Abh. Naturwiss. Ver. Würzburg	Band 45/46	S. 49-119	2004/05

Untersuchungen zum Schadnematoden *Xiphinema index* THORNE et ALLEN (Nematoda: Dorylaimida: Longidoridae) und dem Grapevine Fanleaf Virus (Comoviridae)

KAROLIN NICKEL

Zusammenfassung

Das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) zählt im Weinbau weltweit zu den bedeutendsten Viruserkrankungen (RASKI et al., 1983). Dieses Virus aus der Gattung der Nepoviren (nematode-transmitted viruses with polyhedral particles) wird durch den ectoparasitären Nematoden *Xiphinema index* übertragen, der das Virus beim Saugvorgang an den Rebwurzeln mit seinem Speichel von Pflanze zu Pflanze verbreiten kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einblicke in die Wechselwirkungen des Nematoden *X. index* mit seiner Wirtspflanze, der Weinrebe, zu gewinnen. Hier zeigte sich eine Besaugung aller Testpflanzen, wobei die Pflanzen entweder mit der Bildung von Gallen (v. a. Standardunterlagen), oder Nekrosen (Testpflanze 141) reagierten.

Besonderes Interesse in dieser Arbeit galt der Wirtserkennung und Auffindung der Nahrungsquelle. Anhand der durchgeführten Wanderungsversuche zeigte sich, daß *X. index* die Wurzeln von Rebsämlingen gezielt aufsucht. Hierbei spielen vermutlich sehr instabile, volatile Stoffe, die von der Rebwurzel abgegeben werden, eine bedeutende Rolle. Bei deren Charakterisierung fielen besonders die Stoffklassen der Sesquiterpene und der Phenolcarbonsäuren durch eine positive Chemotaxis auf.

Zur Detektion des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen erwiesen sich sowohl der DAS-ELISA als auch die RT-PCR als effektiv. Das Virus konnte durch beide Methoden in Wurzel, Stängel, Blättern und Beeren nachgewiesen werden. Um Kleinstmengen an Pflanzenmaterial analysieren zu können, erwies sich die RT-PCR als geeigneter. Zur Detektion des Virus in Stängeln ist der ELISA-Test vorzuziehen.

Der Vergleich visueller Bonituren mit den Ergebnissen des DAS-ELISA ergab, daß eine visuelle Bonitur allein nicht ausreicht, um präzise Prognosen über die Erkrankung von Rebstöcken zu machen. Es bestätigte sich, daß nur das an den Blättern ausgeprägte Symptom der Panaschüre als ein eindeutiges Anzeichen für das GFLV angesehen werden kann.

Das Abtöten infektiöser Wurzeln mit Herbiziden im Gewächshaus war nicht erfolgreich. Bei allen eingesetzten Mitteln war weiteres Wurzelwachstum zu beobachten. Nur nach dem Einsatz von Garlon 4 konnte keine Besaugung durch *X. index* beobachtet werden. Dieses Ergebnis sollte aber in weiteren Versuchen überprüft und verfestigt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt muß daher von der Herbizidapplikation zum Abtöten infektiöser Rebstöcke abgeraten werden, da die Risiken für Umwelt und Anwender deutlich größer sind als der effektive Nutzen dieser Behandlung.

Summary

The Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) is one of the most important virus diseases of grapevines worldwide (RASKI et al., 1983). GFLV belongs to the genus Nepovirus (nematode-transmitted viruses with polyhedral particles) because it is transmitted by the ectoparasitic nematode *Xiphinema index*. This nematode transmits the GFLV from plant to plant while feeding on the roots of grapevines.

The aim of this study was to get insights on interactions between the nematode *X. index* and its host plant. Another point of our research was host recognition and food source discovering by the nematodes. Our testing showed that the nematodes fed on all cultivars. The reactions of the plants differ only by the building of galls on the standard plants and the appearance of necroses on cultivar 141.

The conducted migration experiments showed a targeted finding of the seedling roots. The attraction was probably induced by highly instabile and volatile substances released by the seedlings. By characterising these substances particularly the compounds of sesquiterpenes and phenolcarbon acids showed a positive chemotaxis.

To detect the GFLV in different parts of plants both DAS-ELISA as well as RT-PCR proved to be effective. The virus could be detected by both methods in roots, stipes, leaves and berries. For analysing minute amounts of plant material RT-PCR was more suitable. However DAS-Elisa proved to be more effective for the detection of viral particles in stipes.

Comparing visual evaluation of infected plants within the vineyard to the corresponding results of the DAS-ELISA showed that the visual examination is not a reliable method for the detection of infected plants. Only the symptom of yellow mosaic on the leaves was a save indication for an infection with GFLV.

The eradication of infected roots by the use of herbicides in the greenhouse was not effective. After treatment with all tested herbicides the roots continued to grow. Only with Garlon 4 no feeding of the nematodes has been observed. This result has to be verified by further testings. So the use of herbicides can not be recommended at this point of our research because the positive effect is dubious and the side effects on environment and user are too high.

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1	Einleitung	53
1.1	Die Weinrebe *Vitis vinifera* L.	53
1.2	Der phytoparasitäre Nematode *Xiphinema index*	54
1.3	Das Grapevine Fanleaf Virus – Verbreitung, Symptomatik, Bekämpfungsmöglichkeiten	56
1.4	Aufgabenstellung der Diplomarbeit	59
2	Material und Methoden	60
2.1	Medien, Lösungen, Puffer, Reagenzien	60
2.1.1	Kultivierung von sterilen *in-vitro*-Pflanzen und Nematoden	60
2.1.2	Molekularbiologie RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)	61
2.1.3	Immunologisches Nachweisverfahren (DAS-ELISA, double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)	62
2.1.4	Färbereagenzien	63
2.1.5	Gewächshausversuch-Wuchsstoffe	63
2.2	Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien	63
2.3	Pflanzenmaterial	65
2.3.1	Versuchspflanzen *Vitis* spec. und *Ficus carica*	65
2.3.2	Anzucht von Holzstecklingen und Topfreben von *Vitis* spec.	66
2.3.3	Inkulturnahme von *in-vitro*-Grünstecklingen von *Vitis* spec.	66
2.3.4	Anzucht von sterilen Sämlingen von *Ficus carica* und *Vitis* spec.	67
2.4	Das Versuchstier *Xiphinema index*	68
2.4.1	Zucht von *Xiphinema index* an *Ficus carica*	68
2.4.2	Extraktion von *Xiphinema index* aus Erdmaterial	68
2.4.3	Sterilwaschen von *Xiphinema index*	69
2.5	Das Nepovirus – Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)	69
2.5.1	Nachweis des GFLV in *Vitis* mit RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)	71
2.5.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA	71
2.5.1.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualitätskontrolle der Extraktion	72
2.5.1.3	RT-PCR	72
2.5.1.4	Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA	74
2.5.2	Nachweis des GFLV mit DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)	74

2.6. Färbemethoden 75
2.6.1 Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) 75
2.6.2 Anilinblau-Färbung 76
2.7 Biotests 76
2.7.1 Beobachtung der Rebwurzeln von *in-vitro*-Sämlingen und *in-vitro*-Stecklingen nach Inokulation mit *Xiphinema index* 76
2.7.2 Untersuchung der Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte 76
2.7.3 Wanderungstest 77
2.7.4 Test verschiedener Substanzen 79
2.8 Praxisorientierte Freiland- und Gewächshausversuche 80
2.8.1 Bonitur und Untersuchung der Virusinfektion mittels DAS-ELISA in einer ausgewählten Rebanlage 80
2.8.2 Inaktivierung der Rebwurzeln durch den Einsatz von Herbiziden .. 81
2.9 Statistische Auswertung 82
3 Ergebnisse 82
3.1 Charakterisierung der Reaktionen von Rebwurzeln auf den Anstich von *Xiphinema index* und Auswertung der Färbungen 82
3.2 Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte 86
3.3 Wanderungstest 88
3.3.1 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber eines ungekeimten Rebsamens 88
3.3.2 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber eines Steines 90
3.3.3 Wirkung des leeren Keimungsbereiches eines Rebsämlings gegenüber einer Vertiefung im Agar 92
3.3.4 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber des leeren Keimungsbereiches eines Rebsämlings 94
3.4 Wirkung von ausgewählten Substanzen auf *Xiphinema index* 96
3.5 Nachweis des GFLV mittels DAS-ELISA und RT-PCR in verschiedenen Pflanzenteilen 98
3.6 Auswertung der visuellen Bonitur und Nachweis des GFLV mittels DAS-ELISA in der ausgewählten Rebanlage 99
3.7 Wirkung von Herbiziden auf die Rebwurzeln und die Saugaktivität von *Xiphinema index* 101

4 Diskussion 106
4.1 Charakterisierung und Bedeutung der Reaktionen von Rebwurzeln auf den Anstich von *Xiphinema index* 106
4.2 Wanderungsversuche - Wanderung der Nematoden auf einer Agarplatte bei Angebot einer potentiellen Nahrungsquelle 108
4.3 Wirkung ausgewählter Substanzen auf *Xiphinema index* 109
4.4 Vorkommen des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen 111
4.5 Symptomausprägung und Verbreitung des GFLV in einer infizierten Rebanlage 112
4.6 Möglichkeiten der Bekämpfung viröser Rebstöcke mit der Anwendung von Herbiziden 113
5 Literatur 114

1 Einleitung

1.1 Die Weinrebe *Vitis vinifera* L.

Die Weinrebe *Vitis vinifera* L. ist der Gattung *Vitis* aus der Familie der Vitaceae zuzuordnen. Diese Gattung gliedert sich in zwei Untergattungen, *Euvitis* und *Muscadinia* (HILLEBRAND et al.; 1998). Für den wirtschaftlichen Ertragsweinbau ist allein die Untergattung *Euvitis* von Interesse, da diese sowohl die Ertragsrebsorten als auch die Unterlagsrebsorten hervorbrachte.
Die *Euvitis*-Arten stammen ursprünglich aus den drei großen Gebieten Nordamerika, Europa und Vorderasien sowie Asien. In diesen Gebieten sind auch heute noch einige Wildarten zu finden. In Asien sind bislang 26 Wildarten identifiziert worden. In Nordamerika wurden 33 Wildarten dokumentiert. Die bedeutendsten *Vitis*-Arten sind hier *V. berlandieri*, *V. riparia* und *V. cinerea*. Aus Kreuzungen dieser Arten stammen die wichtigsten Unterlagen 5BB, 125AA und Börner. Kreuzungen aus diesen so genannten Amerikanerreben waren notwendig geworden, da im 19. Jahrhundert der Weinbau in Europa durch die aus Amerika eingeschleppte Reblaus (*Phylloxera vitifolii*) fast zum Erliegen gekommen war. Diese mit einem sehr guten Resistenzpotential ausgestatteten Amerikanerreben dienen seit dieser Zeit als Unterlagssorten, auf die eine Edelreissorte der europäischen Kulturrebe aufgepfropft wird.
Europa und Vorderasien haben nur eine einzige Art, *Vitis vinifera*, zu verzeichnen. Diese Art beinhaltet die heutige Kulturrebe *Vitis vinifera sativa*, die durch jahrtausendelange Zuchtwahl des Menschen entstanden ist (VOGT et SCHRUFT, 2000). Aus Kultivaren dieser Unterart stammen die heute verwendeten europäischen Kulturrebsorten für die Weinerzeugung.

