

Untersuchungen zum Mechanismus der Reblausresistenz der Unterlagsrebsorte `Börner`

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Mohamed Fathi El-Nady
Geb. in Kafr Elsheikh (Ägypten)

Mainz, 2001

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Fachgebiet Botanik der Forschungsanstalt Geisenheim unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. habil. Max-Bernhard Schröder im Zeitraum von 01.08 1997 bis 2001 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Pflanzenmaterial	7
2.2 Induktion von Wurzelnekrosen	7
2.2.1 Aseptische-Kultur-von Mikrostecklingen	7
2.2.2 Unsteriles Wurzel-Kultur-System	8
2.3 Induktion von Blattnekrosen	10
2.3.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen	10
2.3.2 An intakten Pflanzen	10
2.3.3 An gestutzten Pflanzen	10
2.4 Probenfixierung und Einbettung für Lichtmikroskopie (LM)	11
2.4.1 GMA-Schnitte-Färbung	12
2.4.2 Paraffin-Schnitte-Färbung	14
2.5 Probenfixierung und Einbettung für Elektronmikroskopie (EM)	15
2.6 Bestimmung der Enzymaktivität	16
2.6.1 Peroxidase (PO) und Polyphenoloxidase (PPO)	16
2.6.2 Phenylalanin-Amoniumlyase-Aktivität (PAL)	17
2.7 Proteintest	18
2.8 Bestimmung der Gesamtphenole	19
2.9 Polyphenolanalytik von Wurzeln mittels HPLC	20
2.10 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen	20
2.11 Statistische Auswertung	21
3 Ergebnisse	22
3.1 Histologische und cytologische Untersuchungen	22
3.1.1 Mechanismus der Reblausresistenz der Wurzeln	22
3.1.1.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen	22
3.1.1.2 Unsteriles Wurzel-Kultur-System	22
3.1.1.2.1 Wurzelnekrosen Typ I	23
3.1.1.2.2 Wurzelnekrosen Typ II	23

3.1.2 Mechanismus der Reblausresistenz der Blätter	27
3.1.2.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen	27
3.1.2.2 Topfreben	39
3.1.2.2.1 Nekrosebildungen	39
3.1.2.2.2 Blattnekrosen Typ I	39
3.1.2.2.3 Blattnekrosen Typ II	39
3.1.2.2.4 Blattgallen	40
3.2 Histochemische Beobachtungen	41
3.3 Biochemische Beobachtungen	54
3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten	54
3.3.1.1 Peroxidase (PO)-Aktivität	54
3.3.1.2 Polyphenoloxidase (PPO)-Aktivität	55
3.3.1.3 Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL)-Aktivität	56
3.3.2 Lösliche Proteine	57
3.3.3 Gesamtphenolgehalt	58
3.3.4 Polyphenolanalytik von Wurzeln mittels HPLC	59
3.4 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen	59
3.4.1 Behandlungen mit IES	59
3.4.2 Behandlungen mit Aminosäuren und Aminosäurengemisch	61
3.4.3 Behandlungen mit IES in Aminosäuren und in Aminosäurengemisch ..	61
4 Diskussion	65
4.1 Vorbemerkungen	65
4.2 Histologische und cytologische Beobachtungen	65
4.2.1 Die Wurzeln	65
4.2.2 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen	65
4.2.3 Unsteriles Wurzel-Kultur-System	66
4.2.4 Wurzelnekrosen	66
4.2.2 Die Blätter	68
4.2.2.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen	68
4.2.2.2 Topfreben	68
4.2.2.2.1 Blattnekrosen	68
4.2.2.2.2 Blattgallen	77
4.3 Histochemische Beobachtungen	78

4.4 Vergleich zwischen den Abwehrreaktionen der Wurzeln und der Blätter der Unterlagsrebsorte `börner`	79
4.5 Biochemische Beobachtungen	79
4.6 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen	83
5 Zusammenfassung	87
6 Literaturverzeichnis	90
7 Anhang	100

1 Einleitung

Die Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch), [Homoptera, Phylloxeridae] war ursprünglich in Nordamerika beheimatet. Mittlerweile kommt sie in fast allen Weinbauregionen der Welt vor und gehört zu den bedeutendsten Rebschädlingen. Sie wurde 1854 vom Insektenforscher Asa Fitch als Blattraub (Gallaus) entdeckt und beschrieben. In jener Zeit hatte man von diesen Insekten in Europa noch keine Kenntnis. Es darf als sicher angenommen werden, daß die Reblaus kurz nach der Mitte des Neunzehnten Jahrhunderts, wahrscheinlich 1862, mit bewurzelten amerikanischen Reben in die europäischen Rebgebiete in Frankreich eingeschleppt wurde. In Deutschland verzeichnete man 1874 den ersten Reblausherd auf dem Annaberg bei Bonn. Versuche, die Reblaus durch strikte Quarantänemaßnahmen aufzuhalten und einen reblausfreien Weinbau aufrechtzuhalten, erweisen sich zunehmend als unmöglich (Sopp et al 1997). Die Verseuchung in Frankreichs Weingebieten griff in der Folge mit einer Geschwindigkeit von etwas 20 km pro Jahr um sich (Remond und Boller, 1994).

In jüngerer Zeit wird aus fast allen deutschen Weinbaugebieten von einer zunehmenden Bedrohung durch die Reblaus gesprochen. Mehr als 2 Millionen ha Weinberg wurden zwischen 1869-1900 in Europa von Rebläusen vernichtet (Ordish 1987). Im Rahmen aktueller Auswertung im Anbaugebiet Rheingau wurde in den letzten Jahren ein explosionsartiger Anstieg der Populationsdichte (Abb. 1) festgestellt. Von 3233 ha Anbaufläche des Gebietes waren 1990 erst 75 ha. Dagegen waren 1997 bereits 361 ha befallen (Jung, 1998).

Die Rebläuse stellen zweifellos einer der gefährlichsten Schädlinge in Weinbau dar. Sie greifen sowohl die Wurzeln als auch die Blätter an. Bei normaler Anfälligkeit reagiert die Rebe auf den Stich der Reblaus immer durch die Bildung eines organfremden Gallgewebes in Form von Blattgallen oder Wurzelgallen.

Dieses Gallgewebe allein ermöglicht der Reblaus die normale Entwicklung und Vermehrung (Sterling 1952, Becker und Brückbauer 1955, Niklowitz 1955 und Hofmann 1957).

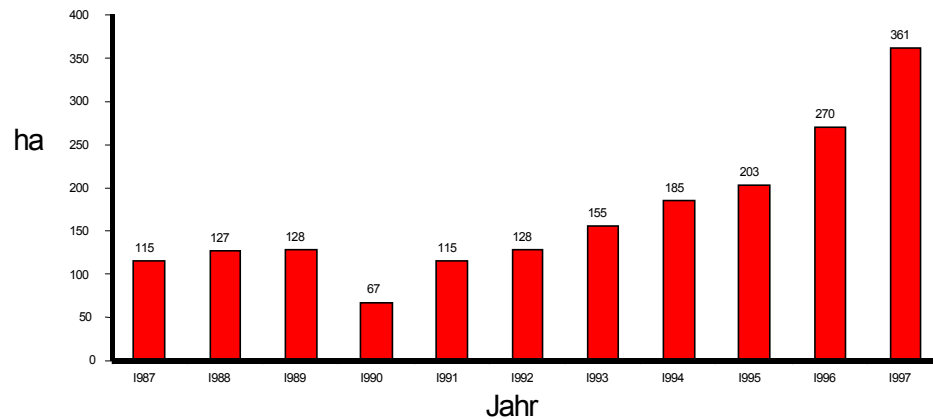


Abb. 1: Reblausherde im Rheingau

Die Reblaus kann an den Rebwurzeln zwei verschiedene Schadbilder hervorrufen: Tuberositäten und Nodositäten (Niklowitz 1955). Tuberositäten treten an älteren Wurzeln auf. Diese Form des Reblausbefalls kann bei Arten wie unserer Kulturrebe *Vitis vinifera* bis zum zentralen Gefäßsystem vordringen. Entweder bereits dadurch oder durch später eindringende Sekundärerreger (Pilze, Bakterien) wird die Wurzel so stark geschädigt, daß sie von der Befallsstelle her abstirbt (Abb. 2).

Nodositäten treten nicht an den älteren, sondern an den sehr jungen Wurzeln auf. Rebläuse können sich deshalb an den Nodositäten von Unterlagswurzeln sehr gut ernähren und vermehren. Die Reblaus sticht ihre Rüsselspitze in die zweite oder dritte Rindenzellschicht ein. Die angestochene Zelle bildet Gerbstoffniederschläge. Danach wird die Zellteilung in der unmittelbaren Umgebung der angestochene Zelle aktiviert. Als Folge davon wölbt sich die Einstichstelle vor. Wenige Tage danach beobachtete man, daß die Zellen im Einstichbereich in ihrem Wachstum zurückbleiben. Seitlich der Einstichstelle ist das Wachstum der Zellen nicht gehemmt. Es läßt sich zunächst die Wachstum der Zellen in alle Richtungen beobachteten, die sich

besonders in einer Streckung äußert, und nach dem Rande des Querschnittes zu in eine Vermehrung übergeht. Infolgedessen wölbt sich das Gewebe zu beiden Seiten der Einstichstelle vor, und die Wurzel krümmt sich (Abb. 2), (Sterling, 1952, Niklowitz, 1955, Hofmann 1957). Die Reblaus legt ca. 30 bis 50 unbefruchtete Eier ab, aus denen sich innerhalb von 2 Wochen junge Rebläuse entwickeln. Sie befallen eine andere Wurzel und legen, sobald sie geschlechtesreif sind, ebenfalls Eier ab. Innerhalb eines Jahres wiederholt sich dieser Zyklus unter den gegebenen Standortverhältnissen etwa 4 bis 6 Generationen (Sopp, et al 1997 und Schirra, et al 1999). Die Bildung von Nodositäten führt zu einer Verringerung des Frischgewicht der Wurzeln, welches direkt mit dem Blattflächenwachstum korreliert ist. Ein reduziertes Blattflächenwachstum führt möglicherweise zu einem Rückgang des Gesamtwachstums, (Rühl und Porten 1998). Man hat herausgefunden, daß in Abhängigkeit vom Bodentyp die Rebläuse bis 1,2 m Tiefe in den Boden eindringen (Deklerk 1974). Die Tuberositäten und Nodositäten, die sich durch Reblausbefall bilden, reduzieren dazu weiter das Wurzelwachstum, wodurch die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen für die Rebe weiter erschwert wird. Dies führt im Anfangsstadium zu Kümmerwuchs und später zum Absterben der Rebe. Omer et al (1995) haben festgestellt, daß die Beschädigung der Reben bei Befall durch Rebläuse mit *Fusarium solani* oder mit *F. solani* mit *Pythium ultimum* stärker ist als bei Befall mit Rebläusen allein.

Die geflügelten Formen legen Eier ab, denen männliche und weibliche Rebläuse entschlüpfen. Nach der Begattung erfolgt die Ablage eines befruchteten Wintereies in die Rinde des Rebholzes. Aus diesem Ei schlüpft eine sogenannte Maigallenlaus. Nachdem die Reben mit den Rebläuse infiziert sind, wandern diese zu Triebspitzen und stechen ihre Rüsselspitze in die noch junge Blätter in der Nähe von jungem Leitgewebe ein. Im Einstichbereich teilen sich die Zellen der Einstichstelle Höchstenfalls zweimal, und zwar erst im fortgeschrittenen Gallenstadium, so daß sich hier die Hemmungszone bildet. Es entstehen in der ringförmigen meristematischen Zone der Galle schließlich kleine Nester teilungsfähiger primordienartiger Zellgruppen. Diese Zellgruppen produzieren mit ihren meristematischen Zellen neues Gewebe.

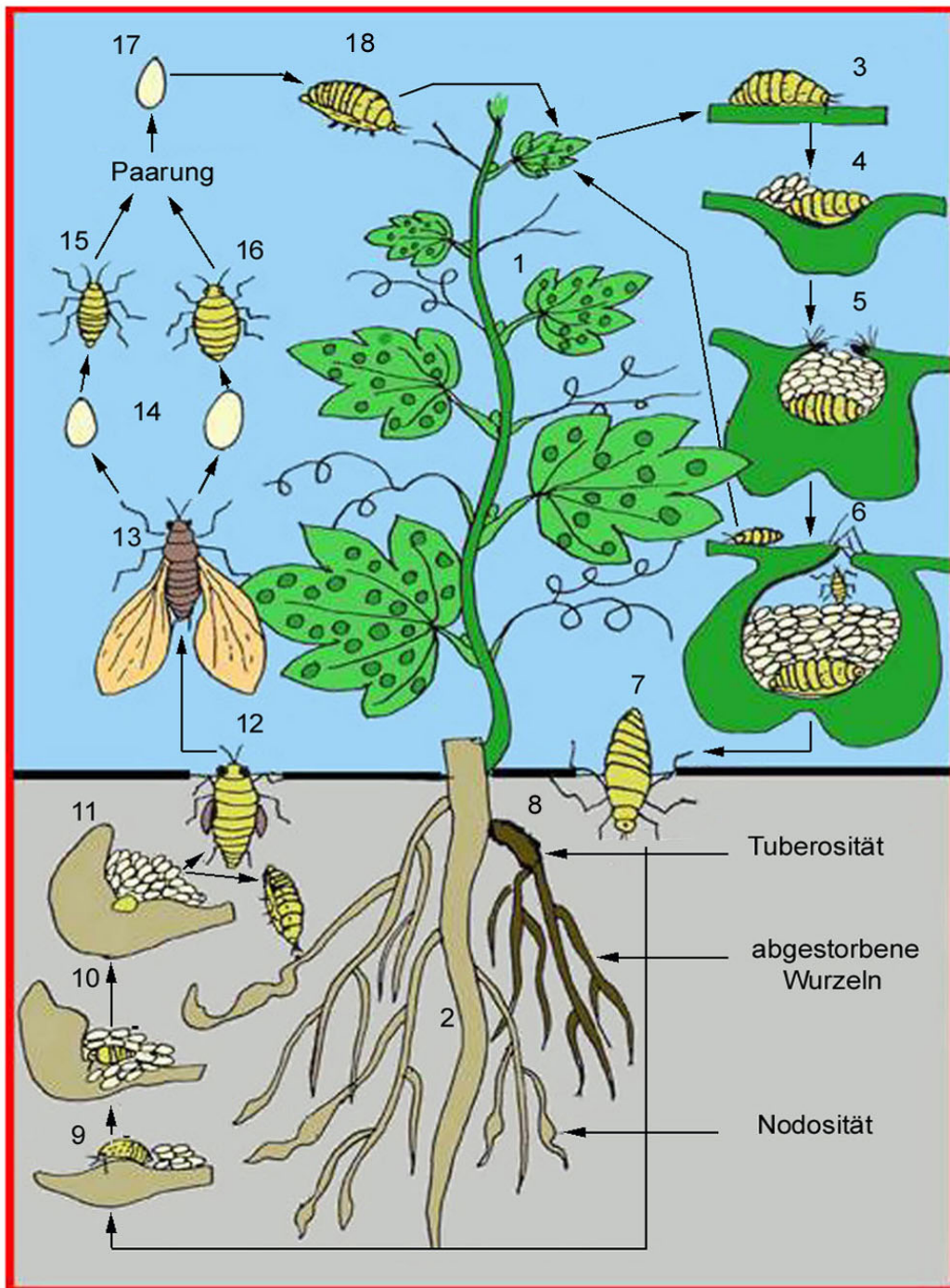


Abb. 2: Lebenszyklus der Reblaus. 1 = Spross der Rebe, 2 = Wurzelsystem der Rebe, 3 bis 6 = Entwicklung von Blattgalle, 7 = Eindringen der Reblauslarve in den Boden, 8 = Tuberosität (führt zum Absterben distaler Wurzelbereich), 9 bis 11 = Entwicklung von Nodositäten, 12 = Reblauslarve verlässt den Boden, 13 = geflügelte Reblaus, 14 = unbefruchtete Eier, 15 = männliche Larve, 16 = weibliche Larve, 17 = befruchtetes Winter Ei, 18 = Stammutter.

Es wurde beobachtet, daß die Reblaus, wenn sie einmal eingestochen hat und das Blattgewebe mit einer Vergallung reagiert, an der Einstichstelle verbleibt. Die Reblaus verharrt während ihres Wachstums bis zur Eiablage und damit bis zum ihrem individuellen Tod (Abb. 2), (Sterling, 1952, Becker und Brückbauer, 1955, Niklowitz, 1955 und Hofmann, 1957). In diesem geschützten Raum legt die Reblaus ca. 400 bis 1200 Eier. Aus den Eiern der Stammutter schlüpfen Rebläuse, die sich über mehrere Generationen (3 bis 6 Generationen) ungeschlechtlich vermehren und immer neue Blätter befallen (Sopp et al 1997, Schropp und Blaich 1998 und Schirra et al 1999). Verschiedene Autoren machen darauf aufmerksam, daß durch die sexuelle Vermehrung von Rebläusen die Möglichkeit von genetischen Neukombinationen sowie der Bildung aggressiverer Biotypen besteht (Presser et al 1993 und Schropp und Blaich 1998).

(Anders 1957) hat Reblauspeichel gesammelt und dessen Rolle bei der Gallenbildung untersucht. Bei der Übertragung des Reblauspeichels auf junge Blätter und Wurzelspitzen reagiert das Wirtsgewebe mit normalen Gallenbildungen. Duspiva (1954) beobachtete, daß die Speichel-Drüsen der Aphiden die Fähigkeit der Umsetzung von Tryptophan zu IES haben. Schäller (1960) hat Reblauspeichel analysiert und herausgefunden, daß er verschiedene Aminosäuren und Amide enthält. Später stellte Schäller (1968) fest, daß der Aphidenspeichel verschiedene Aminosäuren und Indol-essigsäure (IES) enthält. Der Speichel der Aphidenarten, die starke Gallenbildung verursachen, enthält mehr IES als der Speichel der Arten, die schwache Gallenbildung verursachen. Es wurde deshalb versucht, mit künstlichem Speichel, dessen Aminosäuren- und IES-Gehalt dem natürlichen Speichel weitgehend entsprach, künstliche Gallen zu erzeugen. Es ist gelungen, an den Trieb und Wurzelspitzen von Rebsorten Gallen zu induzieren, die den natürlichen Reblausgallen ähnlich sind. Sowohl das Aminosäurengemisch (Tryptophan, Glutaminsäure, Lysin, Histidin und Valin) als auch das IES vermögen allein derartige Gallen zu verursachen. Diese Ergebnisse könnten beweisen, daß die Aminosäuren und das IES für die Gallenbildung des Reblauspeichels mitverantwortlich sind (Anders 1958 und Schäller 1966).

Derzeit ist, als einzige Gegenmaßnahme zur Bekämpfung der Reblaus, der Einsatz von Schwefelkohlenstoff (S=C=S) zugelassen. Aufgrund der Toxizität, der nichtselektiven Wirkung und der eingeschränkten Wirksamkeit, halten wir den Einsatz dieses Giftes für unvertretbar. Es ist vielmehr notwendig, neue Möglichkeiten der Resistenzzüchtung zu prüfen.

Die Resistenzzüchtung bei Unterlagsreben erhielt in Deutschland durch die Arbeiten von Börner (1943) wichtige Impulse. Er stellte fest, daß resistente Rebesorte 'Börner' auf den Reblausangriff nicht mit Gallenbildungen reagiert, sondern mit einer Abwehrreaktion in Form einer Nekrosenbildung. Becker (1988) hat festgestellt, daß die Unterlagsrebsorte 'Börner' für acht Reblausbiotypen unfällig ist. Bisher allerdings ist der Mechanismus der Reblausresistenz der Unterlagsrebsorte 'Börner' nicht erforscht worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, wesentliche Voraussetzungen für die Übertragung der Reblausresistenz der resistenten Unterlagsrebsorte 'Börner' (*Vitis riparia* x *V. cinerea*, Na 5152-54) auf verschiedene Kultursorten mittels Gentransfer zu erarbeiten. Weil es keine Informationen über den Resistenzmechanismus der Unterlagsrebsorte 'Börner' gibt, müssen zuerst die cytologischen und physiologischen Veränderungen nach dem Reblausangriffen untersucht werden. Die Abwehrreaktionen der Wurzeln und der Blätter von Unterlagsrebsorte 'Börner' und Anfälligkeiten der Wurzeln der Ertragsrebsorte 'Riesling' *V. vinifera* und der Blätter von Unterlagsrebsorte 'So4' (*Vitis berlandieri* X *V. riparia*) werden histologisch und cytologisch untersucht.

Die cytologisch- histologischen Arbeiten zum Resistenzmechanismus sind Teil des Gesamtprojektes „Reblausresistenz“ am FG Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, und Voraussetzung für die Verifikation von parallelen, molekularbiologischen Arbeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial:

Freilandmaterial und Topfreben der Unterlagsrebsorten 'SO4' (*Vitis berlandieri* X *V. riparia*) und 'Börner' (*V. riparia* X *V. cinerea*) und der Ertragsrebsorte 'Riesling' *V. vinifera* stammen aus dem Sortiment des Fachgebietes Rebenzüchtung, Forschungsanstalt Geisenheim. In Vitro-Kulturen von Sproßspitzen der Sorten 'Börner', 'SO4' und 'Riesling' wurden am Fachgebiet Botanik der Forschungsanstalt Geisenheim etabliert. Diese Sproßspitzenkulturen wurden alle 6 – 8 Wochen auf modifiziertem MS Medium (Murashige und Skoog 1962); (siehe unten) subkultiviert.

2.2 Induktion von Wurzelnekrosen:

2.2.1 Aseptische-Kultur-von Mikrostecklingen:

Als Kulturgefäße dienten Kunststoff-Boxen (Magenta Ga-7 Vessel, Sigma), die mit Schräg-Agar (Ms-Medium nach Murashige und Skoog 1962, verändert, siehe Anhang S. 100) beschickt wurden und unter 14h Licht (Osram L 36 W / 25-1, weiss - Universal - White + Osram L 36 W / 31, Warmton Lumilux warm - White) bei 23 ± 1 C° aufgestellt wurden. Auf dieses Medium wurden die Sproßspitzen der Unterlagsrebsorte aus Sproßspitzenkulturen 'Börner' und 'Riesling' gesetzt. Nach 2 bis 3 Wochen wurden die Boxen auf eine Seite gelegt (siehe Abb. 3). Als Folge davon wuchsen die Wurzeln aus dem Kulturmedium heraus. Danach wurden diese Wurzeln mit den Oberflächen sterilisierten Eiern der Reblaus infiziert (ca. 10 Eier / Box); (Askani und Beiderbeck 1991).

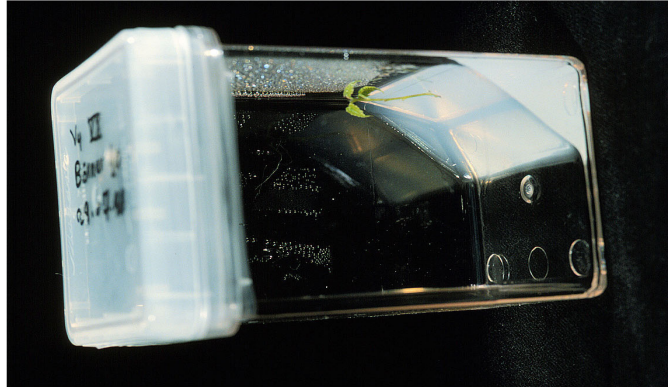


Abb. 3: Aseptische-Kultur von Mikrostecklingen

2.2.2 Unsteriles Wurzel-Kultur-System:

Wurzelschnitte (ca. 5 cm lang, 2 –3 mm Durchmesser) von `Börner` und `Riesling` wurden den Topfreben entnommen und abgewaschen. Die Basisseite wurde mit nasser Watte (Baumwolle) mehrmals straff und umwickelt. Vier Abschnitte wurden in eine Petrischale (10 cm Durchmesser) gelegt. Diese Wurzelabschnitte wurden mit Oberflächen sterilisierten und mit unsterilisierten Reblauseiern aus Blattgallen von `SO4` infiziert (über 20 Eier pro Abschnitt), um eine negative Auswirkung des Sterilisationsprozesses ausschließen zu können.

Um den nötigen Gasaustausch zu gewährleisten und die Kulturen vor Verunreinigungen zu schützen, wurden in die Deckel der Petrischale ca. 2 cm² große Löcher geschnitten. Diese wurden mit feinem Vlies verklebt. Diese Petrischalen wurden bei 23°C im Dunkeln inkubiert. Nach ca. einer Woche schlüpfen die Reblauslarven und nach ca. einer weiteren Woche entwickelten sich Seitenwurzeln(Abb.4a und b).

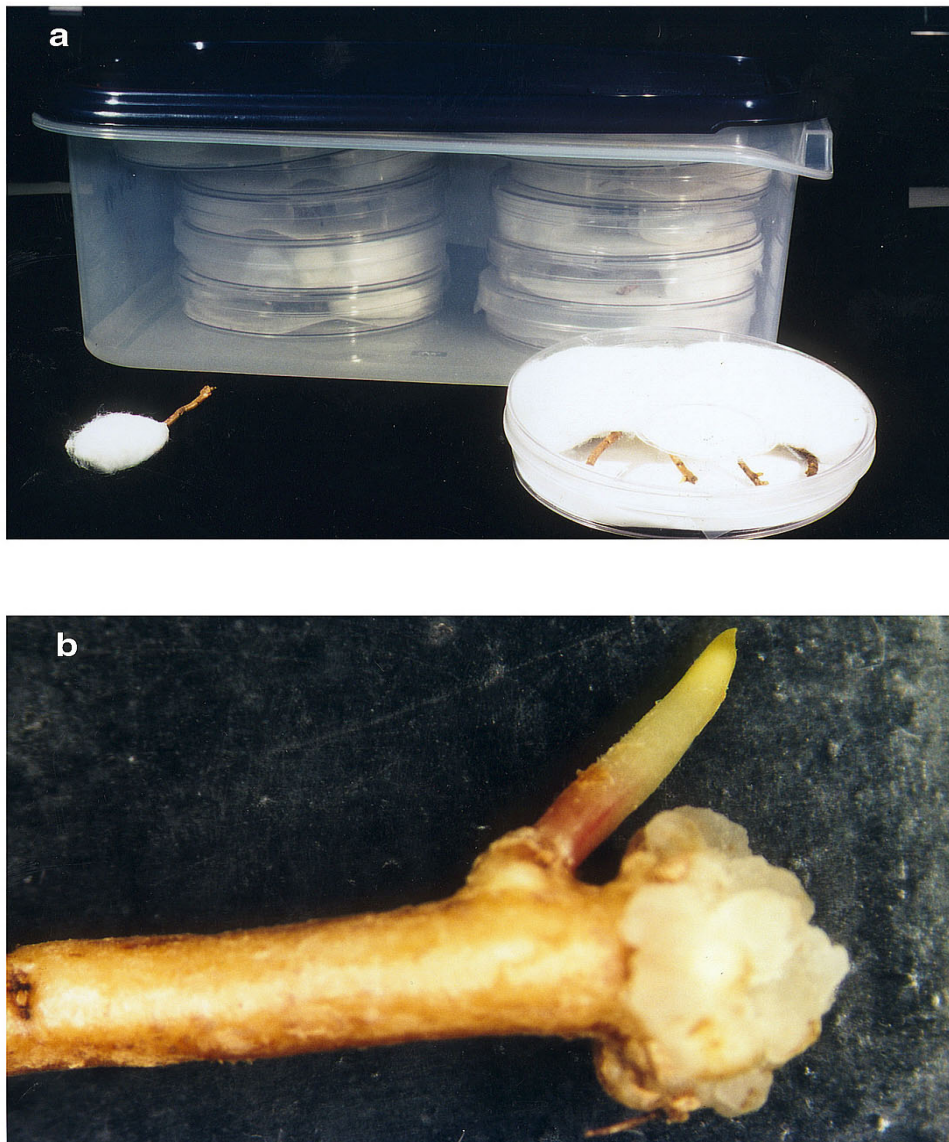


Abb. 4: a- Unsteriles Wurzel-Kultur-System.
b- Entwicklung von Seitenwurzel.

2.3 Induktion von Blattnekrosen:

2.3.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen:

Die Sproßspitzen der Untragsrebsorten aus Sproßspitzenkulturen `Börner` und `SO4` wurden auf das MS-Medium in die Gläser (21 x 7 cm) gesetzt. Nach 3-4 Wochen wurden die Blätter mit den Oberflächen sterilisierten Eier der Reblaus infiziert.

2.3.2 An intakten Pflanzen:

Stecklinge von `Börner` (Freiland , Fachgebiet Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim) wurden im Februar 1999 in Töpfe gesteckt und im Gewächshaus aufgestellt. Im Juli wurden die Reben `Börner` mit Larven der Rebläuse infiziert. Dazu wurden Blätter mit reifen Gallen von `SO4` (Freiland, Institut für Weinbau und Rebenzüchtung) gesammelt, und 12h im Plastikbeutel bei Raumtemperatur (RT) gelassen. Während dieser Zeit schlüpfen die Larven und wandern auf die Blätter. Diese Blätter mit Larven wurden ca. 2 Stunden auf Sproßspitzen von Topfpflanzen der Sorte `Börner` und `SO4` gelegt. Infolgedessen wanderten die Larven an die Sproßspitzen, und durch Anstechen dieser versuchten sie sich zu ernähren. Als Folge davon entwickelten sich die Blattnekrosen oder Gallen.

2.3.3 An gestutzten Pflanzen:

Entsprechend 2.3.2 erzeugte Topfreben der Unterlagsrebsorte `Börner` und `SO4` wurden um die obersten 5 Nodien gekürzt und mit Reblauslarven infiziert.

2.4 Probenfixierung und Einbettung für Lichtmikroskopie(LM):

Die Proben (Wurzel- und Blättstückchen mit oder ohne Nekrosen / Rebläuse) wurden in Fixierungslösung 5% Glutaraldehyd (Fluka, AG) in Natrium-Cacodylat-Puffer (CP), (pH 6,8) für 4 Stunden bei RT fixiert und das Fixiermittel anschließend mit CP 3x20 Min ausgewaschen.

CP - Puffer (pH 6,8):

- 2,14 g Natrium-Cacodylat
- 100 ml H₂O
- 8,3 ml 0,1 N HCl
- H₂O auf 200 ml

Die Entwässerung der Proben erfolgte über eine aufsteigende Ethanolreihe (10%, 30%, 50% und 70% je 30 Min), 80%, 90% und 96% je 2 Stunden, und 100% für 4 Stunden), und danach mit (n) - Propanol 100% ,und (n) - Butanol 100% für je 4 Stunden.

Die Einbettung erfolgte im Technovit 7100 (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf). Technovit 7100 ist ein hydrophiles Kunststoff-Einbettungsmittel basierend auf 2-Hydroxyethylmethacrylat (= glycolmethacrylat, GMA). Die Infiltration den Proben erfolgte mit Technovit 7100-Lösung plus Härterzusatz (Härter I) 1% (w/v) über 3x24 Stunden bei 20 °C.

Die Einbettung der fixierten Proben erfolgte in einer Einbettungsform aus Polyethylen (LKB, 2208-180) in Polymerisationslösung (15ml Infiltrationslösung + 1 ml Härter II). Nach Aushärtung des Kunststoffes und Entfernung der Einbettungsform konnten die Blöcke mit einer Laubsäge getrimmt und mit Sekundenkleber auf Holzklötzchen aufgeklebt werden. Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Reichert- Jung, Mod. 1140 / Autocut) und einen Hartmetallmesser angefertigt. Die Schnittdicke betrug 1,5 -2 µm. Vor dem Färben wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogenen und 3 min auf 150 °C erhitzt.

Bei Paraffineinbettung wurden die Proben genau wie bei der Technoviteinbettung fixiert und entwässert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit:

- 2- Propanol, 1h.
- 2- Propanol mit 0,01% Eosin, 2h..
- 2- Propanol: Xylol = 3:1, 1h.
- 2- Propanol: Xylol = 1:1, 1h.
- 2- Propanol: Xylol = 1:3, 1h.
- Xylol, 3 X, mind. Je 4 h.

Danach wurden die fixierten Proben mit dem doppelten Volumen geschmolzenen Paraffins in offenen Gefäßen überschichtet. Dann wurden die Proben in folgenden Schritten behandelt:-

- 24h bei 20°C.
- 24h bei 40 °C.
- 24h bei 62 °C.
- geschmolzenes Paraffin 3x12h bei 62 °C.
- Einbettung mit geschmolzenem Paraffin.

Die eingebetteten Proben wurden mit dem Mikrotom (Leitz 1400, GMBH) geschnitten. Die Paraffinschnittdicke betrug 7-9 µm. Die Schnitte wurden mit verschiedenen Farblösungen wie folgt behandelt:

2.4.1 GMA-Schnitte-Färbung:

Toluidinblau 0:

Die Toluidinblaufärbung zur Sichtbarmachung von Zellstrukturen erfolgte nach Feder und O'Brien 1968. Dazu wurden die Schnitte in folgenden Schritten gefärbt:

- H₂O , 5 Min.
- 0,05% Toluidinblau 0 in H₂O (w/v), 5Min.

- mit H_2O kurz abspülen.
- Lufttrocknen.
- Eindecken mit DPX.

Safranin 0 +Azur II :

Die Schnitte wurden nach Gutmann (1995) in folgenden Schritten gefärbt:

- 1% Safranin 0 in 50% Ethanol (w/v), 5 Min.
- mit H_2O kurz abspülen.
- 0,5% Azur II in dest. Wasser (w/v), 2-3 Min.
- mit H_2O kurz abspülen.
- Lufttrocknen.
- Eindecken mit DPX.

Perjodsäure -Schiff (PAS)-Reaktion:

Die Schnitte wurden nach Feder und O'Brien 1968 in folgenden Schritten gefärbt:

- gesättigte wässrige Lösung von Dimedon 24 Stunden (0,5g Dimedon +100 ml H_2O werden 5 Stunden lang gerührt und anschließend filtriert.).
- auswaschen mit H_2O , 6x5 Min.
- 0,5% wässrige H_5JO_6 , 10 Min.
- auswaschen mit H_2O , 10x 3 Min.
- Schiffes Reagenz bis zur Rotfärbung (ca. 30 Min).
- 0,5% wässrige $Na_2S_2O_5$, 5x3 Min.
- auswaschen mit H_2O , 5x3 Min.
- Lufttrocknen.
- Eindecken mit DPX.

PAS + Anilinblau:

Die Färbungsschritte sind wie in 2.4.3 bis zum 7. Schritt und dann:

- 1% Anilinblau in 7% Essigsäure, 5 min.
- Überschüssigen Farbstoff auswaschen mit H₂O
- Lufttrocknen.
- Eindecken mit DPX.

