riesling'	1
Sep	Bodenproben Mischprobe innerhalb der Parzellen (50 ml)	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'	1
		2	'125AA' A / 'Spätburgunder'	1
		3	'125AA' B / 'Spätburgunder'	1
		4	'125AA' C / 'Weißburgunder'	1
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'	10
		2	'125AA' A / 'Spätburgunder'	10
		3	'125AA' B / 'Spätburgunder'	9
		4	'125AA' C / 'Weißburgunder'	10
Nov	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'	10
		2	'125AA' A / 'Spätburgunder'	10
		3	'125AA' B / 'Spätburgunder'	10
		4	'125AA' C / 'Weißburgunder'	10

Rebschule 3

2015

Monat	Art der Probe		Probe	n
Feb	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'125AA' Herkunft: Deutschland	15
		2	'SO4' Herkunft: Italien	10
		3	'Börner' Herkunft: Italien	9
Feb/Mrz	Tauchbäder (4x 50 ml)	1	H ₂ O-Bad für Unterlagen	1
		2	H ₂ O-Bad für Edelreiser	1
		3	Beltanol-Bad für Unterlagen	1
		4	Beltanol-Bad für Edelreiser	1
Mai	Pfropfreben	1	'125AA' / 'Ruländer'	10
		2	'SO4' / 'Riesling'	10
		3	'Börner' / 'Spätburgunder'	10
	verkaufsfertiges Pflanzgut	1	'125AA' A / 'Müller-Thurgau'	10
		2	'125AA' B / 'Spätburgunder'	10
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'125AA' / 'Ruländer'	1
		2	'SO4' / 'Riesling'	1
3		'Börner' / 'Spätburgunder'	1	
Sep	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' (Italien) / 'Weißburgunder'	1
		2	'125AA' / 'Ruländer'	1
		3	'SO4' / 'Riesling'	1
		4	'Börner' / 'Spätburgunder'	1
	Pfropfreben	1	'5BB' (Italien) / 'Weißburgunder'	10
		2	'125AA' / 'Ruländer'	10
		3	'SO4' / 'Riesling'	10
		4	'Börner' / 'Spätburgunder'	10
Nov	Pfropfreben	1	'5BB' (Italien) / 'Weißburgunder'	10
		2	'125AA' / 'Ruländer'	10
		3	'SO4' / 'Riesling'	10
		4	'Börner' / 'Spätburgunder'	10

Rebschule 3						
2016						
Monat	Art der Probe			Probe	n	
Feb	Unterlagenholz Ruten (1,20 m)	1	'5BB'	Herkunft: Italien	10	
		2	'125AA'	Herkunft: Deutschland	10	
		3	'SO4'	Herkunft: Italien	10	
		4	'Börner'	Herkunft: Italien	10	
	Tauchbäder (4x 50 ml)	1		H ₂ O-Bad für Unterlagen		2
		2		H ₂ O-Bad für Edelreiser		1
		2		Beltanol-Bad für Unterlagen und Edelreiser		2
Mai	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'		10	
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'		10	
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'		10	
		4	'Börner' / 'Ruländer'		10	
	Vortriebssubstrate Torf + Sägespäne (50 ml)	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'			1
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'			1
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'			1
		4	'Börner' / 'Ruländer'			1
Sep	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'		1	
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'		1	
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'		1	
		4	'Börner' / 'Ruländer'		1	
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'			10
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'			10
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'			10
		4	'Börner' / 'Ruländer'			10
Okt	Bodenproben Mischprobe aus dem Wurzelbereich der beprobten Pfropfreben (50 ml)	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'		1	
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'		1	
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'		1	
		4	'Börner' / 'Ruländer'		1	
	Pfropfreben	1	'5BB' / 'Müller-Thurgau'			10
		2	'125AA' / 'Spätburgunder'			10
		3	'SO4' / 'Spätburgunder'			10
		4	'Börner' / 'Ruländer'			10

Unterlagen derselben Sorte mit unterschiedlichen Herkünften sind für die jeweiligen Rebschulen generell durch fettgedruckte Großbuchstaben gekennzeichnet (**A**, **B**, **C** etc.). Sofern nicht explizit angegeben, handelt es sich bei den einzelnen Pfropfkombinationen zu den jeweiligen Probennahmen-Zeitpunkten um Unterlagen und Edelreiser desselben Produzenten (innerhalb der jeweiligen Rebschulen und Jahre). Beim verkaufsfertigen Pflanzgut aus 2015 und 2016 wurden nach Möglichkeit dieselben Pfropfkombinationen aus dem Pflanzguterzeugungsprozess 2014 bzw. 2015 beprobt; ansonsten wurde darauf geachtet, dass zumindest die Unterlagenkomponente derselben Herkunft entstammt. (n: Probenumfang).