1.2 Der phytoparasitäre Nematode *Xiphinema index*

Mit der zunehmenden Kultivierung der Weinrebe als Monokultur und der Intensivierung des Weinbaus hatte sich das Auftreten von Krankheiten und Schädlingen gleichermaßen intensiviert. Einer dieser Schädlinge ist der phytoparasitäre Nematode *Xiphinema index* THORNE et ALLEN (Ordnung: Dorylaimida). Diese ektoparasitäre Nematodenart aus der Familie der Longidoridae (Klassifizierung nach COOMANS, 1996), hat ein begrenztes Wirtsspektrum. Er vermehrt sich erfolgreich an seiner Hauptwirtspflanze, der Feige, und an verschiedenen *Vitis*-Arten (COIRO et al., 1990).
Der Nematode ist zwischen 2,7 und 3,6 mm lang und besitzt einen hohlen kontraktilen Mundstachel aus Chitin, das Odontostilett. Die basale Verlängerung des Odontostiletts bezeichnet man als Odontophor (Abb. 1).
Xiphinema index vermehrt sich parthenogenetisch. Die Eier werden in der Nähe der Feinwurzeln der Wirtspflanze abgelegt. Die Entwicklung verläuft in vier Larvenstadien (L1 bis L4), wobei zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien Häutungen stattfinden. Neben der äußeren Kutikula werden sowohl das Odontostilett als auch die Oesophagus-Auskleidung abgestoßen (TAYLOR et RASKI, 1964).
Mit dem Odontostilett werden Pflanzenzellen in der Nähe des vaskulären Zylinders der Wurzel angestochen (BACK et al., 2002). *X. index* saugt vor allem an den Wurzelspitzen in der Nähe der meristematischen Wachstumszone der Wurzel (WYSS, 1999). Nach der Perforation der Pflanzenzellwand mit dem

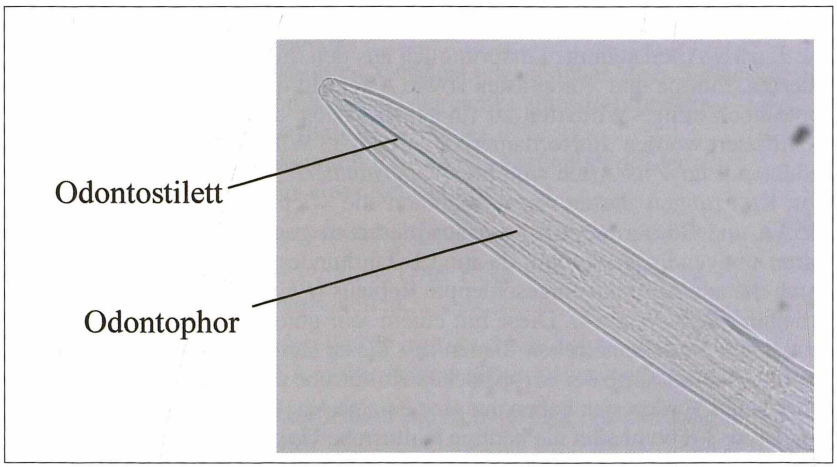


Abb. 1: *Xiphinema index*: Vorderende mit Odontostilett (Foto: K. Nickel)

Stilett injiziert der Nematode Verdauungsflüssigkeiten. Durch die Injektion dieser Speichelsekrete aus einer dorsalen sekretorischen Drüsenzelle werden die Strukturen der Zellen aufgelöst und der Nematode kann sich von den aufgelösten Bestandteilen ernähren (Wyss et al., 1988). Für die Aufnahme dieses Zellsaftes durch das Odontostilett und die Injektion von Verdauungssekreten in die Zelle ist der oesophageale Bulbus verantwortlich. Aufgrund der hyalinen Cuticula des Nematoden kann man die Kontraktion dieses Bulbus während des Saugens im Tier verfolgen.

Die besaugten Bereiche der Wurzel beginnen anzuschwellen und nach einigen Tagen werden Gallen an diesen Stellen sichtbar. Diese Gallen werden weiterhin besaugt (Abb. 2). Im Inneren der Galle befinden sich große, multinukleäre Zellen, in deren Umgebung braun verfärbte, nekrotische epidermale Zellen zu beobachten sind. Diese kollabierten Zellen wurden direkt durch das Stilett des Nematoden angestochen (Wyss, 1978). Die genaue Entstehung der metabolisch sehr aktiven multinukleären Zellen ist noch unbekannt. Diese Riesenzellen in den Wurzelgallen dienen als Nahrungsquelle und sind essentiell für die Reproduktion der Nematoden. In ihrer Nähe findet die Eiablage statt (Wyss, 1999).

Aufgrund kleiner Populationszahlen im Weinbau spielt *X. index* in Deutschland als Direktschädiger eher eine untergeordnete Rolle. Seine Bedeutung erlangt er als Überträger eines Virus, des Grapevine Fanleaf Virus, auf Reben. Das Virus, das im oesophagealen Lumen und am Odontophor lokalisiert ist (Raski et al., 1973), wird während des Saugens an den Pflanzenwurzeln mit dem Verdauungssekret aus der Oesophagusdrüse, übertragen (Taylor et Brown, 1997). Die Virulenz der Nematoden geht jedoch bei den Häutungen zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien verloren, da sie die Oesophagus-Auskleidung ebenfalls ausstoßen.

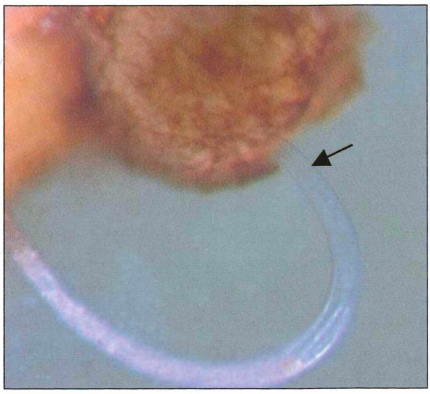


Abb. 2: Saugender *Xiphinema index* an einer Wurzelgalle (Pfeil: Odontostilett) (Foto: K. Nickel)

1.3 Das Grapevine Fanleaf Virus – Verbreitung, Symptomatik, Bekämpfungsmöglichkeiten

Das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) aus der Familie der Comoviridae ist der Gattung der Nepoviren (**ne**matode-transmitted viruses with **po**lyhedral particles) zuzuordnen. Es wird durch den phytoparasitären Nematoden *X. index* auf *Vitis* spec. übertragen.

Das Virusgenom besteht aus einem zweiteiligen RNA-Genom (RNA1 und RNA2) positiver Polarität und einem kleinen Protein, VPg, das kovalent gebunden an das 5'-Ende der viralen genomischen RNAs ist (RITZENTHALER et al., 2002). Während die RNA1 Proteine kodiert, die für die Replikation des Virus verantwortlich sind, kodiert die RNA2 unter anderem ein Protein, das $2B^{MP}$, welches Tubuli bildet, durch die sich das Virus von Zelle zu Zelle durch die Plasmodesmata bewegen kann (RITZENTHALER et al., 1995).

Das GFLV kommt heute weltweit in allen Gebieten vor, in denen Weinbau betrieben wird (RASKI et al., 1983). Seine ursprüngliche Heimat läuft konform mit den Ursprungszentren der Weinrebe in Kleinasien, dem Kaukasus und die Gebiete rund um das Kaspische und das Schwarze Meer (VOGT und SCHRUFT, 2000). Von dort stammt wahrscheinlich auch sein Vektor, der phytoparasitäre Nematode *Xiphinema index*. Dieser wurde vermutlich über kontaminierte Erdreste an bewurzelten Reben verbreitet (RASKI et al., 1983). Mit der zunehmenden Kultivierung der Weinrebe konnten sich das Virus und sein Vektor in den mediterranen Regionen ausbreiten. Über Frankreich, Italien, Spanien und Portugal gelangten Weinreben im 17. Jahrhundert in die Neue Welt (TAYLOR et BROWN, 1997). Mit dem Auftreten des Virus in Asien, Afrika, Europa, Neuseeland, Süd-Australien, Nordamerika und Südamerika wurde das GFLV zu einem weltweiten Problem (ANDRET-LINK et al., 2004).

Das GFLV verursacht die Symptome der Reisigkrankheit (Fächerblättrigkeit, engl. Fanleaf), die oftmals von einer Mischinfektion verschiedener Viren hervorgerufen wird. Im deutschen Weinbau sind die Viren des Grapevine Fanleaf Virus (GFLV), des Arabis Mosaic Virus (ArMV) und des Raspberry ringspot Virus (RpRSV-ch) am weitesten verbreitet (RÜDEL, 1985). Sie werden durch verschiedene phytoparasitäre Nematoden der Gattungen *Xiphinema, Longidorus* und *Paralongidorus* übertragen. Die weitaus größte Rolle spielt jedoch das Grapevine Fanleaf Virus. Der Krankheitsverlauf der Reisigkrankheit ist in der Regel schleichend. Meist treten in den ersten Jahren nach der Infektion die Symptome kaum oder nur sehr schwach auf. Eine genaue Bestimmung der Krankheit ist oft sehr schwierig, da die Symptomausprägung je nach Rebsorte, dem Krankheitsstadium und dem jeweiligen Virus bzw. Isolat sehr unterschiedlich sein kann (MOHR, 2005).

Das GFLV tritt aufgrund der Transmission durch den freilebenden Nematoden *Xiphinema index* oft herdförmig in einem Weinberg auf. Da die Viren durch die Saugtätigkeit der Nematoden von Stock zu Stock übertragen werden, kann

die Krankheit also allein von einem einzigen infizierten Rebstock im Weinberg aus verbreitet werden. Eine weitere Verbreitung ist durch infiziertes Rebpflanzgut bei der Herstellung von Pfropfreben möglich (Rüdel, 1987). Das Auftreten im Weinberg wäre dann nicht mehr herdförmig, sondern zufällig verteilt.

Typische Symptome eines infizierten Stockes sind Schwachwüchsigkeit, gestauchter Wuchs, bis hin zu Besenwuchs. Die Triebe selbst zeichnen sich vor allem durch verkürzte Internodien, anomale Gabelungen der Triebe und eine Häufung von Doppeltrieben aus (Abb. 3).

Die Blätter zeigen oftmals eine untypische asymmetrische Blattform (Abb. 4) und einen sehr spitz gezahnten Blattrand, die sogenannte „Petersilienblättrigkeit" (Höbaus et Nieder, 1992). Sie weisen meist eine stark geöffnete Stielbucht und chromgelbe Verfärbungen (Panaschüre) der Blätter auf (Abb. 5).

Durch starkes Durchrieseln der Gescheine nach der Blüte bilden sich kleinbeerige Trauben aus, was mit einem Ertragsverlust von bis zu 50 % einhergeht (Ipach, 2004; Rüdel, 1987). Infizierte Rebstöcke sind im allgemeinen verstärkt frostempfindlich, da die Holzreife oftmals ausbleibt. Für den Winzer bedeutet das, neben den Ertragseinbußen, einen Mehraufwand an Zeit und Arbeitsstunden, da der Stockaufbau im nächsten Frühjahr äußerst beeinträchtigt ist. Bei einer stark verbreiteten Infektion des Virus in einer Rebanlage sind Nutzungsdauer und Rentabilität der Anlage deutlich minimiert (Ipach, 2004). Zudem darf aus virusverseuchten Flächen kein Material für die Vermehrung von Rebpflanzgut gewonnen werden.