2.4.2 Paraffin-Schnitte-Färbung:**Suberin-Nachweis mit Sudan-III:**

Die Schnitte wurden im Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in H₂O gebracht.

- 1 Tropfen einer Mischung von 1 Volumenteil 2% Sudan III (w/v) in Ethanol (96%) und einem Volumenteil Glycerin auf entparaffinierte Paraffinschnitte.
- Deckglas auflegen.
- nach 48 Stunden bei RT mikroskopische Auswertung.

Lignin-Nachweis mit Phloroglucin-Salzsäure:

Auf entparaffinierte Paraffinschnitte wurde ein Tropfen einer 1%igen Lösung von Phloroglucin in Ethanol gegeben und ca. 2 Min lang einwirken lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Filterpapier abgesaugt, ein Tropfen 25%ige HCl zugesetzt und ein Deckglas aufgelegt.

2.5 Probenfixierung und Einbettung für Elektronenmikroskopie

(EM):

Die Proben (Wurzeln ca. 1,5 - 2 mm lang und Blätter ca. 1,5 - 2 mm² mit oder Nekrosen / Rebläuse) für EM wurden in folgenden Schritten fixiert und eingebettet :

- Fixierung mit 2% Glutaraldehyd für Elektronmikroskopie (Serva) in 0,1M CP pH 6,8 , 4 Stunden bei RT.
- auswaschen in CP 3x20 Min ,und über Nacht bei RT.
- Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid in 0,1M CP, 1 Stunde
- auswaschen in H₂O , 3x30 Min.
- Entwässerung der Proben erfolgte über aufsteigende Ethanolreihen (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 96% und 100% ,je 1 Stunde, für Einbettung in Epoxidharz nach Spurr (1969) außerdem über Propylenoxid (PrO).
- Einbettung in Spurr Epoxidharz nach Spurr:

Die Proben wurden aus PrO in mehreren Schritten in Epoxidharz überführt:

- PrO : Epoxidharz =3:1 , 12 Stunden , 20 C°.
- PrO : Epoxidharz =1:1 , 12 Stunden , 20 C°.
- PrO : Epoxidharz =1:3 , 6 Stunden.
- Epoxidharz , 6 Stunden, 20C°.

Danach erfolgte die Einbettung der Proben in 100% Epoxidharz in Einbettungsformen (Plano W. Plannet GmbH) und die Polymerisation bei 70 °C für 8 bis 12 Stunden. Die eingebetteten Proben wurden mit dem Ultramikrotom geschnitten. Die Dicke der Ultradünnschnitte betrug 80 nm (Ultracut S, Leica), wurden mit Uranyl -acetat und Lead Citrat gefärbt. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte mit EM 900 von Zeiss (heißt jetzt LEO).

2.6 Bestimmung der Enzymaktivität:

2.6.1 Peroxidase (PO) und Polphenoloxidase (PPO):

Probenaufbereitung :

Die Wurzeln der Unterlagssorte `Börner` mit oder ohne Nekrosen (Wurzelnekrosen ca.2 Tage Alt) wurden vom Wurzel-Kultur-System (Abb. 4) gesammelt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Aufbereitung wurde jeweils 0,5g Wurzeln kleingeschnitten und mit 5ml TRIS-Puffer, pH: 8,2 (siehe Anhang S. 100) in einem Potter (Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 15 Min. bei 10000g zentrifugiert (Eppendorf-Centerfug). Der Überstand wurde als Rohextrakt für die Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet. Die Probenaufbereitung und die Zentrifugation erfolgten bei 4°C .

Bestimmung der Enzym-Aktivität

Peroxidase:

Die Bestimmung der Peroxidase erfolgte nach Pütter (1974), verändert von Sopp (1993). Ein Aliquot der Probe (50 μl) wurde mit 2700 μl Natriumacetat- Puffer (0,1M, pH. 5,2) und 200 μl Guajacol (10 mg/ml) in eine Glasküvette einpipettiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 100 μl H_2O_2 (1%ig). Das Produkt der Dehydrogenierung - das Oktadehydro-tetraguajacol- wurde photometrisch bestimmt. Die Extinktion wurde bei 436 nm und 25°C zu Beginn der Reaktion und nach 5 Min. mit dem Spektralphotometer Modell SP8-10 (Fa. Philips" Pye Unicam") gemessen.

Polyphenoloxidase:

Die Polyphenoloxidase - Aktivität wurde nach der Methode von Batra & Kuhn (1975), verändert von Schneider-Müller (1991), ermittelt. Einem Aliquot der Probe (500µl) wurde 2000 µl Sörensen-Phosphat-Puffer (50mM, pH 6,5) mit 1mM Ethylendinitrilo- Tetraessigsäure (EDTA) zugegeben. Danach wurden dem Testansatz 500µl Substrat (10 mM Brenzcatechin und 1mM Chlorogensäure in Sörensen - Phosphat - Puffer) hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Als Reaktionsprodukte entstandene Chinone färbten die Lösung dunkel. Diese Färbung wurde mit dem Spektralphotometer nach 10 Min. bei 410nm gemessen.

2.6.2 Phenylalanin-Ammoniumlyase-Aktivität (PAL):

Probenaufbereitung:

Die Wurzelproben 0,5 g (mit oder ohne Nekrosen) wurden mit 10 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,2 mit einem Potter homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 15 Min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt für die Tests eingesetzt.

Bestimmung der Enzym-Aktivität:

Ein Aliquot Probe wurde mit Phenylalanin inkubiert. Phenylalanin wird im Gegenwart von Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL) zu Trans-Zimtsäure desaminiert. Zimtsäure absorbiert im Gegensatz zu Phenylalanin bei einer Wellenlänge von 290 nm. Die Aktivität der PAL kann deshalb anhand der Zunahme der Absorption bei 290 nm verfolgt werden (Zucker 1968, verändert von Schneider-Müller 1991).

Testansatz:

500 µl Probe
+3000 µl 50 mM Natrium-Borat/HCl-Puffer, pH 8,8
mit 5mM Mercaptoethanol
+250 µl 60mM Phenylalanin
in 50 mM Natrium-Borat/HCl-Puffer, pH 8,8

Inkubation: 10 min bei 37 °C

Photometrie erfolgte bei 290 nm

2.7 Proteintest (nach Bradford 1976):

Die Probenaufbereitung ist genau wie 2.6.2. Zur Bestimmung des Gehaltes an löslichen Proteinen wurde ein Aliquot der Probe mit Bradford-Reagenz vermischt und nach 15 min die Farbveränderung spektralphotometrisch bestimmt. Bei der Bindung des Farbstoffes an die Proteine wird die ursprünglich rote Farbe des Farbstoffes zum kurzwelligen Bereich des Spektrums verschoben und die Reaktionslösung wird blau.

Bradford-Reagenz:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 ml 95%-igem Äthanol lösen, mit 100 ml 85%-iger Orthro-Phosphorsäure (H₃PO₄) versetzen und auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen.

Testansatz:

200 µl Probe
3 ml Bradford-Reagenz
Inkubation: 15 min Bei Zimmertemperatur
Photometrie bei 595 nm.

2.8 Bestimmung der Gesamtphenole:

Die Bestimmung der Gesamtphenole, mittels Folin - Ciocalteu - Reagenz (FCR), (Merck) erfolgte nach der Mikromethode von Ritter (1992). Die Gesamtphenole wurden von den Blättern Nr. 1,2,3,4 und 5 ausgehend von den Sproßspitzen der Rebsorten `Börner`, `SO4` und der Ertragsorte `Riesling` bestimmt (erstes Blatt ist noch nicht entfaltet).

Probenaufbereitung

Die Blätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Zur Aufbereitung wurden jeweils 2g Probe kleingeschnitten und mit 100ml 6% iger HCl in Ethanol (96%) homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 min im Wasserbad inkubiert und dann filtriert. Die Proben wurden im Vakuum Rotationsverdampfer (Rotavapor- R & RE) verdampft.

Messung:

8,4 ml dest. Wasser

(bei Kontrolle 8,5 ml dest. Wasser ohne Probe)

+0,1ml Probe

+0,5ml Folin - Ciocalteu - Reagenz in eine Reagenzglas geben

+1,0ml Natriumcarbonat -Lösung mischen und nach 60 Min. bei 720 nm gegen Kontrollwert messen.

2.9 Polyphenolanalytik von Wurzeln mittels HPLC :

Probenaufbereitung

Die Wurzeln mit oder ohne Nekrosen wurden vom Wurzel-Kultur-System (Abb. 4) gesammelt. Die Wurzeln, mit denen die Polyphenolanalytik durchgeführt wurde, waren zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und gelagert worden. Zur Aufbereitung wurden jeweils 0,5 g Wurzeln, kleingeschnitten und mit 100 ml 6%iger HCl in 96%igem Ethanol in einem Potter (Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert. Die Proben wurden membranfiltriert ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) und anschließend direkt injiziert. Die Auswertung der Phenolanalyse erfolgte nach Rechner et al (1998) und wurde graphisch dargestellt (HPLC-Bedingungen und Gradientenprogramm siehe Anhang S. 101).

2.10 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen:

Die Wurzeln der Unterlagesrebsorte 'Börner' und der Ertragsorte 'Riesling', sowie jeweils eine Hälfte von Blättern der Unterlagesrebsorten 'Börner' und 'SO4' wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IES, Aminosäurengemisch (L-Tryptophan, L-Glutaminsäure, L-Lysin, Histidin und L-Valin) und IES + Aminosäurengemisch behandelt. Die Applikation erfolgte durch Injektionen des o. g. Substanzen mit Hilfe eine feinen Glaskapillare; 1 Injektion pro Wurzelspitze, mehrere Injektionen pro Blatthälfte. Im Kontrollversuch wurden Wurzelspitzen bzw. die jeweils andere Blatthälfte mit dest. Wasser gespritzt.

Tabelle 1: Die verschiedenen Konzentrationen von IES, Aminosäuren, Aminosäurengemisch (in Anlehnung an: Anders (1958) und Schaller (1966)).

IES %	Aminosäuren %	Aminosäurengemisch % (W/V)
0,1	0,25	0,25
0,05	0,1	0,1
0,025	0,05	0,05
0,001	0,025	0,025

Bei der Gemeinsamen Applikation von IES und dem Aminosäuren-Gemisch wurden alle in Tabelle 1 genannten jeweiligen Konzentrationsstufen miteinander kombiniert.

2.11 Statistische Auswertung:

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Varianzanalyse mit F-Test und Mittelwertevergleich nach Duncan (1955). Hierfür stand das Statistikprogramm Super ANOVA zur Verfügung. Als Signifikanzniveau wurde 95%-Irrtumswahrscheinlichkeit ($P=0,05$) zugrunde gelegt.

3. Ergebnisse:

3.1 Histologische und cytologische Untersuchungen:

3.1.1 Mechanismus der Reblausresistenz der Wurzeln :

3.1.1.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen:

In aseptischen Kulturen von Mikrostecklingen der Rebsorte `Börner` und `Riesling` (s. Abb. 3) wurde versucht, die Wurzelnekrosen und Nodositäten zu induzieren. Die Larven schlüpften zwar nach einer Woche, sie starben aber bei `Börner` innerhalb eines Tages ab. Im Gegensatz dazu, starben bei `Riesling` die Reblauslarven nicht ab und Nodositäten konnten induziert werden. Deshalb müsste man nach anderer Möglichkeit suchen, um Wurzelnekrosen bei `Börner` zu induzieren.

3.1.1.2 Unsteriles Wurzel-Kultur-System:

Im unsterilen Wurzel-Kultur-System (s. Abb. 4) schlüpften die Reblauslarven innerhalb einer Woche, unabhängig davon, ob die Eier oberflächlich sterilisiert wurden waren oder nicht. Nach ca. einer weiteren Woche entwickelten sich Seitenwurzeln, die von den Rebläusen angestochen wurden. Infolgedessen entwickelten sich die Wurzelnekrosen bei `Börner` und die Nodositäten bei `Riesling`.

In diesem System kam es bei `Börner` als Folge des Reblausangriffs zur Bildung von Nekrosen. Es gibt verschiedene Nekrosentypen auf den Wurzeln. Das hängt von Alter des entsprechenden Wurzelabschnittes zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches ab.

3.1.1.2.1 Wurzelnekrosen Typ I:

Dieser Nekrosetyp entwickelte sich in wenig differenzierten Wurzelgeweben. Die Rebläuse stachen ihre Rüsselspitze durch die Calyptra in die erste oder zweite Zellschicht ein. Etwa 5 Stunden danach färbte sich das Gewebe um die Einstichstelle im Durchmesser von ca. 0,5 mm braun (Abb. 5 a). Abb. 5 b zeigte einen Querschnitt an dieser Stelle. Die Zellen im Einstichbereich streckten sich und plasmolysierten. Elektronenmikroskopische Auswertungen (Abb.6) zeigten, daß das Cytoplasma der Zellen im Einstichbereich von den Zellwänden stärker abgetrennt sind. Das Cytoplasma erscheint elektronendichter. Es wurde beobachtet, daß es einige Membranstrukturen zwischen degeneriertem Cytoplasma und den Zellwänden gibt. Diese Zellwände erschienen elektronendichter als die normalen Zellwände (Abb. 6 b). Etwa 12 - 24 Stunden nach dem Reblaus-Einstich starben alle Zellen im braun-gefärbten Einstichbereich ab und bildeten Wurzelnekrosen vom Typ I (Abb. 5c).

3.1.1.2.2 Wurzelnekrosen Typ II:

Dieser Nekrosetyp entwickelte sich in mehr differenzierten Wurzelgeweben. Es wurde beobachtet, daß die Reblaus immer in die Streckungszone einstachen. Die Rebläuse stachen ihre Rüsselspitze durch die Reste der Calyptra in die erste oder zweite Rindenzellschicht ein. Angestochene Zelle hatte eine konkave Form und erscheint im mikroskopischen Bild transparenter (Abb. 7 a). Angestochene und durchgestochenen Zellen starben ab und bildeten einen Stichkanal (Abb. 7 b). Abb. 9a zeigte einen Wurzelquerschnitt mit saugender Reblauslarve (ca. 7 Stunden nach dem Reblaus-Einstich).

Es ist bemerkenswert, daß die angestochene Zelle von mehreren Schichten cytoplasma-reicher Zellen umgeben war. Nach ca. 12 Stunden entwickelte sich eine begrenzte Braunfärbung von ca. 1 bis 1,5 mm Durchmesser um die Einstichstelle (Abb. 8a).

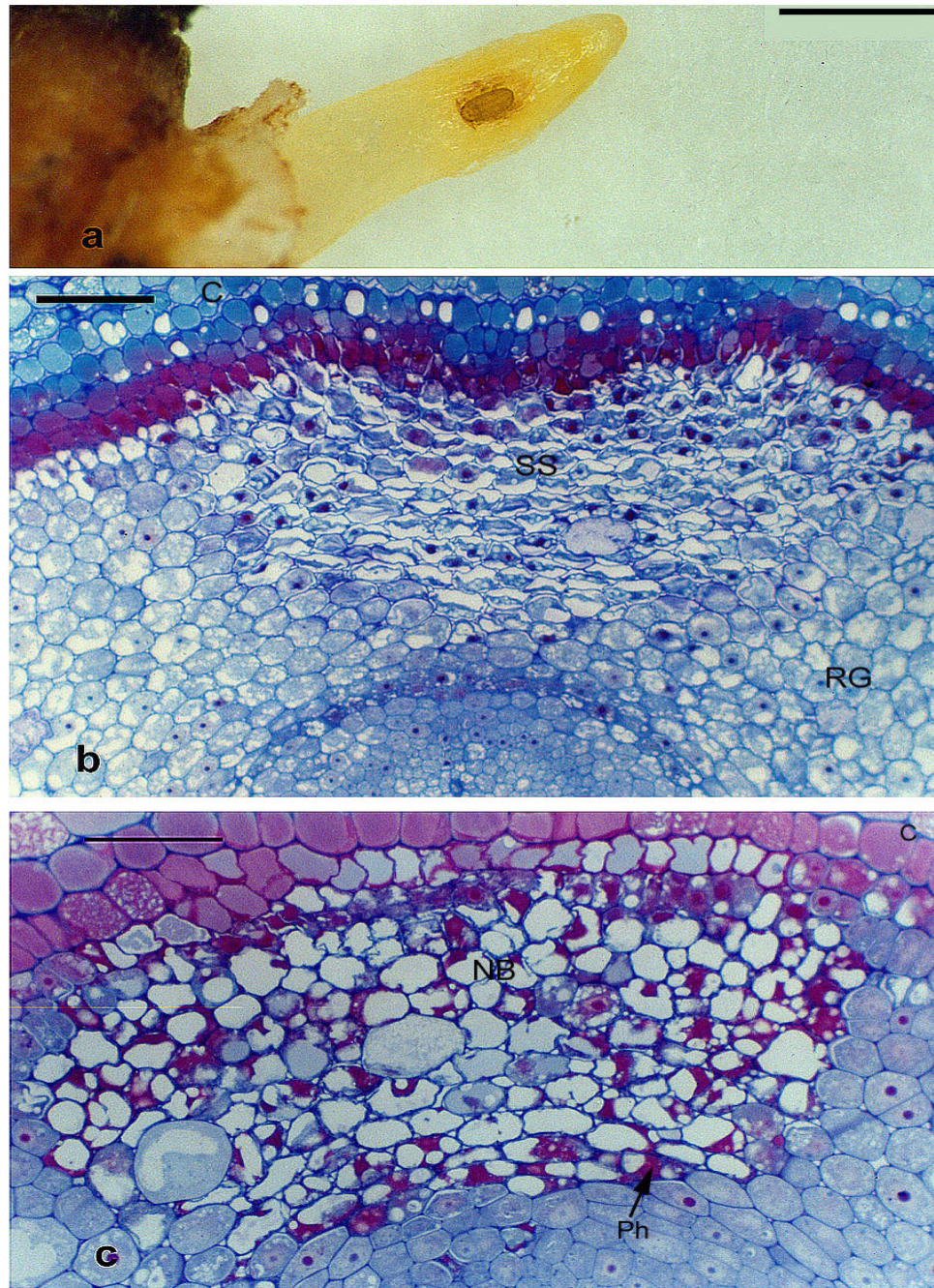


Abb. 5: Wurzelnekrose Typ I, Unterlagsrebsorte 'Börner'. a: Übersichtsaufnahme, Wurzelspitze mit saugender Reblauslarve. b und c: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten im Einstichbereich, Färbung: Safranin o - Azur II (b: ca. 5 h nach Reblaus-Einstich, c: ca. 24 h nach Reblaus-Einstich). C = Calyptra, Ph = Phenole, NB = nekrotisierte Zellen, RG = Rindengewebe, SS = Einstichstelle. (Balkenlängen: a = 1 mm, b und c = 100 µm).

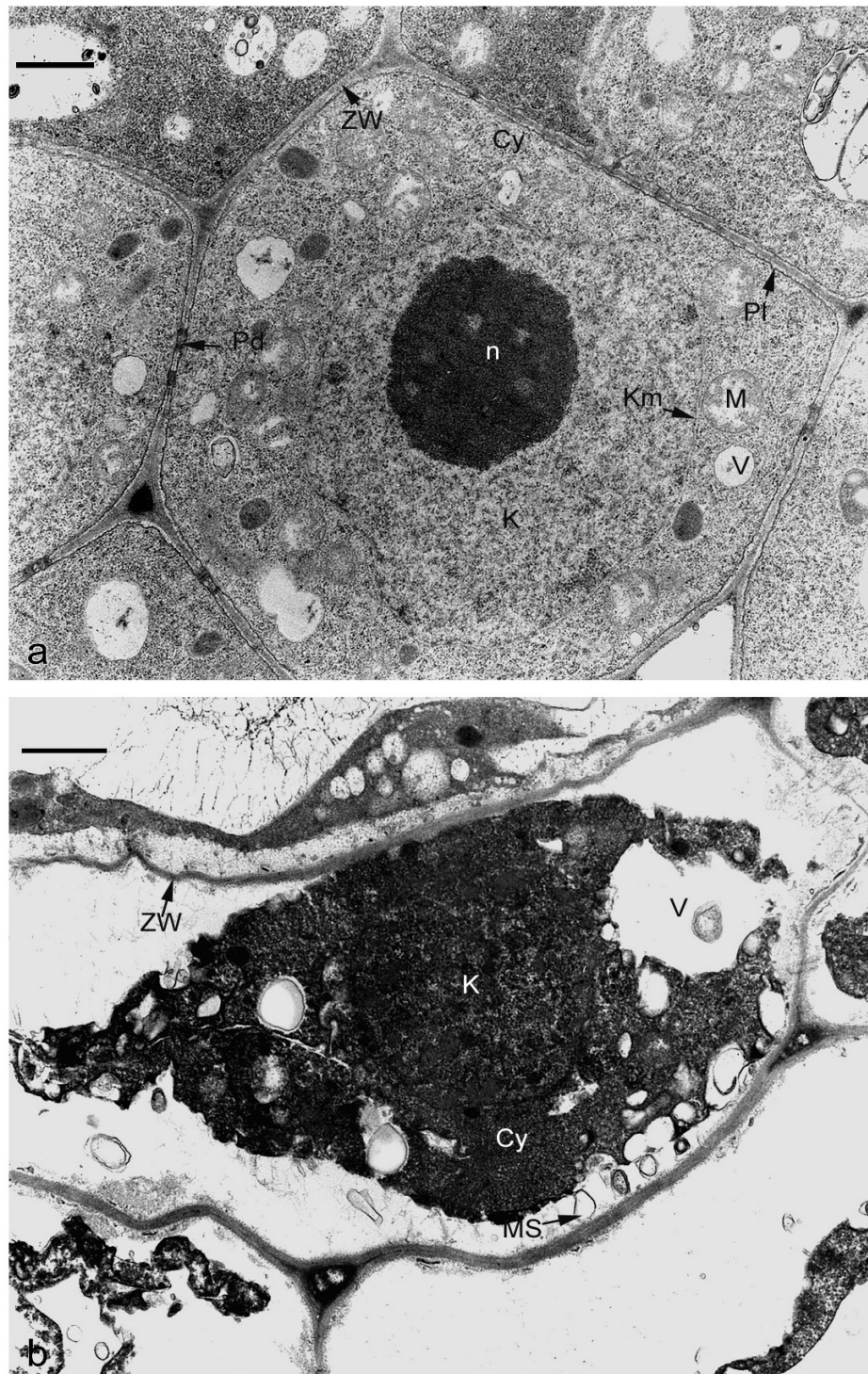


Abb. 6: Wurzelnekrose Typ I, Unterlagsrebsorte 'Börner', elektronenmikroskopische Aufnahmen. a: Kontrolle. : Zelle im Einstichbereich. Cy = Cytoplasma, K = Kern, Km = Kernmembranen, Pd = Plasmodesma, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlänge = 1,1 μm).

Abbildung 9 b zeigte einen Wurzelquerschnitt an dieser Einstichstelle. Die Zellen, die sich den cytoplasma-reichen Zellen in der Umgebung der Einstichstelle anschließen plasmolysierten. Aus den elektronenmikroskopischen Auswertungen (Abb.10) geht hervor, daß das Cytoplasma dieser Zellen von den Zellwänden stärker abgetrennt sind. Es wurde beobachtet, daß es Membranstrukturen in den Vakuolen und zwischen dem Cytoplasma und den Zellwänden gibt. Das Cytoplasma und Kernplasma dieser Zellen waren granulös. Die Kernmembranen dieser Zellen erschienen elektronendichter in einigen Zonen. An der inneren Kernmembran traten Blasen auf. Der Nucleolus fragmentierte sich (Abb. 11 a). Gleichzeitig starb eine Reihe von Zellen in der unmittelbaren Umgebung der angestochene Zelle ab. Während cytoplasma-reiche Zellen am Leben geblieben waren, kam es in der daran angrenzenden Zone von außen nach innen fortschreitend zum Absterben der Zellen (Abb. 8 a und 9b). Nach ca. 24 Stunden wurden phenolische Substanzen in diese Zellen eingelagert (Abb. 12a), und ihre Zellwände degenerierten (Abb. 14b). Etwa 48 Stunden nach dem Reblaus-Einstich starben diese Zellen ab (Abb. 12b).

Abb. 8b und 13a und b zeigten das Entwicklungsstadium der Wurzelnekrose Typ II nach 3 Tagen. Außerhalb der nekrotisierten Zellen, in der angrenzenden gesunden Geweben, kam es im Kontaktbereich zur Verdickung der Zellwände, und diese erschienen elektronendichter (Abb. 13 b und 14c und d).

Nach 2 bis 5 Tagen starben alle Zellen im Einstichbereich ab, und bildeten eine Wurzelnekrose vom Typ II (Abb. 13 c). Abbildung 15 zeigte 3 verschiedene Entwicklungsstadien der Wurzelnekrose vom Typ II.

Es gibt eine Korrelation sowohl zwischen der Größe als auch der Entwicklungszeit der Wurzelnekrose vom Typ II und ihrer Position im Bereich der Streckungszone der Wurzel zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches. D. h., je älter der angestochene Wurzelbereich ist, desto größer sind Ausmaß und Entwicklungszeit der gebildeten Nekrose (Abb. 8a).

In der Abb. 16 ist zu sehen, daß die Wurzeln der anfälligen Rebsorte 'Riesling' sowohl an der Streckungszone als auch an Calyptrazone auf den Reblaus-Einstich mit Nodositäten reagierten, aber wenn die Nodositäten an der Calyptrazone entstanden, konnten die Wurzeln nicht weiterwachsen.

Abb. 17 zeigte einen Wurzelquerschnitt an der Einstichstelle in der Streckungszone der Wurzeln von 'Riesling' (ca. 24 Stunden nach dem Reblaus-Einstich). Die Rebläuse stachen ihre Rüsselspitze genau wie bei 'Börner' (o. g.) ein. Die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der angestochene Zelle teilten und streckten sich und enthielten dichtes reiches Cytoplasma. Als Folge davon wölbte sich die Einstichstelle vor (vgl. Abb. 12a).

Es ist bemerkenswert, daß die Rebläuse auf den Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner', im Gegensatz zur Ertragsrebsorte 'Riesling', keine Eier abgelegt haben. Die Rebläuse vermehrten sich nicht auf den Wurzeln von 'Börner'.

3.1.2 Mechanismus der Reblausresistenz der Blätter:

3.1.2.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen:

In aseptischer Kultur von Mikrostecklingen (s. 2.3.1) wurde versucht, Blattnekrosen bei 'Börner' zu induzieren. Die Reblauslarven schlüpfen nach ca. einer Woche, starben aber dann innerhalb eines Tages genau wie bei Wurzeln (s. o.) ab. Deshalb konnte man keine Blattnekrosen in diesem System induzieren. Im Gegensatz dazu stachen die Reblauslarven an den Blätter der Unterlagsrebsorte 'SO4' ein und verursachten Blattgallen. Es gelang uns, Blattnekrosen bei 'Börner' an intakten Pflanzen (Topfreben) zu induzieren (s. 2.3.2). Die Blätter reagierten auf den Reblausangriff nicht nur mit den Nekrosebildungen, sondern auch mit Gallbildungen. Diese Reaktionen hingen vom Alter der Blätter ab.

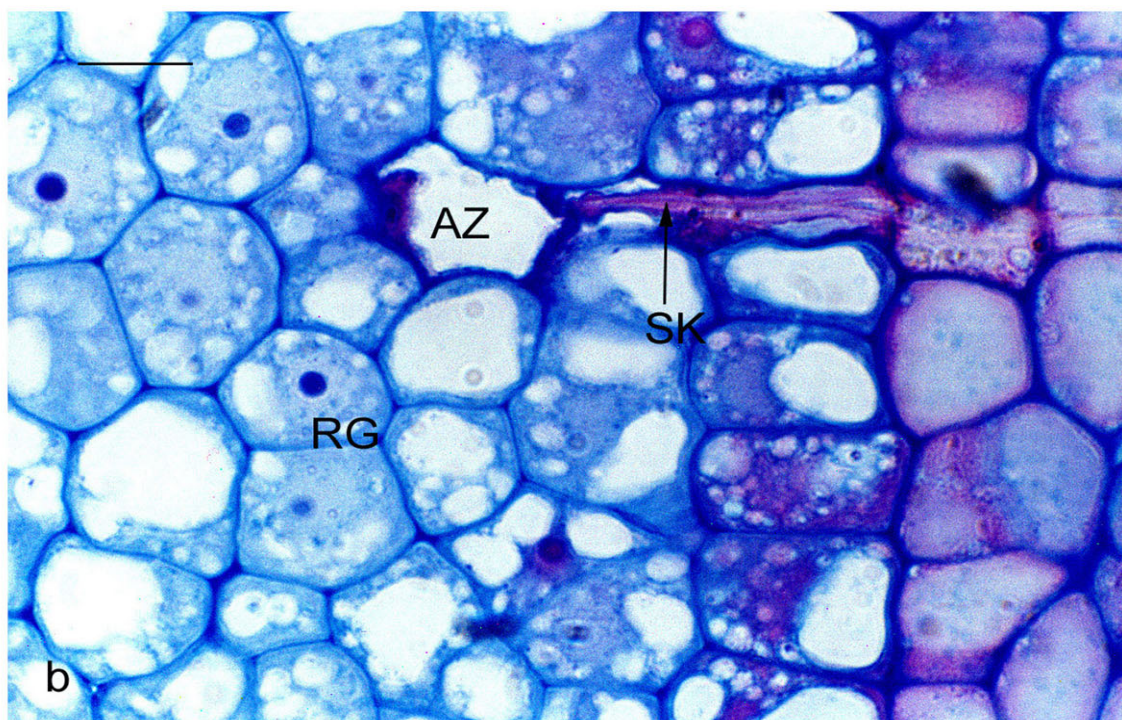
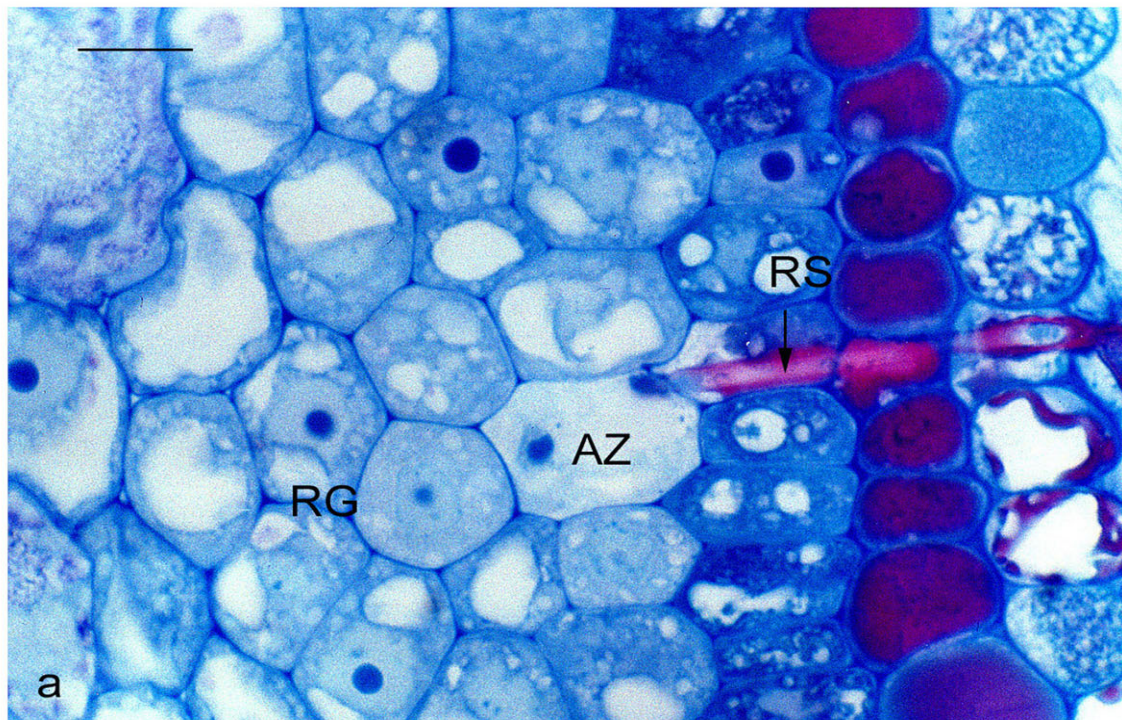


Abb. 7: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten im Einstichbereich. Färbung: Safranin O - Azur II. a: Rüsselspitze der Reblauslarve (RS). b: Einstichkanal (SK). AZ = angestochene Zelle, RG = Rindengewebe. (Balkenlänge = 10 µm).

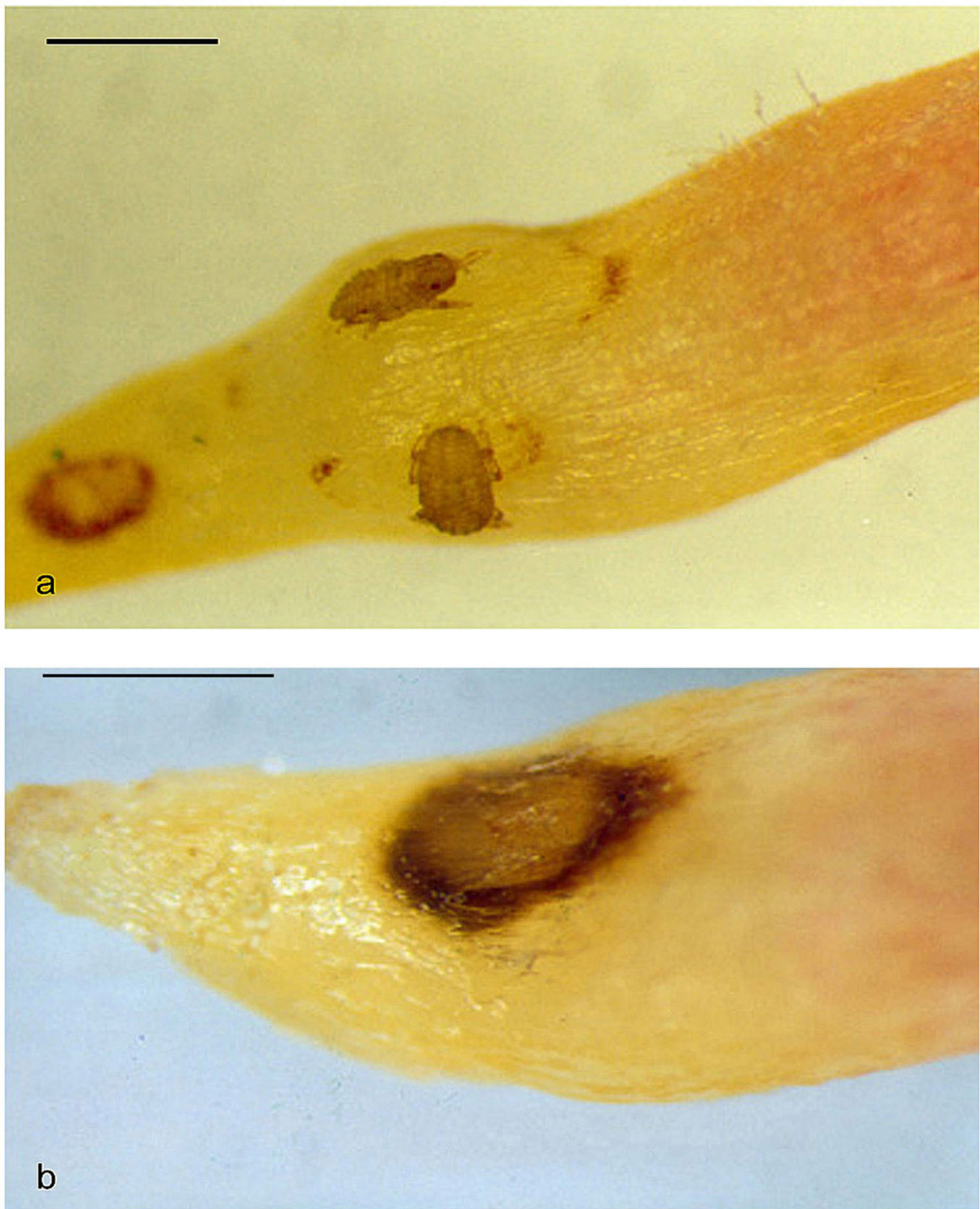


Abb. 8: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Übersichts-Aufnahmen von verschiedenen Stadien des Wurzelnekrosetypes II. a: ca. 12 h nach dem Reblaus-Einstich. b: ca. 3 Tage nach dem Reblaus-Einstich. (Balkenlänge = 0,5 mm).