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Fischer für die Überlassung des äußerst interessanten und komplexen Forschungsthemas und die Betreuung dieser Arbeit am Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau in Siebeldingen.

Lieber Michael, vielen Dank für die vielen konstruktiven Gespräche, dein entgegengebrachtes Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheiten, die ich zur Verwirklichung meiner Ideen genießen durfte.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf T. Vögele bedanke ich mich herzlich für die Betreuung der Promotion an der Universität Hohenheim und die ständige Bereitschaft bei Fragen und Problemen Hilfestellung zu leisten.

Herrn Dr. Michael Maixner danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung des Forschungsprojekts am Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau.

Vielen Dank an Dr. Christoph Hoffmann, der stets ein offenes Ohr bei fachlichen und organisatorischen Fragen für mich hatte.

Meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe Mykologie, Melanie Molnar, Dagmar d'Aguiar, Cornelia Dubois und Christian Kraus danke ich sehr herzlich für den konstruktiven Wissensaustausch und ihre Hilfe bei kleineren und größeren Problemen. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit. Ihr seid mir alle sehr ans Herz gewachsen.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pflanzschutz in Obst- und Weinbau danke ich herzlich für ihre fachliche Unterstützung und die menschliche Zusammenarbeit. Ich habe mich von Anfang an sehr wohl bei euch gefühlt und viele Freunde unter euch gefunden. Ein besonderer Dank gilt Gertraud Michl für den regen fachlichen Austausch und die gegenseitige Hilfe bei der Lösung molekularbiologischer Schwierigkeiten. Herzlichen Dank auch an Thomas Gramm und Anita Kramm für ihre Unterstützung meiner Versuchsdurchführungen.

Des Weiteren möchte ich allen Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftlern am Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau und am Institut für Rebenzüchtung danken. Es war eine tolle Zeit mit euch, die ich nicht missen möchte. Ein besonderer Dank vor allem an Daniel Zandler, Florian Rist, Robert Richter, Ulrike Braun und Janine Köckerling für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen, die vielen konstruktiven Diskussionen und ihre menschliche Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich beim Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) für die finanzielle Förderung des Projekts sowie beim Verband Deutscher Rebenpflanzguterzeuger e.V. für die zusätzliche finanzielle Unterstützung nach Ende der Projektlaufzeit.

Ein großer Dank gilt den am Projekt beteiligten Pflanzguterzeugungsbetrieben. Vielen herzlichen Dank für die Kooperationsbereitschaft, die Bereitstellung der zahlreichen Proben und die gute Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester mit Familie bedanken, die immer an mich geglaubt und mich stets in meinem Tun unterstützt haben.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Grapevine Trunk Diseases: Epidemiologie und Molekulardiagnose wichtiger Esca-Erreger während der Pflanzguterzeugung

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Landau in der Pfalz, den 19. Februar 2018

Teile dieser Arbeit werden voraussichtlich unter folgendem Titel veröffentlicht:

„Grapevine trunk diseases (GTDs): a new multiplex PCR approach reveals *Cadophora luteo-olivacea* as the prevailing species in German nurseries”

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Nicolai Walter Haag
Geburtsdatum 11. Februar 1986
Geburtsort Bad Neustadt an der Saale

Schule und Studium

10/2010 – 03/2013 Universität Hohenheim
Studium, Studiengang: Crop Sciences
Abschluss: Master of Science

08/2011 – 12/2011 University of Illinois at Urbana-Champaign, USA
Auslandssemester

10/2007 – 9/2010 Universität Hohenheim
Studium, Studiengang: Agrarbiologie
Abschluss: Bachelor of Science

10/2005 – 07/2006 Hochschule Heilbronn
Diplomstudium Automotive System Engineering (ohne Abschluss)

6/2005 Edith-Stein-Gymnasium, Bretten
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Praktische Tätigkeiten

10/2016 – 9/2017 Julius Kühn-Institut
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Siebeldingen
Gastwissenschaftler (Doktorand)

9/2013 – 9/2016 Julius Kühn-Institut
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Siebeldingen
Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand)

11/2010 – 04/2011 Universität Hohenheim
Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
Hilfswissenschaftler

08/2009 – 09/2009 Family Trust, Morrinsville, Neuseeland
Landwirtschaftliches Praktikum (Berufspflichtpraktikum)

04/2009 – 07/2009 Universität Hohenheim
Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
Agrarbiologisches Projekt

05/2007 – 08/2007 Hammann GbR, Kürnbach
Landwirtschaftliches Praktikum

11/2006 – 04/2007 Firma E.G.O., Oberderdingen
Arbeitskraft in der Logistik

08/2006 – 11/2006 Michaeli Bräu, Sulzfeld
Servicekraft in der Gastronomie

Landau in der Pfalz, den 19. Februar 2018