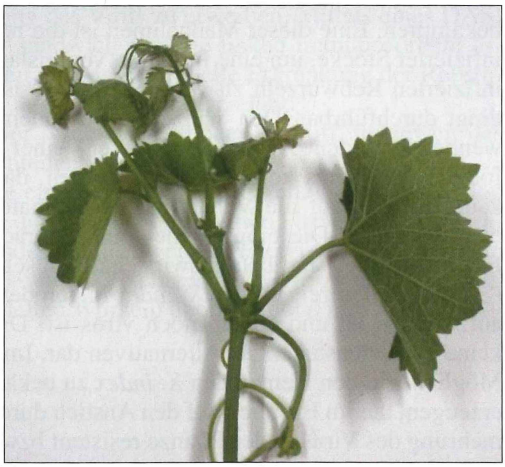


Abb. 3: Kranke Triebspitze mit vermehrten Doppeltrieben einer GFLV-infizierten Rebe (Foto: K. Nickel)

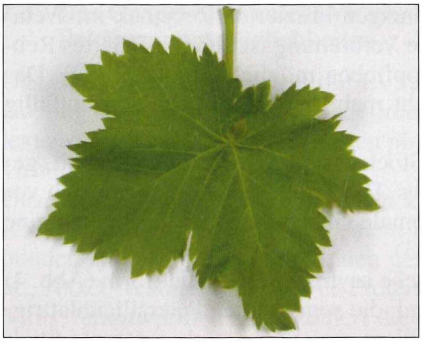


Abb. 4: Deformiertes Blatt einer GFLV-infizierten *Vitis* spec. (Foto: K. Nickel)

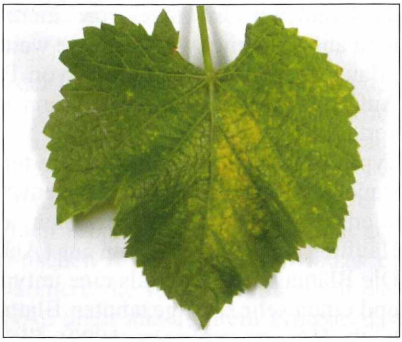


Abb. 5: Blatt mit Panaschüre einer GFLV-infizierten *Vitis* spec. (Foto: K. Nickel)

Die Viruserkrankung der Pflanze ist persistent und für die direkte Bekämpfung der Viren im Freiland ist im Moment noch nicht möglich. Eine entscheidende Bedeutung haben also vorbeugende oder indirekte Maßnahmen. Hierbei spielen eine gewissenhafte Gesundheitsselektion bei der Rebpflanzguterzeugung (Mohr, 2005) sowie die Bekämpfung der Virusvektoren eine entscheidende Rolle. Die über viele Jahre praktizierte Bodenentseuchung mit Nematiziden ist seit 1988 in Deutschland generell verboten, da die verwendeten gasförmigen Stoffe (etwa Dichlorpropen, Methylbromid) sowohl für den Anwender als auch für die Umwelt hoch giftig waren. Es gibt zur Zeit neben den empfohlenen ackerbaulichen Maßnahmen keine Möglichkeit, die Nematoden zu bekämpfen. Eine dieser Maßnahmen ist die restlose Entfernung der Wurzeln infizierter Stöcke, um eine Infektion von bislang nicht virösen Nematoden an infizierten Rebwurzeln zu vermeiden. Dies ist jedoch in der Praxis nur bedingt durchführbar. Den Winzern wird zudem eine Langzeitbrache und tief wendende Bodenbearbeitung (Rigolen) einer virusverseuchten Fläche empfohlen. Allerdings konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche Rigoltiefen kaum Einfluß auf die Minderung der Nematodenpopulation haben (Bleyer et Fox, 1995). Die empfohlene Langzeitbrache (5 Jahre) von verseuchten Flächen ist nicht nur betriebswirtschaftlich sehr unrentabel. Demangeat et al. (2005) konnten zeigen, daß *X. index* in gerodeten Flächen auch nach 4 Jahren aufzufinden ist und zudem noch virös ist. Diese Maßnahmen stellen somit keine zufriedenstellenden Alternativen dar. Im Moment liegt also die einzige Möglichkeit, den Nematoden *X. index* zu bekämpfen darin, Rebunterlagen zu erzeugen, die im Hinblick auf den Anstich durch den Nematoden und die Vermehrung des Virus in der Pflanze resistent bzw. tolerant sind.

1.4 Aufgabenstellung der Diplomarbeit

Aufgrund der Tatsache, daß es noch keine resistenten Rebunterlagen gegen *X. index* gibt, ist es von Bedeutung, tiefere Einblicke in die Interaktionen des Nematoden *X. index* mit seiner Wirtspflanze, *Vitis* spec., zu gewinnen. Die möglichen Interaktionen zwischen Rebe und *X. index* wurden in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener Biotests untersucht. An ausgewählten Rebsorten sollte beobachtet werden, inwieweit die verschiedenen Sorten unterschiedlich auf den Anstich durch *X. index* reagieren.
In weiteren Biotests wurde der Auffindungsprozeß der Nahrungsquelle von *X. index* untersucht. Schon 1925 vertrat STEINER die Hypothese, daß phytoparasitäre Nematoden die Fähigkeit besitzen, ihre Wirtswurzeln über beträchtliche Distanzen zu lokalisieren. Er postulierte, daß die Wurzeln Stoffe produzieren, die als selektive Stimuli dienen. Die Erkennung des Wirtes durch die Nematoden erfordert also Lockstoffe, die eine Taxis in Richtung Wurzel auslösen (PROT, 1980; ZHAO et al., 2000). In der vorliegenden Diplomarbeit sollte untersucht werden, ob auch *X. index* eine gezielte Anlockung durch die Wurzeln erfährt. In einem weiteren Versuch sollte die Wirkung möglicher Lockstoffe der Wurzel, wie beispielsweise verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe und Duftstoffe, auf den Nematoden *X. index* überprüft werden.
Durch die verschiedenartige Symptomatik des GFLV in einer Rebfläche ist es problematisch, erkrankte Stöcke in einer Fläche zu identifizieren und eine mögliche Ausbreitung der Infektion abzuschätzen. Für die Praxis wäre es von Vorteil, allein anhand einer visuellen Bonitur viruskranke Rebstöcke eindeutig erkennen zu können, um so eine mögliche Rodung in Betracht zu ziehen. In dieser Arbeit wurde in einem Freilandversuch das Vorkommen des GFLV in einer ausgewählten Rebanlage bonitiert und kartiert, um Kenntnis über die Symptomatik und die Verbreitung des Virus zu erwerben. Mittels eines DAS-ELISA-Tests (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) wurde untersucht, inwieweit sich die potentielle Erkrankung der Rebstöcke aus einer visuellen Bonitur tatsächlich bestätigen läßt.
Außerdem wurde anhand zweier Nachweismethoden geprüft, inwieweit das Virus in verschiedenen Pflanzenteilen vorhanden ist.
Im letzten Teil der Arbeit sollte eine mögliche Eindämmung der Reinfektion einer neu angepflanzten Fläche durch restlose Entfernung bzw. Zerstörung infizierter Wurzeln des Altbestandes studiert werden. Hierzu wurden in einem Gewächshausversuch Rebstöcke mit verschiedenen Herbiziden behandelt, und überprüft, ob die so behandelten Wurzeln überleben und ihre Attraktivität für *X. index* behalten.

2 Material und Methoden

2.1 Medien, Lösungen, Puffer, Reagenzien

2.1.1 Kultivierung von sterilen *in-vitro*-Pflanzen und Nematoden

Kulturmedium für *in-vitro*-Stecklinge (FEIL, noch nicht veröffentlicht)

3,17 g	Linsmaier & Skoog-Medium
10 g	Bacto™ Agar
20 g	D-(+)-Glucose
ad 1 l	Aqua dest.

pH 6,2 – 6,4

Hoagland Spurenelementlösung No.2 (HOAGLAND et ARNON, 1938) nach WYSS (1999)
Von den verschiedenen Elementen wurden zuerst Stammlösungen hergestellt, die anschließend in der angegebenen Menge zur Endlösung zusammengestellt wurden. Die Elemente wurden leicht modifiziert (Tab. 1).

Tab. 1: Zusammensetzung der Spurenelementlösung No.2 (HOAGLAND et ARNON, 1938, modifiziert)

Stammlösung	Verbindung	Konzentration (g/l)	ml für 1 l Lösung
I	KH_2PO_4	136.09	0.1
II	KNO_3	101.11	0.5
III	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236.15	0.5
IV	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.48	0.2
	H_3BO_3	2.86	
	$Mn(II)Cl_2 \cdot 4H_2O$	1.81	
V	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22	0.1
	$Cu(II)SO_4 \cdot 5H_2O$	0.08	
	Na_2MoO_4	0.09	
VI	Fe(III)citrat	6.605	0.1

Knop-Medium (KNOP, 1860)

250 mg	KH_2PO_4
250 mg	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
250 mg	KCl
1 g	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$
12,5 mg	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$
ad 1 l	Aqua dest.

pH 5,8

Wasseragar (0,8 %)

8 g	Bacto™ Agar
ad 1 l	Aqua dest.

2.1.2 Molekularbiologie RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

DEPC-Wasser:

0,1 % (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat)
ad 1 l Aqua dest

RNA-Isolierung
Nets-Puffer:

200 mM	NaCl
2 mM	EDTA
20 mM	Tris-Cl
1 %	SDS

pH 7,5

Elektrophoretische Auftrennung der RNA
10 × MOPS

42 g	MOPS (Morpholino propane sulfonic acid)
6,8 g	Natriumacetat
20 ml	0,5 M EDTA
ad 1 l	DEPC-Wasser

pH 7,0

1 % Agarosegel:

0,8 g	Agarose
59 ml	Aqua dest.
8 ml	10 × MOPS
13 ml	Formaldehyd (Zugabe nach Aufkochen)

Elektrophoretische Auftrennung der DNA
50 × TAE-Puffer:

242 g	Tris
57,1 ml	Eisessig (Essigsäure)
100 ml	EDTA
ad 1l	Aqua dest.

pH-Wert: 8,0

1,2 % Agarosegel:

1 g	Agarose
80 ml	1 × TAE
4 µl	Ethidiumbromid-Lösung (Zugabe nach Aufkochen)

2.1.3 Immunologisches Nachweisverfahren DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)

Beschichtungspuffer:

1,59 g	Na_2CO_3
2,93 g	$NaHCO_3$
ad 1 l	Aqua dest.

pH 9,6 (einstellen mit HCl)

Konjugatpuffer:

8,0 g	NaCl
0,2 g	KH_2PO_4
1,15 g	$NaH_2PO_4 \times 12\ H_2O$
0,2 g	KCl
20,0 g	PVP
0,2 g	$MgCl_2$
2,0 g	BSA
0,5 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 7,4 (einstellen mit HCl)

Extraktionspuffer:

60,5 g	Tris
8,0 g	NaCl
20,0 g	PVP
10,0 g	PEG 6000
0,5 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 8,2 (einstellen mit HCl)

Waschpuffer (50 fach):

400 g	NaCl
10 g	KH_2PO_4
145 g	$NaH_2PO_4 \times 12\ H_2O$
10 g	KCl
25 ml	Tween 20
ad 1 l	Aqua dest.

pH 7,4 (einstellen mit HCl)

Substratpuffer:

97 ml	Diethanolamin
ad 1 l	Aqua dest.

pH 9,6 (einstellen mit HCl)

2.1.4 Färbereagenzien

NBT-Färbung (ADAM et al., 1989)
Färbelösung:
0,1 % NBT (w/v) in 10 mM NaN_3 und 10 mM KH_2PO_4
pH 7,8

Entfärbelösung:
0,15 % Trichloressigsäure (w/v) in Ethanol:Chloroform (4:1; v/v)

Anillinblau-Färbung (nach UNGER, 2001)
0,05 % Anillinblau (w/v) in 67 mM K_2HPO_4
pH 9,8

2.1.5 Gewächshausversuch – verwendete Herbizide

Basta	Bayer CropScience Deutschland GmbH
Glyfos	Cheminova A/S
Garlon 4	Dow AgroSciences GmbH

2.2 Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien

Name	**Hersteller**
Anilinblau	Merck, Darmstadt
Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Borsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Caryophyllen 80+%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumhypochlorid 33-35% Chlorkalk	Grüssing GmbH, Filsum
Calciumnitrat p.a.	Merck, Darmstadt
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Eisen (II)-sulfat-Heptahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Eisen (III)-citrat-Monohydrat p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol p.a. 98,8%, unvergällt	Roth, Karlsruhe
Farnesen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isovanillinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
1-Indanol 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumnitrat p.a.	Merck, Darmstadt
Linolool 97+%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Linsmaier & Skoog-Medium	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande
Lithiumchlorid	Biometra, Göttingen
Magnesiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Mangandichlorid p.a.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyljasmonat	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Magnesiumsulfat-Heptahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat, wasserfrei p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid reinst	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochloritlösung (15%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriummolybdat p.a.	Merck, Darmstadt
Pentan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol 6000 purum	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon MW 2400	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS 2×krist. 99% p.a.	Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach
Tannin purum	Roth, Karlsruhe
TopVision™ LE GQ Agarose	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Trichloressigsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe

Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat	Merck, Darmstadt

Molekularbiologische Reagenzien
Oligo(dT)$_{18}$-Primer, 0,5 μg/μl, Fermentas
10 mM dNTPMix, Fermentas
5 × Reaction buffer for M-MuLV RT, Fermentas
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas
10×PCR buffer, Fermentas
Taq-DNA-Polymerase, Fermentas
Primer, hergestellt von MWG Biotech
6 × loading dye Solution, Fermentas
Gene Ruler™ 100 bp DNA-Ladder, Fermentas

2.3 Pflanzenanzucht

2.3.1 Versuchspflanzen *Vitis* spp. und *Ficus carica*

Es wurden ausschließlich Pflanzen von *Vitis* spp. (Weinrebe) und *Ficus carica* (Feige) verwendet, weil das Versuchstier, der Nematode *Xiphinema index,* nur ein sehr begrenztes Wirtsspektrum aufweist (Wyss, 1980). Da er an seiner Hauptwirtspflanze, der Feige, die größte Vermehrungsrate hat (Brown et Coiro 1985), wurde diese für die Zucht der Nematoden verwendet. Für die Durchführung der Versuche wurden vor allem Pflanzen der Gattung *Vitis* aus der Familie der Vitaceen verwendet (Tab. 2 - 4).
Die in der Diplomarbeit verwendeten Versuchspflanzen stammen aus einem am Staatlichen Weinbauinstitut vorhandenen Sortiment an Unterlagsrebsorten und *Vitis* spec., aus dem einige Sorten ausgewählt wurden. Es wurden sowohl Samen von wildbestäubten Testpflanzen als auch Stecklinge verwendet.