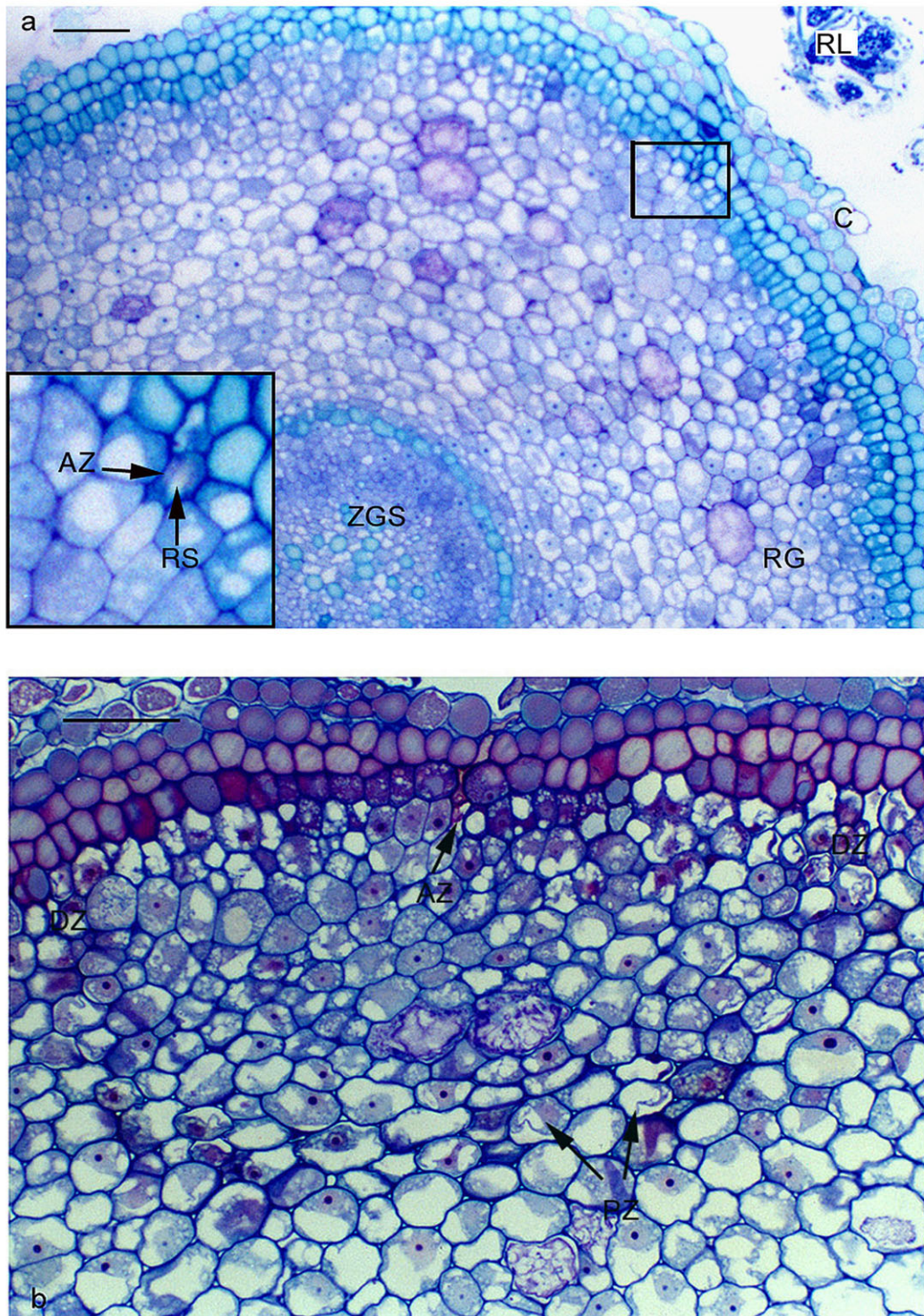


Abb. 9: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. a: ca. 7 h nach dem Reblaus-Einstich, Färbung: Toluidinblau. b: ca. 12 h nach dem Reblaus-Einstich, Färbung: Safranin O - Azur II. AZ = angestochene Zelle, C = Calyptra, DZ = degenerierte Zelle, RG = Rindengewebe, RL = Reblauslarve, RS = Rüsselspitze der Reblaus, ZGS = zentrales Gefäßsystem. (Balkenlänge = 50 µm).

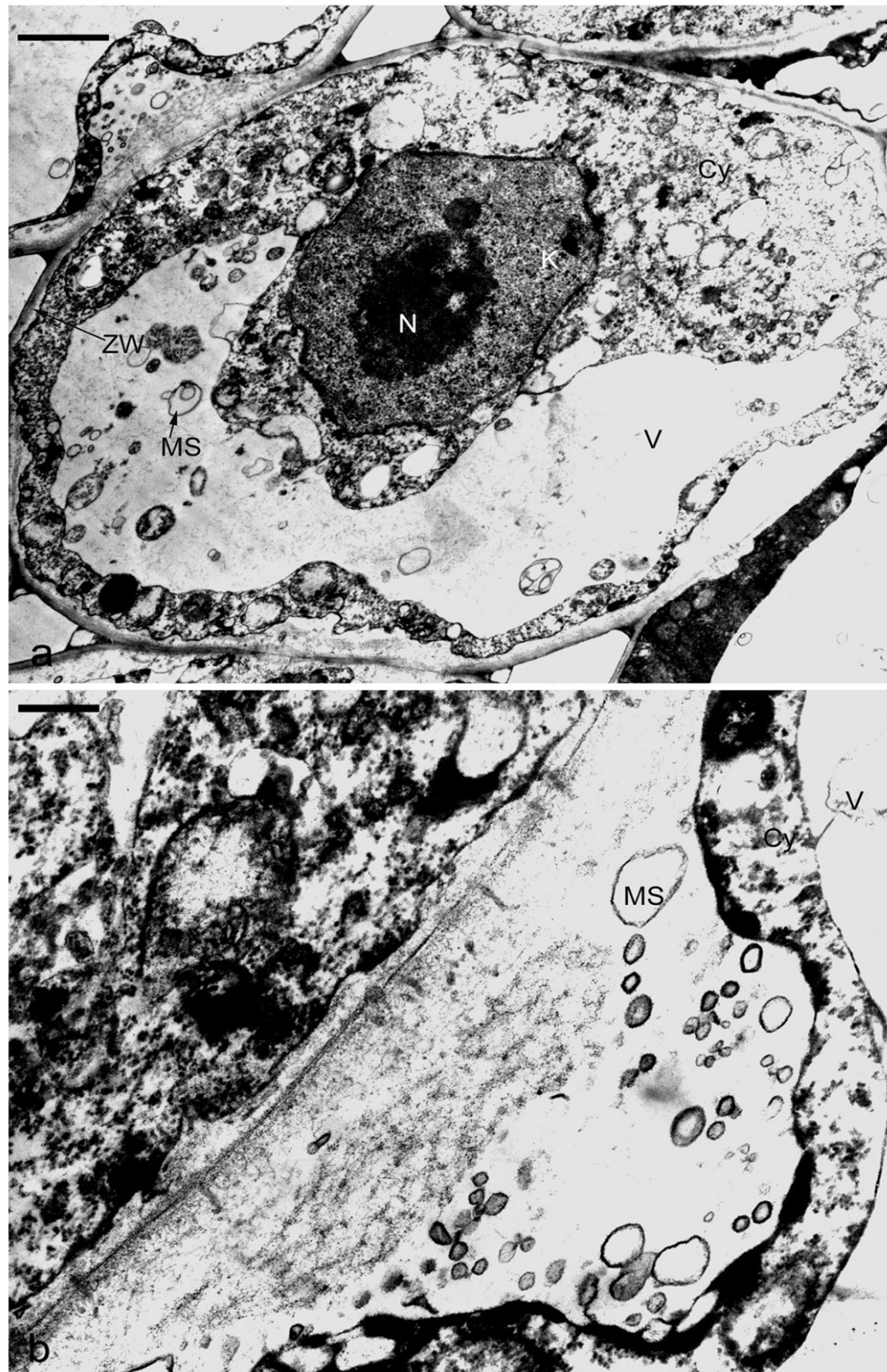


Abb. 10: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen degenerierter Zellen in der Umgebung der Einstichstelle (s. Abb. 9b). a: Übersichtsaufnahme einer Zelle. b: Starke Abtrennung des Cytoplasmas von Zellwand. Cy = Cytoplasma, BS = Membranstrukturen, N = Nucleolus, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlängen: a = 1,7 μm , b = 0,4 μm).

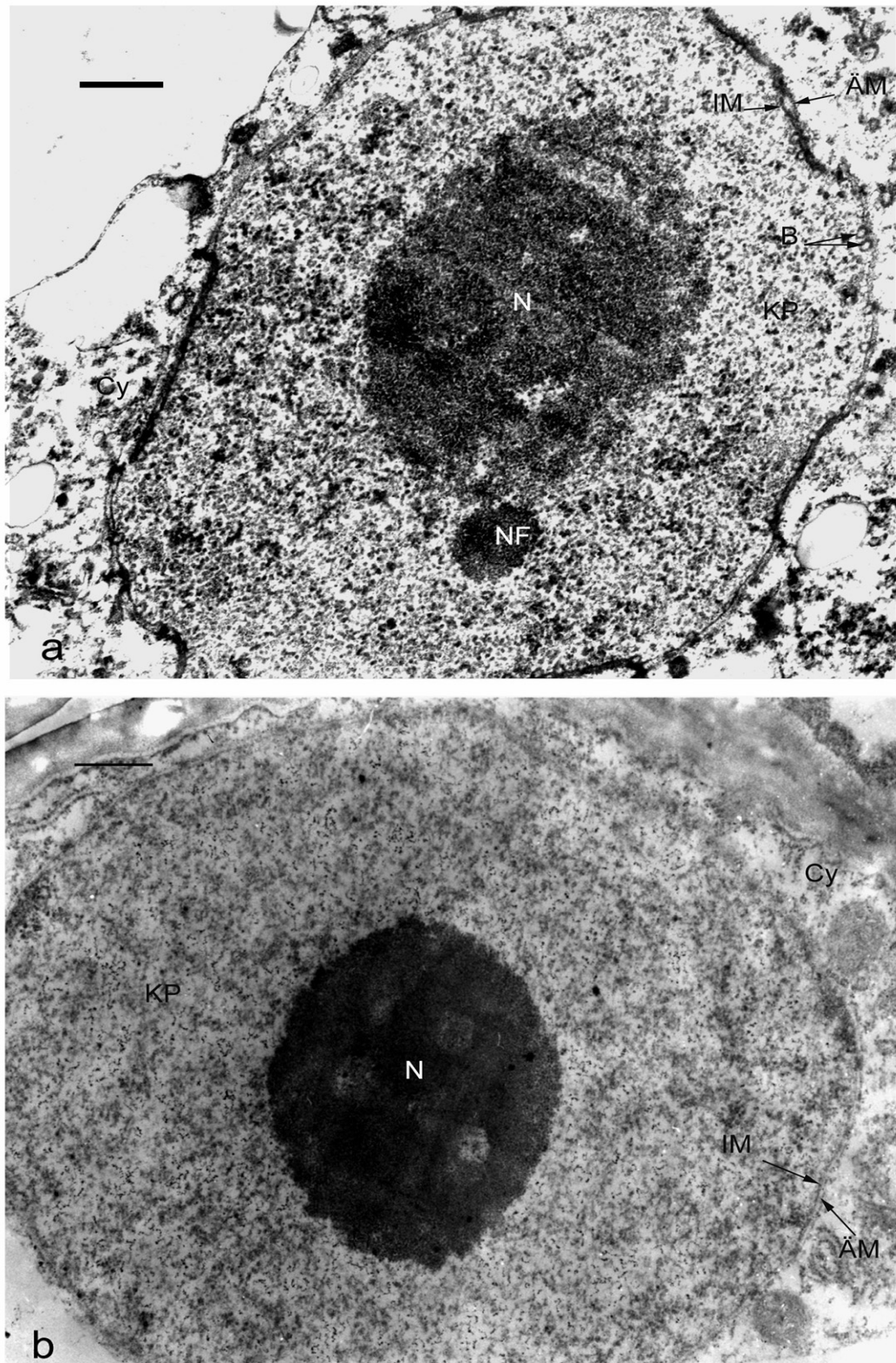


Abb. 11: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen. a: Veränderung der Kernstruktur der degenerierten Zellen (s. Abb. 9b und 10a). b: Kontrolle. AM = äußere Membran, B = Blasen, Cy = Cytoplasma, IM = innere Membran, N = Nucleolus, NF = Nucleolusfragment. (Balkenlänge = 0,6 µm).

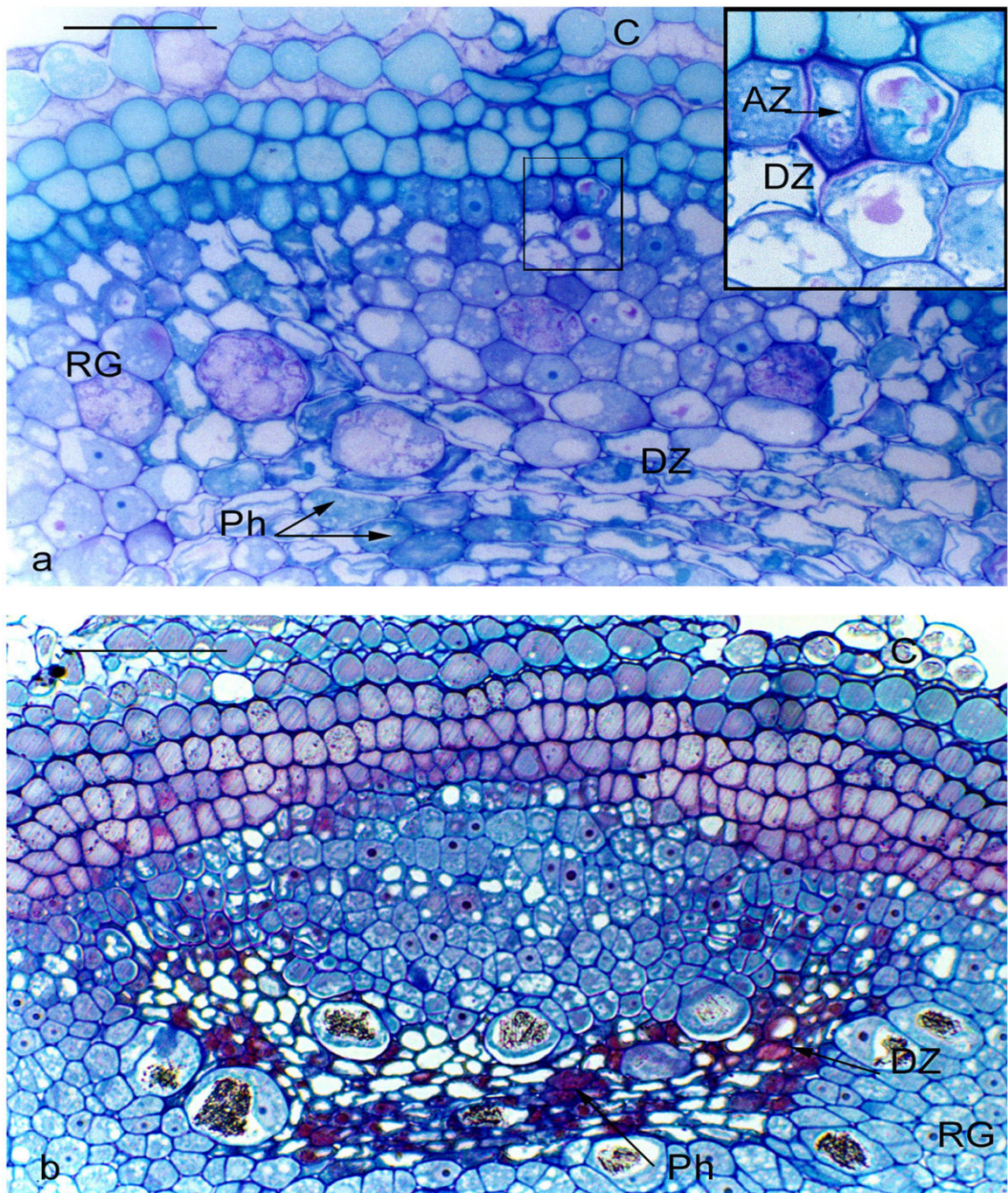


Abb. 12: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten im Einstichbereich. a: ca. 24 h nach dem Reblaus-Einstich, Färbung: Toluidinblau. b: ca. 48 h nach dem Reblaus-Einstich. AZ = angestochene Zelle, C = Calyptra, Ph = Phenole, Rg = Rindengewebe. (Balkenlänge = 100 µm).

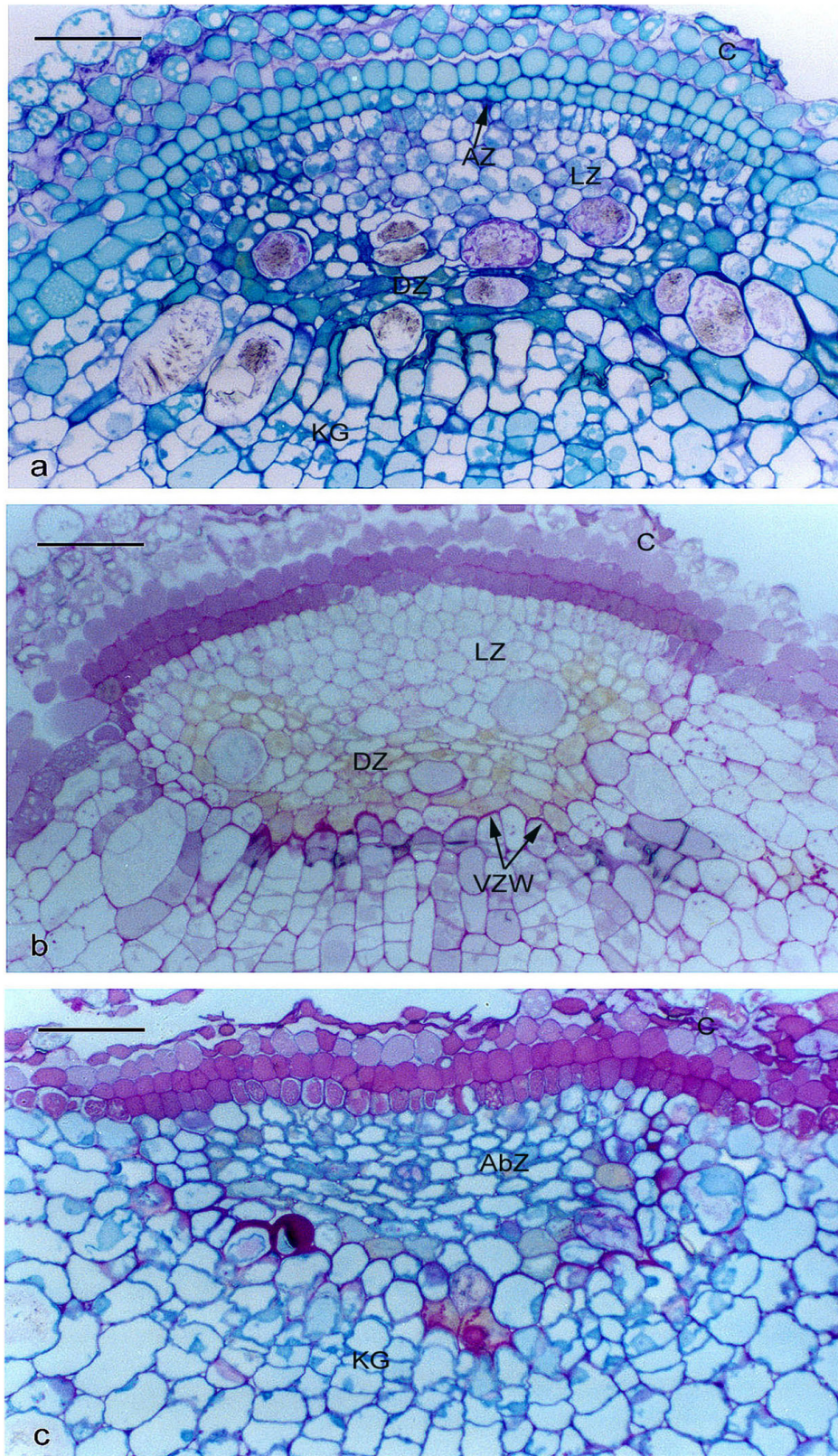


Abb. 13: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Lichtmikroskopische Aufnahmen von wurzelquerschnitten im Einstichbereich. a und b: ca. 72 h nach dem Reblaus-Einstich, Färbung: Toluidinblau, PAS. C: ca. 96 h nach dem Reblaus-Einstich, Färbung: PAS - Anilinblau. AbZ = abgestorbene Gewebe, VZW = verdickte Zellwände. (Balkenlänge = 50 µm).

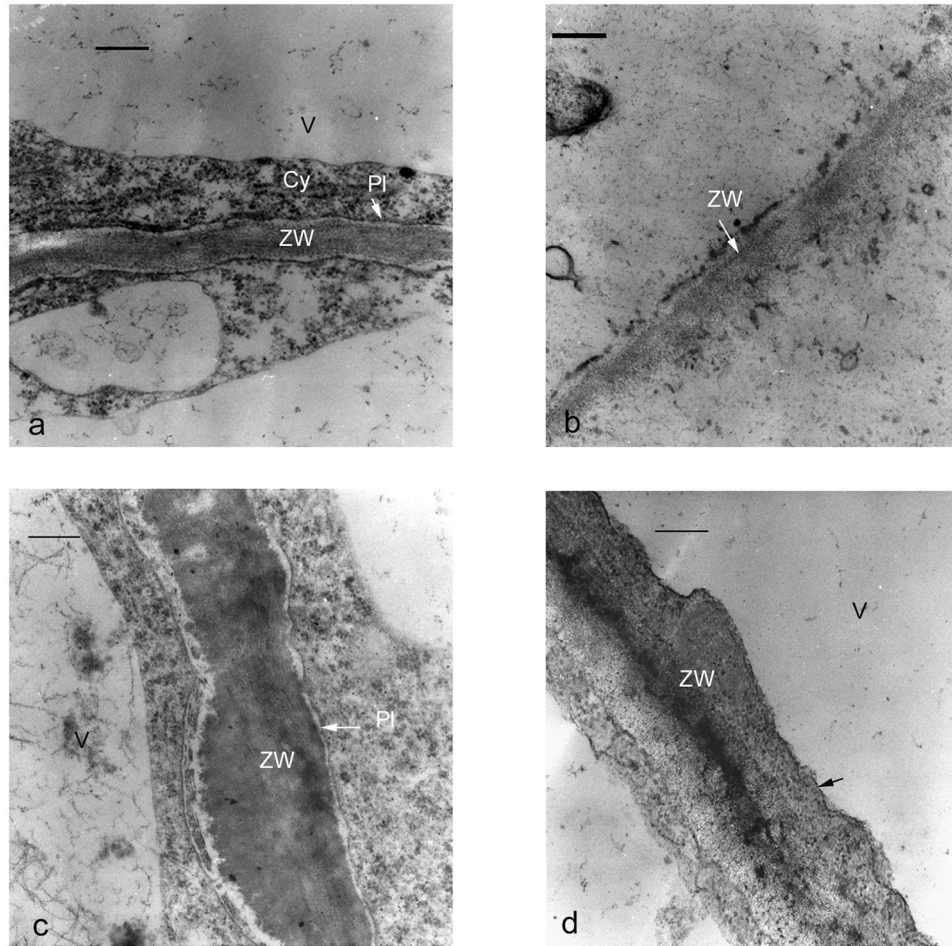


Abb. 14: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner', elektronenmikroskopische Aufnahmen. a: Kontrolle. b: Zellwand einer degenerierten Zelle. c: Zellwand zwischen Nekrosestelle und verkorkten Gewebe. d: Zellwand des verkorkte Gewebes. Cy = Cytoplasma, PI = Plasmalemma, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlängen: a, b und c = 0,4 µm, d = 0,25 µm).

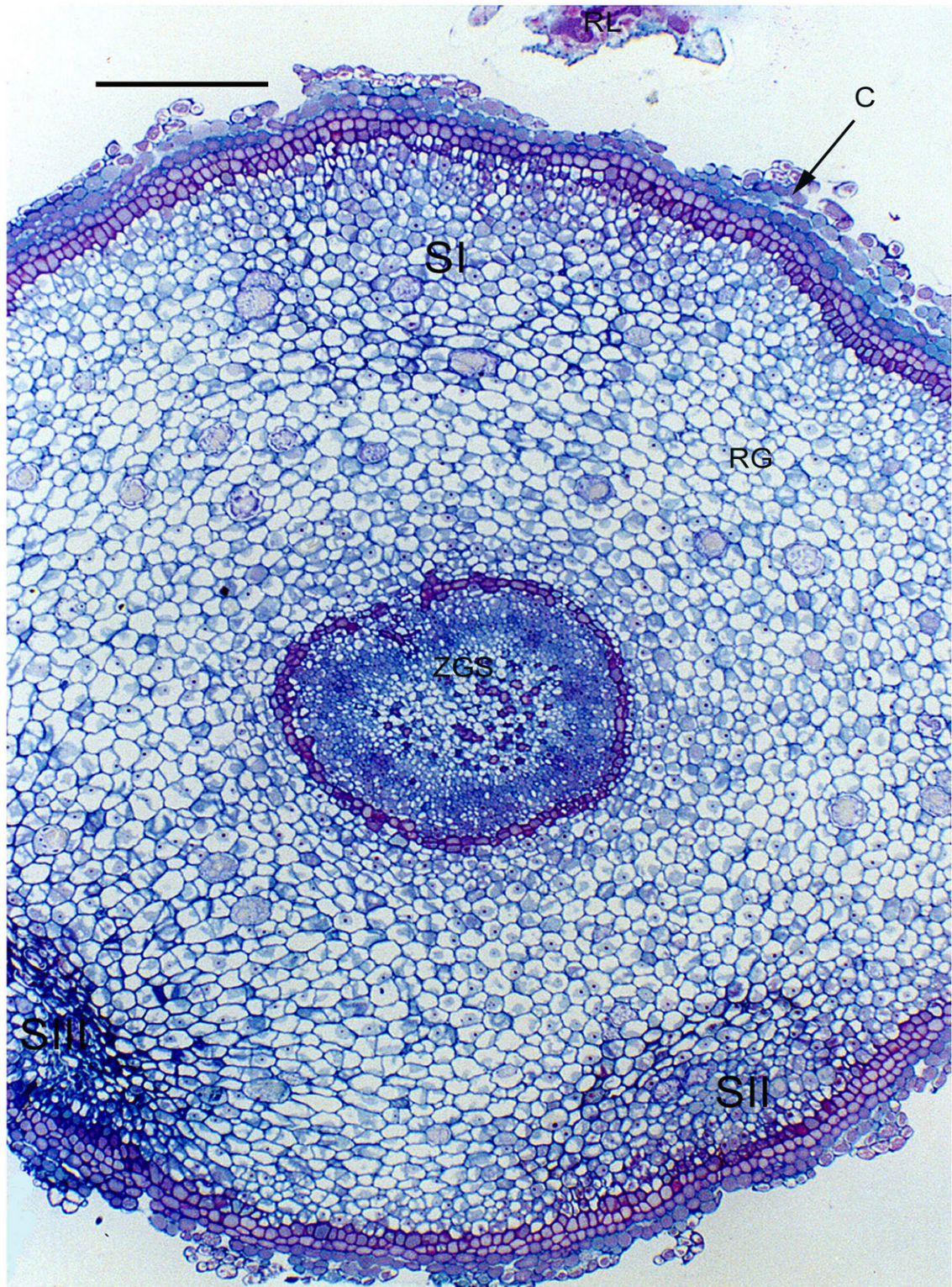


Abb. 15: Wurzelnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner', lichtmikroskopische Aufnahme von Wurzelquerschnitt im Bereich verschiedener Stadien der Nekrose, Färbung: Safranin O - Azur II. C = Calyptra, RG = Rindengewebe, RL = Reblauslarve, S I = Stadium 1, S II = Stadium 2, S III = Stadium 3, ZGS = zentrales Gefäßsystem,. (Balkenlänge = 200 µm).

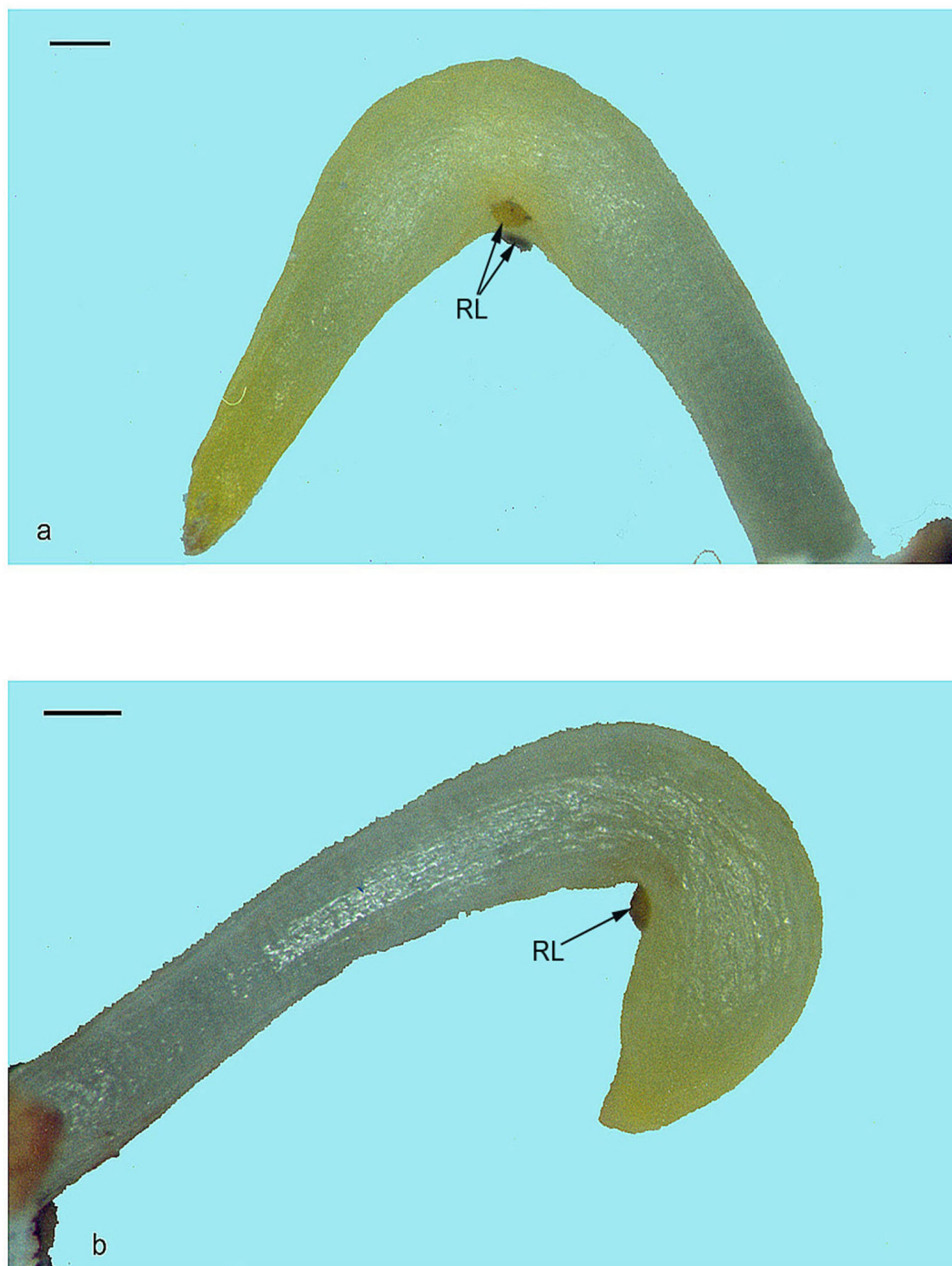


Abb. 16: Zwei verschiedene Nodositätenpositionen der Wurzel der Ertragsrebsorte 'Riesling'. a: Subterminalposition. b: Terminalposition. RL = Reblauslarve. (Balkenlänge: 0,5 mm).

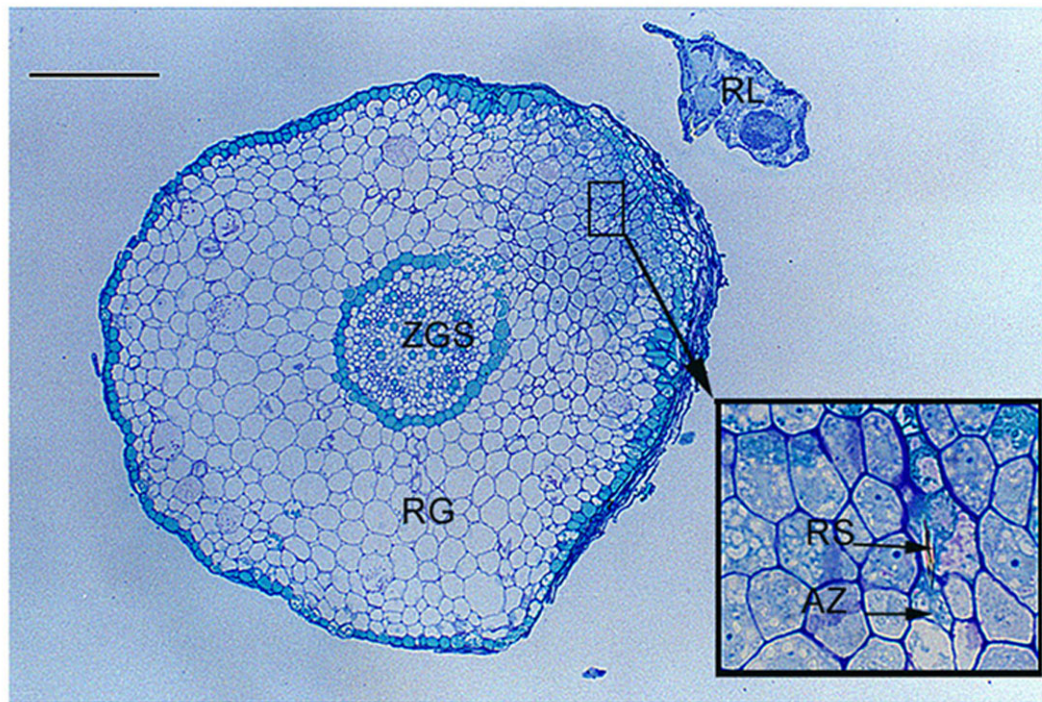


Abb. 17: Entwicklung der Nodosität der Wurzeln der Ertragsrebsorte `Riesling´ (ca. 24 h nach dem Reblaus-Einstich), Färbung: Toluidinblau. AZ = angestochene Zelle, RG = Rindengewebe, RL = Reblauslarve, RS = Rüsselspitze der Reblauslarve, ZGS = zentrales Gefäßsystem. (Balkenlänge = 200 µm).

3.1.2.1 Topfreben:

3.1.2.2.1 Nekrosebildungen:

3.1.2.2.2 Blattnekrosen Typ I:

Blattnekrosen vom Typ I traten an sehr jungen Blättern (noch nicht entfaltet) auf. Diese Blätter sind stark behaart (Haar / Fläche). In den Querschnitten findet man 6 Zellschichten, und diese Zellen enthalten dichtes, reiches Cytoplasma (Abb. 18 a und 19 a). Es wurde beobachtet, daß die Rebläuse immer an der oberen Seite der Blätter in der Nähe von jungem Leitgewebe in die zweite oder dritte Zellschicht einstachen. Die Zellen der oberen Schichten im Einstichbereich teilten und streckten sich und die Zellen der unteren Schichten waren stark vakuolisiert. Als Folge davon verdickte sich die Einstichstelle. Phenolische Substanzen wurden in den oberen Zellschichten eingelagert (Abb. 19 b bis e). Etwa 12 - 24 Stunden nach dem Reblaus-Einstich starben alle Zellen in der Einstichstelle ab, und bildeten eine Blattnekrose vom Typ I (Abb. 18 b und 19 f).

3.1.2.2.3 Blattnekrose Typ II:

Blattnekrosen vom Typ II traten an gerade entfalteten Blättern (1 bis 3 Blatt von oben) auf. In den Querschnitten sieht man bereits deutlich differenzierte Gewebe (obere und untere Epidermis, Mesophyll und Leitgewebe). Die Rebläuse stachen ihre Rüsselspitze in der Nähe von den Adern durch eine oder zwischen zwei oberen Epidermiszellen in Palisadenzellen oder in die erste Zellreihe des Schwammgewebes ein. Die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der angestochene Zelle teilten und streckten sich . Als Folge davon verdickte sich die Einstichstelle (Abb. 20a und b). Diese Zellen enthielten abnormale Chloroplasten. Die Chloroplasten streckten sich und degenerierten teilweise (Abb. 22 b). Das Cytoplasma dieser Zellen enthielt mehrere kleine Vakuolen und der Kern deformierte sich und fragmentierte (Abb. 21 b). Die Zellwände im Einstichbereich degenerierten teilweise und verdickten teilweise (Abb. 23 a). Danach wurden die Zellteilung

und Zellstreckung im Einstichbereich gehemmt, und bildeten eine sog. Hemmungszone (Becker, und Brückbauer, 1955): Gleichzeitig wurden die Zellteilung und die Zellstreckung der Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hemmungszone aktiviert (Abb. 20 b). Einige der Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hemmungszone streckten sich, enthielten elektronendichten Niederschlag, und verdickten ihre Zellwände (Abb. 20b und Abb. 23b). Außerhalb der aktivierten Zellen, in dem angrenzenden gesunden Gewebe, kam es im Kontaktenbereich zur Phenol-Einlagerung. Diese Zellen enthielten mehrere kleine Vakuolen, und ihr Cytoplasma war stärker von Zellwände abgetrennt. Danach degenerierten diese Zellen und starben ab (Abb. 18b, c und d, Abb. 24a und b , Abb. 25a).

Etwa 2 bis 20 Tage nach dem Reblausangriff starben alle Zellen im Einstichbereich ab, und bildeten eine Nekrose (Blattnekrose Typ II) (Abb. 24 c und d). Außerhalb des Nekrosebereiches, in dem angrenzenden gesunden Gewebe, kam es im Kontaktbereich zur Verdickung der Zellwände, und sie erschienen elektronendichter (Abb. 25b).

Es wurde beobachtet, daß es eine Korrelation sowohl zwischen der Größe als auch der Entwicklungszeit der Blattnekrose vom Typ II und den Alter der Blätter zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches gibt. Das bedeutet, je älter die Blätter waren, desto größer waren Ausmaß und Entwicklungszeit der gebildeten Nekrose (Abb. 18b, c und d). Im Freiland waren häufig abgestorbene Reblauslarven auf Blattnekrosen von 'Börner' zu finden (Abb. 26).

3.1.2.2.4 Blattgallen:

Die älteren Blätter der Unterlagsrebsorte 'Börner' (Blattebenen 3 bis 5) reagierten auf Reblausangriff nicht mit Nekrosebildungen, sondern mit Gallbildungen. Die Rebläuse stachen ihre Rüsselspitze genau wie bei Blattnekrose vom Typ II ein (s. o.). Die Zellen im Einstichbereich teilten und streckten sich . Als Folge davon verdickte sich die Einstichstelle. Danach wurden die Zellteilung und Zellstreckung im Einstichbereich gehemmt, und bildeten eine Hemmungszone. Gleichzeitig wurden die Zellteilung und die

Zellstreckung der Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hemmungszone aktiviert (genau wie bei frühem Entwicklungsstadium der Blattnekrose vom Typ II, o. g.). Infolgedessen entwickelte sich schwache (kleine) Blattgallen mit ca. 1,5 mm Durchmesser (Abb. 27a). Es wurde beobachtet, daß diese Blattgallen nicht wie die Blattgallen an der Unterlagsrebsorte 'SO4' Leitgewebe enthielten (Abb. 27 b und d). Phenolische Substanzen wurden in verschiedene Stellen der Galle ausgebildet (Abb. 27 a). Diese Blattgallen sind geöffnet geblieben (Abb. 27b und c). Nach ca. 5 Wochen wurde beobachtet, daß sich die Blattgallen braun färben (Abb. 27a). Aus dem Gallenlängsschnitt (Abb. 27c) geht hervor, daß nur die Zellen in der Vertiefung der Galle (Hemmungszone) abstarben.

Es war bemerkenswert, daß die Rebläuse hier keine Eier in diese Blattgallen abgelegt haben. Im Gegensatz dazu, stachen die Rebläuse ihre Rüsselspitze in die Blattgewebe anfälliger Rebsorten (z. B. 'So4') und legten gleichzeitig viele Eier ab.

Die Zahl und die Größe der Blattgallen der Unterlagsrebsorte 'SO4' nehmen von Blatt 4 zu Blatt 1 zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches zu (Abb. 28). Wenn die 5 oberen Blattebenen der Unterlagsrebsorten 'Börner' und 'SO4' entfernt wurden, konnten die Reblauslarven weder Blattnekrosen noch Blattgallen verursachen.

3.2 Histochemische Beobachtungen:

In den Zellwänden der Umgebung der Nekrosen des Typs II an den Wurzeln konnte man mit Sudan III-Färbung Suberin nachweisen (Abb. 29 a). Lignin konnte mit Phloroglucin-Salzsäure nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß die Nekrosestelle durch suberinisierte Zellwände isoliert wurde.

Im Gegensatz dazu konnte man mit diesen Färbungen des Nekrosentyps II an Blättern die Bildung von Lignin (Abb. 29 b), aber nicht Suberin nachweisen.

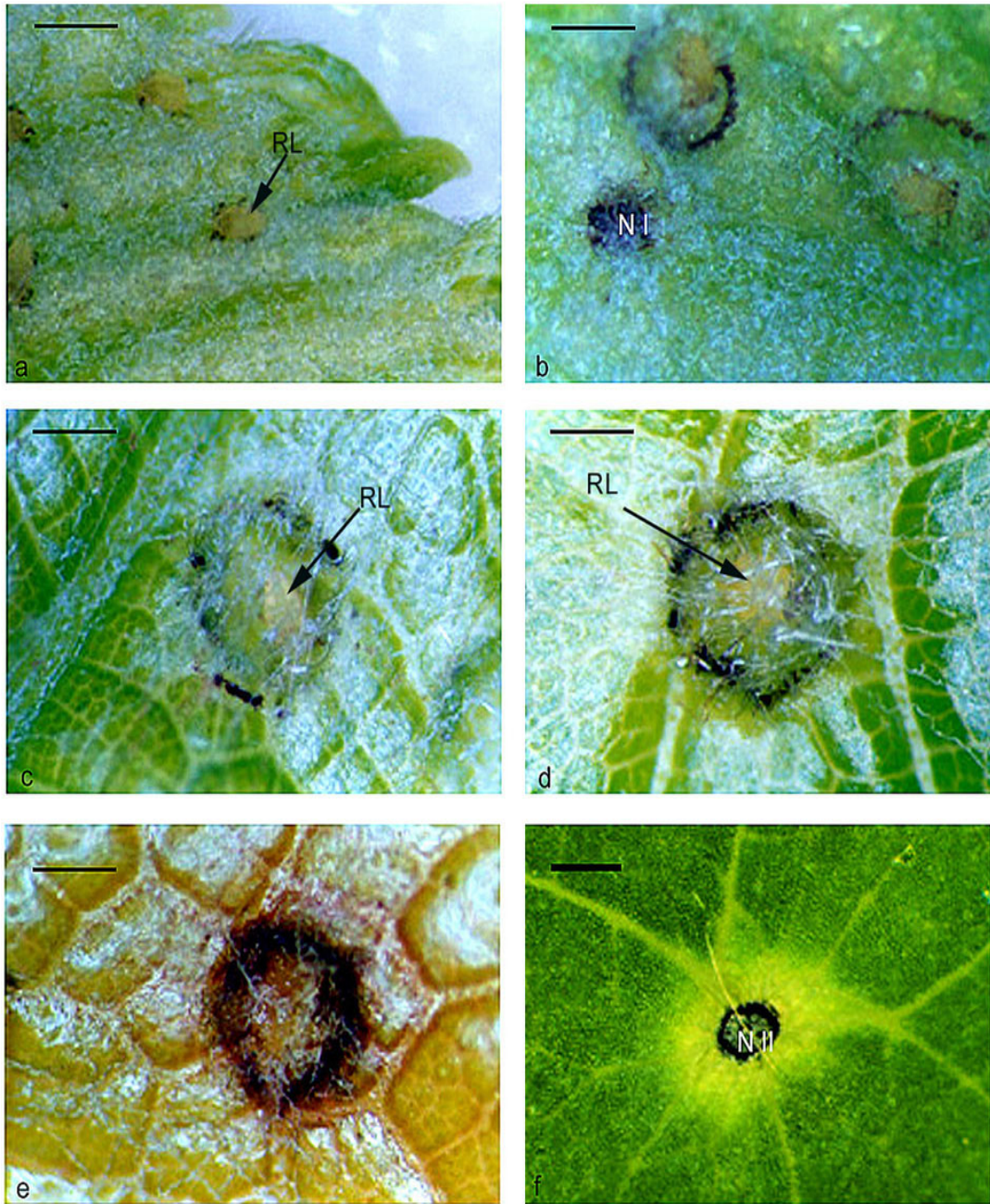


Abb. 18: Übersichts-Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien von Blattnekrosen der Unterlagsrebsorte 'Börner'. a und b: Blattnekrose Typ I (N I), Detail s. Abb. 19. B bis f: Blattnekrose Typ II (N II), Detail s. Abb. 20 bis 26. RL = Reblauslarve. (Balkenlängen: a bis e = 0,5 mm, f = 1 mm).

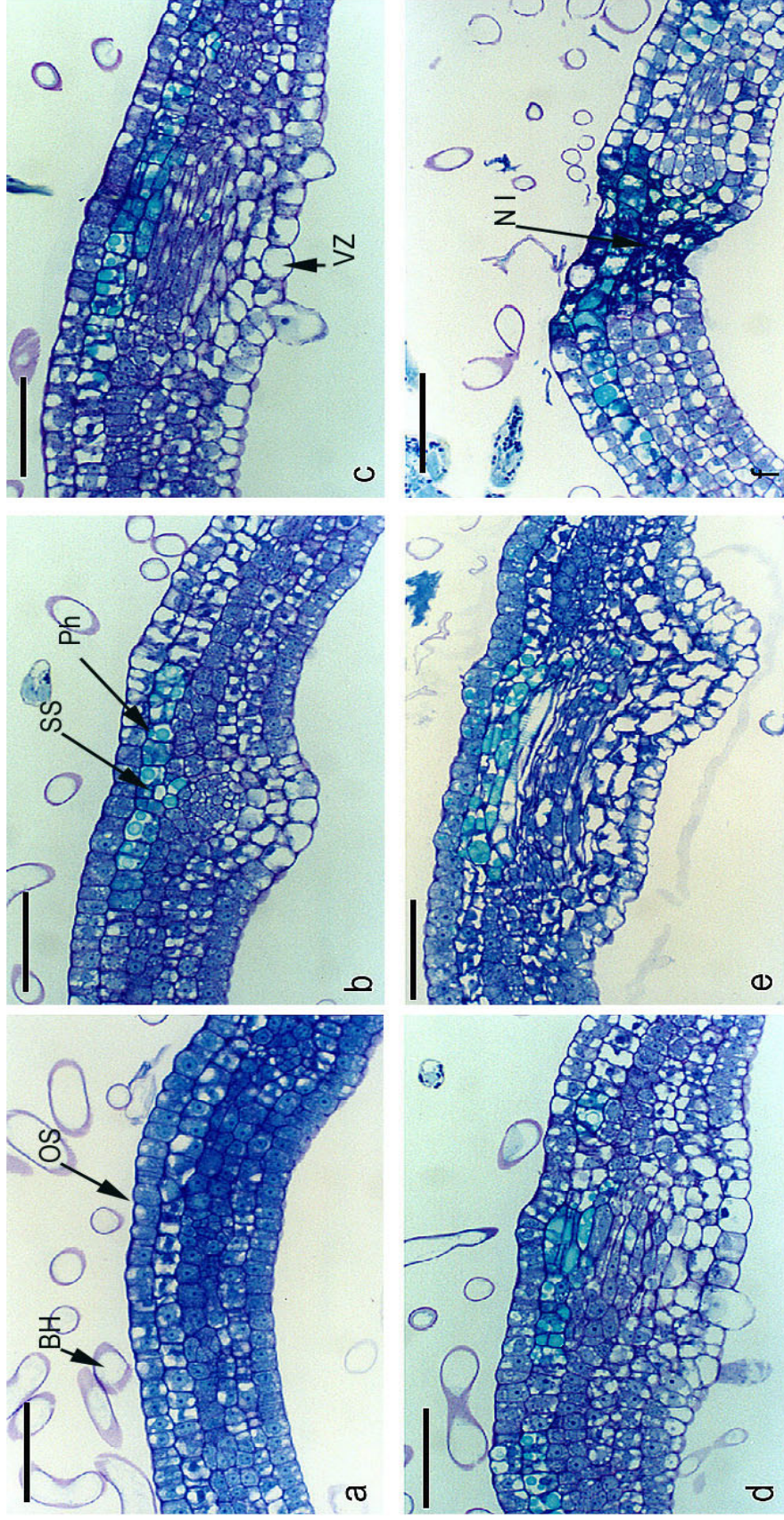


Abb. 19: Blattnekröse Typ I, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Färbung: Toluidinblau. a: Kontrolle. b bis f: verschiedene Entwicklungsstadien der Blattnekröse Typ I (N I). BH = Blatthaar, OS = obere Seite des Blattes, Ph = Phenole, RS = Rüsselspitze der Reblauslarve, SS = Einstichstelle, VZ = vakuolierte Zelle. (Balkenlänge = 100 µm).

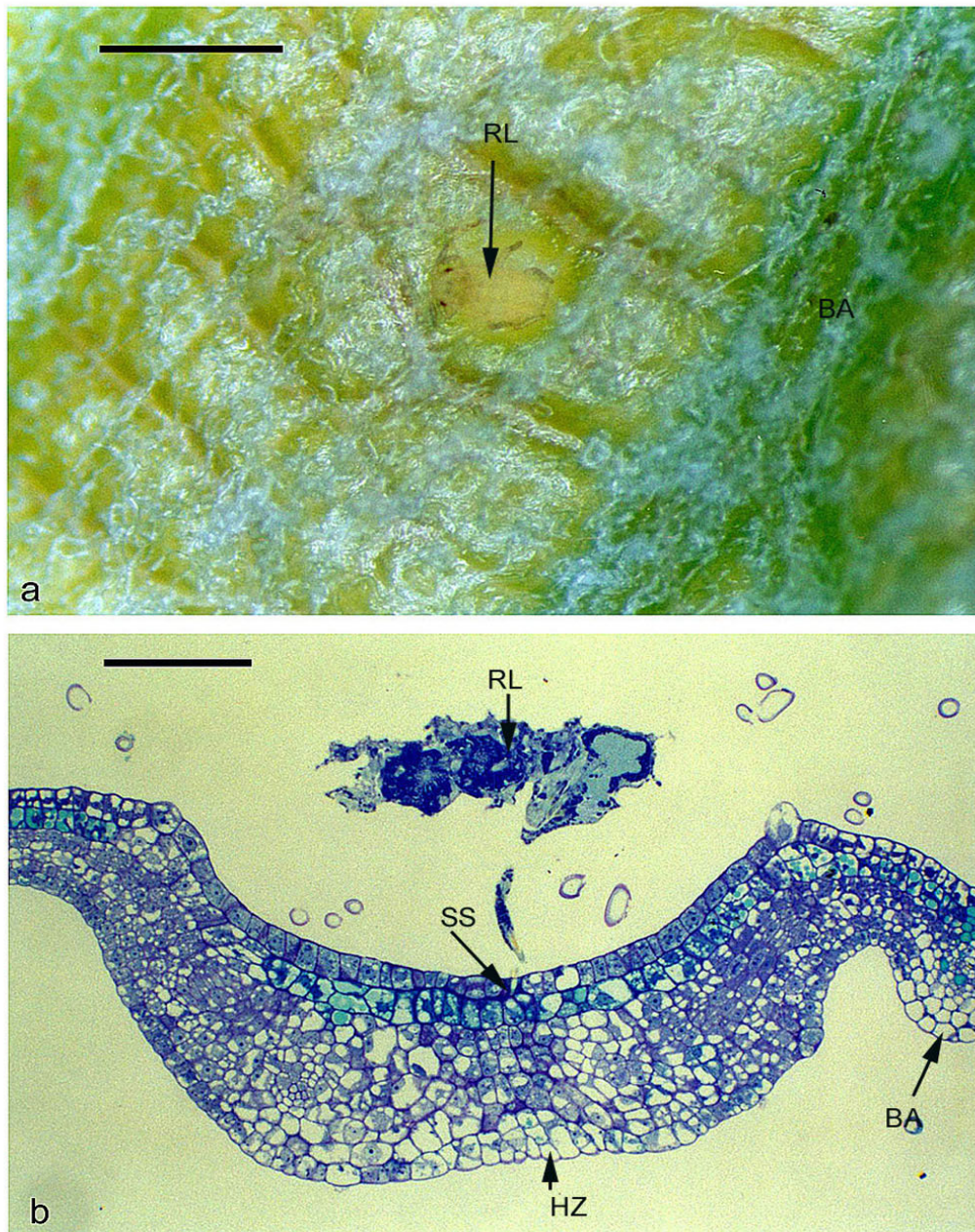


Abb. 20: Frühes Entwicklungsstadium der Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. a: Übersichts-Aufnahme eines Blatt-Teils mit saugender Reblauslarve. b: Lichtmikroskopische Aufnahme von Blattquerschnitt im Einstichbereich, Färbung: Toluidinblau. BA = Blattader, HZ = Hemmungszone, RL = Reblauslarve, RS = Rüsselspitze der Reblauslarve. (Balkenlängen: a = 0,5 mm, b = 100 µm).

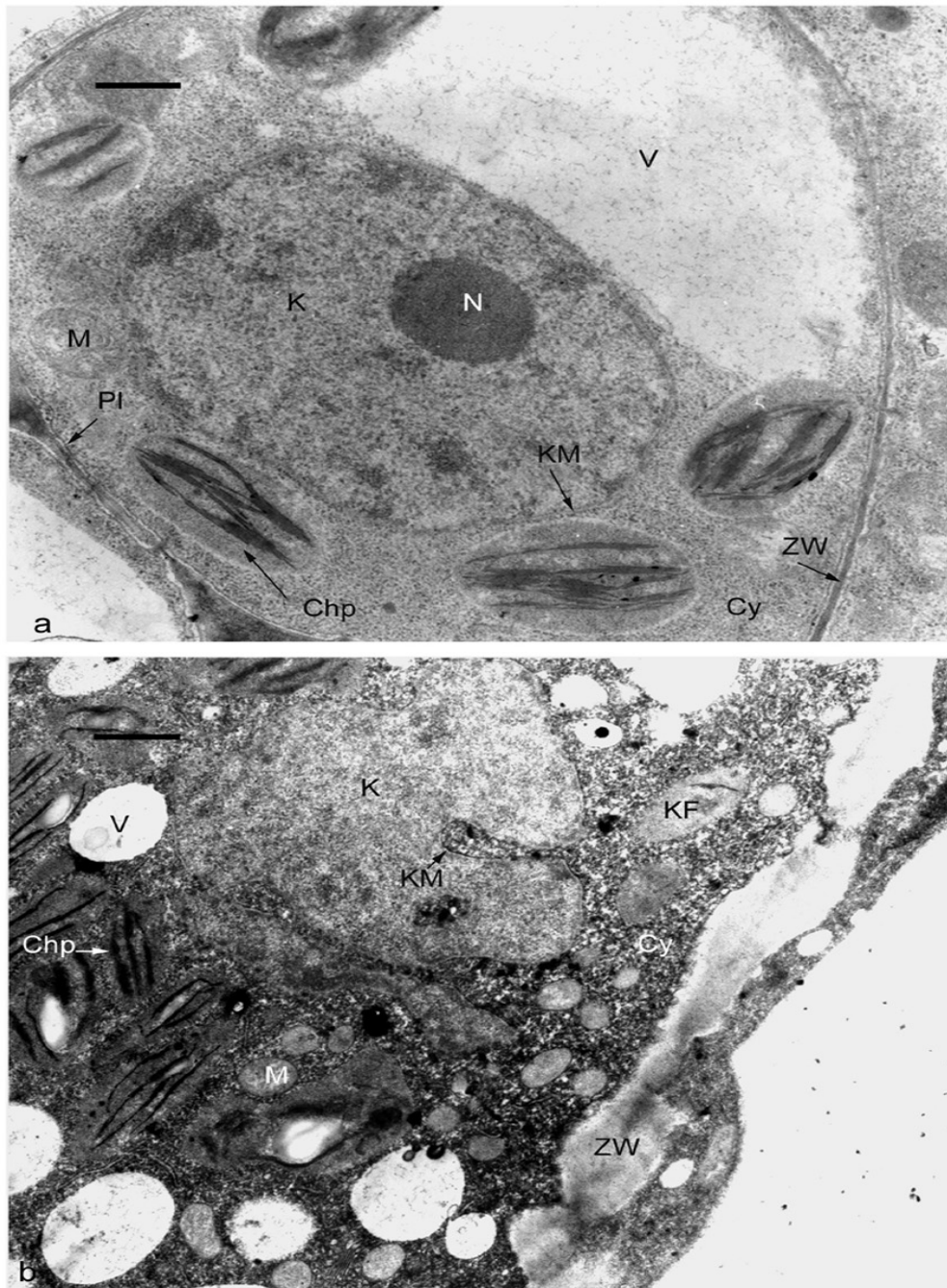


Abb. 21: Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen cytologischer Veränderungen der Zellen im Einstichbereich. a: Kontrolle. b: Zelle im Einstichbereich. Chp = Chloroplast, Cy = Cytoplasma, KF = Kernfragment, KM = Kernmembranen, M = Mitochondrien, N = Nucleolus, PI = Plasmalemma, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlängen: a = 0,6 μ m, b = 1,1 μ m).



Abb. 22: Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen cytologischer Veränderungen der Chloroplasten von Zellen im Einstichbereich. a: Kontrolle. b: veränderte Chloroplasten. Chp = Chloroplast, Cy = Cytoplasma, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlänge = 0,4 μm).

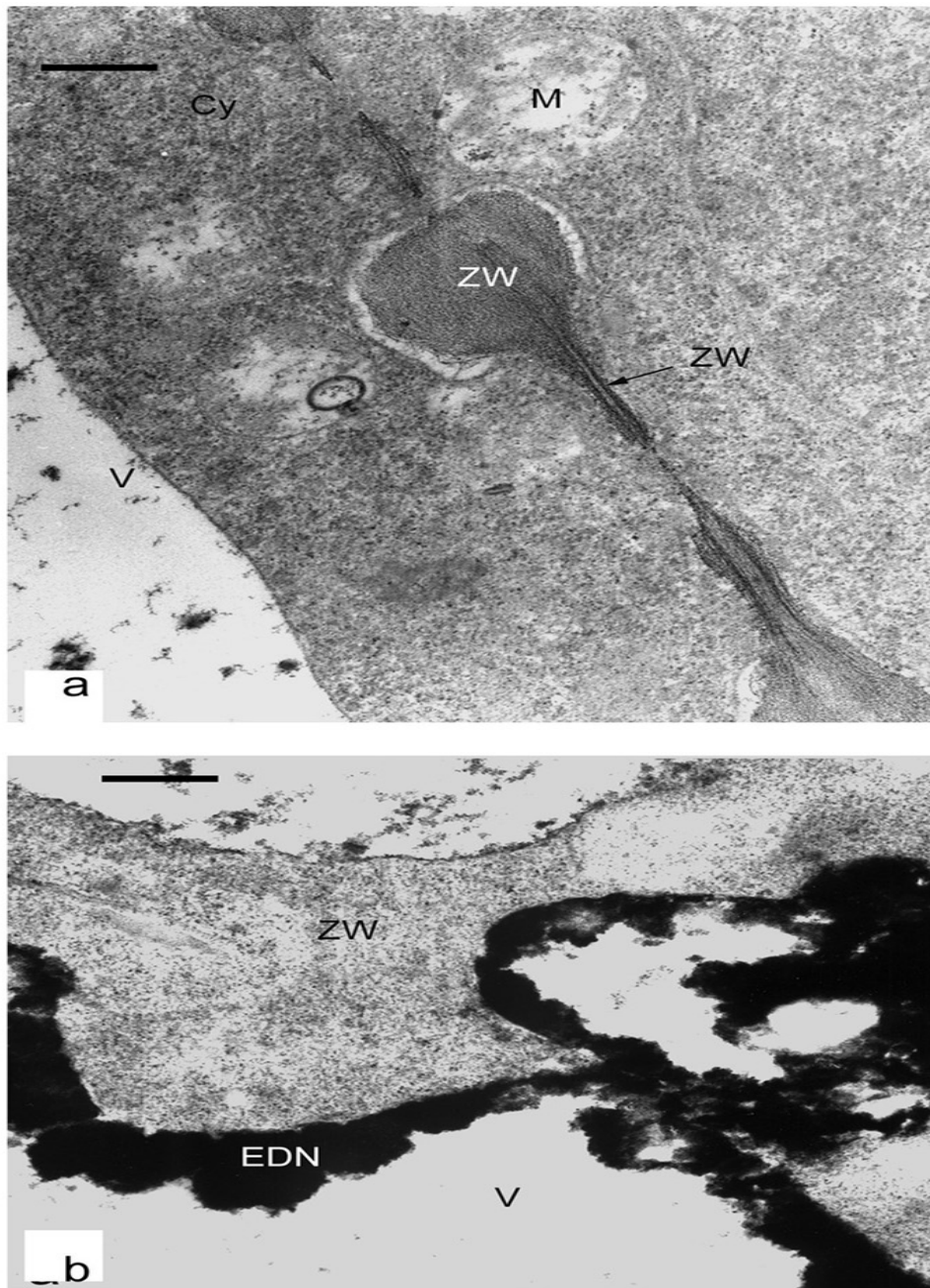


Abb. 23: Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen cytologischer Veränderungen der Zellwand von Zellen im Einstichbereich. a: Zellwand im Einstichbereich. b: Zellwand in der Umgebung der Hemmungszone. EDN = elektronendichter Niederschlag, M = Mitochondrien, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlänge = 0,4 µm).

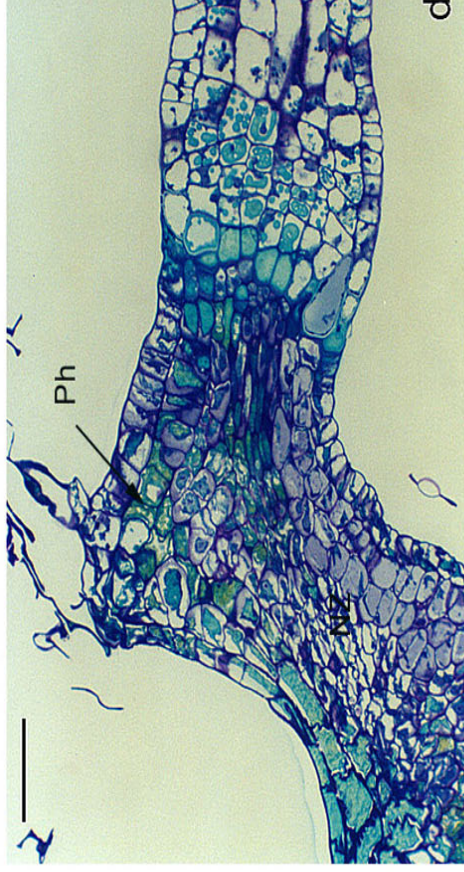
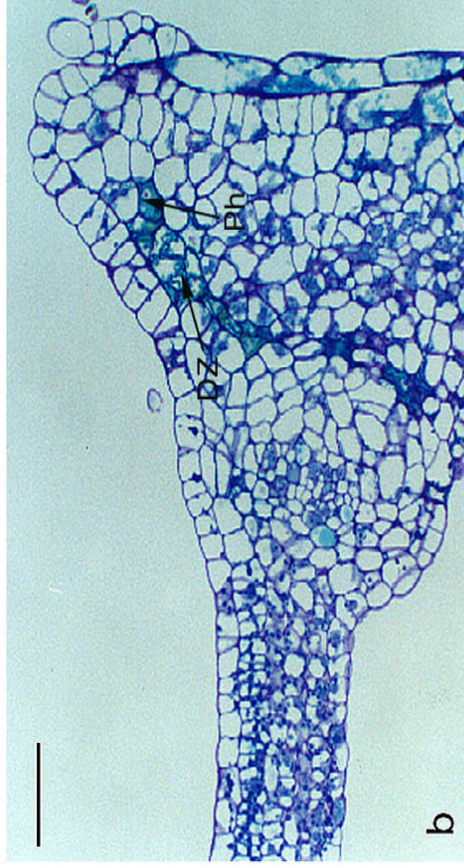
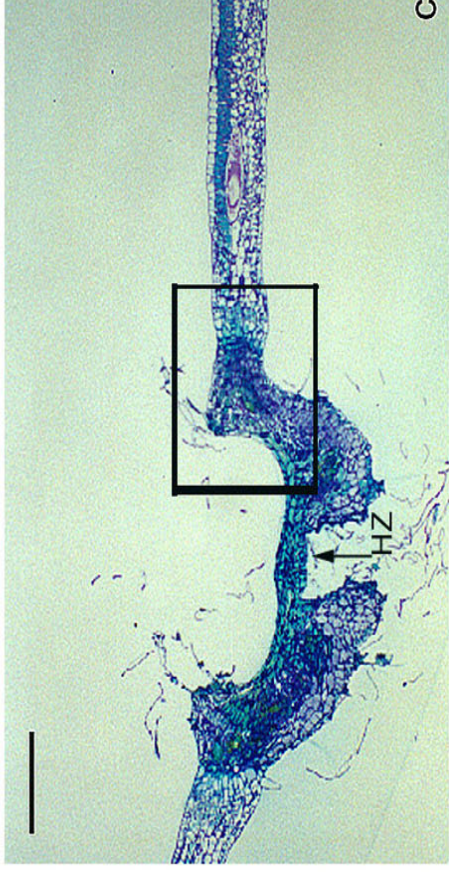
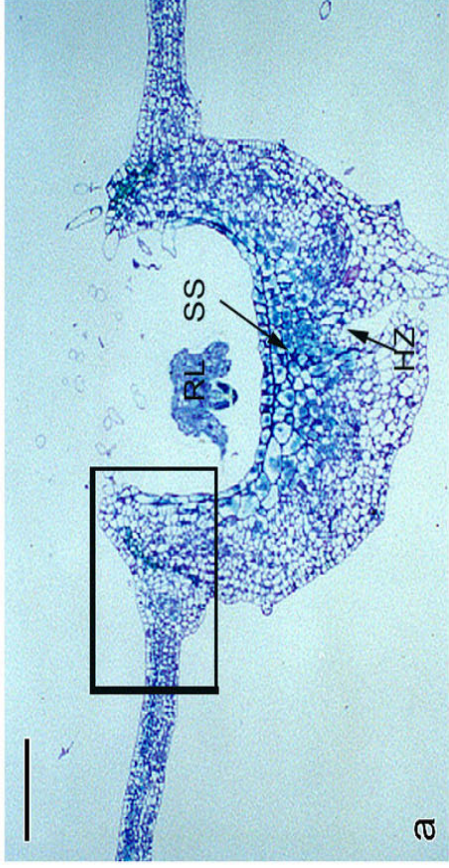


Abb.24: Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Färbung: Toluidinblau. a: frühes Stadium. c und b: späteres Stadium. DZ = degeneriertes Stadium, HZ = Hemmungszone, NZ = nekrotische Zellen, Ph = Phenole, RL = Reblauslarve, SS = Einstichstelle. (Balkenlängen: a und c = 200 µm, b und d = 50 µm).