Tab. 2: Verwendete Kultivare von *Vitis vinifera*

Vitis vinifera	**Kreuzung**
Müller-Thurgau	Riesling × Madeleine Royale
Blauer Spätburgunder	Schwarzriesling × Traminer

Tab. 3: Verwendete Unterlagsrebsorten, die im Weinbau als Standardunterlagen eingesetzt werden

Unterlagsrebsorten	**Kreuzung**
5 BB	*V. berlandieri* × *V. riparia*
125 AA	*V. berlandieri* × *V. riparia*
Binova	*V. berlandieri* × *V. riparia*

Tab. 4: Verwendete Pflanzen aus dem Sortiment der Rebenzüchtung

Testpflanze[a]	Kreuzung
16	*V. vinifera* × *V. rotundifolia*
141	*V. rufotomentosa* × *V. vinifera*

a die Nummerierung entspricht der internen Standortnummer des Weinbauinstitutes

Die Testpflanzen aus dem Sortiment der Rebenzüchtung wurden ausgewählt, um sie auf ihre Eigenschaften als potentielle Unterlage für den Weinbau zu testen (Tab. 4).

2.3.2 Anzucht von Holzstecklingen und Topfreben von *Vitis* spec.

Für die Anzucht und den Aufbau eines Gewächshausreservoirs wurden von den in 2.3.1 genannten *Vitis*-Pflanzen im Winter Ruten geschnitten. Diese wurden im Frühjahr als Zwei-Augen-Holzstecklinge in Tontöpfchen mit 1/3 Sand und 2/3 Pflanzerde zum Austreiben gebracht. Für einige Versuche wurden ältere Topfreben benötigt. Hierzu wurden fünf Jahre alte Topfreben vom Blauen Spätburgunder im zeitigen Frühjahr zurückgeschnitten und zum Austreiben auf Torf kultiviert. Sowohl die Holzstecklinge als auch die Topfreben wurden in einem beheizbaren Gewächshaus in Tontöpfen gezogen. Im Winter wurden die Pflanzen zusätzlich mit Natrium-dampflampen (Osram, Valox, NAV T 400 W) bestrahlt, um eine Tageslänge von 16 h zu erreichen.

2.3.3 Inkulturnahme von *in-vitro*-Grünstecklingen von *Vitis* spec.

Die Inkulturnahme wurde unter keimfreien Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt.
Zu Beginn des Frühjahrs und im Laufe des Sommers wurden von jungen Trieben der in 2.3.2 erwähnten Holzstecklinge und von Freilandreben aus dem Sortiment des Weinbauinstitutes Grünstecklinge gewonnen. Hierzu wurden ausschließlich junge, noch nicht verholzte Triebe verwendet. Die Herstellung der *in-vitro*-Grünstecklinge erfolgte nach BRENDEL (1988) in modifizierter Weise. Von den jungen Trieben wurden ca. 2 cm große Ein-Augen-Stecklinge geschnitten, von denen Blätter und Ranken entfernt wurden. Die Stecklinge wurden zuerst 20 min mit einer Lösung des Fungizids Switch (0,6 g/l) behandelt. Anschließend wurden sie kurz in 70 %iges Ethanol getaucht und 30 min in einer 1,5 %igen Natriumhypochlorid-Lösung oberflächendesinfiziert. Im Anschluss daran wurden die Stecklinge dreimal mit 100 ml Aqua dest. gewaschen. Mit einer Pinzette wurden je drei bis vier Stecklinge in einen lichtdurchlässigen 500 ml großen Lebensmittelbecher überführt, der 100 ml des erkalteten Kulturmediums für *in-vitro*-Stecklinge enthielt. Die Becher wurden luftdicht mit einem lichtdurchlässigen Deckel verschlossen (Abb. 6). Die

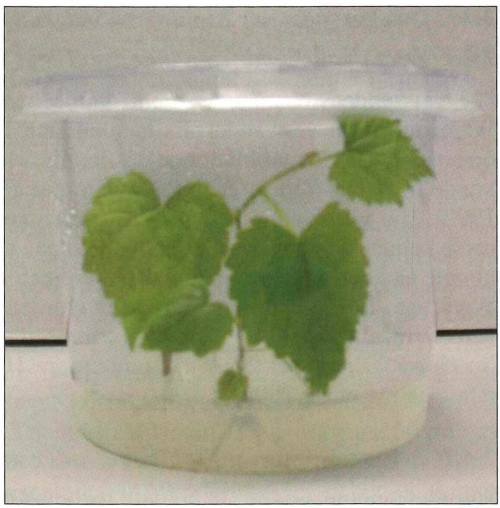


Abb. 6: Bewurzelte *in-vitro*-Grünstecklinge der Unterlage 125AA (Foto: K. Nickel)

Stecklinge wurden in einer Klimakammer bei 25 °C und einer Photoperiode von 16 h kultiviert.

2.3.4 Anzucht von sterilen Sämlingen von *Ficus carica* und *Vitis* spec.

Die Feigensamen wurden aus frischen Früchten gewonnen. Das Fruchtfleisch wurde mit Wasser entfernt und die Samen auf einem Sieb aufgefangen. Die so gewonnenen Samen wurden mit 70 %igem Ethanol oberflächendesinfiziert und anschließend getrocknet. Bei den verwendeten Rebsamen handelt es sich um wildbestäubte Exemplare der Testpflanzen aus dem Sortiment der Rebenzüchtung des Weinbauinstitutes.
Um sterile Sämlinge anzuziehen, wurden die Samen über Nacht zum Quellen in destilliertem Wasser eingeweicht und am nächsten Tag 20 min in einer gefilterten 4 %igen Calciumhypochlorid-Lösung unter Rühren oberflächensterilisiert. Anschließend wurden sie eine Stunde in sterilem destilliertem Wasser gewaschen und in Petrischalen auf 0,8 %igem Wasseragar aufgesetzt. Danach wurden die Petrischalen luftdicht verschlossen und in eine Klimakammer bei 25 °C und 16 h Photoperiode zum Auskeimen gestellt (Wyss, 1978). Die Rebsamen wurden vor der Keimung 14 Tage bei 5 °C kälteinduziert (Vernalisation), um die Samenruhe zu brechen. Die Sämlinge wurden alle zwei Wochen mit 600 μl Spurenelementlösung No.2 (Hoagland et Arnon, 1938) gegossen.

2.4 Das Versuchstier *Xiphinema index*

2.4.1 Zucht von *Xiphinema index* an *Ficus carica*

Die verwendete Nematodenzucht wurde bereits in früheren Versuchen am Weinbauinstitut verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Mischpopulation aus Nematodenpopulationen des Instituts für Nematologie und Wirbeltierkunde in Münster und der INRA in Colmar, Frankreich (STAUDT et WEISCHER, 1992). Die virusfreien Nematoden wurden an Feigenpflanzen angezogen, da diese keinen Wirt für das Grapevine Fanleaf Virus darstellen. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß die Nematoden virusfrei blieben (STAUDT et WEISCHER, 1992). Die Feigenpflanzen wurden in 5 l- und 10 l- Töpfen mit einem Gemisch aus 1/3 Sand und 2/3 Pflanzerde bei ausreichender Feuchtigkeit im Gewächshaus bei 20-25 °C und einem 16 h Lichttag kultiviert (Abb. 7) (DEMANGEAT et al., 2005).

2.4.2 Extraktion von *Xiphinema index* aus Erdmaterial

Die Gewinnung von *X. index* aus Erde erfolgte mittels einer modifizierten Siebmethode nach FLEGG (1967).
Es wurden ca. 200 ml Erde entnommen und diese in einem 1-l -Becher mit

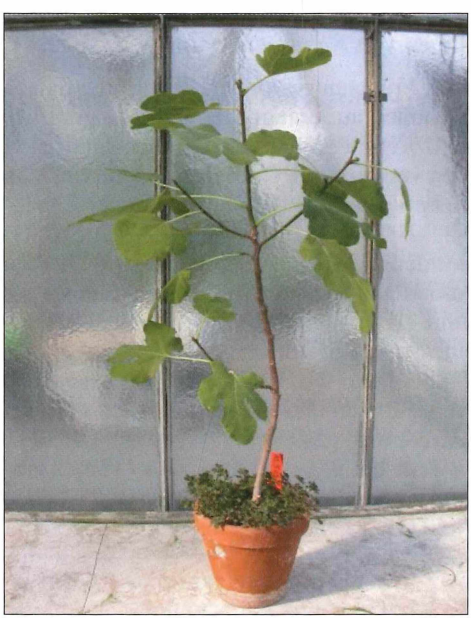


Abb. 7: Zucht von *Xiphinema index* an *Ficus carica* (Foto: K. Nickel)

Leitungswasser aufgefüllt. Die Erde wurde je nach Bodenart zwei Stunden eingeweicht (Abb. 8). Danach wurde die aufgeweichte Erde über ein Sieb mit 2 mm Porengröße gegossen, wobei der Sieddurchlauf in einem 5 l Eimer aufgefangen wurde. Der Siebrückstand wurde solange mit Leitungswasser ausgewaschen, bis der Eimer komplett gefüllt war. Nach 25 Sekunden Sedimentationszeit wurde der wässrige Überstand des Eimers über drei übereinander liegende Siebe mit einer jeweiligen Porengröße von 150 μm dekantiert. Nun wurde der feste Bodensatz des Eimers noch einmal mit Leitungswasser aufgewirbelt bis der Eimer erneut komplett gefüllt war. Danach erfolgte ein zweites Dekantieren über die 150 μm Siebe. Die Erdrückstände mit den enthaltenen Nematoden aus diesen drei Sieben wurden in einen 100 ml Becher überführt und auf ein Nylonsieb (Maschenweite 150 mm) in einem Baermann Trichter gegossen. Nun wurde der Baermann-Trichter mit Wasser aufgefüllt. Die sich in den Erdrückständen befindlichen Nematoden wanderten durch das Sieb und setzten sich im unteren Teil des Trichters ab. Nach 20 h wurden ca. 50 ml aus dem Trichter abgelassen und anschließend die Nematoden unter dem Binokular ausgezählt. Wurden die Nematoden in Wanderungsversuchen oder zum Aufsetzen auf Sämlingsplatten verwendet, betrug die Sedimentationszeit 72 h, um eine optimale Vitalität der Nematoden zu gewährleisten.