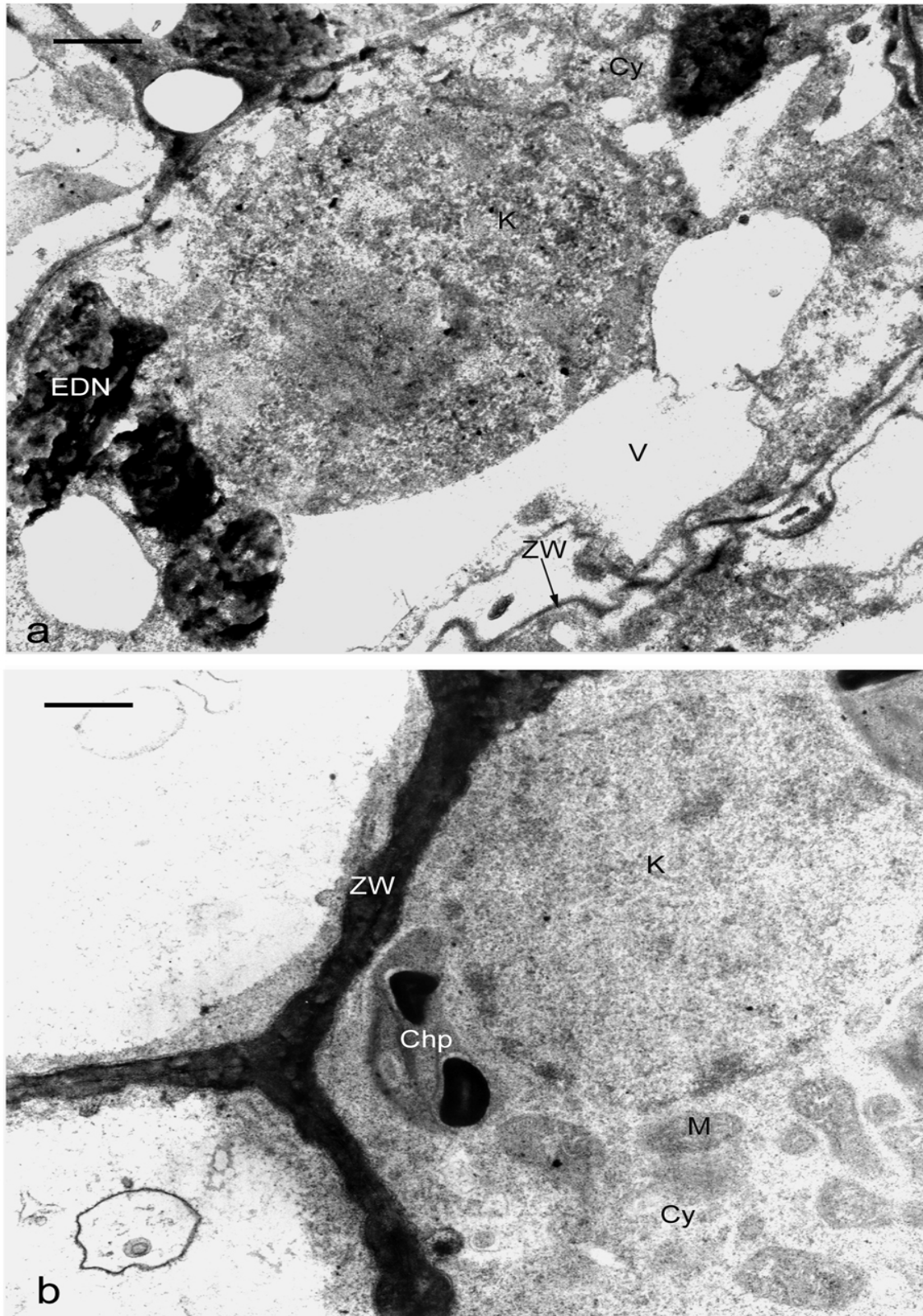


Abb. 25: Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner'. Elektronenmikroskopische Aufnahmen. a: degenerierte Zellen (s. Abb. 24a und b). b: Zellwände zwischen Nekrosestelle und gesunden Geweben. Cy = Cytoplasma, Chp = Chloroplast, EDN = elektronendichter Niederschlag, K = Kern, M = Mitochondrien, V = Vakuole, ZW = Zellwand. (Balkenlänge = 0,6 μm).

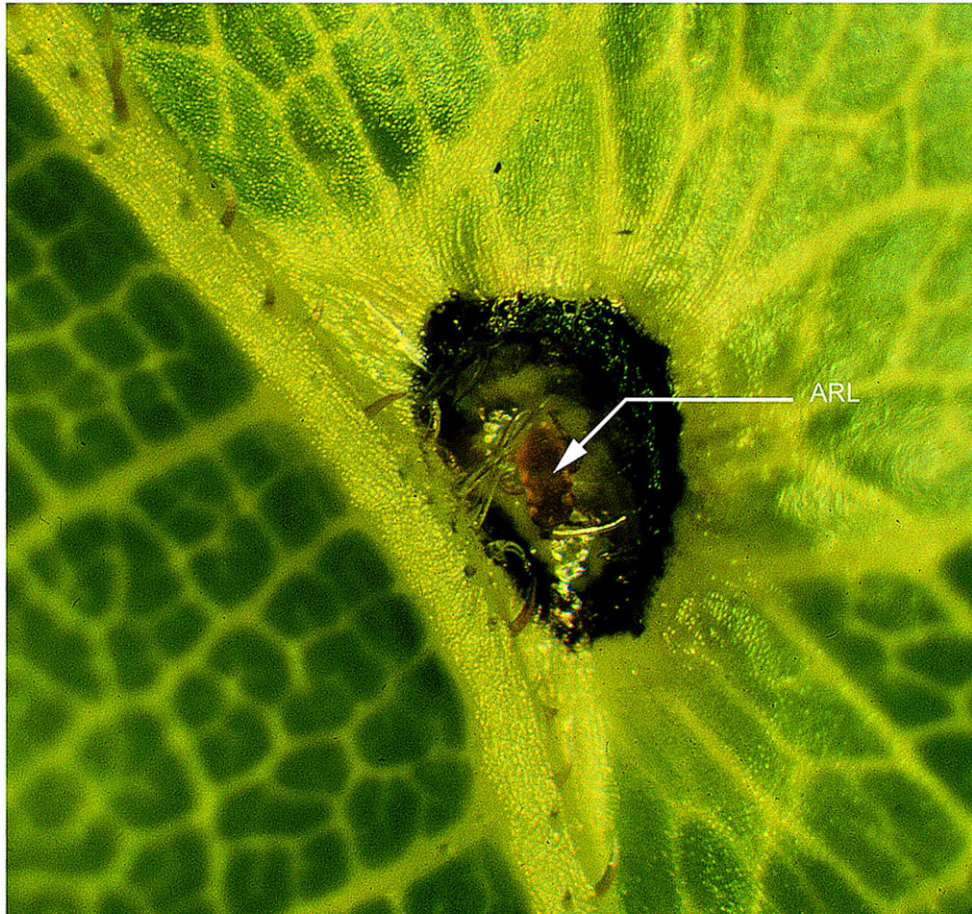


Abb. 26: Übersichts-Aufnahme von Blattnekrose Typ II, Unterlagsrebsorte 'Börner' mit abgestorbener Reblauslarve (ARL).

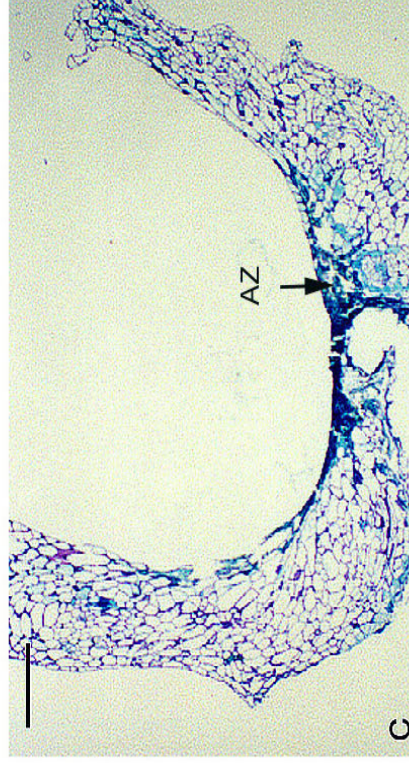
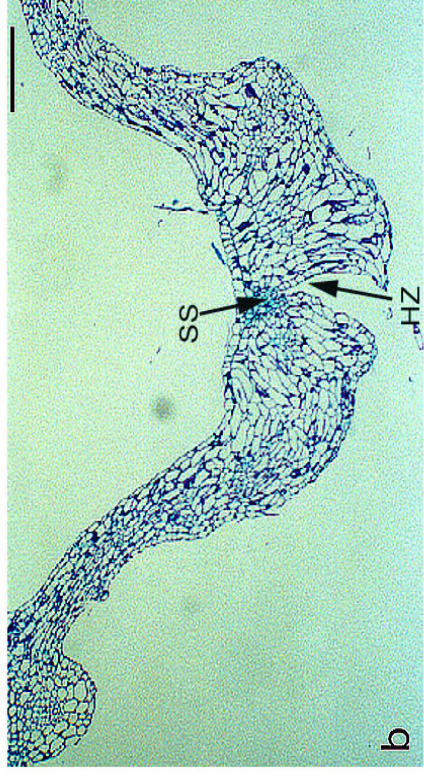
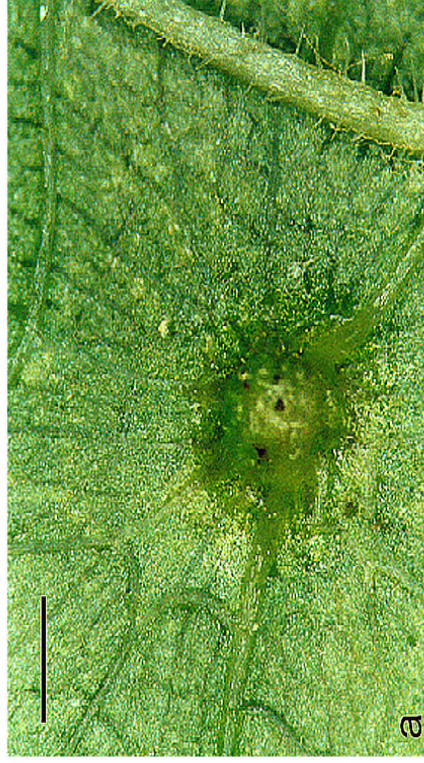


Abb. 27: Blattgallen der Unterlagsrebsorten 'Bömer' (a, b und c) und 'SO4' (d), Färbung: Toluidinblau. a: Übersichtsaufnahme einer Blattgalle, ca. 5 Wochen nach dem Reblaus-Einstich (Detail s. Abb. 27c). b und d: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Blattgallenlängsschnitten (ca. 3 Wochen nach dem Reblaus-Einstich). c: Lichtmikroskopische Aufnahme von Blattgallenlängsschnitt. AZ = abgestorbene Zellen, HRG = Hohlraum der Galle, HZ = Hemmungszone, LG = Leitgewebe, SS = Einstichstelle. (Balkenlängen: a = 1 mm, b, c und d = 200µm).

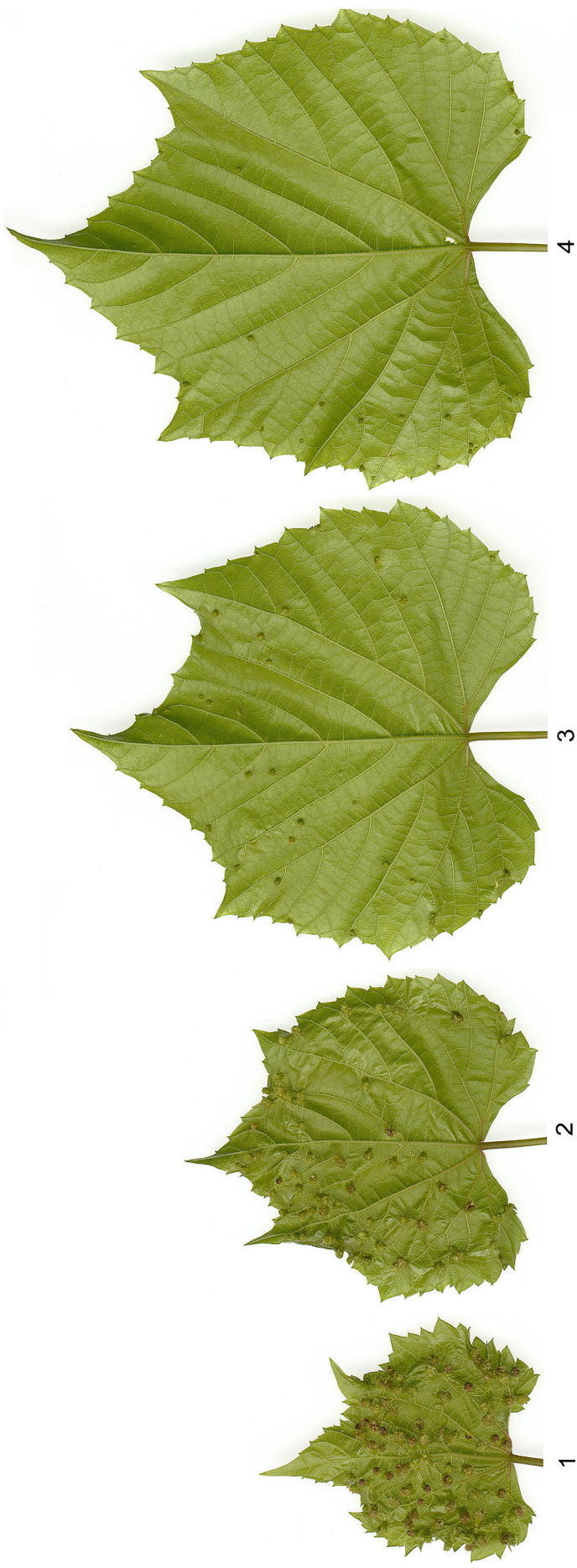


Abb 28: Blattgallen verschiedener Blattebenen der Unterlagsrebsorte 'SO4', ca. 15 Tage Nach Reblausinfektion. Die Zahl und die Größe der Blattgallen nehmen von Blatt 4 zu Blatt 1 zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches zu.

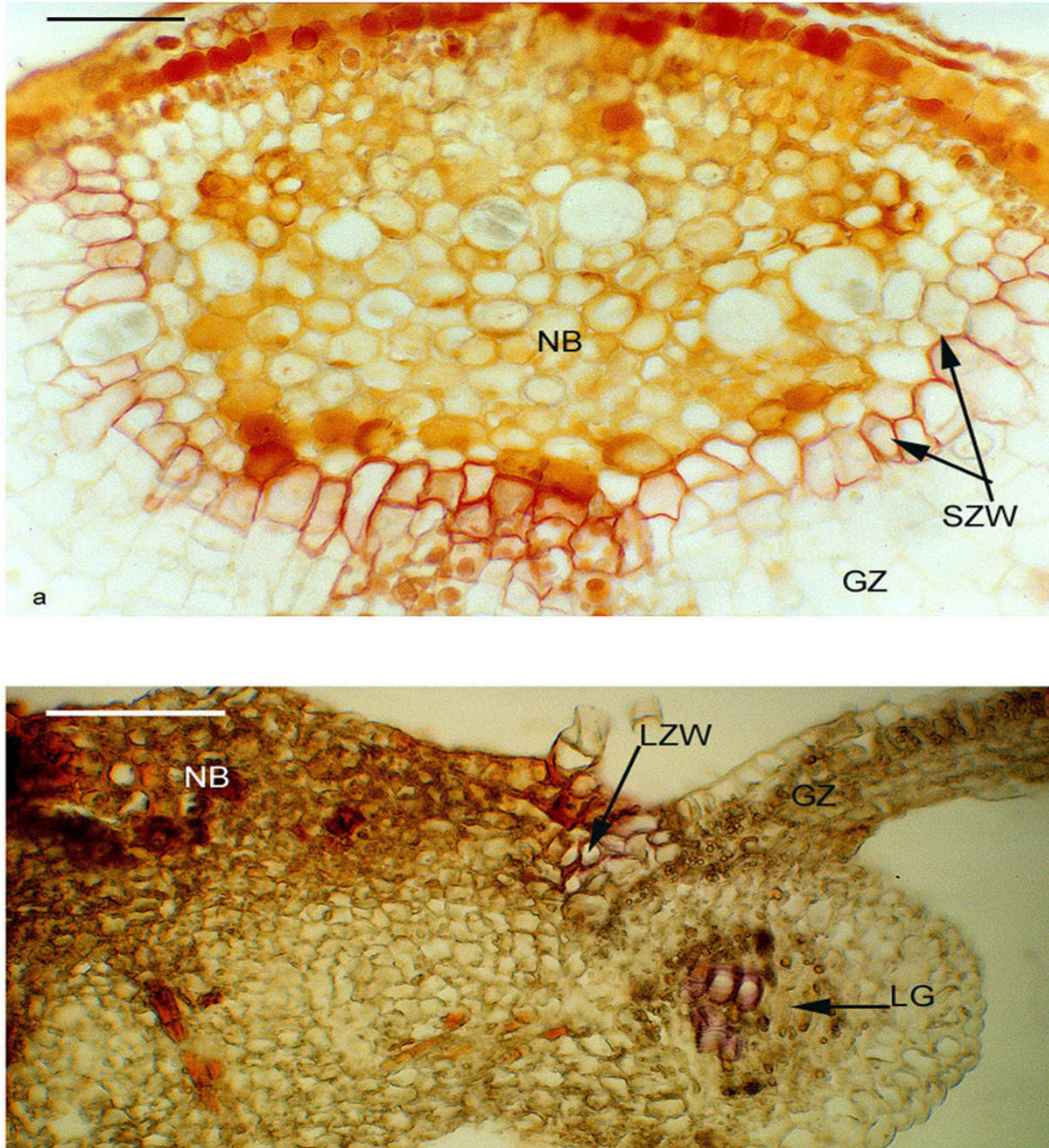


Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzel- und Blatt-Querschnitten im Nekrosebereich (Nekrosen vom Typ II). a: mit Sudan III gefärbt. b: mit Phloroglucin-Salzsäure gefärbt. GZ = gesunden Zellen, LG = Leitgewebe, LZW = lignifizierte Zellwände, NB = Nekrosebereich, SZW = suberinisierte Zellwände. (Balkenlängen: a = 50 µm, b = 100 µm).

3.3. Biochemische Beobachtungen:

3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten:

3.3.1.1 Peroxidase (PO)- Aktivität:

Die Peroxidase–Aktivität der Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` war, im Vergleich zur Kontrolle, nach Reblausbefall signifikant erhöht (Abb. 30).

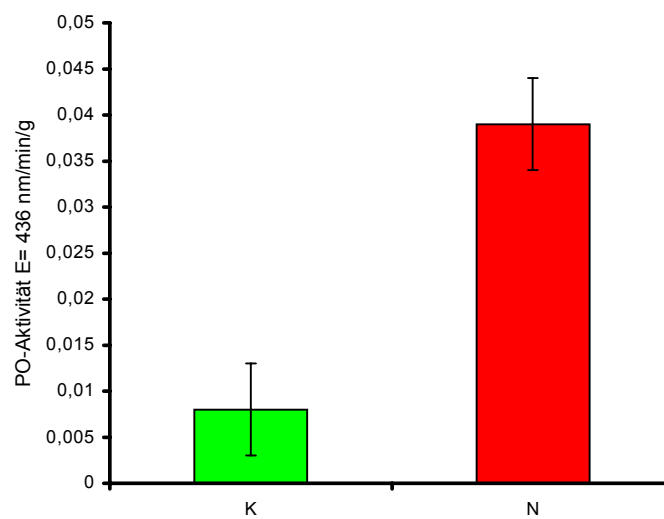


Abb. 30: Peroxidase-Aktivität in Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner`; Kontrolle (K); Befallende Wurzeln (N) (n= 5). Enzymaktivität: Extinktion (436 nm) pro Minute und g Frischgewicht.

3.3.1.2 Polyphenoloxidase (PPO) - Aktivität:

Die Untersuchungsergebnisse zur Bestimmung der Polyphenoloxidase (PPO) stellt in Abbildung 31 dar. Die Polyphenoloxidase - Aktivität der Rebwurzeln war, verglichen mit der Kontrolle, nach Befall durch Reblaus signifikant erhöht.

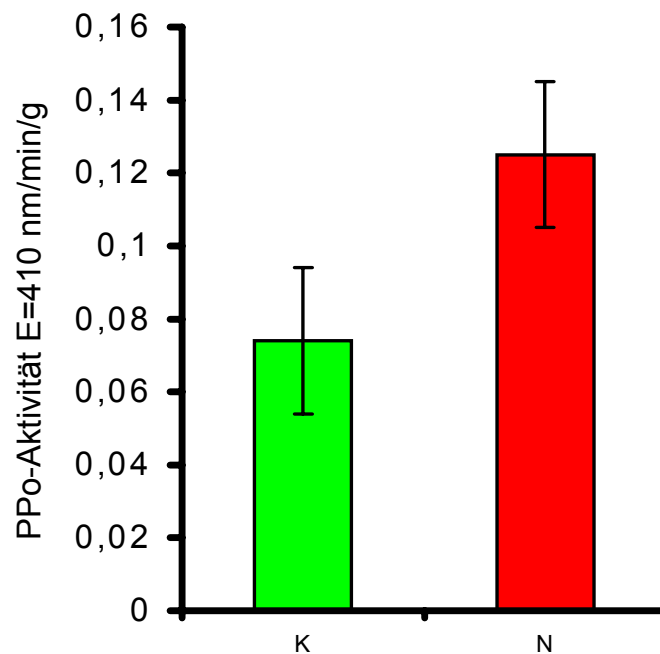


Abb. 31: Polyphenoloxidase-Aktivität in Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner'; Kontrolle (K); Befallende Wurzeln (N) (n=5). Enzymaktivität: Extinktion (410 nm) pro Minute und g Frischgewicht.

3.3.1.3 Phenylalanin- Ammoniumlyase (PAL) – Aktivität:

Nach dem Befall der Rebwurzeln durch Rebläuse war die PAL-Aktivität signifikant erhöht (Abb. 32).

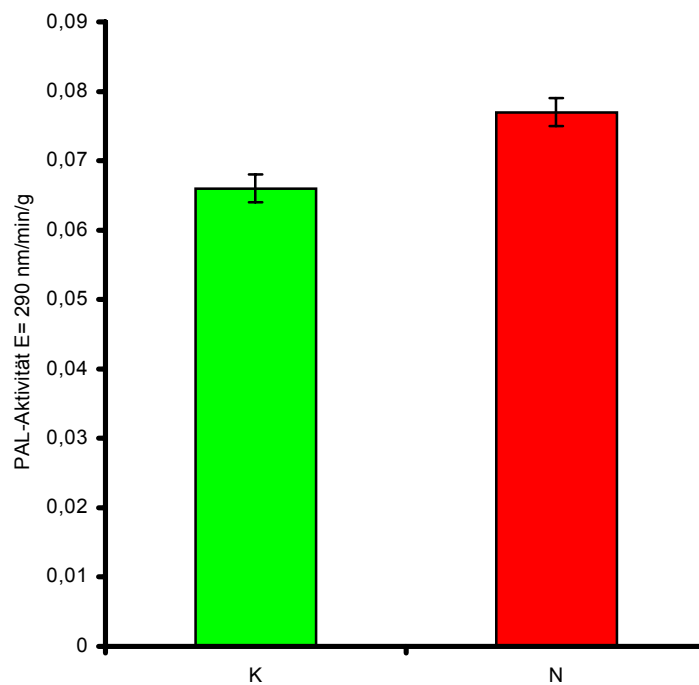


Abb. 32: Phenylalanin-Ammoniumlyase-Aktivität in Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner`; Kontrolle (K); Befallende Wurzeln (N) (n= 6). Enzymaktivität: Extinktion (290 nm) pro Minute und g Frischgewicht.

3.3.2 Lösliche Proteine:

Bei der Bestimmung des Gehaltes an löslichen Proteinen wurde festgestellt, daß die lösliche Proteine der Rebwurzeln nach dem Befall durch Rebläuse signifikant erhöht waren (Abb. 33).

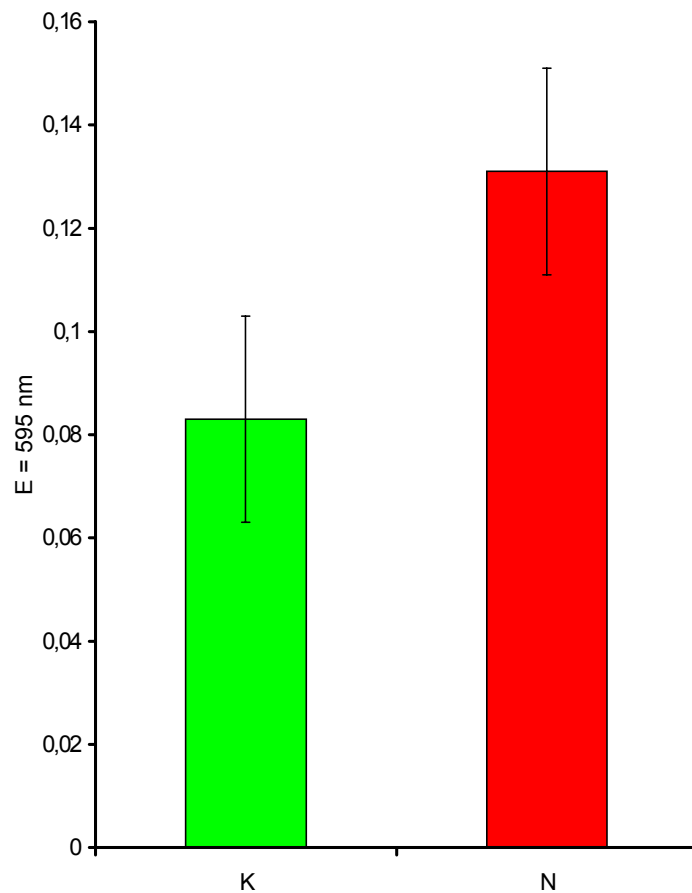


Abb. 33: Lösliche Proteine in Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner'; Kontrolle (K); befallenden Wurzeln (N) (n= 6).

3.3.3 Gesamtphenolgehalt :

Die phenolischen Verbindungen wurden in 5 Blattebenen, ausgehend von der Sproßspitze in den Rebsorten 'Börner', 'SO4' und 'Riesling' summarisch gemessen. Es gibt signifikante Unterschiede zwischen den 3 Rebsorten. Diese Unterschiede konnten in allen Blattebenen, außer in den Blattebenen 2 und 3 gefunden werden. In der Blattebene 1 wurde der höchste Phenolgehalt bei der Rebsorte 'SO4' gemessen, während bei 'Riesling' der niedrigste Phenolgehalt in dieser Blattebene festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu war in den Blattebenen 3 bis 5 der Phenolgehalt bei der Sorte 'Riesling' am höchsten und bei der Sorte 'SO4' am niedrigsten (Abb. 34).

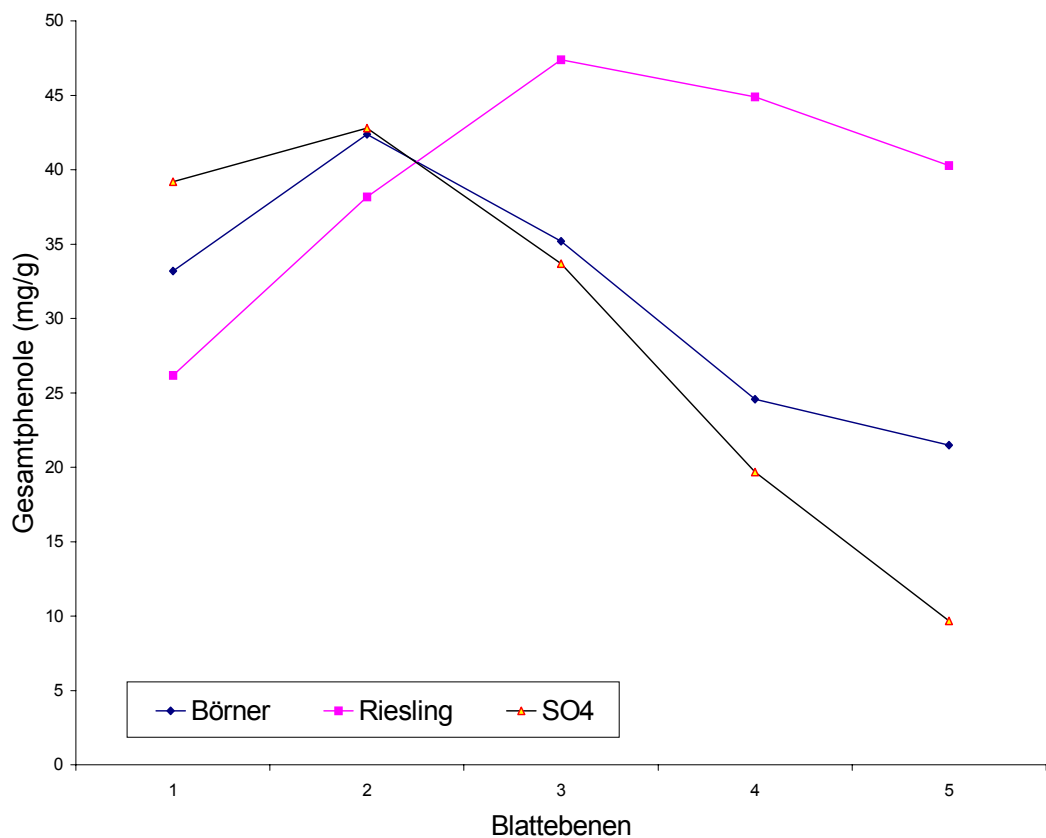


Abb. 34: Gesamtphenole in verschiedene Blattebenen der Unterlagsrebsorten 'Börner' und 'SO4' und Ertragsrebsorte 'Riesling'.

3.3.4 Polyphenolanalytik von Wurzeln mittels HPLC :

Die phenolische Substanzen von den Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' mit und ohne Nekrosen wurden mittels HPLC (high performance liquid chromatography) gemessen. Aus der Abb. 35 geht hervor, daß die Procyanidin-Peaks (2 und 3) im Vergleich zur Kontrolle erhöht waren. Im Gegensatz dazu waren der Procyanidin-Glykosid-Peak (1) und der Ellagsäure-Peak (4) im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt.

3.4 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen:

Die Blätter der Unterlagsrebsorten 'Börner' und 'SO4' und die Wurzeln der 'Börner' und der Ertragsrebsorte 'Riesling' wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IES, Aminosäuren (L-Tryptophan, L-Glutaminsäure, L-Lysin, Histidin und L-Valin), Aminosäurengemisch und IES + Aminosäurengemisch (Tabelle 1) behandelt.

3.4.1 Behandlungen mit IES:

Nach 24 Stunden starben die Applikationsstellen sowohl bei 'Börner' als auch bei 'SO4' ab, wobei nur bei 'Börner' diese Stellen durch die Einlagerung phenolischer Substanzen begrenzt wurden(vgl. Abb.36e, f und Abb. 36a, b).

Nach 15 Tagen wurde beobachtet, daß die Hälfte der Blätter der Unterlagsrebsorte 'SO4' , die mit IES behandelt wurde, ein verändertes Wuchsverhalten aufgezeigt hat. Während es bei 'SO4' in der Umgebung der Applikationsstelle zu verstärktem Streckungswachstum kam, konnte auf der mit dest. H₂O behandelten Blatthälfte kein verändertes Wachstum festgestellt werden. Bei 'Börner' gibt es weder auf der mit IES behandelten, noch auf der Kontroll-Blattseite Wachstumsveränderungen (Abb.37a und b).

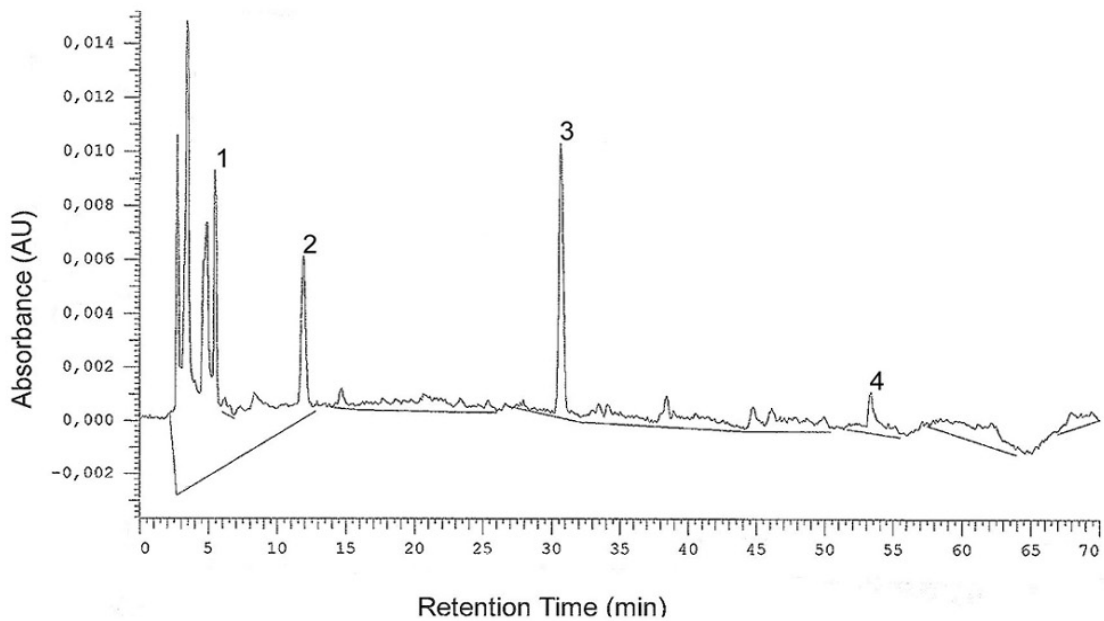
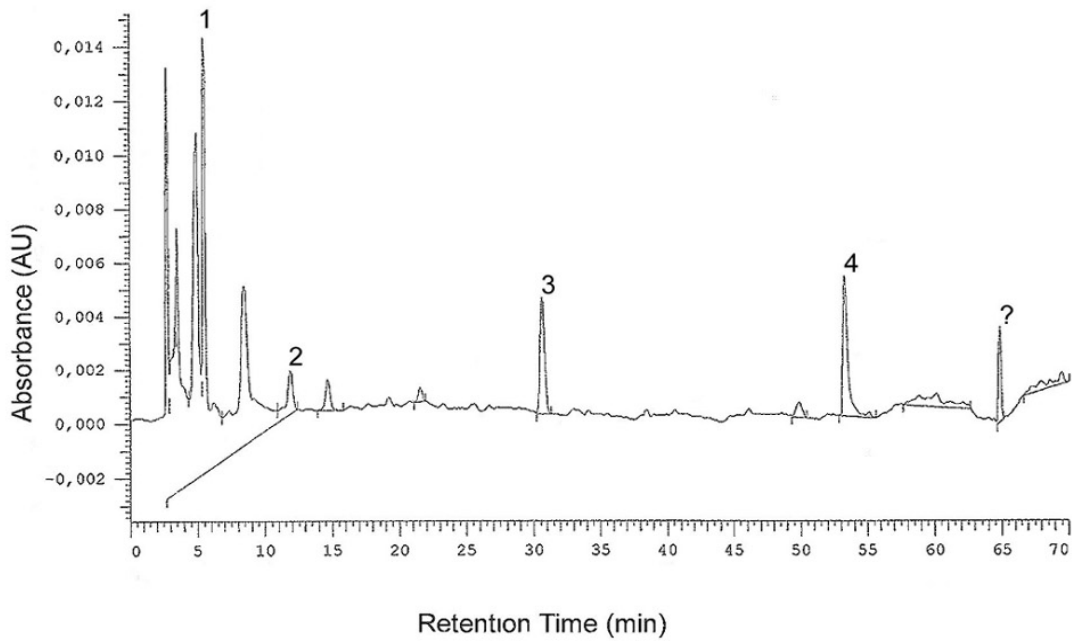


Abb. 35: Polyphenolanalytik von Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' mittels HPLC, Kontrolle (oben), Wurzenekrosen (unten). 1: Procyanidin-Glykosid-Peak, 2 und 3: Procyanidin-Peak, 4: Ellagsäure-Peak.