2.4.3 Sterilwaschen von *Xiphinema index*

Zur Verwendung von *X. index* in Sterilkulturen mit *in-vitro*-Testpflanzen erfolgte zuvor eine Oberflächensterilisation (modifiziert nach AUMANN, 1997). Nach der Gewinnung von *X. index* aus Erdmaterial wurden die Nematoden unter dem Binokular ausgezählt und mit einem Nematodenhaken in Gläschen mit Leitungswasser überführt.
Die Nematoden wurden in der Sterilbank über einem Sieb mit einer Porenweite von 30 μm mit 20 ml 0,1 %iger Natriumhypochloridlösung oberflächensterilisiert. Anschließend wurden sie mit ca. 200 ml destilliertem Wasser gewaschen und in ein Falconröhrchen mit 2,5 ml Knoplösung gegeben. Diese Nematodensuspension wurde mit einer gekappten Pipettenspitze auf eine Petrischale mit 0,8 %igem Wasseragar aufpipettiert. Um eine Darmentleerung der Nematoden zu gewährleisten, wurden die luftdicht verschlossenen Platten über Nacht in einem Klimaschrank bei 27-29 °C und 16 h Lichttag inkubiert. Zur weiteren Verwendung in den verschiedenen Tests wurden die Nematoden aus diesen Agarplatten mit dem Nematodenhaken herausgesammelt.

2.5 Das Nepovirus - Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)

Das Vorkommen des GFLV in der Rebe wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht, der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction) und dem DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay).

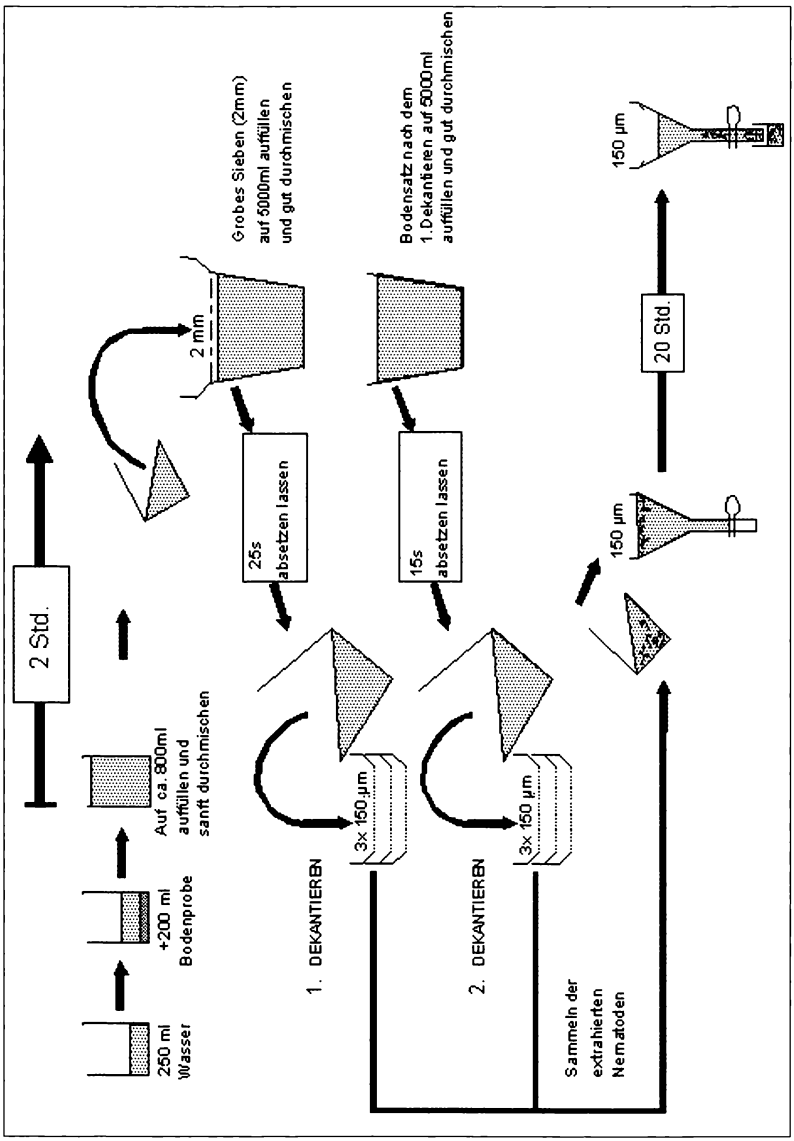


Abb. 8: Extraktion der Nematoden aus Bodenmaterial (Grafik G. Bleyer, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg)

Hierbei wurde sowohl Pflanzenmaterial von nicht mit dem Virus infizierten Kontrollpflanzen verwendet, als auch Material von Pflanzen, die bekanntermaßen virös waren. Der Virusnachweis wurde mit Material von Rebwurzeln, Stängeln, Blättern und Beeren durchgeführt.

2.5.1 Nachweis des GFLV in *Vitis* mit RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction)

2.5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung wurde mit der Hot-Phenol-Methode nach THOMAS et SCHIEFELBEIN (2002) durchgeführt.
Hierzu wurden von jeder Probe 0,2 g Pflanzenmaterial in flüßigem Stickstoff in einem gekühlten Mörser zerkleinert und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurde je 1 ml einer auf 80 °C erhitzten Phenol/Nets-Puffer-Lösung (1:1) gegeben. Die Proben wurden sofort gut suspendiert, zehn Minuten auf Eis inkubiert und danach fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Nun wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zur Fällung der Proteine wurde 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1) zugegeben. Dieser Ansatz wurde zweimal je 30 Sekunden intensiv geschüttelt und anschließend fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die wässrige Oberphase, in der sich die Nucleinsäuren befinden, in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2; versetzt mit DEPC-behandeltem Aqua dest.) und dem doppelten Volumen Ethanol (99 %) versetzt. Die Volumenangaben beziehen sich jeweils auf die Menge der transferierten Oberphase. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden im Gefrierschrank bei -20 °C inkubiert.
Anschließend wurde der Ansatz bei 11.000 rpm 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen und zum Fällen der RNA 200 µl 5 M Lithiumchlorid (versetzt mit DEPC-behandeltem Aqua dest.) zugegeben. Hierbei war darauf zu achten, daß sich das Pellet vor Zugabe das Lithiumchlorids gelöst hatte. Die Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C.
Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 11000 rpm pelletiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 100 µl absolutes Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde mindestens eine Stunde bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde nochmals zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualitätskontrolle der Extraktion

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde die Absorption der RNA-Lösung bei 260 und 280 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (UV VIS Spektralphotometer, SPECORD® 50, Analytik Jena AG, Jena; Software: WinASPECT) ermittelt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der RNA-Lösung mit DEPC-Wasser gemessen. Mit folgender Formel wurde die RNA-Konzentration in μg RNA/ml berechnet.

$$c\ (RNA)\ [\mu g/ml] = OD_{260} * 40 * f_{Verdünnung}$$

Zur Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion wurde 1 μg RNA mit 9 μl DEPC-Wasser und 1,1 μl Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend zum Abkühlen auf Eis gestellt. Das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die RNA, so daß diese bei Anregung mit UV-Licht im Gel detektiert werden kann. Da RNA eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist, muß sie unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V ca. eine Stunde in 1×MOPS durchgeführt. Anschließend konnten die RNA-Banden im Gel mit Hilfe eines Dokumentationsgerätes (ImageMaster® VDS, PharmaciaBiotech, San Francisco, USA) sichtbar gemacht werden.

2.5.1.3 RT-PCR

Bei einer RT-PCR dient die RNA als Matrize für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Die RNA-Moleküle werden im ersten Schritt der RT-PCR mit dem Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert.
Nach der Isolierung der RNA wurde zunächst eine cDNA-Synthese nach folgender Weise durchgeführt:

cDNA-Synthese

1 μg	RNA
2 μl	Oligo$(dT)_{18}$-Primer (2 mM)
ad 10 μl	DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde zur Denaturierung für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Im Anschluß daran wurde folgendes hinzugegeben:

5 μl	Reaktionspuffer
2 μl	dNTPMix
3 μl	DEPC-Wasser
1 μl	Reverse Transkriptase

Dieser Ansatz wurde eine Stunde bei 42 °C inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion 10 Minuten auf 70 °C erhitzt.

Amplifizierung der cDNA

Die synthetisierte cDNA konnte nun mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert werden. Die cDNA-Proben wurden jeweils mit Kontrollprimern und mit Primern für das GFLV versetzt. Zur Überprüfung der erfolgten Amplifizierung der cDNA wurden Primer für die 18S-rRNA verwendet, da diese ribosomale RNA in großen Mengen in den Pflanzenzellen vorkommt. Für den Nachweis des Virus wurden spezifische Primer für das coat-Protein des Grapevine Fanleaf Virus verwendet. Die spezifischen Sequenzen der einzelnen Primer sind im Folgenden aufgelistet.

Primer für GFLV:

FVforward	5'-TAG TGA GTG GAA CGG GAC-3'
FVreverse	3'-GCA ATC ATT GCA GCA AAC G-3'

Fragmentgröße: 416 bp

Primer für 18S-rRNA:

5'Vitis18S	5'-CCC CGA CTT CTG GAA GGG A-3'
3'Vitis18S	5'-CGG AGG CAC GAC CCG GC-3'

Fragmentgröße: 546 bp

Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/μl eingesetzt.

Folgendes Pipettierschema wurde für die PCR-Ansätze verwendet:

2 μl	cDNA
5 μl	*Taq*-Puffer
1 μl	Forward-Primer
1 μl	Reverse-Primer
1 μl	dNTP-Mix
39 μl	DEPC-Wasser

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler (Biometra, Tpersonal) auf 99 °C erhitzt und schließlich 1 μl *Taq*-Polymerase zugegeben.

PCR-Programm:

Start	99°C	50 s
Denaturierung	95°C	45 s
Annealing	56°C	45 s
DNA-Synthese	73°C	1,30 min
Schluss-Synthese	70°C	10 s
Lagertemperatur	4°C	∞

Die PCR wurde mit 40 Zyklen durchgeführt.

2.5.1.4 Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA

Nach der PCR wurde in einem 1,2 % Agarosegel überprüft, ob die gewünschten DNA-Fragmente (18S-Fragment: 546 bp; GFLV: 416 bp;) amplifiziert worden waren.
Hierzu wurden je 10 μl Probe mit 3 μl loading dye versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V in 1 × TAE-Puffer durchgeführt. Anhand einer DNA-Leiter konnte die Größe des Fragmentes unter UV-Licht bestimmt werden. Auf diese Weise konnte man nachweisen, ob in der Probe Fragmente des GFLV enthalten waren.

2.5.2 Nachweis des GFLV mit DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay)

Das Grapevine Fanleaf Virus lässt sich ebenso mit Hilfe des ELISA-Tests serologisch nachweisen (Clark et Adams, 1977). Hier wurde die DAS-ELISA Technik (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) angewandt, in der zwei Antikörper verwendet werden. Diese binden spezifisch an unterschiedliche Stellen des zu detektierenden Antigens, so daß ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entsteht. Der zweite Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert, wodurch bei Zugabe des entsprechenden Substrats eine Farbreaktion hervorgerufen wird.

Durchführung des DAS-ELISA

1) Aufarbeitung der Proben
   Es wurde jeweils 1 g Pflanzenmaterial eingewogen und in spezielle Extraktionsbeutel (12×14 mit Innenwand, Bioreba AG, CH-Reinach) gegeben. Den Proben wurde Extraktionspuffer zugegeben, so daß sie 1:10 verdünnt waren. Danach wurden sie mit einem Probenaufbereitungsgerät (Homex 6, 110W, 230V, Bioreba AG, CH-Reinach) homogenisiert.

2) Beschichtung der Microtiterplatten
   Der Beschichtungsantikörper (Polyklonaler Antikörper, IgG anti-rabbit, Bioreba AG,Reinach) wurde im Beschichtungspuffer 1:1000 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 200 μl pro Probe in die Microtiterplatten pipettiert und die Platten vier Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer waren die Platten gebrauchsfertig. Hier stellte der ELISA Plate Washer (Easy Wash 2000, Bioreba AG, CH-Reinach) automatisch eine 1:2 Verdünnung des 50 × Waschpuffers mit der entsprechenden Menge Wasser her.

3) Probenzugabe
   Von der mit Extraktionspuffer behandelten Probensuspension wurden jeweils 200 μl Probe in die wells pipettiert und die Platten über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Für jede Probe wurde ein Doppelansatz pipettiert.

4) Konjugatzugabe
Nach dreimaligem Waschen der Microtiterplatten wurden 200 μl des konjugierten IgG (monoklonales IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, Bioreba-AG, Reinach) in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Proben gegeben und vier Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5) Substratzugabe
Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe des Substrats 4-Nitrophenylphosphat, gelöst in Substratpuffer (1:1000). Die Platten wurden im Dunkeln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
Während der Inkubation spaltet die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers den Phosphatrest vom farblosen Substrat ab, so daß eine gelbe Farbreaktion (Nitrophenol) sichtbar wird. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Platten an einem Photometer (GENios Plus, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim; Software: Magellan Standard V.5) bei 450 nm vermessen, wobei die Farbintensität proportional ist zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

2.6 Färbemethoden

Um die Reaktion der Wurzel auf die Besaugung durch *Xiphinema index* zu untersuchen, wurden zwei Färbemethoden verwendet. Mit der NBT-Färbung (Nitroblau-Tetrazolium) sollte die Bildung von Superoxidradikalen, die bei einer aktiven Abwehrreaktion der Pflanze entstehen, untersucht werden. Die Anillinblau-Färbung wird verwendet, um Calloseeinlagerungen in die Zellwände der Pflanzenzelle nachzuweisen.

2.6.1 Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT)

Um die Bildung von Superoxidanion-Radikalen in der Wurzel zu untersuchen, wurden diese, wie bei Hückelhoven et Kogel (1998) und bei Trujillo et al. (2004) beschrieben, mit NBT angefärbt. Das Nitroblau-Tetrazolium reagiert im Wurzelgewebe mit Sauerstoffradikalen. An dieser Stelle wird eine Blaufärbung sichtbar.
Es wurden sowohl frisch besaugte als auch unbesaugte Wurzeln in einer 0,1 %igen NBT-Lösung inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Wurzeln in eine Lösung aus 0,15 % Trichloressigsäure in 4:1 Ethanol/Chloroform eingelegt, um die Färbereaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Wurzeln unter dem Mikroskop betrachtet.

2.6.2 Anilinblau-Färbung

Die Färbung wurde, wie bei UNGER (2001) beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden die Wurzeln mit einer Anilinblau-Färbelösung 5-10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. von der überflüssigen Färbelösung befreit und unter dem Mikroskop untersucht.

2.7 Biotests

In verschiedenen Biotests wurden die Reaktionen von Wurzeln verschiedener Rebpflanzen auf die Besaugung von *X. index* untersucht. Zusätzlich wurden Versuche zum Wanderungsverhalten von *X. index* durchgeführt. Dafür wurden sowohl frisch gekeimte Rebsämlinge als auch verschiedene pflanzliche Duftstoffe und Substanzen eingesetzt.

2.7.1 Beobachtung der Rebwurzeln von *in-vitro*-Sämlingen und *in-vitro*-Stecklingen nach Inokulation mit *Xiphinema index*

Um die Reaktion der unterschiedlichen *Vitis*-Unterarten zu untersuchen, wurden *in-vitro*- Sämlinge und *in-vitro*-Stecklinge von verschiedenen Testpflanzen (Tabelle 3 und 4), die bereits Wurzeln gebildet hatten, mit *X. index* inokuliert. Die Versuchsansätze wurden bei 28 °C aufbewahrt. In bestimmten Zeitabständen wurden die sichtbaren Reaktionen der Wurzeln und das Verhalten der Nematoden beobachtet. Diese Versuche wurden mindestens zehnmal durchgeführt.

2.7.2 Untersuchung der Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte

Um festzustellen, wie sich *X. index* auf einer Agarplatte ausbreitet, wenn ihm kein Stimulus angeboten wird, wurde folgender Test durchgeführt.

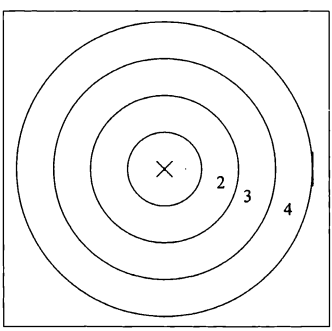


Abb. 9: Versuchsaufbau: Agarplatte mit konzentrischen Ringen (1-4); X = Im Zentrum wurden die Nematoden aufgesetzt. (Grafik: K. Nickel)

Auf den Boden einer Petrischale wurden von der Mitte ausgehend konzentrische Kreise im Abstand von je 1 cm voneinander aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Aufsetzung von 25 Nematoden in die Mitte des innersten Kreises (Abb. 9). Nach jeweils 2, 4, 8 min usw. bis 256 min wurde die Anzahl der einzelnen Nematoden in den jeweiligen Ringen (1 - 4) protokolliert. In der Versuchsauswertung wurde die Anzahl der Nematoden pro cm^2 ermittelt. Dieser Versuch wurde fünfmal wiederholt.

2.7.3 Wanderungstest

In diesem Test sollte untersucht werden, ob es sich bei der Auffindung der Nahrungsquelle um eine gerichtete Bewegung des Nematoden handelt.
Dazu wurden Rebsamen von *Vitis* spec., wie in 2.3.4 beschrieben, auf 0,8 %igem Wasseragar kultiviert. Die Petrischale wurde durch eine Linie halbiert, wovon eine Hälfte wiederum in zwei Sektoren aufgeteilt wurde. Die Samen wurden auf dem Agar so plaziert, daß sie sich in den Vierteln der oberen Hälfte der Petrischale befanden (Abb. 10).

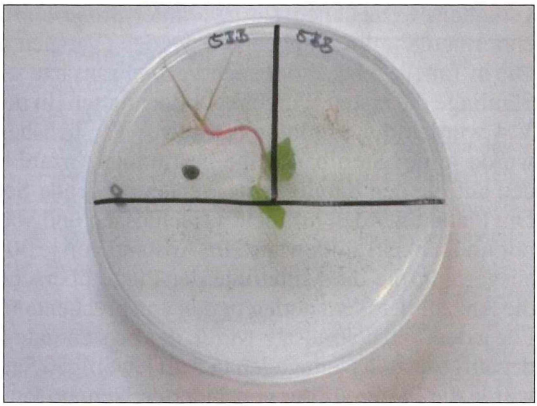


Abb. 10: Versuchsansatz zur Wanderung der Nematoden; links: gekeimter Sämling, rechts: gekeimter Sämling, der vor Versuchsbeginn entfernt wurde (Versuch 1) (Foto: K. Nickel)

Folgende Versuchsansätze wurden angesetzt:

Tab. 5: Versuchsansätze des Wanderungsversuches

Versuch 1 (V 1)	Rebsame gekeimt	Rebsame ungekeimt
Versuch 2 (V 2)	Rebsame gekeimt	Stein
Versuch 3 (V 3)	Rebsame gekeimt, entfernt	Vertiefung im Agar
Versuch 4 (V 4)	Rebsame gekeimt	Rebsame gekeimt, entfernt

Um auszuschließen, daß *X. index* von eventuell abgegebenen Stoffen des ungekeimten Samens (Versuch 1) angelockt wird, wurde dieser in einem zweiten Versuchsansatz durch einen Stein ersetzt (Versuch 2).
Außerdem wurde untersucht, ob *X. index* auch noch gezielt die Stelle des gekeimten Samens aufsucht, wenn dieser nach der Keimung entfernt wurde (Versuch 3 und 4). Da an der Stelle des entfernten Samens ein Loch entstanden war, wurde den Nematoden im zweiten Sektor auf der Agarplatte ebenfalls eine Vertiefung angeboten. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß die Nematoden allein auf eine strukturelle Veränderung im Agar reagieren (Versuch 3). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich die Nematoden verhalten, wenn ihnen ein gekeimter Same und der Keimungsbereich eines entfernten Sämlings angeboten werden (Versuch 4).
Die in Tabelle 5 beschriebenen Versuchsansätze wurden verwendet, sobald die Sämlinge die ersten Wurzeln gebildet hatten. In den Versuchsansätzen V 3 und V 4 wurden die Sämlinge direkt vor Versuchsbeginn entfernt. Anschließend wurde in der Sterilbank eine bestimmte Anzahl oberflächensteriler Nematoden auf die den Sämlingen gegenüberliegende Seite auf den Agar aufgesetzt. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und während des Versuches im Labor im Dunkeln aufbewahrt. Im Abstand von je 30 min wurden die Nematoden ausgezählt, die die Mittellinie der Platte überschritten hatten. Hierbei wurde die Anzahl der Nematoden in den entsprechenden Sektoren notiert.
Für jeden Versuchsansatz wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden in dem jeweiligen Sektor bestimmt. Anschließend wurde die Präferenz der gewanderten Nematoden mit Hilfe des Präferenzwertes P ermittelt (Gl. 1). Hier wurde überprüft, um wieviel größer die Anzahl an gewanderten Nematoden am gekeimten Samen ist, und deren prozentualer Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt.

$$P\,[\%] = \frac{\text{Anzahl Nematoden (Samen gekeimt)} - \text{Anzahl Nematoden (v)}}{\Sigma \text{ gewanderte Nematoden gesamt}} \times 100 \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Die Anzahl Nematoden (v) entspricht der Anzahl der gewanderten Nematoden in die jeweilige Alternativvariante zum gekeimten Samen auf der gleichen Agarplatte.

2.7.4 Test verschiedener Substanzen

Pflanzen geben über ihre Wurzeln Stoffe in das sie umgebende Medium ab (PROT, 1980; ZHAO et al., 2000). Es ist denkbar, daß solche Verbindungen auch für die Orientierung der Nematoden eine Rolle spielen. Daher wurden verschiedene in Frage kommende Substanzen sowie Extrakte getestet. Die Auswahl der Substanzen erfolgte anhand verschiedener Literaturhinweise (RASMANN et al., 2005, TASIN et al., 2005).
Der Vorbereitung der Versuchsplatten erfolgte, indem der Boden der verwendeten Agarplatten durch eine Mittellinie halbiert wurde. Von den verwendeten Substanzen wurde je 1 mg in 1 ml Lösungsmittel suspendiert. Der getestete Feigenwurzelextrakt wurde hergestellt, indem Feigenwurzeln in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert und das Pulver in 1 ml Aqua dest. aufgenommen wurde. Dieser Extrakt wurde ebenso wie die in Aqua dest gelösten und die unverdünnten Substanzen direkt in den Agar appliziert. Die in einem flüchtigen Lösungsmittel gelösten Substanzen wurden auf ein Filterrondell (Durchmesser: 5 mm) appliziert, kurz abdampfen gelassen und in den Agar eingesteckt.