Bei der Wurzelbehandlungen mit IES verursachten alle Konzentrationen Schwellungen in der Umgebung der Applikationsstelle der Ertragsrebsorte 'Riesling', während es bei den Wurzeln der 'Börner' in der Umgebung der Applikationsstelle nur zur Braunfärbung kam (Abb.37c und d).

3.4.2 Behandlungen mit Aminosäuren und Aminosäurengemisch:

Alle Konzentrationen von Aminosäuren und auch von Aminosäurengemisch konnten bei keiner Rebsorte (Blätter und Wurzeln) eine Reaktion hervorrufen.

3.4.3 Behandlungen mit IES in Aminosäuren und in Aminosäurengemisch:

Bei den Blättern und den Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' gibt es keine Unterschiede zwischen diesen Behandlungen und den Behandlungen nur mit IES. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, daß die Applikationsstelle der Blätter der Unterlagsrebsorte 'SO4' bei 0,05% IES in 0,1% Aminosäurengemisch anschwell (Abb. 38 a). Im Blattquerschnitt (Abb. 38b) ist zu sehen, daß sich die Zellen an der Applikationsstelle stärker als bei der Kontrolle teilten und streckten (Abb. 38 c).

Es wurde beobachtet, daß Blatt- und Wurzel-Verwundungen der anfälligen Rebsorten (z. B. 'SO4' und 'Riesling') und resistenten Rebsorten (z. B. 'Börner') keine Blattgallen, Nodositäten oder Blatt- und Wurzel-Nekrosen verursachen. Abb. 36c zeigt eine Übersichts-Aufnahme der Blattwunde ca. 2 Tage nach der Behandlung, und Abb. 36d zeigt einen Blattquerschnitt an dieser Stelle.

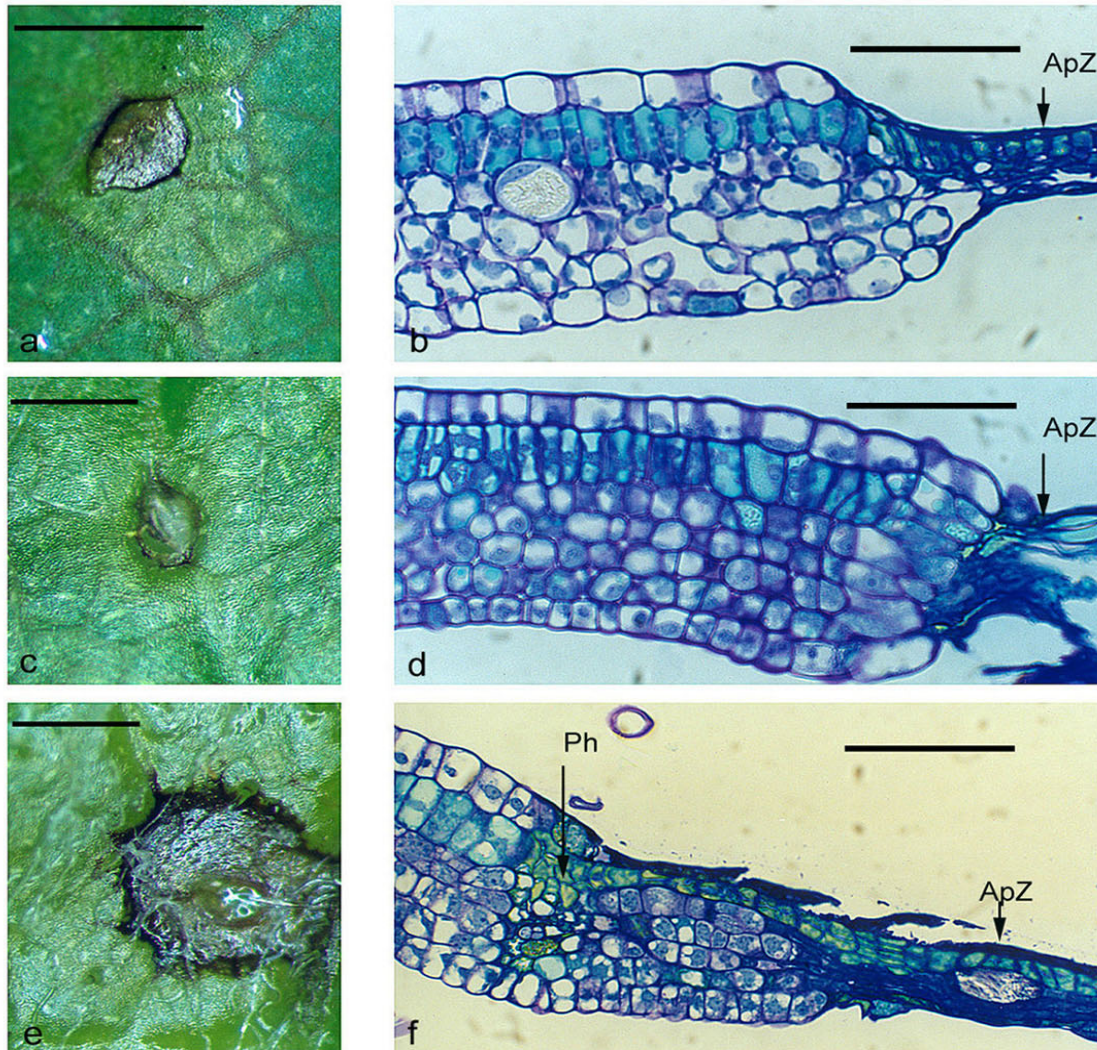


Abb. 36: Blätter, zwei Tage nach der Behandlung mit 0,1% IES. a: Übersichtsaufnahme einer IES-Applikationszone der Unterlagsrebsorte 'SO4'(Detail s. Abb. 35b). b: Lichtmikroskopische Aufnahme vom Blattquerschnitt in der Applikationszone. c: Übersichtsaufnahme der Applikationszone (nur mit dest. Wasser) der Unterlagsrebsorte 'Börner'(Detail s. 35d). d: Lichtmikroskopische Aufnahme vom Blattquerschnitt in der Applikationszone. e: Übersichtsaufnahme einer IES-Applikationszone der Unterlagsrebsorte 'Börner'(Detail s. Abb. 35f). f: Lichtmikroskopische Aufnahme vom Blattquerschnitt in der Applikationszone. ApZ = Applikationszone, Ph = Phenole. (Balkenlängen: a = 1 mm, c und e = 0,5 mm, b, d und f = 50 µm).

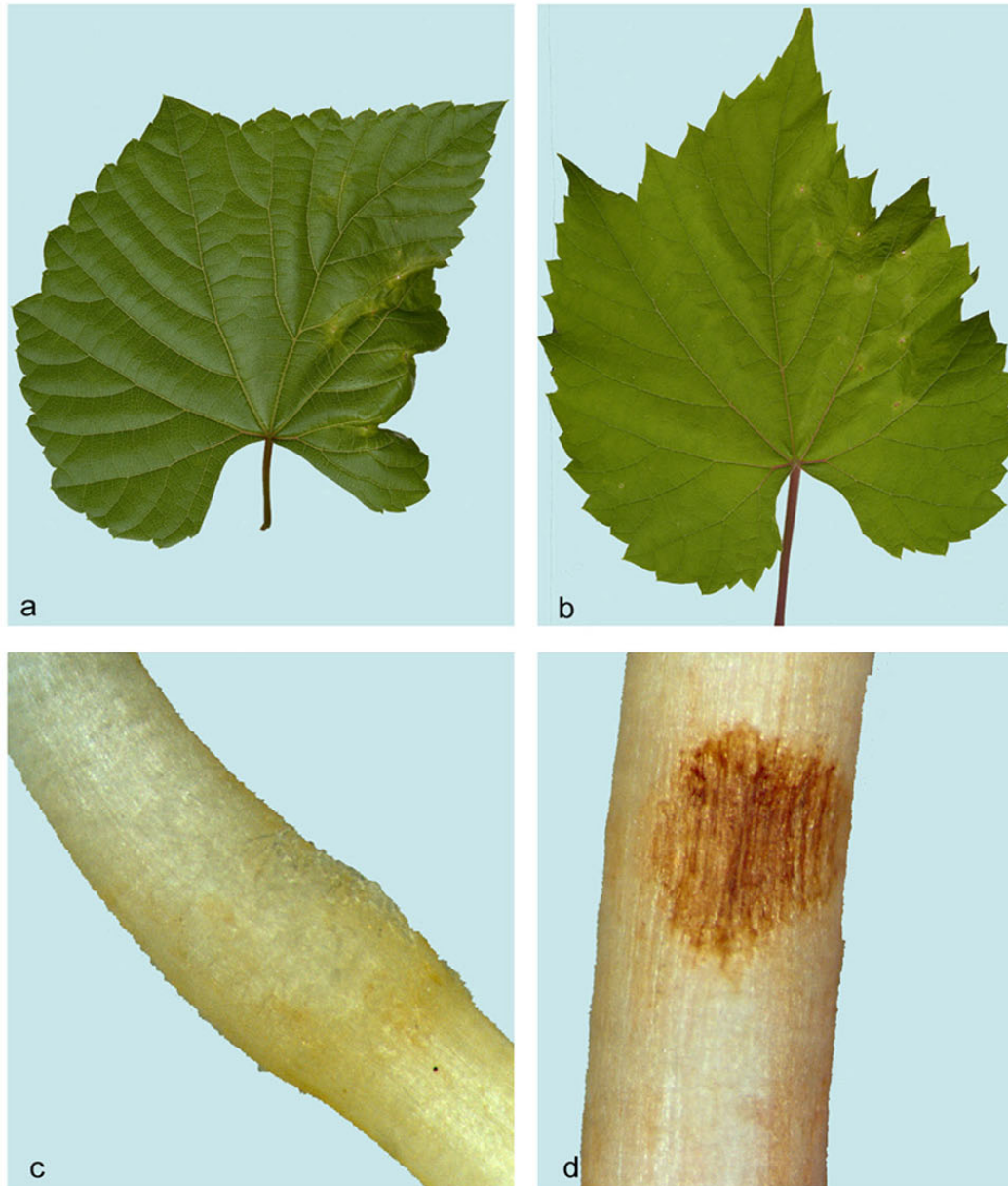


Abb. 37: Behandlung von Blätter der Unterlagsrebsorten 'SO4' (a) und 'Börner' (b) und von Wurzeln der Ertragsrebsorte 'Riesling' (c) und der Unterlagsrebsorte 'Börner' (d). a und b: die rechte Blatthälfte wurde mit 0,1% IES und die linke Blatthälfte nur mit dest. Wasser behandelt (nach 15 Tagen). c und d: nach 3 Tagen.

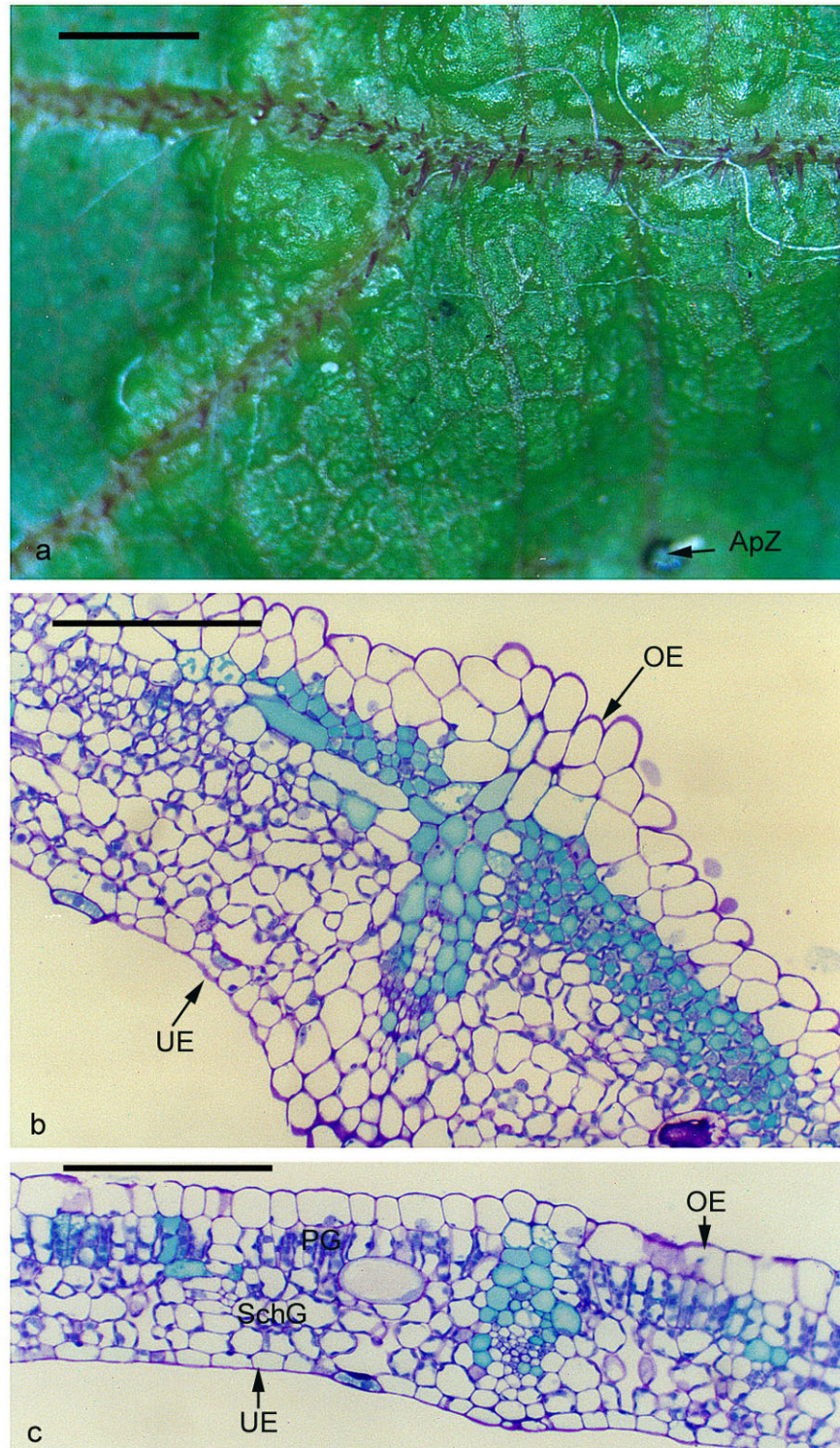


Abb. 38: Blätter der Unterlagsrebsorte 'SO4', acht Tage nach der Behandlung mit 0,1% Aminosäurengemisch in 0,5% IES. A: Übersichts-Aufnahme der Applikationszone (ApZ), Detail s. Abb. 37b. b: Lichtmikroskopische Aufnahme von Blattquerschnitt in der Applikationszone. c: Kontrolle. OE = obere Epidermis, PG = Palisadengewebe, SchG = Schwammgewebe, UE = untere Epidermis. (Balkenlängen: a = 1 mm, b und c = 100 μ m).

4. Diskussion:

4.1 Vorbemerkungen:

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, greifen die Rebläuse sowohl die Wurzeln als auch die Blätter an. Anfällige Rebsorten reagieren auf den Reblaus-Einstich mit der Bildung von Wurzelgallen (Nodositäten und Tuberositäten) und Blattgallen. Als Folge davon vermehren und verbreiten sich die Rebläuse. Das führt im Anfangsstadium zum Kümmerwuchs und später zum Absterben der Rebe. Bei der einzigen, in Deutschland verfügbaren, resistenten Unterlagsrebsorte `Börner` kommt es nach einem Reblaus-Einstich zu einer Hypersensitivitätsreaktion (HR ist eine Form des Zelltodes, die oft mit der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen in Verbindung gebracht wird). Deren Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

4.2 Histologische und cytologische Beobachtungen:

4.2.1 Die Wurzeln:

4.2.2 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen:

In aseptischen Kulturen von Mikrostecklingen konnte man keine Wurzelnekrosen bei der Unterlagsrebsorte `Börner` induzieren, weil die Reblauslarven ohne offensichtliche Ursache frühzeitig abstarben. Die Frage bleibt offen, warum die Reblauslarven unter gleichen Bedingungen nicht auch auf den Wurzeln der Ertragsrebsorte `Riesling` abstarben, und dort Nodositäten verursachen. Forneck et al (1996) stellten ebenfalls fest, daß die Wurzeln der Ertragsrebsorte `Riesling` in diesem System durch den Einstich von den Rebläusen mit Nodosität-Bildungen reagierten.

4.2.3 Unsteriles Wurzel-Kultur-System:

Es ist uns gelungen, die Wurzelnekrosen bei 'Börner' im unsterilen Wurzel-Kultur-System zu induzieren. Dieses Kultur-System hat den Vorteil, daß die Kulturen einfach zu bearbeiten sind und die Wurzelstrukturen denen der Freiland- oder Topfreben ähnlicher als im in vitro-System sind.

4.2.4 Wurzelnekrosen:

Es gibt zwei verschiedene Nekrosetypen auf den Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' (Abb. 41, 42 und 43). Die jeweilige Typen der Nekrose hängen von dem Alter des entsprechenden Wurzelabschnittes zum Zeitpunkt des Einstiches ab. Die Wurzelnekrosen vom Typ I entwickelte sich in wenig differenzierten Wurzelgeweben. Nach ca. 5 Stunden plasmolysierten die Zellen im Einstichbereich. Danach wurden phenolische Substanzen in die plasmolysierten Zellen eingelagert. Etwa 12 – 24 Stunden nach dem Reblaus-Einstich starben alle Zellen im Einstichbereich ab.

Bei Wurzelnekrose vom Typ II stechen die Rebläuse stets an der Streckungszone der Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' ein. Sopp (1993) beobachtete, daß die Nematoden (*Xiphinema index*) auch immer an der Streckungszone der Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' einstechen. Die angestochene Zelle hatte eine konkave Form, weil sie ihren Turgor-Druck durch das Saugen der Reblaus verliert hat, und von den unter normalen Turgor-Druck stehenden Nachbarzellen eingedrückt wurde. Ebenso erscheint die angestochene Zelle im mikroskopischen Bild transparenter, weil sich das Cytoplasma, der Reblauspeichel und der Vakuoleninhalt vermischt haben. Die Reblausrüsselspitze zerstörte die Zellwände, Plasmamembranen und Cytoplasmen der durchgestochenen Zellen und der angestochene Zelle. Als Folge davon starben diese Zellen ab und bildeten einen Einstichkanal. Der Einstichkanal war umgeben von mehreren Schichten cytoplasmareicher Zellen. Die Rückbildung der Vakuolen in diesen Zellen ist das erste Anzeichen für eine Reaktion des Gewebes auf den Reblaus-Angriff. Etwa 12 Stunden nach dem Reblaus-Einstich plasmolysierten die Zellen, die sich den cytoplasmareichen Zellen der Umgebung der Einstichstelle

anschließen. Gleichzeitig starb eine Zellreihe in der unmittelbaren Umgebung der angestochene Zelle ab. An der inneren Kernmembran der plasmolysierten Zellen traten Blasen (blebbing) auf. Die Bildung von Blasen an Kernmembranen wurden auch unter der Einwirkung von Pilzinfektionen an Gerstenblättern (*Hordeum vulgare*) beobachtet (Heller et al 1990). Der Nucleolus der plasmolysierten Zellen fragmentiert. Nucleolusfragmentierung wurde in der Nähe von Verwundungen (Ziegler 1955), unter Einwirkung von Aflatoxinen (Crisan 1973) und in *Heterodera* – Gallen, (Übersicht bei Fink 1999) beobachtet. Die Cytoplasmen und Kernplasma dieser Zellen waren granulös. Veränderungen der Kernmembranen, des Kernplasmas, der Nucleoli und des Cytoplasmas, die im Zusammenhang mit der Wurzelnekrose auftreten, entsprechen den typischen Symptomen, die beim PCD (programmed cell death) auftreten. Aber aus den eigenen Untersuchungen sowie aus der Literatur ergeben sich keine Hinweise auf die entsprechenden Signalketten bei den Pflanzen.

Nach ca. 24 Stunden begannen sich oxidierte phenolische Substanzen in plasmolysierte Zellen einzulagern, und die betroffenen Zellen starben ab. Außerhalb dieses Bereiches, in dem angrenzenden gesunden Gewebe, kam es im Kontaktbereich zur Verdickung der Zellwände, und sie erschienen elektronendichter, weil diese Zellwände verkorkten (histochemischer Nachweis s. S. 78). Die Plasmodesmata wurden abgeschlossen. Diese wurde in der Umgebung von Verwundungen bei Pfirsich (Biggs & Stobbs 1986) und nach der Behandlung mit Abscisinsäure (Übersicht bei Fink 1999) und nach der Infektion durch verschiedene Pathogene (Übersicht bei Fink 1999) beobachtet. Die degenerierten Zellen und verkorkten Zellwände isolierten die Einstichstelle und nach 2-5 Tagen starben alle Zellen im Nekrosebereich ab, weil die Wasser- und Nährstoffversorgung durch gesunde Gewebe verhindert wurde.

Es gibt eine Korrelation sowohl zwischen der Größe als auch der Entwicklungszeit der Wurzelnekrose vom Typ II und ihrer Position im Bereich der Streckungszone der Wurzel zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches. D. h., je älter der angestochene Wurzelbereich war, desto größer waren Ausmaß und Entwicklungszeit der gebildeten Nekrose. Dies gilt auch für die Wurzelnekrose vom Typ I. Daraus geht hervor, daß die Geschwindigkeit der Abwehrreaktion von Wurzeln der

Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff vom Ausmaß der Gewebedifferenzierung abhängt.

Die Wurzeln der anfälligen Rebsorte (z. B. 'Riesling') reagierten sowohl an der Streckungs- als auch an der Calyptrazone auf den Reblaus-Einstich mit Nodosität-Bildungen. Wenn die Nodositäten an der Calyptrazone entwickelt wurden, konnten die Wurzeln nicht weiterwachsen. Es ist möglich, daß die Integrität des Wurzelvegetationspunkts durch den Reblaus-Einstich gestört wird. Im Gegensatz zur Ertragsrebsorte 'Riesling' haben die Rebläuse auf den Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' keine Eier abgelegt. Das deutet darauf hin, daß sich die Rebläuse auf den Wurzeln von 'Börner' nicht ausreichend ernähren konnten.

4.2.2 Die Blätter:

4.2.2.1 Aseptische Kultur von Mikrostecklingen:

In aseptischer Kultur von Mikrostecklingen (s. 2.3.1) konnte man keine Blattnekrosen bei 'Börner' induzieren. Die Reblauslarven schlüpften zwar nach ca. einer Woche, starben aber dann innerhalb eines Tages ohne offensichtliche Ursache ab. Im Gegensatz dazu stachen die Reblauslarven an den Blätter der Unterlagsrebsorte 'SO4' ein und verursachten Blattgallen.

4.2.2.2 Topfreben:

4.2.2.2.1 Blattnekrosen:

Die jungen Blätter der Unterlagsrebsorte 'Börner' reagierten auf den Reblaus-Einstich mit Nekrosebildungen. Je nach dem Ausmaß der Gewebedifferenzierung gibt es zwei Typen von Blattnekrosen. Die Blattnekrosen vom Typ I traten an sehr jungen Blättern (noch nicht entfaltet) auf. Die Blattnekrosen vom Typ II traten an gerade entfalteten Blättern (1 bis 3 Blatt von oben) auf. Von Becker und Brückbauer (1955) und Niklowitz (1955) wurde über die Bildung von Blattnekrosen bei *Vitis rupestris* Ganzin und *V. riparia* berichtet. Eine Differenzierung verschiedene Nekrosetypen erfolgt durch die Autoren jedoch nicht.

Bei Blattnekrosen vom Typ I stachen die Rebläuse ihre Rüsselspitze in der Nähe von jungem Leitgewebe in die zweite oder dritte Zellschicht ein. Danach

streckten sich die Zellen im Einstichbereich. Infolgedessen verdickte sich die Einstichstelle. Dann wurden Phenole in diese Zellen eingelagert. Etwa 12 – 24 Stunden später starben diese Zellen ab, und bildeten eine Blattnekrose vom Typ I (s. Abb. 40, 42). Es ist möglich, daß die jungen Blattgewebe genau wie bei Wurzelspitzen eine rasche HR dagegen entwickeln. Ähnliche Veränderungen wurden im Anfangsstadium der Entwicklung von Blattgallen zwar auch bei anfälligen Rebsorten beobachtet, die Zellen im Einstichbereich starben aber nicht ab, und die Blattgalle entwickelte sich weiter (Sterling 1952, Becker und Brückbauer, 1955, Niklowitz, 1955, Hofmann, 1957).

Bei Blattnekrosen vom Typ II stachen die Rebläuse ihre Rüsselspitze bei den gerade entfalten Blättern in der Nähe von Adern durch eine oder zwischen zwei oberen Epidermiszellen in Palisadenzellen oder in die erste Zellreihe des Schwammgewebes ein. Eventuell ist der Gehalt von Wasser und Nährstoffen in Zellen nahe den Leitbündeln höher, und damit eine bessere Rebläusernährung möglich. Diese Beobachtung wurde auch bei der Entwicklung der Blattgallen der anfälligen Rebsorten beobachtet (Sterling 1952, Becker und Brückbauer, 1955, Niklowitz, 1955, Hofmann, 1957). Danach wurde das Zellwachstum der Zellen im Einstichbereich aktiviert. Als Folge davon verdickte sich die Einstichstelle. Diese Veränderungen waren zwar identisch mit den Anfangsstadium der Entwicklung von Blattnekrosen des Typs I (s. o.), die Zellen im Einstichbereich starben aber nicht wie bei anfälligen Rebsorten ab, und die Blattgalle entwickelte sich weiter. Je nachdem Ausmaß der Differenzierung des Blattgewebes gibt es zwei Möglichkeiten: 1. Wenn die entfalten Blätter sehr jung (erstes Blatt von oben) waren, wurden phenolische Substanzen in die gesunden Zellen in der unmittelbaren Umgebung dieses Bereiches eingelagert und diese starben ab. Infolgedessen starben alle Zellen im Einstichbereich ab, weil die Wasser- und Nährstoffversorgung aus dem gesunden Gewebe unterbrochen wurde (s. Abb. 43). 2. Wenn die Blätter älter (2.-3. Blatt von oben) waren, wurde das Wachstum der Zellen im Einstichbereich nur gehemmt, und diese bildeten eine sogenannte Hemmungszone (Becker und Brückbauer 1955). Gleichzeitig wurde das Wachstum der Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hemmungszone aktiviert (genau wie bei der Entwicklung von Blattgallen von anfälligen Rebsorten, s. Einleitung). Es wurde beobachtet, daß die Zellen im Einstichbereich (Hemmungszone) abnormal gestreckte Chloroplasten enthielten. Die

Kerne dieser Zellen erschienen deformiert und fragmentiert. Das Cytoplasma war elektronendichter und enthielt mehrere kleine Vakuolen. Zellwände degenerierten teilweise und verdickten teilweise. Es ist möglich, daß die Konzentration des Reblausspeichels in den Zellen im Einstichbereich nach dem Reblaus-Einstich nach und nach erhöht wurde, und diese erhöhte Speichelkonzentrationen für diese cytologischen Veränderungen und die Wachstums-Hemmung verantwortlich waren. Aus der Literatur ergeben sich keine Hinweise, ob diese cytologischen Veränderungen auch im Einstichbereich nach dem Reblaus-Einstich bei anfälligen Rebsorten (z. B. 'SO4') induziert wurden. Kernfragmentierung wurde nach Verwundung und der Behandlung mit Toxinen, chemischen Mutagenen und Strahlung beobachtet (Übersicht bei Fink 1999). Kern-Deformierung (multilobed) wurde nach dem Einstich der Nematode *Cryphodera utahensis* an *Rosa sp.* nachgewiesen (Mundo-Ocampo und Baldwin, 1984). Chloroplasten-Deformierung wurde auch nach dem Befall durch verschiedene Pathogene und während der Alterung-Vorgänge (natural leaf senescence processes) beobachtet (Übersicht bei Fink 1999). Über Zellwand-Degenerierung und -Verdickung im Einstichbereich der Nematoden *Nacobbus batatiformis* wurde auch bei Wurzeln der Zuckerrübe berichtet (Übersicht bei Dropkin 1969).

Einige der Zellen zwischen Hemmungszone und aktivierten Zellen streckten sich, enthielten elektronendichten Niederschlag und verdickten ihre Zellwände. Es erscheint möglich, daß diese Zellen sowohl den Transport von Komponenten des Reblausspeichels vom Einstichbereich (Hemmungszone) zu den benachbarten Geweben als auch die Wasser- und Nährstoffe-Versorgung zum Einstichbereich behindern könnten. Deshalb bleiben die Blattgallen von 'Börner' klein (s. u.), ebenfalls könnten die Rebläuse sich nicht ausreichend ernähren. Durch die Teilung und die Streckung der Zellen in der Umgebung der Hemmungszone wurde eine kleine Blattgalle ausgebildet. Diese Blattgalle und die Blattgalle bei anfälligen Rebsorten sind ähnlich (s. Einleitung). Außerhalb der aktivierten Zellen, in den angrenzenden gesunden Geweben, kam es gleichzeitig im Kontaktbereich zur Plasmolysierung der Zellen. Danach wurden phenolische Substanzen in dieser Zellen eingelagert, und sie starben ab. Infolgedessen wurden die Wasser- und Nährstoffe-Versorgung zum Gallbereich verhindert. Das hatte zur Folge, daß alle Zellen im Einstichbereich ca. 2 bis 20 Tage nach dem Reblaus-Einstich abstarben

und sich Blattnekrosen vom Typ II bildeten. Außerhalb dieses Nekrosebereiches, im angrenzenden gesunden Gewebe, kam es im Kontaktbereich zur Verdickung der Zellwände, und diese erschienen elektronendichter, weil sie lignifizieren (Histochemischer Nachweis s. S. 78).

Größe und Entwicklungszeit der Blattnekrosen vom Typ II hingen auch vom Alter des Blattes zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches ab. D. h., je älter die Blätter waren, desto größer waren Ausmaß und Entwicklungszeit der gebildeten Nekrose. Dies galt auch für die Blattnekrosen vom Typ I. Daraus geht hervor, daß die Geschwindigkeit der Abwehrreaktion auch von Blättern der Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff vom Ausmaß der Gewebedifferenzierung abhängt. Becker und Brückbauer (1955) und Niklowitz (1955) zeigten, daß die Zellen im Einstichbereich bei *Vitis rupestris* Ganzin und *V. riparia* nach dem Reblaus-Einstich abstarben und eine Nekrose ausgebildet wurde. Danach begann eine sekundäre Phase mit Zellvermehrung in der Umgebung der nekrotischen Zellen. Dieses Wundmeristem verkapselte den Nekrosenbereich, um ihn vom übrigen gesunde Gewebe zu isolieren. Durch diesen nekrogenen Vorgang wurden also immer wieder neue Zellen in den Bereich der Nekrosenflecke mit einbezogen, und der Nekrosebereich gewinnt immer mehr an Größe. Diese Beobachtungen konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Die Größe der ausgebildeten Nekrosen sind hier konstant geblieben.

Es wurde beobachtet, daß im Freiland häufig abgestorbene Reblauslarven auf den Blattnekrosen von 'Börner' zu finden sind. Es ist möglich, daß die Reblauslarven verhungerten, weil alle Zellen im Einstichbereich abstarben, und / oder sie durch phenolische Substanzen vergiftet wurden. Beckman (2000) zeigte, daß phenolische Substanzen als Toxine oder Repellents gegen Insekten wirken können.

Nekrotische Abwehrreaktionen wurden auch von anderen Pathogen - Pflanzen - Systemen nachgewiesen. Die resistenten Pflanzen reagieren auf Viren, Bakterien, Pilze, Nematoden oder parasitische Samenpflanzen mit Abwehrreaktionen, d.h. die Zellen im Infektionsbereich sterben ab, und verhindern die Verbereitung der Pathogene (Übersicht bei Wohanka 1973, Tomiyama 1982, De Wit 1987, Sigeo

1993, Kombrink, Somssich 1995, Greenberg 1997 Heath 1998 Gilchrist 1998 und Fink 1999, Lam et al 1999, und Beckman 2000).

Tomiya (1982) hat die Hypersensitivitäts-Reaktionen (HR) von Pflanzen gegen Pilze in vier Klassen unterteilt (Abb.39): Klasse A: Der Pilz (nicht-Pathogen) bildet ein Haustorium und die Zellwand des Wirtes verbräunt. Die infizierte Zelle stirbt nicht ab. Klasse B: Die infizierte Zelle stirbt früher als die benachbarten Zellen ab. Klasse C: Die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der infizierten Zelle (10-30%) sterben früher ab als die infizierte Zelle. Klasse D: Die infizierte Zelle stirbt nur nach dem Wachstum der Hyphen in den umgebenden Zellen ab. Die Intensität der Hypersensitivitäts-Reaktionen sinkt von Klasse A zu Klasse D.