Tab. 6: Übersicht über Substanzen, die in den Wanderungsversuchen verwendet wurden

Substanz	Lösungsmittel	Applikation
cis-3-Hexen-1-ol	unverdünnt	10 µl in Agar
Tannin	Aqua dest	10 µl in Agar
1-Indanol	Methanol	10 µl auf Filterrondell
β-Caryophyllen	Pentan	10 µl auf Filterrondell
Linalool	Methanol	10 µl auf Filterrondell
Farnesen	Pentan	10 µl auf Filterrondell
Isovanillinsäure	Aqua dest.	10 µl in Agar
Methylsalicylat	Pentan	10 µl auf Filterrondell
Feigenwurzelextrakt (wässrig)	unverdünnt	10 µl in Agar
Kontrolle (MeOH)	unverdünnt	10 µl auf Filterrondell

Nachdem die Platten mit den Substanzen präpariert worden waren, wurden auf die gegenüberliegende Seite des applizierten Duftstoffes die Nematoden aufgesetzt. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und während des Versuches im Dunkeln aufbewahrt. Im Abstand von je 30 Minuten wurden die Nematoden ausgezählt, die die Mittellinie der Platte überschritten hatten und deren Anzahl notiert.
Anhand der ermittelten Daten wurde der chemotaktische Index I_c der Substanzen nach BARGMANN et HORVITZ (1991) bestimmt (Gl. 2). Dieser berechnet sich wie folgt:

$$I_c = \frac{\sum \text{gewanderte Nematoden (Substanz)} - \sum \text{gewanderte Nematoden (Kontrolle)}}{\sum \text{gewanderte Nematoden gesamt}}$$

(Gl. 2)

Der chemotaktische Index variiert von -1,0 (perfektes Repellents) bis 1,0 (perfektes Attraktans). Allgemein gelten Substanzen mit $I_c \leq -0{,}2$ als repellent, Substanzen mit I_c zwischen -0,2 und 0 als schwach repellent. Dementsprechend sind Stoffe mit einem I_c zwischen 0 und 0,2 als schwach attraktiv und Substanzen mit $I_c \geq 0{,}2$ als stärker attraktiv anzusehen (O'HALLORAN et BURNELL, 2003). Um einen ersten Einblick über die Wirkung der verschiedenen Stoffe zu gewinnen, wurde der Versuch dreimal durchgeführt.

2.8 Praxisorientierte Freiland- und Gewächshausversuche

2.8.1 Bonitur und Untersuchung der Virusinfektion mittels DAS-ELISA in einer ausgewählten Rebanlage

Um das Vorkommen des GFLV im Freiland zu dokumentieren, wurde eine Rebfläche ausgewählt, von der bekannt war, daß sie Rebstöcke mit Virussymptomen enthält. Die Fläche befindet sich in Sasbach, im Weinanbaugebiet Kaiserstuhl. In dieser Fläche wurde Ende Juni 2006 eine visuelle Bonitur auf Symptomausprägung durchgeführt. Vor der Bonitur wurden sowohl die Zeilen als auch die einzelnen Rebstöcke der Fläche nummeriert. In der visuellen Bonitur wurden die einzelnen Stöcke begutachtet und auffällige Reben auf einem Pflanzplan markiert. Dabei wurden die Pflanzen in folgende Kategorien eingeteilt:

verdächtig	auffällige Blattform, verkürzte Internodien, Durchrieseln der Gescheine und/oder auffälliger Wuchs
eindeutig virös	Panaschüren auf den Blättern, Kümmerwuchs
potentiell virös	Petersilienblättrigkeit

Anschließend wurden an den Stellen, die vermehrt auffällige oder kranke Reben zeigten, von mehreren Stöcken Blattproben entnommen. Diese wurden anhand eines ELISA-Tests auf GFLV hin untersucht. Bei der Entnahme der Blattproben wurde an einem Stock von verschiedenen Stellen der Laubwand ca. 1 g Blattmasse gesammelt und in Extraktionsbeuteln für den ELISA-Test (Extraktionsbeutel 12×14 mit Innenwand, Bioreba AG, CH-Reinach) aufbewahrt. Die Blattproben wurden noch am selben Tag, wie in 2.5.2 beschrieben, aufbereitet.
Aus dem Weinberg wurden zudem Bodenproben entnommen. Mit Hilfe eines Bohrstocks wurden an neun Stellen, gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt, jeweils zwischen den Rebstöcken in 30 cm Tiefe Proben entnommen und einzeln in Plastiktüten verpackt. Die Bobenproben wurden gekühlt aufbe-

wahrt, mit der in 2.4.3 beschriebenen Methode ausgewaschen und auf Individuen von *X. index* untersucht.

2.8.2 Inaktivierung der Rebwurzeln durch den Einsatz von Herbiziden

Hierzu wurden 5 Jahre alte Spätburgunderreben, die in Töpfen angezogen worden waren, auf zweierlei Weise mit vier verschiedenen Herbiziden behandelt (Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht über den Herbizidversuch

Variante	Mittel	Wirkstoff	Applikation		Anzahl
			Bohrung	Pinseln	Reben
A 1	Kontrolle	--	+		5
A 2	Basta	Glyfosinat	+		5
A 3	Glyfos	Glyphosat	+		5
A 4	Garlon 4	Triclopyr	+		5
B 1	Kontrolle	--		+	5
B 2	Basta	Glyfosinat		+	5
B 3	Glyfos	Glyphosat		+	5
B 4	Garlon 4	Triclopyr		+	5

In einem Versuchsansatz (Variante A) wurden die Spätburgunder mit einer handelsüblichen Baum-und Astschere kurz unterhalb der Veredlungsstelle abgeschnitten und der Stumpf mit dem jeweiligen Herbizid bepinselt (Abb. 11). In einem weiteren Versuchsansatz (Variante B) wurde mit einem Akkubohrer in den Stamm des Rebstockes ein Sackloch mit einem Durchmesser von 0,5 cm gebohrt. Hierbei war darauf zu achten, daß schräg nach unten bis in das Mark gebohrt wurde. In dieses Loch wurde mit einer Pipette 0,3 ml des jeweiligen Herbizids appliziert und das Loch anschließend gut mit Parafilm verschlossen (Abb. 12).
In bestimmten Abständen wurde jeweils eine Spätburgunderrebe der jeweiligen Varianten A 1 - 4 und B 1 - 4 zur Untersuchung ins Labor gebracht. Dort wurden einige Wurzeln von der Erde befreit und eine repräsentative Wurzel ausgewählt. Diese wurde mit sterilem Wasser gewaschen und in eine Petrischale mit 0,8 %igem Wasseragar eingegossen (modifiziert nach Weischer et Wyss, 1976). Nach Erkalten des Agars wurden Nematoden aufgesetzt und die Wurzeln alle zwei Tage unter dem Binokular beobachtet. Hierbei wurde die Anzahl der Nematoden notiert, die sich direkt an der Wurzel befanden.

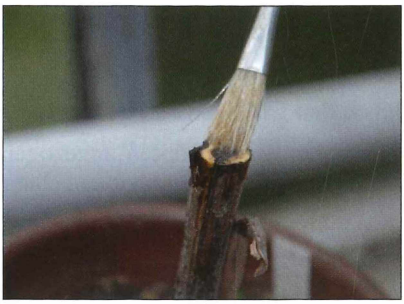


Abb. 11: Variante A: Applikation des Herbizides auf den abgesägten Stamm (Foto: K. Nickel)



Abb. 12: Variante B: Applikation des Herbizides in ein Bohrloch (Foto: K. Nickel)

2.9 Statistische Auswertung

Die Berechnungen wurden zum größten Teil mit Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Die Darstellung der Mittelwerte erfolgte in den Tabellen, Abbildungen und im Text in der Regel unter Angabe der Standardabweichung (SD). In einigen Abbildungen wurde aus Übersichtlichkeitsgründen auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet.
Bei der Auswertung der Wanderungsversuche wurde eine Regressionsgerade durch die Mittelwerte der gewanderten Nematoden gelegt und der Regressionskoeffizient gegen Null geprüft. In der Auswertung eines Wanderungsversuchs (Versuch 2) wurde die Zeitreihe auf Trendänderung überprüft. Hierzu wurde der Vorzeichen-Trendtest von Cox und Stuart verwendet (Sachs, 1984). In den Wanderungsversuchen V1 – V3 wurden die Regressionskoeffizienten b_{xy} der jeweiligen Regressionsgeraden anhand des entsprechenden t-Tests gegen Null geprüft (Sachs, 1984).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Reaktionen von Rebwurzeln auf den Anstich von *Xiphinema index* und Auswertung der Färbungen

In diesem Versuch wurden die Reaktionen verschiedener Testpflanzen aus dem Sortiment des Weinbauinstitutes nach dem Anstechen des Nematoden *X. index* studiert. Es wurden sowohl wildbestäubte Sämlinge als auch *in-vitro*-Stecklinge der verschiedenen Testpflanzen ausgewertet. Die Versuche wurden mindestens zehnmal wiederholt.

Sowohl die Sämlinge als auch die *in-vitro*-Stecklinge zeigten identische Wurzelreaktionen. Nach der Besaugung der Wurzeln durch die Nematoden zeigten sich entweder Gallen oder Nekrosen (Tab. 8).

Tab. 8: Beobachtete Reaktion der Wurzeln der verschiedenen Rebpflanzen

Testrebsorten	Reaktion der Wurzeln
5BB	Gallen
125AA	Gallen
Binova	Gallen
16	Nekrosen und Gallen
141	Nekrosen

Bei den Rebunterlagen 5BB, 125AA und Binova konnte man bereits einen Tag nach der Inokulation ein Anstechen der Nematoden in den Regionen der Wurzelspitzen erkennen (Abb. 13). Unter dem Binokular sah man das Eindringen des ausgefahrenen Odontostiletts der Nematoden in tiefer liegende Zellschichten der Wurzel. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits eine Saugaktivität registriert werden, die sich in einem rhythmischen Pumpen des oesophagischen Bulbus äußerte. Das Saugen an einer Stelle der Wurzel war nicht von Dauer. Die Nematoden wanderten ungerichtet an der Wurzel entlang, wobei ein Abtasten der Wurzeloberfläche mit der Lippenregion verfolgt werden konnte. Bei diesem Abtasten wurde vereinzelt beobachtet, daß das Stilett nur wenige Millimeter in die Zellen eingestochen wurde. In den darauf folgenden drei

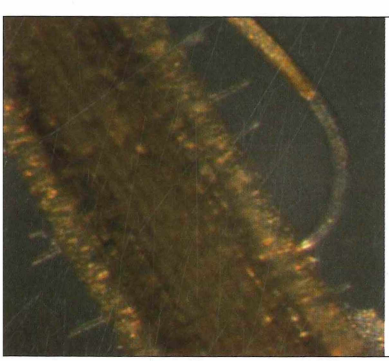


Abb. 13: Saugender *Xiphinema index* an einer Wurzel der Unterlage 5BB (Foto: K. Nickel)



Abb. 14: Wurzelgalle, Nematoden und deren Eier an der Unterlage 125AA (Foto: K. Nickel)

Tagen wurde dieses Abtasten nahezu eingestellt und die Nematoden begannen lokal an der Wurzel zu saugen. Besonders auffällig war, daß die Nematoden an den einmal besaugten Gallen akkumulierten (Abb. 14). Während des Saugvorgangs kam das Längenwachstum der besaugten Wurzeln zum Erliegen und bereits nach wenigen Tagen waren große Gallen an den vorherigen Saugstellen sichtbar (Abb. 14). Die Gallen wurden stets noch nach einigen Tagen besaugt. Zudem konnte eine vermehrte Eiablage in der Nähe der Gallen verzeichnet werden.