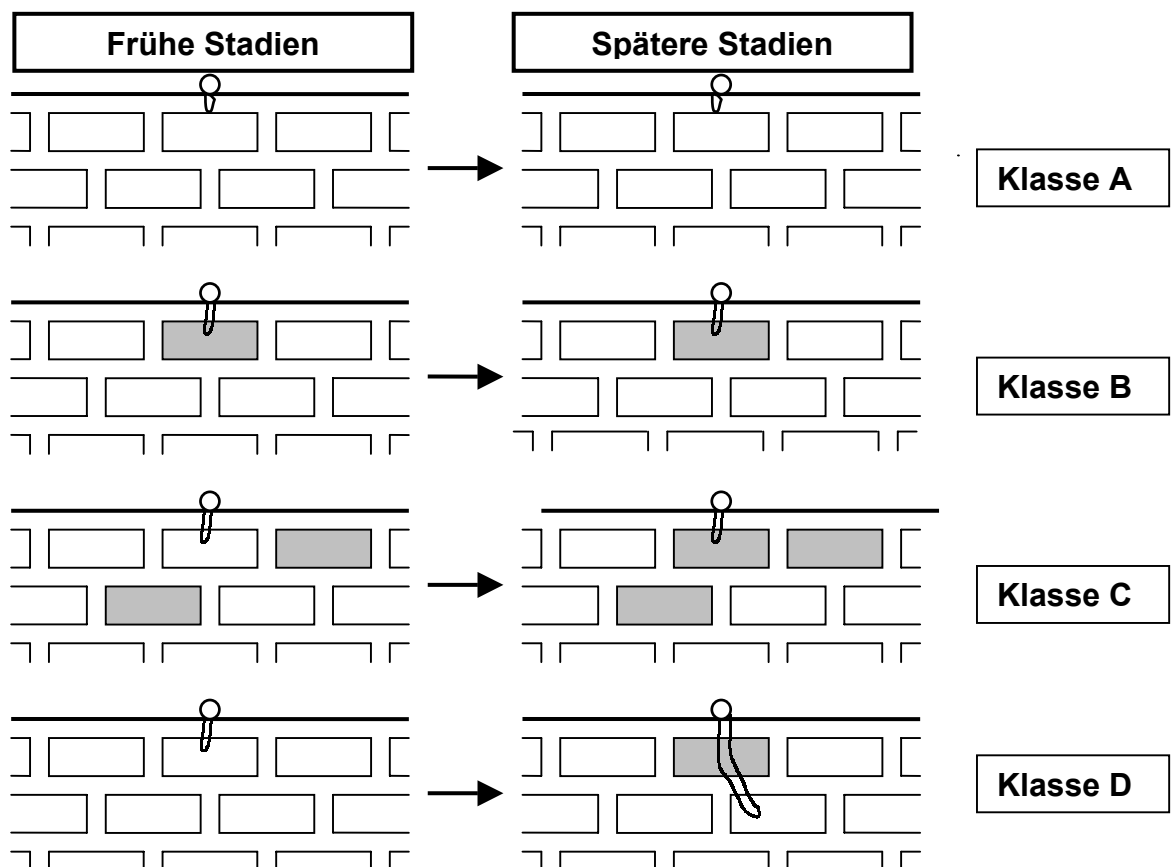


Abb.39: Die Typen der Hypersensitivitäts-Reaktionen gegen Pilze. Schattierung zeigt abgestorbene Zellen, Erläuterung siehe Text (nach Tomiyama 1982).

Die Nematoden (migratory root endoparasites nematods) stachen ihre Rüsselspitze in die äußeren Zellschichten des Rindengewebes ein, und ernährten sich einige Stunden vom Zellinhalt. Die angestochene Zelle verlor allerdings schnell ihren Turgor-Druck und vergrößerte ihren Kern und starb ab. Danach versuchte die Nematode in benachbarte Zelle erneut anzustechen. Als Folge der wiederholten Einstiche in benachbarten Zellen und deren Absterben entstand eine Nekrose (Townshend et al 1989, Castillo et al 1998 und Übersicht bei Fink 1999). Nach dem Befall der Pflanze *Arabidopsis thaliana* durch die Nematode *Heterodera glycines* nekrotisierten die Zellen in der Umgebung der unmittelbar angestochenen Zelle (Grundler, et al 1997). Einige resistente Pflanzen reagierten auf den Nematode-Befall mit der Entwicklung von Riesen -Zellen. Diese Zellen enthalten Nährsubstanzen für Nematoden. Etwa 3 bis 4 Tage nach dem Nematode-Einstich begannen die Zellen in der Umgebung der Riesen-Zellen zu nekrotisieren (Übersicht bei Dropkin 1969 und bei Bell 1981). Die Wurzeln der resistenten Pfirsich-Sorte 'Okinawa' reagierten auf den Nematodenangriff *Meloidogyne javanica* mit Entwicklung von Riesen -Zellen. Etwa 8 bis 10 Tage nach dem Nematode-Einstich begannen die Zellen in der Umgebung der Riesen-Zellen abzusterben. Als Folge davon starben alle Zellen im Einstichbereich ab (Malo 1966). Diese HR von Pflanzen gegenüber den Nematoden können in der Abbildung 40 dargestellt werden.

Bei 'Börner' waren die Hypersensitivitäts-Reaktionen bei den Wurzelnekrosen und Blattnekrosen vom Typ I darin ähnlich, daß die Zellen im Einstichbereich schnell abstarben. Im Gegensatz dazu starben bei Nekrosen vom Typ II 100% der Zellen im unmittelbaren Einstichbereich, sowie einige Zellschichten ab, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum Einstich liegen. Zwischen diesen 2 absterbenden Bereichen liegende Zellschichten starben erst wesentlich später ab. Dieser Fall stellt eine andere Klasse der (HR) dar. Entwicklung der Nekrosen vom Typ II bei 'Börner' (besonders an Blättern) und der Nekrosen bei Nematodenbefall (Abb. 41C) sind ähnlich, weil Nährgewebe als Folge des Reblausangriffes ausgebildet werden. Die HR von Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff können in Abb. 41 dargestellt werden.

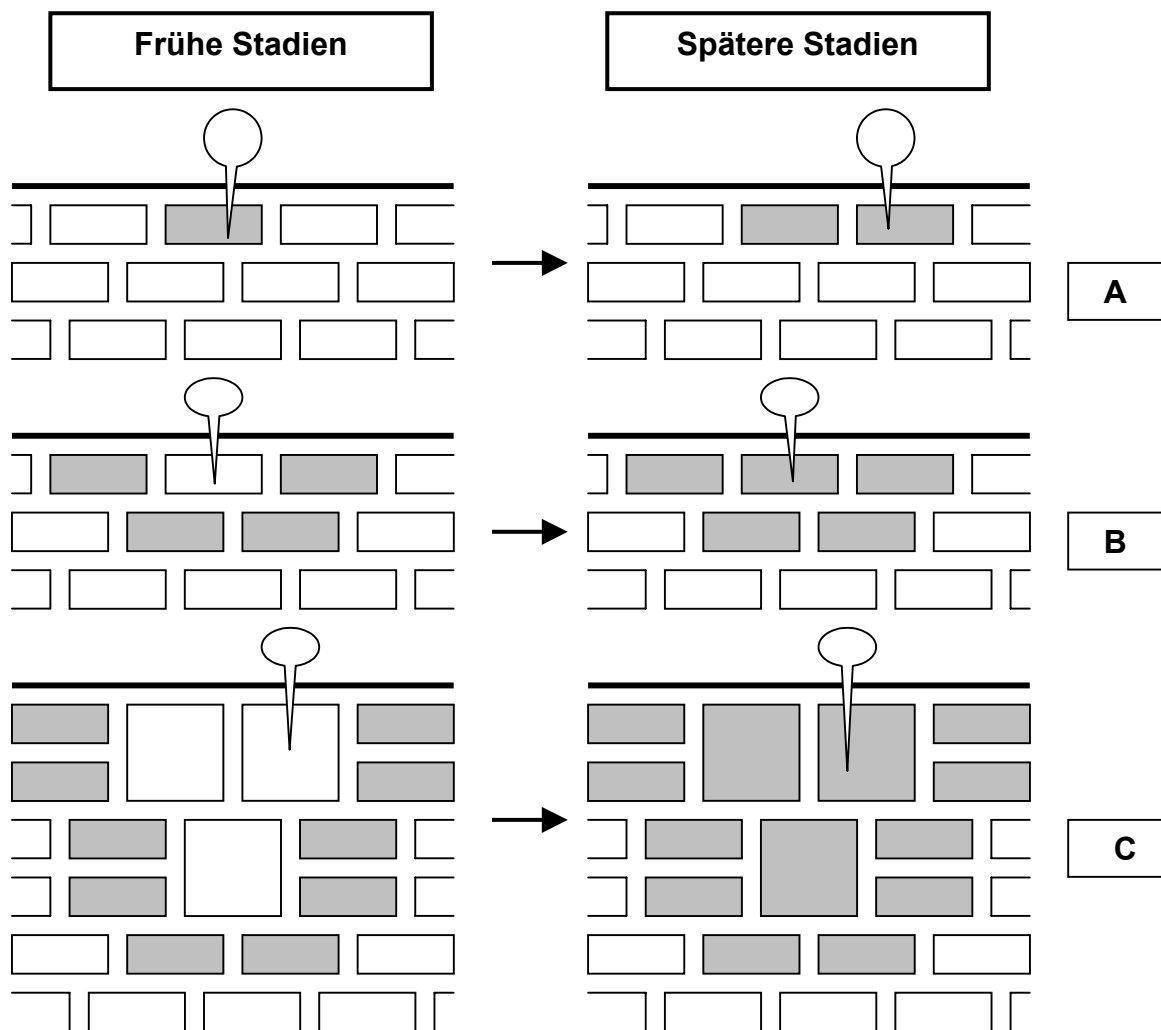


Abb. 40: HR-Typen gegenüber Nematoden. Schattierung zeigt abgestorbene Zellen.

Normale Zelle: , Riesen-Zelle: , Erläuterung siehe Text.

Es stellt sich die Frage, warum die Zellen im Umkreis der angestochenen Zelle beim Nekrosentyp II (Wurzeln und Blätter) am Leben geblieben sind, weiter entfernte Zellen absterben. Wenn Pflanzen mit Pathogenen infiziert werden, gibt es zwei Typen von Zelltod: 1. Hypersensitivitäts-Reaktion (rapid hypersensitive responses), als Folge der Resistenz der Pflanzen. Die Pathogene können in diesem Fall nicht wachsen, sich vermehren, und benachbarte Zellen infizieren. 2. Zelltod ist als Folge der Krankheit. Die Pathogene können sich vermehren und benachbarte Zellen infizieren.

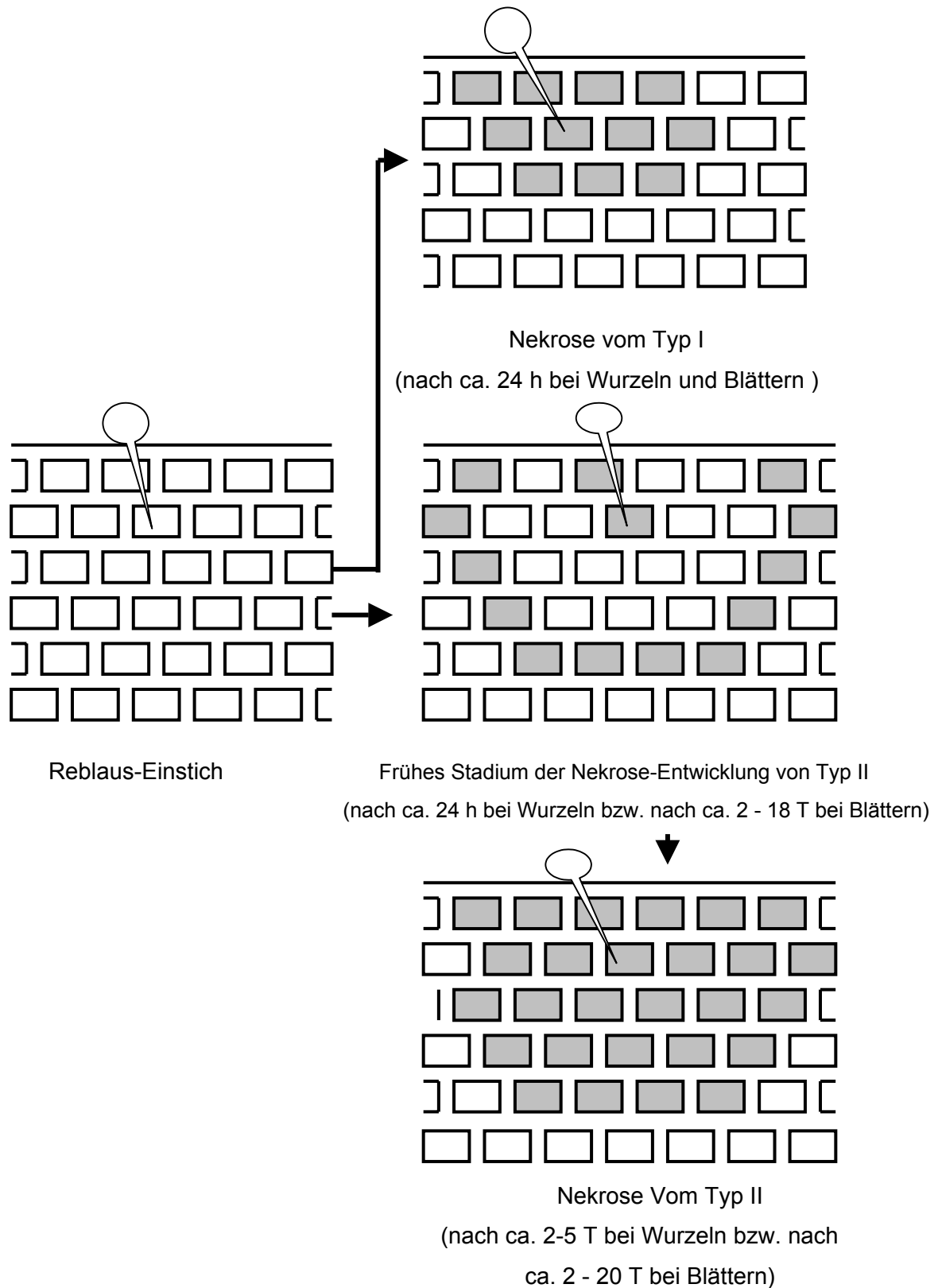


Abb. 41: HR-Typen der Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff. Schattierung zeigt abgestorbene Zellen.

Bezug zu 1. gibt es verschiedene Zelltod-Signale (z. B. Salizyl-Säure, "reactive Oxygen species" (ROS), Hormon-Balance, Pathogenesis - related - Gen, Ionen-Level, etc...) (Übersicht bei Atkinson, 1993, Kombrink und Somssich, 1995, Greenberg, 1997, Lam et al, 1999). Denkbar ist z. B., daß eine Signalkette als Folge des Reblaus-Einstichs in Gang gesetzt wird. Eine solches Signal (o. Signalkette) könnte möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Resistenz-Genexpression gemäß folgendem Schema (Abb. 42) spielen.

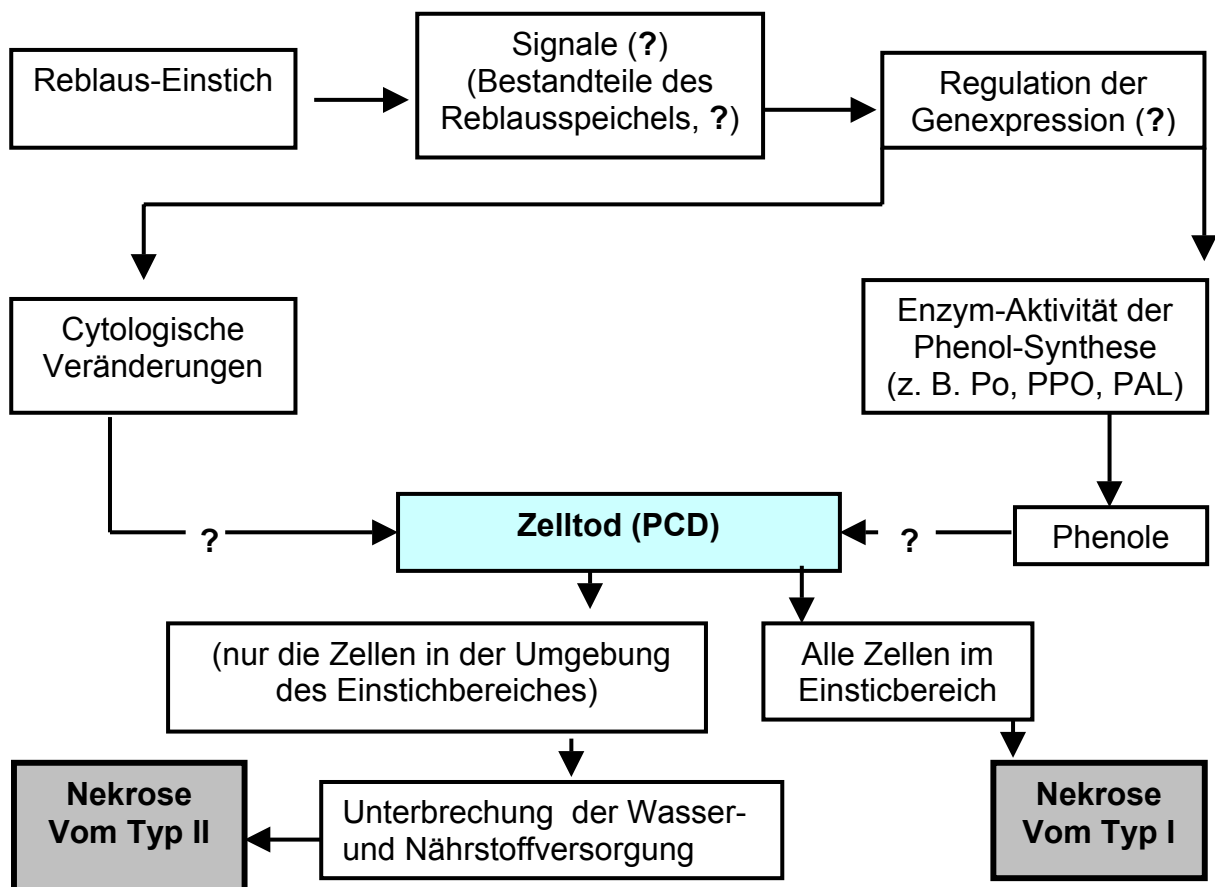


Abb. 42: Ablauf der HR auf zellulärem Niveau.

Dafür gibt es folgende Hinweise, die diese Hypothese unterstützen: 1. wenn resistente Pflanzen durch Pathogene infiziert werden, werden interzelluläre Signale induziert. Diese Signale aktivieren die entsprechenden Resistenz-Gene. Infolgedessen werden verschiedene Substanzen (z. B. phenolische Substanzen Phytoalexin, lytische Enzyme, etc...) synthetisiert. Diese können eine direkte oder indirekte Rolle bei der Abwehrreaktion gegen die Pathogene spielen (Übersicht bei

Dixon und Harrison 1990, Nicholson, 1992, Atkinson 1993, und Greenberg, 1997).).
2. Es gibt eine offensichtliche Korrelation zwischen dem Zelltod (PCD) und der Einlagerung phenolischer Substanzen (Übersicht bei Kosuge 1969 und Beckman 2000). Insbesondere deren gute mikroskopische Erkennbarkeit nach Oxidation macht sie geeignet als "Früherkennungsmerkmal" des PCD.

4.2.2.2 Blattgallen:

Die älteren Blätter der Unterlagsrebsorte 'Börner' (3. –5. Blattebenen) reagierten auf den Reblausangriff nicht mit Nekrosenbildungen, sondern mit schwachen Gallbildungen. Die frühen Entwicklungsstadien von Blattgallen bei 'Börner' lief zwar genau wie bei der Entwicklung von Blattnekrosen vom Typ II (s. o.), phenolische Substanzen wurden aber nicht intensiv in den Zellen zwischen den Gallgeweben und den gesunden Blattgeweben ausgebildet, und die Galle entwickelte sich weiter (Abb. 43). Die Blattgallen bei 'Börner' und bei anfälligen Rebsorten (z. B. 'SO4') sind ähnlich, aber es gibt einige Unterschiede :

1. Die Blattgallen an älteren Blättern von 'Börner' waren kleiner, während die jungen Blätter auf den Reblaus-Einstich nur mit Nekrosebildungen reagierten. Im Gegensatz dazu traten große Blattgallen bei anfälligen Rebsorten an jungen Blättern auf, d. h. an Blättern, bei denen die Phase der Mitoseaktivität noch nicht beendet war.
2. Die Blattgallen der Unterlagsrebsorte 'Börner' waren stets geöffnet, während sie sich bei den anfälligen Rebsorten schließen (vgl. Abb. 2, s. S. 4 und Abb. 43, s. S. 80)
3. Die Blattgallen bei 'Börner' enthielten keine Reblauseier. Es ist möglich, daß sich die Rebläuse nicht genug ernähren konnten. Im Gegensatz dazu enthielten die Blattgallen bei anfälligen Rebsorten viele Reblauseier (s. Einleitung).
4. Im Gegensatz zu den Blattgallen der anfälligen Rebsorten (z. B. 'SO4') starben die Zellen der Hemmungzone bei 'Börner' nach ca. 5 Wochen ab (Abb. 42).

An gestutzten Topfreben der Unterlagsrebsorten 'Börner' und 'SO4' konnten die Reblauslarven weder Blattnekrosen noch Blattgallen verursachen. Bei der Übertragung des Reblaus-speichels auf junge Blätter anfälliger Rebsorten reagierte das Blattgewebe mit normalen Gallenbildungen. Ältere Blätter vermochten überhaupt nicht mehr mit einer Gallenbildung zu reagieren (Anders 1957). So ist es möglich, daß die Reblauslarven nicht auf den älteren Blättern einstachen könnten, oder die Reblauslarven auf diesen Blättern eingestochen könnten, aber die Blattgewebe nicht mit der Bildung von Blattnekrosen oder Blattgallen reagiert könnten.

4.3 Histochemische Beobachtungen:

Wurzelnekrosen vom Typ II wurden durch suberinisierte Zellwände begrenzt, aber Blattnekrosen vom Typ II wurden durch lignifizierte Zellwände begrenzt. Diese Ergebnisse wurden durch elektronenmikroskopische Beobachtungen (Abb. 14, s. S. 35 und Abb. 25, s. S. 49) gestützt.

Pilze, Bakterien, Viren, und Nematoden, die das Gewebe infizieren, sondern Substanzen ab, welche die Wirtszellen anregt, suberinisierte und / oder lignifizierte Gewebe zu bilden. Diese grenzt die infizierte Stelle von dem gesundem Gewebe ab (Übersicht bei Ride, 1979, Agrios, 1988, Kombrink und Somssich, 1995, Greenberg, 1997, Lucas, 1998, und Beckman, 2000). Suberinisierungen behindern den Transport von Wasser und Nährstoffen zum Einstichbereich. Es ist möglich, daß die Zellwände in der Umgebung von Blattnekrosen nicht ausreichend genug suberinisiert wurden, um Suberin cytologisch nachzuweisen.

4.4 Vergleich zwischen den Abwehrreaktionen der Wurzeln und der Blätter der Unterlagsrebsorte `Börner`:

1. Die Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` reagierten auf den Einstich der Rebläuse nur mit Nekrosenbildungen (Typ I und II), die Blätter mit Nekrosen (Typ I und II) und auch mit schwachen Gallbildungen.
2. Bei der Entwicklung der Blattnekrose Typ II wurde Zellwachstum im Einstichbereich aktiviert, nicht bei Wurzelnekrose Typ II.
3. Die Wurzelnekrosen vom Typ II entwickeln sich schneller als die Blattnekrosen vom Typ II.

Somit ist das Abwehrpotential der Wurzeln höher als das der Blätter einzustufen. Abb. 43 stellt die verschiedenen Abwehrreaktionen sowohl von den Wurzeln als auch von den Blättern der Unterlagsrebsorte `Börner` dar (vgl. Abb. 2, s. S. 4 und Abb. 43, s. S. 80)

4.5 Biochemische Beobachtungen:

Enzym-Aktivitäten der Phenol-Synthese (z. B. Peroxidase, Polyphenoloxidase und Phenylalanin-Amonium-Lyase) sind nach dem Reblausbefall der Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` erhöht.

Neben der Expression hydrolytischer Enzyme gibt es in der Pflanze weitere Resistenzmechanismen, die aktiviert werden können, darunter die Bildung antimikrobiell wirkender phenolischer Substanzen und des Lignins. Pflanzen produzieren während ihres Wachstums viele verschiedene Phenolverbindungen. Diese Phenolderivate bilden Pigmente zum Schutz vor UV-Strahlung und dienen zum Aufbau der Zellwand (Halbrock und Griesbach 1979 und Beckman 2000). Einige pflanzliche Phenolderivate, darunter Chinone, Cumarine und Phytoalexine besitzen antimikrobielle Eigenschaften. Lignin dagegen ist indirekt an der Pathogenabwehr beteiligt, in dem es die Pflanzenzellwand verstärkt. Die Lignifizierung kann daher als weiterer Mechanismus zur Abwehr von Erregern gedeutet werden (Srivastava 1987 und Barber et al 1989).

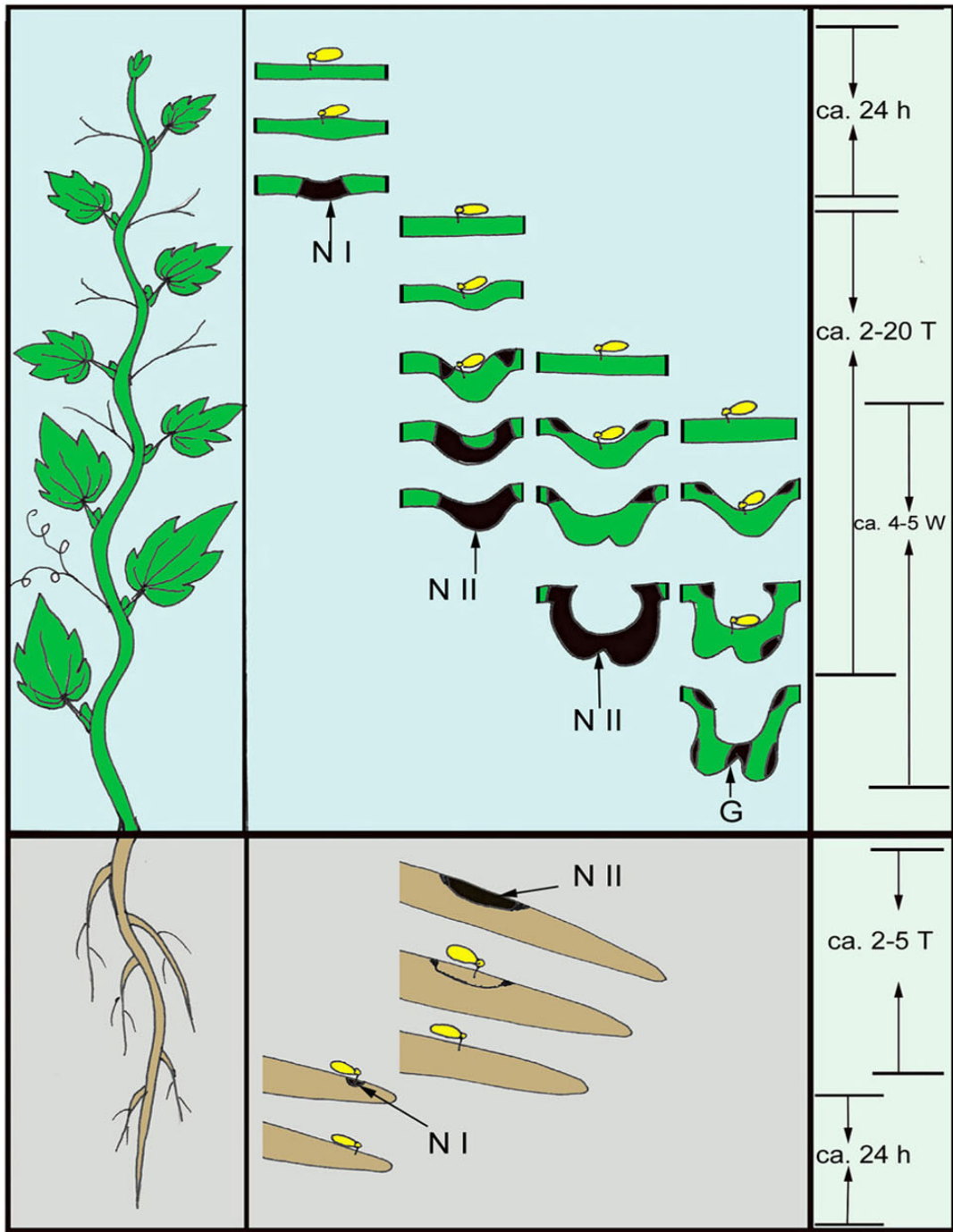


Abb. 43: Vereinfachte Darstellung der Abwehrreaktionen von Blätter und Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' gegen Rebläuse im zeitlichen Ablauf. G = Blattgalle, h = Stunde, N I = Nekrose vom Typ I, N II = Nekrose vom Typ II, W = Woche.

Die Phenolverbindungen der höheren Pflanzen werden vor allem über den Shikimatweg synthetisiert. Die Synthese kann durch äußere Einflüsse wie Streßfaktoren oder Hormone stimuliert werden (Schneider-Müller 1991 und Beckman 2000).

Das Schlüsselenzym der Phenolsynthese ist die Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL). Dieses Enzym bildet aus Phenylalanin durch oxidative Desaminierung Zimtsäure, die das Ausgangssubstrat für verschiedene Phenolderivate darstellt. An der Synthese dieser Derivate sind unter anderem Peroxidase (PO) und Polyphenoloxidase (PPO) beteiligt, wie in folgendem Schema (Abb. 44), beschrieben wurde.

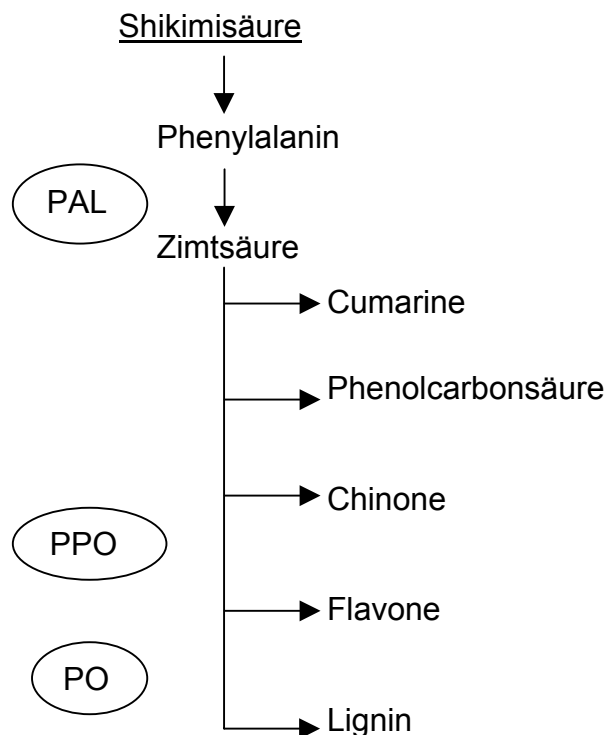


Abb. 44: Einige an der Synthese von Phenolderivate beteiligte Enzyme (nach Schneider-Müller 1991).

Sopp (1993) stellte fest, daß die Aktivität der Enzyme PPO und PO bei anfälligen und auch bei resistenten Unterlagsrebsorten nach Nematodenangriff *Xiphinema index* signifikant erhöht ist. Die höchste Enzymaktivität konnte in den von *X. index* parasitierten Wurzeln der Rebsorte 'Börner' nachgewiesen werden. Es

wurde festgestellt, daß die Bildung der an der Phenolderivatproduktion beteiligten Enzyme, darunter PAL, PPO und PO nach Infektion induziert wird (Übersicht bei Kosuge, 1969, Grzelinska und Sierakowaska, 1975, Vegetti, et al. 1975, Weststeijn, 1976 und Mark Lagrimini und Rothstein 1987).

Man stellte fest, daß die Peroxidase-Aktivität im Wundgewebe von Kartoffelknollen und von Paprikablättern generell erhöht war (Espelie, et al 1986 und Dia`z und Merino 1997). Die Peroxidase-Aktivität wurde nach Befall von Tomatenpflanzen durch Nematoden *Meloidogyne incognita* (Zacheo, et al 1982) und Tabak durch Verwundung und TMV (tobacco mosaic virus), (Weststeijn 1976 und Mark Lagrimini und Rothstein 1987) erhöht. Untersuchungen der Peroxidase und Polyphenoloxidaseaktivität in verhältnismäßig resistenten und empfindlichen *Brassica juncea* Sorten zu aufeinanderfolgenden Terminen nach einer Inokulation mit verschiedenen *Macrophomina phaseolina* –Isolaten zeigten, daß die Aktivität dieser Enzyme in befallenem Gewebe höher als die in gesundem Gewebe war. Kortekamp und Zyprian (1998) haben festgestellt, daß Plasmoparainfektion bei resistenten Rebsorten die Peroxidase-Aktivität steigert. Diese Untersuchungsergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle dieser oxidierenden Enzyme in der Resistenz gegenüber Krankheiten hin (Srivastava 1987).

Der Gehalt an löslichen Proteinen war nach dem Befall der Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` durch Rebläuse erhöht. Pflanzen reagierten auf einen Befall durch Pathogene häufig mit der Neubildung von speziellen Proteinen, den sogenannten „ Pathogenesis-related-Proteins“ oder PR-Proteinen, (Pierpoint et al. 1981, Schneider-Müller 1991, Kombrink und Somssich 1995 und Übersicht bei Fink 1999). Ohashi und Matsuoka (1987) stellte fest, daß PR-Proteine durch Befall von TMV und die Behandlung mit IES induziert wurden.

Procyanidine waren nach dem Befall der Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` durch Rebläuse erhöht. Im Gegensatz dazu waren Procyanidin-Glykosid und Ellagsäure erniedrigt. Diese Phenole wurden während der Probenaufbereitung offensichtlich nicht oxidiert. Es wäre möglich, daß auch andere Phenole induziert wurden, diese aber während der Probenaufbereitung oxidieren und damit nicht nachweisbar waren. Habermann (2000) stellte fest, daß der Procyanidin- und

Tannin-Gehalt der Nadeln bei der europäischen Lärche *Larix decidua* Mill. und japanische Lärche *L. leptolepis* Gord. durch den Befall von *Coleophora laricella* Hbn. erhöht sind, jedoch Protein-Aminosäuregehalt erniedrigt ist. Als Folge davon verschlechtert sich die Verdaubarkeit der Nadeln und das Populations -Wachstum des Schädlings nimmt ab. Es wäre denkbar, daß die erhöhte Konzentration von Procyanidinen nach dem Reblausangriff eine Rolle beim Verhungern oder Vergiftung der Rebläuse spielen könnte.

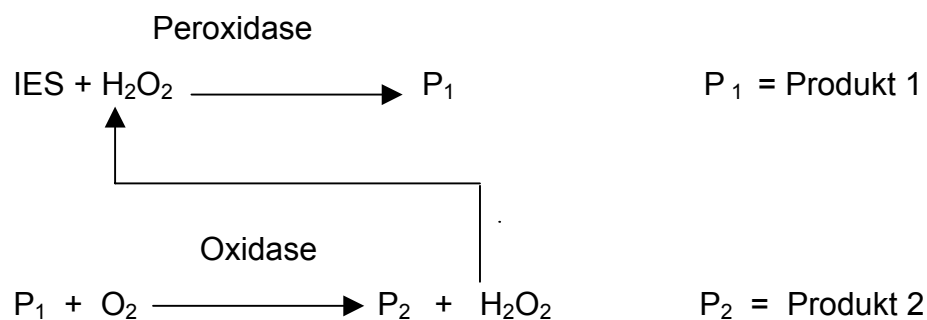
Bei den Blättern besteht in den 5 Blattebenen der Rebsorten 'Börner', 'SO4' und 'Riesling' keine Korrelation zwischen dem Basis-Gehalt an Gesamtphenolverbindungen und der Reblausresistenz. Diese Beobachtung wurde auch von Henke (1958) an anderen anfälligen Rebsorten gemacht.

4.6 Experimentelle Induktion von Nekrosen und Gallen:

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, enthält der Reblauspeichel verschiedene Aminosäuren und Amide (Schäller1960). Ebenso wurde festgestellt, daß der Aphidenspeichel verschiedene Aminosäuren und IES enthält. Einige phytopathogene Bakterien produzieren ebenfalls IES im Kulturmedium, (Audus 1965).

IES-Behandlungen verursachte an Blättern von 'SO4' und Wurzeln von 'Riesling' Wachstumsveränderung an der Applikationsstelle. Diese Wachstumsveränderung erfolgte durch Zellstwachstum. Anders (1958) und Schäller (1966) stellten fest, daß IES-Behandlung an Blättern und Wurzeln von anfälligen Rebsorten (*V. rupestris* Geisenheim 187, *V. riparia* Geisenheim 181, *V. riparia* X *V. rupestris* M. G. 101. M.) Gallen induziert. Der Speichel der Aphidenarten, die starke Gallenbildung verursachten, enthielt mehr IES als der Speichel der Arten, die schwache Gallenbildung verursachen (Schäller, 1968). Die Infektion an Stengeln der Taubenerbse *Cajanus cajan* (L.) Huth mit *Phytophthora drechsleri* f. Sp. *cajani* und die Behandlung mit IES verursachten Gallbildungen. Die Gallen an natürlich infizierten Stengeln waren größer als an künstlich inokulierten Stengeln (Chauhan, et al. 2000). Das deutet darauf hin, daß IES eine direkte oder indirekte Rolle bei der Induktion und Gallenentwicklung spielt.

Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum der Blätter und der Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' an der IES-Applikationsstelle nicht verändert. Phenolische Substanzen wurden intensiv in der Umgebung der Applikationsstelle eingelagert. Das deutet darauf hin, daß IES bei 'Börner' die Phenol-Synthese stimuliert. Goldacre (1960) hat die Korrelation zwischen Peroxidase und IES nach folgendem Schema beschrieben:



Grzelinska und Sierakowska (1975) und Grambow und Langenbeck-Schwich (1983) fanden, daß Peroxidase und phenolische Substanzen IES zu Indol-3-methanol und Methylenoxiindol umsetzen. Es wurde festgestellt, daß eine Korrelation zwischen PPO-Aktivität und IES-Synthese besteht, d. h. je höher die PPO-Aktivität ist, desto höher ist die IES-Synthese aus Tryptophan (Gordoon und Paleg 1961, Mace und Solit 1966 und Matta und Gentile 1968). Ebenso gibt es eine Beziehung zwischen IES und phenolischen Substanzen. Monophenolische Substanzen verringern die IES-Aktivität, aber polyphenolische Substanzen erhöhen sie (Übersicht bei Miles 1989). In der Pflanze steigert IES die Phenolsynthese, und phenolische Substanzen erhöhen wiederum den Gehalt an IES mittels der Hemmung der IES-Oxidase (Kosuge 1969 und Übersicht bei Fink 1999). Ebenfalls gibt es eine Korrelation zwischen IES und der Resistenz von Pflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen. Die Behandlung von Mais mit IES steigert ihre Resistenz gegen *Helminthosporium* (Hoffmann und Zscheile 1973 und Übersicht bei Bell 1981). Deng et al (1995) stellten fest, daß wenigstens 2 Gene der Auxin-Synthese und -Regulierung, nämlich *tms1* und *6b*, für die Induktion von Nekrosen in Weinreben gegen *Agrobacterium tumefaciens* verantwortlich sind.

Aminosäuren oder Aminosäurengemisch konnten weder bei den anfälligen Rebsorten (Blätter der `SO4` und Wurzeln der `Riesling`) noch bei der Unterlagsrebsorte `Börner` Reaktionen hervorrufen. Dies deutet darauf hin, daß die Behandlungen nur mit Aminosäuren oder Aminosäurengemisch keine Rolle bei den Gallenbildungen (anfälligen Rebsorten) oder bei den Nekrosebildungen (z. B. `Börner`) spielen.

Wir konnten besonders bei `Börner` keine Unterschiede zwischen den Behandlungen nur mit IES und den Behandlungen mit IES + einzelne Aminosäuren oder IES + Aminosäurengemisch feststellen. Daraus geht hervor, daß Aminosäuren oder ein Aminosäurengemisch wahrscheinlich keine Rolle bei den Nekrosenbildungen spielen. Auf der andere Seite verursacht die Behandlung mit 0,05% IES in 0,1% Aminosäurengemisch eine Schwellung (keine richtige Blattgalle) an der Applikationsstelle der Blätter der Rebsorte `SO4`. Im Gegensatz dazu haben Anders (1958) und Schäller (1966) festgestellt, daß diese Konzentrationen vom Aminosäurengemisch oder von einzelnen Aminosäuren richtige Gallen (Blattgallen und Nodositäten) bei anfälligen Rebsorten hervorrufen.

Die benutzenden Konzentrationen von IES, einzelnen Aminosäuren und Aminosäurengemischen sind unphysiologische Behandlungen, weil sie sehr hoch sind. Diese Konzentrationen wurden in der Literatur beschrieben (Anders,1958 und Schäller, 1966). Es ist allerdings unbekannt, wieviel dieser Stoffe in die Gewebe bzw. Zellen gelangen und damit biologisch aktiv sind.

Es wurde beobachtet, daß die Blatt- und Wurzel-Verwundungen der anfälligen Rebsorten (z. B. `SO4`und `Riesling`) und der resistenten Rebsorten (z. B. `Börner`) keine Gall- oder Nekrose-Bildungen verursachen. Anders (1957) stellte fest, daß anfällige Rebsorten bei der Übertragung des Reblauspeichels auf junge Wurzelspitzen oder junge Blätter ohne Verwundung mit Nodositäten- oder Blattgallen-Bildungen reagieren. Daraus kann man schließen, daß Gallen bei anfälligen Rebsorten und Nekrosen bei resistenten Rebsorten nicht mechanisch sondern chemisch induziert werden.

Abschließend ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen, daß die Geschwindigkeit der Abwehrreaktion der Unterlagsrebsorte `Börner` gegenüber dem Reblausangriff vom Ausmaß der Gewebedifferenzierung abhängt. Es ist wahrscheinlich, dass IES eine direkte oder indirekte Rolle bei der HR-Entwicklung spielt. Daraus geht hervor, daß die Abwehrreaktion der Unterlagsrebsorte `Börner` gegenüber dem Reblausangriff von mehr als einem Gen abhängt bzw. reguliert wird. Die Unterlagsrebsorte `Börner` dürfte für die Praxis von großem Interesse sein, da sie außer den oben genannten Eigenschaften zusätzlich eine gute weinbauliche Eignung aufweist. Die Sorte ist seit der EG-Klassifizierung im Jahr 1991 zum Anbau zugelassen. Insbesondere im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes und des umweltschonenden Weinbaues hat die Verwendung der Unterlagen-Neuzüchtung `Börner` als indirekte Maßnahme zur Bekämpfung der Reblaus beigetragen. Es bleibt weiteren Forschungen vorbehalten, diese Gene und Signale zu identifizieren, um dieses Wissen gezielt in der Züchtung einsetzen zu können.

5. Zusammenfassung:

Der Resistenzmechanismus der Unterlagsrebsorte 'Börner' (*Vitis riparia* x *V. cinerea*) gegenüber dem Reblausangriff *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch) wurde im *in vitro*, im Gewächshaus und im Freiland histologisch, cytologisch, histochemisch und biochemisch untersucht. Ein unsteriles Wurzel-Kultur-System wurde entwickelt, um die Abwehrreaktionen im Detail zu beobachten. Die Wurzeln reagierten auf den Einstich der Reblaus mit Nekrosebildungen. Es gibt zwei verschiedene Wurzelnekrosentypen. Das hängt von dem Alter des entsprechenden Wurzelabschnittes zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches ab. Der erste Wurzelnekrosentyp (Typ I) entwickelte sich auf weniger differenzierten Wurzelgeweben. Etwa 5 Stunden nach dem Reblaus-Einstich färbte sich das Gewebe um die Einstichstelle im Durchmesser von ca. 0,5 mm braun. Etwa 12 - 24 Stunden nach dem Reblaus-Einstich starben diese Zellen ab und bildeten Wurzelnekrose Typ I.

Der zweiten Wurzelnekrosentyp (Typ II) entwickelte sich auf mehr differenzierten Wurzelgeweben. Die Rebläuse stachen stets in die Streckungszone ein. Etwa 12 Stunden nach dem Reblaus-Einstich entwickelte sich eine begrenzte ringförmige Braunfärbung um die Einstichstelle. Die Zellen im braungefärbten Ring plasmolysieren. Nach ca. 24 Stunden begannen sich phenolische Substanzen in diese Zellen einzulagern. Während in der unmittelbaren Umgebung der Einstichstelle die Zellen am Leben geblieben sind, kam es der daran angrenzenden Zone, von außen nach innen fortschreitend, zum Absterben der Zellen. Außerhalb dieses Bereiches, in der angrenzenden gesunden Geweben, kam es im Kontaktbereich zur Verdickung der Zellwände, diese suberinisierten und erschienen elektronendichter. Zwei bis fünf Tage nach dem Reblaus-Einstich starben alle Zellen im Einstichbereich ab, und bildeten Wurzelnekrose Typ II.

Die Abwehrreaktionen von Blättern der Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff wurden an intakten Pflanzen untersucht. Die Blätter der Unterlagsrebsorte 'Börner' reagierten auf den Reblaus-Einstich, abhängig vom Blattalter bzw. vom Differenzierungsgrad der betroffenen Gewebe, nicht nur mit Nekrosebildungen, sondern auch mit unvollständigen Gallbildungen. Die jungen Blätter reagierten auf den Einstich der Reblaus mit Nekrosebildungen. Je nach dem Ausmaß der Gewebedifferenzierung gibt es zwei verschiedene Nekrosetypen. Blattnekrosen des Typs I entwickelten sich innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach dem Reblausangriff an sehr jungen, noch nicht entfaltetten Blättern.

An den gerade entfaltetten Blättern (1. bis 3. Blatt von oben) trat der zweite Blattnekrosetyp auf. Durch die Zell-Teilung und -Streckung in der Umgebung der Hemmungszone wurde eine kleine Blattgalle ausgebildet. Außerhalb des Gallgewebes, in den angrenzenden gesunden Gewebe, kam es gleichzeitig im Kontaktbereich zur plasmolysierung der Zellen. Dann wurden phenolische Substanzen in dieser Zellen eingelagert, und sie starben ab. Als Folge davon starben alle Zellen ca. 2 - 20 Tage nach dem Reblaus-Einstich im Gallbereich ab, und sich Blattnekrose Typ II bildeten. Es wurde beobachtet, daß im Freiland häufig abgestorbene Reblauslarven auf den Blattnekrosen von 'Börner' zu finden sind.

Größe und Entwicklungszeit der Wurzel- und Blattnekrosen vom Typ II hingen vom Alter des Gewebes zum Zeitpunkt des Reblaus-Einstiches ab. D. h., je älter die Gewebe sind, desto größer sind Ausmaß und Entwicklungszeit der gebildeten Nekrose. Dies gilt auch für die Wurzel- und Blattnekrosen vom Typ I. Daraus geht hervor, daß die Geschwindigkeit der Abwehrreaktion von Blättern und Wurzeln der Unterlagsrebsorte 'Börner' gegenüber dem Reblausangriff vom Ausmaß der Gewebedifferenzierung abhängt.

Wurzel- und Blattnekrosen folgten den gleichen Entwicklungsprinzipien. Die erhobenen cytologischen, ultrastrukturellen und histochemischen Daten zeigten, daß es sich hierbei um eine Hypersensitivitäts-Reaktion bzw. um Apoptose (PCD, programmed cell death) handelt.

Die älteren Blätter der Unterlagsrebsorte `Börner` (3. – 5. Blattebenen) reagierten auf den Reblausangriff nicht mehr mit Nekrosenbildungen, sondern mit schwachen Gallbildungen. Diese Blattgallen sind klein (1 bis 1,5 mm Durchmesser). Sie enthielten keine Leitgewebe und bleiben geöffnet. Die Rebläuse haben keine Eier in diesen Blattgallen abgelegt. Wenn die fünf oberen Blattebenen entfernt werden, konnten die Rebläuse weder Blattnekrosen noch Blattgallen verursachen.

Die Phenol-Synthese-Aktivitäten (Peroxidase, Polyphenoloxidase und Phenylalanin-Ammonium-Lyase) und die Konzentration löslicher Proteine in den Wurzeln der Unterlagsrebsorte `Börner` sind bei Reblausbefall signifikant erhöht. Ebenfalls ist der Procyanidingehalt durch Reblausbefall der Wurzeln erhöht, aber Procyanidin-Glykosid- und Ellagsäure-Gehalt sind erniedrigt. Es konnten jedoch keine direkten Korrelationen zwischen dem Phenolgehalt der Blätter und den Nekrosebildungen festgestellt werden.

Nekrosen und Gallen konnten experimentell nicht mechanisch sondern nur chemisch induziert wurden. Indol-essigsäure (IES) spielte eine wichtige Rolle bei den Abwehrreaktion der Unterlagsrebsorte `Börner` gegen Reblausangriffe.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Unterlagsrebsorte `Börner` auf den Reblausangriff mit verschiedenen bzw. abgestuften Abwehrreaktionen sowohl der Wurzeln als auch der Blätter reagieren. Das deutet darauf hin, daß die Abwehrreaktionen der Unterlagsrebsorte `Börner` von mehr als einem Gen abhängen bzw. reguliert werden. Es bleibt weiteren Forschungen vorbehalten, diese Gene und Signale zu identifizieren, um dieses Wissen gezielt in der Züchtung einsetzen zu können.

6. Literaturverzeichnis:

- Anders, F., (1957): Neuere Auffassungen über die Reblaus-resistenz. *Vitis* 1 : 142-152.
- Anders, F., (1958): Das galleninduzierende Prinzip Reblaus (*Viteus vitiflilii* shimer). *Zool. Anz.* 22: 355-365.
- Agrios, G. N. (1988): *Plant Pathology*. Ebird Edition, Sau Diago u. a., Academic Press Inc., P: 97-105.
- Askani, A. and R. Beiderbeck (1991): In Vitro propagation of *Dactylosphaera vitifolii* SHMER (Homoptera: Phylloxeridae) on shoot and root cultures of a *Vitis* hybrid. *Vitis*, 30: 223-232.
- Atkinson, M. M. (1993): Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. *Advances in plant pathology*, Vol. 10: 33-63.
- Audus, L. J. (1965): *Plant growth substances*. Interscience publishers, INC. New York, p.476.
- Barber, M. S., R. E. Bertram and J. P. Ride (1989): Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 3-12.
- Batra, G. K. & C. W. Kuhn (1975): Polyphenoloxidase and Peroxidase activities associated with a cquired in Virus- infected Soybean. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 239-248.
- Becker, H. und H. Brückbauer (1955): Untersuchungen zur Histogenese der Reblausblattgallen. *Gartenbauwiss.* 19, 450-456.

-
- Becker, H. (1988): Braucht der deutsche Weinbau die Rebenzüchter noch ? Deutsches Weinbau – Jahrbuch. P 53-66.
- Beckman, H. C (2000): Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plant?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 101 - 110.
- Bell, A. A. (1981): Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Physiol.* 32:21-81.
- Biggs, A. R. und W. Stobbs (1986): Fine structure of the suberized cell wall in the boundary zone and necrophylactic periderm in wounded peach bark. *Can. J. Bot.* 64: 1606-1610.
- Börner, C. (1943): Die ersten reblausimmunen Rebenkreuzungen. *Angew. Botanik* 25: 126-143.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72: 248-254.
- Castillo, P., N. Vovlas und R. M. Jimenez-Dias (1998): Pathogenicity and histopathology of *Pratylenchus thornei* populations on selected chickpea genotypes. *Plant Pathol.* 47: 370-376.
- Chauhan, V. B., P. N. Singh und U. P. Singh (2000): Role of indole-3-acetic acid in gall formation in *Phytophthora*-infected stem of pigeonpea. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(6). 637-642.
- Crisan, E. V. (1973): Effect of aflatoxin on seedling growth and ultrastructure in plants. *Appl. Microbiol.* 12: 991-1000.
- Deklerk, C. A. (1974): Biology of *Phylloxera vitifoliae* (fitch) (Homoptera: Phylloxeridae) in South Africa. *Phytophylactica* 6: 109-118.

-
- Deng, W., Xin-an Pu, R. N. Goodman, M. P. Gordon and E. W. Nester (1995):
T-DNA Genes responsible for inducing a necrotic response on Grape Vines.
MPMI vol. 8 No. 4 , PP. 538-548.
- De Wit, P. J. G. M. (1987): Specificity of active resistance mechanisms in plant-fungs
interaction. In: Pegg, G. F. & P. G. Ayres, Fungal infection of plant,
Cambridge University press, P: 1 24.
- Diàz, J. and F. Merino (1997): Wound-induced shikimate dehydrogenase and
peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.). J. P.
Physiol. Vol. 152: 51-57.
- Dixon, R. A. and M. J. Harrison (1990): Activation, structure, and organization of
genes involved in microbial defense in plants. In: Scandalios J. G. und T. R.
F. Wright , Advances in genetics, Vol. 28, PP. 165-233, Academic Press,
Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, New York, Boston,
London und Tokyo.
- Dropkin, V. H. (1969): Cellular responses of plants to nematode infections. Ann. Rev.
Phytopathol. 7: 101-122.
- Duncan, B.D. (1955): Multiple range and multiple F.Test. Biometrics 11:1-42.
- Duspiva, F. (1954): Weitere Untersuchungen über stoffwechsel-physiologische
Beziehungen zwischen Rhynchoten und ihren Wirtspflanzen. Mitteilungen
der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 80: 155-162.
- Espelie, K. E., V. R. Franceschi and P. E. Kolattukudy (1986): Immunocytochemical
localization and Time course of appearance of anionic peroxidase associated
with suberization in wound-Healing potato tuber tissue. Plant physiol.81: 487-
492.
- Feder, N. und T. P. O'Brien (1968): Plant Microtechnique: Some Principles and new
methods. Amer. J. Bot. 55(1): 123-142.

-
- Fink, S. (1999): Pathological and regenerative plant anatomy. Spezieller Teil, Band XIV, Teil 6 Gebrüder Borntraeger. Berlin . Stuttgart, Germany.
- Forneck, A., M. A. Walker and N. Merkt (1996): Aseptic dual culture of grape (*Vitis spp.*) and grape phylloxera (*Daktulospharia vitifoliae* Fitch). *Vitis*, 35 (2): 95-97.
- Gilchrist, D. G. (1998): Programmed cell death in Plant disease: The Purpose and Promise of Cellular Suicide. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 36: 393-414.
- Goldacre, P. L. (1960): Plant growth regulation. Fourth international conference on plant growth regulation, The Indole-3-acetic acid Oxidase-Peroxidase of Peas. P.143-147.
- Gordon, S. A. and L. G. Paleg (1961): Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols. *Plant Physiol.* 36:838-845.
- Grambow, H. J. and B. Langenbeck-Schwich (1983): The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro. *Planta*, 157: 131-137.
- Greenberg, J. T. (1997): Programmed cell death in Plant-Pathogen interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 525-545.
- Grundler, F. M. W., M. Sobczak and S. Lange (1997): Defence responses of *Arabidopsis thaliana* during invasion and feeding site induction by the Plant-Parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:419-429.
- Grzelinska, A. and J. Sierakowska (1975): Effect of Infection with *Verticillium alboatrum* and agents interacting with DANN on the Activity of peroxidase and phenylalanin Ammonia Lyase. *Phytopath. Z.*, 84: 271-280.

-
- Gutmann, M. (1995): Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy*. Vol. 179, pp. 277-281.
- Habermann, M. (2000): The Larch casebearer and its host tree: II. Changes in needle physiology of the infested trees. *Forest Ecology and Management*, 136: 23-34.
- Halbrock, K. and H. Griesbach (1979): Enzymic control in the biosynthesis of Lignin and Flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 105-130.
- Heath, M. C. (1998): Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 117-124.
- Heller, A., F. Grossmann, B. Frenzel and S. Hippe (1990): A cytological study of the development of *Erysiphe graminis* in its host barley, as influenced by the two fungicides ethirimol and propiconazole. *Can. J. Bot.* 68: 2618-2628.
- Henke, O., (1958): Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der Reblausresistenz der Reben. *Phytopath. Z.* 32: 149-166.
- Hofmann, E. (1957): Die Histologie der Nodositäten verschiedener Rebensorten bei Reblausbefall. *Vitis* 1, 66-81.
- Hoffmann, S.E. and F. P. Zscheile (1973): Leaf bioassay for *Helminthosporium carbonum* toxin-search for phytoalexin. *Phytopathology* 63:729-734.
- Jung, C. (1998): Aktuelle Reblausprobleme im Rheingau. 19. Internationale Geisenheimer Rebveredlertagung. pp.6-15.
- Kombrink, E. and I. E. Somssich (1995): Defense responses of plants to pathogens: advances in botanical Research vol. 21: 1-34.
- Kortekamp, A. und E. Zyprian (1998): Untersuchungen der Interaktion von *Plasmopara viticola* mit toleranten und anfälligen Rebsorten. Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, p. 244.

-
- Kosuge, T. (1969): The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7: 193-222.
- Lam, E., D. Ponier and O. Pozo (1999): Die and live - programmed cell death in plants. *Lant Biology*, 2: 502-507.
- Lucas, J. A. (1998): Plant defence. In: *Plant pathology and plant pathogens*, Third Edition, PP: 140-165, IACR-Long Ashton Research Station, University of Bristol.
- Mace M. E. and Solit, E. (1966): Interaction of 3-indoleacetic acid and 3-hydroxytyramine in *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 56:245-247.
- Malo, S. E. (1966): Nature of Resistance of 'Okinawa' peach to the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica*. *American Society for Horticultural Science*, 90: 39-46.
- Mark Lagrimini, L. and S. Rothstein (1987): Tissue specificity of peroxidase isosymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.*, 84: 438-442.
- Matta, A. and I. A. Gentile (1968): The relation between polyphenoloxidase activity and ability to produce indoleacetic acid in *Fusarium*-infected plants. *Neth. J. Plant Pathol.* 74: 47-51.
- Miles, P. W. (1989): The Responses of plants to the feeding of aphidoidea: principles. In: Minks, A. K. and P. Harrewijn (ed.), *Aphids their Biology, natural Enemes and control*, Volume C, PP: 1 - 21, Elsevier Science publishers B. V., Amesterdam, Oxford, New York and Tokyo.
- Mundo-Ocampo, M. und J. G. Baldwin (1984): Comparison of host response of *Cryphodera utahensis* with other Heteroderidae, and a discussion of phylogeny. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 51: 25-31.

-
- Muraschige, T. and F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nicholson, R. L. (1992): Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Niklowitz, w. (1955): Histologische Studien an Reblausgallen und Reblausabwehrnekrosen (*Viteus vulpinae* CB. Auf *Vitis vinifera* und *Vitis riparia*). *Phytopath. Z.* 24, 299-340.
- Ohashi, Y. and M. Matsuoka (1987): Induction and secretion of pathogenesis-related proteins by salicylate or plant hormones in tobacco suspension cultures. *Plant Cell physiol.* 28 (4):573-580.
- Omer A.D., J.Granett, J. A. De Benedictis and M. A. Walker (1995): Effect of fungal root infections on the vigor of grapevines infected by root-feeding grape Phylloxera. *Vitis*, 34: 165-170.
- Ordish, G. (1987): *The Great Wine Blight*. J. M. Dent & Sons. London.
- Pierpoint, W.S., N. P. Robinson and M. B. Leason (1981): The pathogenesis-related proteins of tobacco: induction by viruses in intact plants and their induction by chemicals in detached Leaves. *Physiological plant Pathology*, 19:85-97.
- Presser, C., J. Schmid und E. Rühl (1993): Die Reblaus-kein Problem mehr?. *Das deutsche Weinmagazin.* 23/13 : 22-25.
- Pütter, J. (1974): Peroxidase, In: Begmeyer, H. U., *Methoden der enzymatischen analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, S. 725-731.
- Rechner, A., C.Patz und H. Dietrich (1998): Polyphenolanalytik von Fruchtsäften und Weinen mittels HPLC/UV/ECD an einer fluorierten RP-Phase. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* /94. Jahrg. / Heft 11 pp. 363-365.

-
- Remund, U. und E. Boller (1994): Die Reblaus – wieder aktuell?. Obst- und Weinbau Nr. 10 PP 242-244.
- Ride, J. P. (1979): The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Ann. App. Biol. ,89: 302-306.
- Ritter, G. (1992): Bestimmung der Gesamtphenole und Flavanoide mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR) nach der Mikromethode. Interne Arbeitsvorschrift FA Geisenheim, FG Weinanalytik.
- Rühl, E. und O. M. Porten (1998): Untersuchungen zur Entwicklung eines „Reblausmangementkonzepts“. Forschungsring des Deutschen Weinbaues bei der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft Jahresbericht 1998.
- Schäller, G., (1960): Untersuchungen über den Aminosäuregehalt des Speicheldrüsensekrets der Reblaus (*Viteus [Phylloxera] vitifolii* Shimer), Homoptera. Ent. exp. E appl. 3:128-136.
- Schäller, G., (1966): Untersuchungen zur Erzeugung künstlicher Pflanzengallen. Teil einer habilitationsschrift Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Schäller, G., (1968): Biochemische Analyse des Aphidenspeichels und seine Bedeutung für die Gallenbildung. Zool. Jb. Physiol. Bd. 74: 54-87.
- Schirra, K, A. Kopf und F. Louis (1999): Reblaus Lebensweise mit Tücken. Das deutsche Weinmagazin. 8/17: 25-27.
- Sigee, D. C. (1993): Bacterial plant pathology: Cell and Molecular aspects, Cambridge University press, P: 126-152.
- Schneider-Müller, S. (1991): Physiologische Veränderungen bei Pflanzen während der Ausbildung der induzierten systematischen Resistenz, Dissertation, Darmstadt.

-
- Schropp, A. und R. Blaich (1998): Untersuchungen zur Abundanz der Reblaus (*Dactylosphaera vitifolii* Fitch) und zur Nodositätenbildung in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Forschungsring des Deutschen Weinbaues bei der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft Jahresbericht 1998.
- Sopp, E., (1993): Untersuchungen zur Resistenz von Unterlagesreben gegenüber virusübertragenden Nematoden unter besonderer Berücksichtigung der Nematodenzönose in Weinbauböden. Dissertation, Darmstadt.
- Sopp, E, E. Bleser und E. Rühl (1997): Renaissance der Reblaus: Schädling gibt noch viele Rätsel auf. Das deutsche Weinmagazin. 10/17: 22-26.
- Spurr, A. R.,(1969): A low-viscosity resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43.
- Srivastava, S. K. (1987): Peroxidase and polyphenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomona phaseolina* (TASSAI) GOLD. And their implication in disease resistance. J. Phytopathol. 120: 249-254.
- Sterling, C., (1952): Ontogeny of the phylloxera gall of grape leaf. Amer. J. Bot. 38: 6-15.
- Tomiyama, K. (1982): Hypersensitive cell death: Its significance and physiology. In: Asada, Y., W. R. Bushnell, S. Ouchi and C. P. Vace, Plant Infection: The physiological and Biochemical Basis. JapanSci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, pp. 329-344.
- Townshend, J. L., L. Stobbs und R. Carter (1989): Ultrastructural patholog of cells affected by *Pratylenchus penetrans* in alfalfa roots. J. Nematol. 21: 530-539.

-
- Vegetti, G., G. G. Conti and P. Pesci (1975): Changes in phenylalanine ammonia-lyase, Peroxidase and polyphenoloxidase during the development of local necrotic lesions in pinto bean Leaves infected with alfalfa mosaic virus. *Phytopath. Z.*, 84: 153-171.
- Weststeijn, E. A. (1976): Peroxidase activity in leaves of *Nicotiana tabacum* var. Xanthi nc. Before and after infection with tobacco mosaic virus. *Physiology and Plant Pathology*, 8: 63-71.
- Wohanka, W. (1973): Grundlagen der pflanzlichen Resistenz gegen Befall durch pflanzenpathogene Organismen. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der TU-Hannover.
- Zacheo, G., T. Blevé-Zacheo and F. Lamberti (1982). Role of peroxidase and superoxidase dismutase activity in resistant and susceptible tomato cultivars infested by *Meloidogyne incoonita*. *Nematol. mediterr.* 10:75-80.
- Ziegler, M. (1955): Untersuchungen über Wundreizreaktionen von Pflanzen. *Protoplasma*, 44: 350-360.
- Zucker, M. (1968): Sequential induction of phenylalanine ammonia lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiol.* 43: 365-374.

7. Anhang:

Ms-Medium (nach Murashige und Skoog 1962, verändert):

Ansatz für 1l Medium (pH 5,6 - 5,8):

50 ml	Stammlösung Makronährstoffe
1 ml	Stammlösung Mikronährstoffe
5 ml	Stammlösung Eisen
1 ml	Stammlösung Molybdat + Kupfer
1 ml	Stammlösung Jodid
1 ml	Stammlösung Vitamine
200 mg	Meso-Inosit
20 g	Saccharose
7,5 g	Difco-Bacto Agar

TRIS-Puffer (pH. 8,2):

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	60,5g
Polyvinylpyrrolidon, MW 24000	20,0g
Polyethylenglycol, MW 6000	10,0g
NaCl	80,0g
HCl (38%)	20,0 ml
in 1l Aqua dest.	

HPLC-Bedingungen

Pumpe:	Merck-Hitachi-6200A
Detektor 1:	UV/Vis.Detektor ERC 7217, ERC Inc., Tokyo, Japan
Wellenlängen:	280 nm (Flavonoide), 310 nm (Resveratol), 320 nm (Phenolcarbonsäuren), 525 nm (Anthocyane)
Detektor 2:	Elektrochemischer Detektor Trace TED 4020, Trace Analysensysteme GmbH, Braunschweig
DC-Amperometrie:	500 mV
Meßbereich:	200 nA
Offset:	20 nA
Injektion:	Merk-Hitachi AS 2000
Injektionsvolumen:	10-30 µl
Säule:	Fluofix 120 E; 250-4,6; 5 µm, NEOS Company Ltd., Kobe, Japan
Säulentemperatur:	25 °C
Fluß:	1 ml/ min
Fließmittel:	A. Bidest. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (99,5 / 0,5 v/v) B. Acetonitril / Bidest. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (50 / 49,5 / 0,5 v/v)

Gradientenprogramm:

T (min)	A	B
0,0	100%	0%
5,0	100%	0%
45,0	75%	25%
65,0	20%	80%
70,0	0%	100%
70,1	100%	0%
84,9	100%	0%

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich **Herrn Prof. Dr. habil. M.-B. Schröder**, Leiter des Fachgebietes Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, für die Überlassung des Themas, für die wertvolle wissenschaftliche Leitung, für die vielen Anregungen bei der Durchführung der Versuche und der Interpretation der Ergebnisse danken.

Herrn Prof. Dr. W. Wernike, Institut für Allgemeine Botanik, Gutenberg-Universität-Mainz, danke ich für die wissenschaftliche Mitbetreuung.

Herrn Dr. K. Eimert, Fachgebiet Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, danke ich für seine Hilfsbereitschaft und seine Mühe bei der sprachlichen Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. Dr. G. Hause, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Biozentrum der Universität, danke ich für die wertvolle Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Dr. T. Geier, Fachgebiet Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, möchte ich für viele nützliche Anregungen danken.

Herrn Dipl. Ing. (FH) F. Schneider, Fachgebiet Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, danke ich für seine Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre danksagen.

Lebenslauf

Name: Mohamed Fathi El-Nady.
Geburtstag: 06.02.1966.
Geburtsort: El-Roda, Sidi-Salem, Kafr El-Sheikh, Ägypten.

Schulbildung:

1973 - 1979: El-Roda Grundschule.
1979 - 1982: El-Roda Präparschule.
1982 - 1985: Staatliches Gymnasium in Abokanima, Sidi-Salem, Kafr El-Sheikh.
1985: Abitur.

Studium und beruflicher Werdegang:

1985 - 1989: Landwirtschaftsstadium an der Kafr El-Sheikh der Tanta Universität, Ägypten.
1989: B. Sc. agr. Prüfung in Kafr El-Sheikh, Tanta Universität.
1989 - 1990: Militärdienst.
1990 - 1994: Fortsetzung des Landwirtschaftsstadium im Rahmen des Magisterstudienganges.
17.12.1994: M. Sc. agr. Prüfung an der Landwirtschaftlichen Fakultät Kafr El-Sheikh, Tanta Universität.
1990 -1997: Tätigkeit als Assistent an der Landwirtschaftlichen Fakultät Kafr EL-Sheikh, Tanta Universität.
Seit 01.08.1997: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fachgebiet Botanik der Forschungsanstalt Geisenheim und Anfertigung vorliegenden Dissertation.