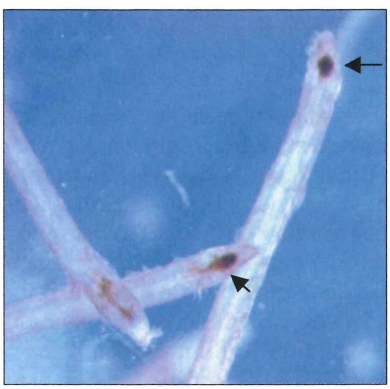


Abb. 15: Nekrosen an den Wurzelspitzen der Testpflanze 141 (Pfeile) (Foto: K. Nickel)

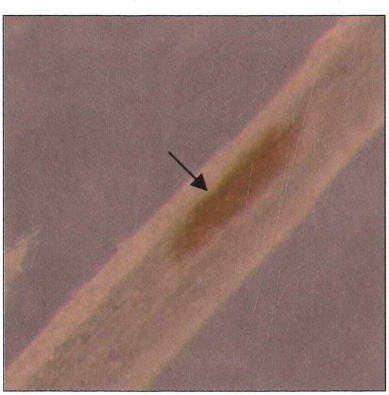


Abb. 16: Nekrose an der Testpflanze 16 (Foto: K. Nickel)

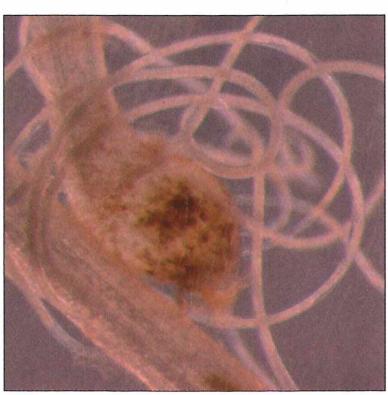


Abb. 17: Wurzelgalle an der Testpflanze 16 und an dieser saugende Nematoden (Foto: K. Nickel)

Die Wurzeln der Testpflanze 141 wurden von *X. index* ebenfalls besaugt. Hier wurde keine Gallbildung beobachtet. Drei bis vier Tage nach der Besaugung der Wurzeln waren braun verfärbte Stellen, sogenannte Nekrosen, an diesen Stellen zu erkennen (Abb. 15).
An den *in-vitro*-Stecklingen der Testpflanze 16 konnte erst nach mehreren Wochen ein Anstechen der Wurzeln durch *X. index* beobachtet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt hielten sich die Nematoden nicht in der Nähe der Wurzeln auf, sondern waren willkürlich im Medium verteilt. Die Sämlinge der Testpflanze 16 zeigten unterschiedliche Reaktionen. Einige wurden bereits nach ca. drei Tagen besaugt. Andere Individuen dieser Pflanzen wurden erst nach einigen Wochen besaugt oder sie wurden überhaupt nicht angestochen. Nach einer erfolgten Besaugung entwickelten sich an diesen Bereichen sowohl Nekrosen als auch Gallen (Abb. 16, 17).
Zur näheren Untersuchung der Wurzelreaktionen wurden die besaugten Wurzeln mit verschiedenen Färbemethoden behandelt. Die Anilinfärbung dient im Allgemeinen dazu, eingelagerte Callose sichtbar zu machen. Mit der NBT-Färbung können Superoxidradikale in den Pflanzenzellen nachgewiesen werden.
Bei Anfärbung der Gallen mit Anilinblau konnte keine eingelagerte Callose nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Auch in den Nekrosen, die ebenfalls mit Anilinblau angefärbt worden waren, wurden keine Calloseeinlagerungen beobachtet (Abb. 18).
Anhand der durchgeführten NBT-Färbungen konnte keine Bildung von Superoxidradikalen in den Wurzelgallen der Testpflanzen nachgewiesen werden (Abb. 19).
Dahingegen konnte in den Nekrosen die Bildung von Superoxidradikalen aufgezeigt werden. Diese waren im gesamten Bereich der Nekrosen in den Zellen als blaue Verfärbungen am Zellrand oder baumartige Strukturen in der Zelle zu beobachten (Abb. 20, Pfeile).

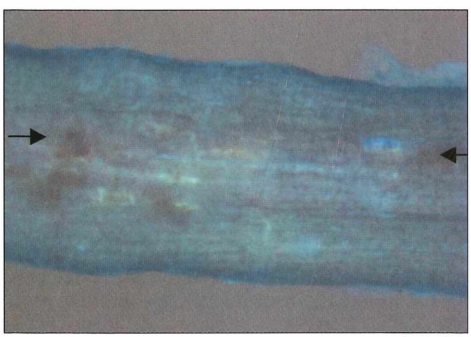


Abb. 18: Anilinblau-Färbung von Nekrosen der Testpflanze 141 (Pfeile: Nekrosen ohne Callose) (Foto: K. Nickel)



Abb. 19: NBT-Färbung einer Wurzelgalle von Unterlage 5BB; keine Superoxidradikale sichtbar (Foto: K. Nickel)

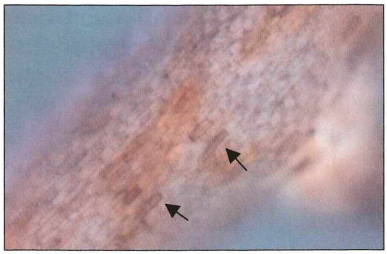


Abb. 20: NBT-Färbung von Nekrosen (Pfeile: Superoxidbildung in den Zellen) (Foto: K. Nickel)

3.2 Ausbreitung von *Xiphinema index* auf einer Agarplatte

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, wie sich die Nematoden auf einer Agarplatte verteilen, wenn ihnen kein Stimulus angeboten wird. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt, die Mittelwerte bestimmt und die Anzahl der Nematoden pro Fläche (cm^2) in den einzelnen Ringen berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen wurden in verschiedenen Grafiken dargestellt. Aus Übersichtsgründen wurden nur die Zeiten 2, 8, 32 und 128 min herausgegriffen.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich zur ersten Auszählung nach 2 Minuten die Mehrzahl der Nematoden noch im ersten Ring befand (Abb. 21). Von da aus verteilten sie sich jedoch zunehmend auf der gesamten Fläche der Ringe. Die Anzahl der Nematoden/cm^2 im Ring 1 nahm im Laufe der Zeit deutlich ab. Die Nematoden breiteten sich zunehmend auf die anderen Ringflächen aus

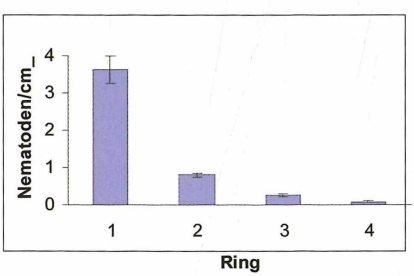


Abb. 21: Nematoden/cm^2 Ringfläche nach 2 min (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

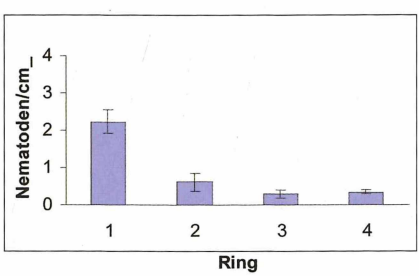


Abb. 22: Nematoden/cm^2 Ringfläche nach 8 min (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

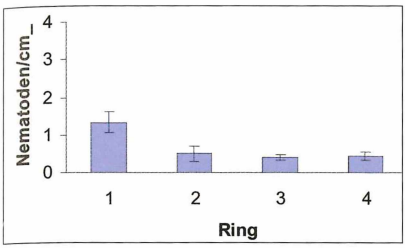


Abb. 23: Nematoden/cm² Ringfläche nach 32 min (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

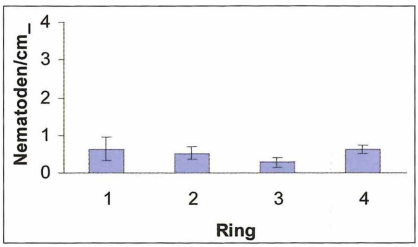


Abb. 24: Nematoden/cm² Ringfläche nach 128 min (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

(Abb. 22; 23). Nach 128 Minuten waren die Nematoden schließlich nahezu gleichmäßig in allen vier Ringen verteilt (Abb. 24).
Betrachtet man die Anzahl der Nematoden/cm² im Zeitverlauf eines einzelnen Ringes, so erkennt man, daß sich die Nematodenanzahl vor allem im innersten Ring 1 und im äußersten Ring 4 änderte (Abb. 25; 28).
Man sieht vor allem am Ring 1, daß die Anzahl der Nematoden in der Ringfläche des ersten Ringes mit der Zeit exponentiell abnahm (Abb. 25). Dahingegen stieg die Anzahl der Nematoden in der Fläche des Ringes 4 mit der Zeit an (Abb. 28). Die Nematoden breiteten sich also von ihrem Aufsetzungspunkt aus nach außen auf der Platte in einem diffusionsähnlichen, zufälligen Prozess aus. In den Ringen 2 und 3 änderte sich die Anzahl der Nematoden pro cm² im zeitlichen Verlauf nur sehr wenig (Abb. 26; 27). Die Anzahl der zugewanderten Nematoden entsprach hier ungefähr der Anzahl der abgewanderten Nematoden. Die Tiere akkumulierten nicht an einer Stelle, sondern verteilten sich angerichtet und diffus auf der Platte.

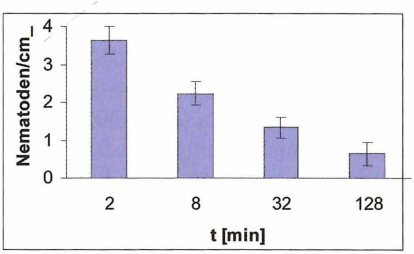


Abb. 25: Nematoden/cm² in Ring 1 (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

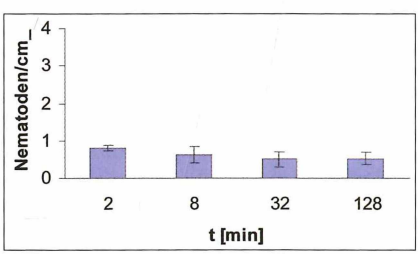


Abb. 26: Nematoden/cm² in Ring 2 (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

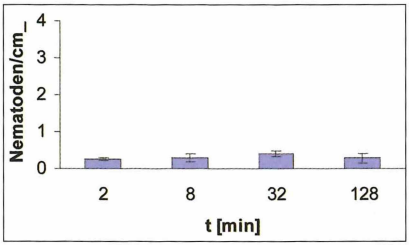


Abb. 27: Nematoden/cm² in Ring 3 (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

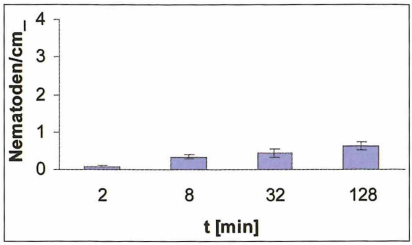


Abb. 28: Nematoden/cm² in Ring 4 (Mittelwerte mit SD; n = 5) (Grafik: K. Nickel)

3.3 Wanderungstest

Um zu testen, ob eine gerichtete Wanderung der Nematoden zu einem gekeimten Rebsamen erfolgt, wurden den Nematoden verschiedene Stimuli in zwei verschiedenen Sektoren auf einer Agarplatte angeboten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 29 - 36 dargestellt.
Bei der Auswertung der Versuche wurde für jeden Versuchsansatz zuerst der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden in dem jeweiligen Sektor bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse wurden grafisch aufgetragen (Abb. 29, 31, 33, 35). Um den Verlauf der Mittelwerte während des Versuches zu skizzieren, wurde die Regressionsgerade als gestrichelte Linie eingezeichnet. Anschließend wurde die Präferenz der gewanderten Nematoden mit Hilfe des Präferenzwertes P ermittelt (siehe 2.7.3, Gl. 1). Hierzu wurde überprüft, um wie viel größer die Anzahl der gewanderten Nematoden am gekeimten Samen war und deren prozentualer Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt (Abb. 30, 32, 34, 36).

3.3.1 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber eines ungekeimten Rebsamens

Im ersten Versuchsansatz wurden den Nematoden in zwei Sektoren je ein gekeimter Rebsame und ein ungekeimter Rebsame angeboten (Abb. 29).
Das Ergebnis zeigt, daß sich bereits zu Beginn der Messung ab 1,5 Stunden mehr Nematoden im Sektor des gekeimten Samens befanden als im Sektor des ungekeimten (Abb. 29). Die prozentuale Nematodenanzahl, die sich im Sektor des Sämlings aufhielt, überstieg zu jedem Zeitpunkt der Messung die Anzahl der Nematoden im Sektor des ungekeimten Samens. Die Zahl der Nematoden, die in einen der beiden Sektoren wanderte, nahm im Laufe des Versuches in beiden Sektoren zu. Dies verdeutlichen auch die ansteigenden Geraden der beiden Mittelwertskurven. In den ersten 2 Stunden waren die Unterschiede in

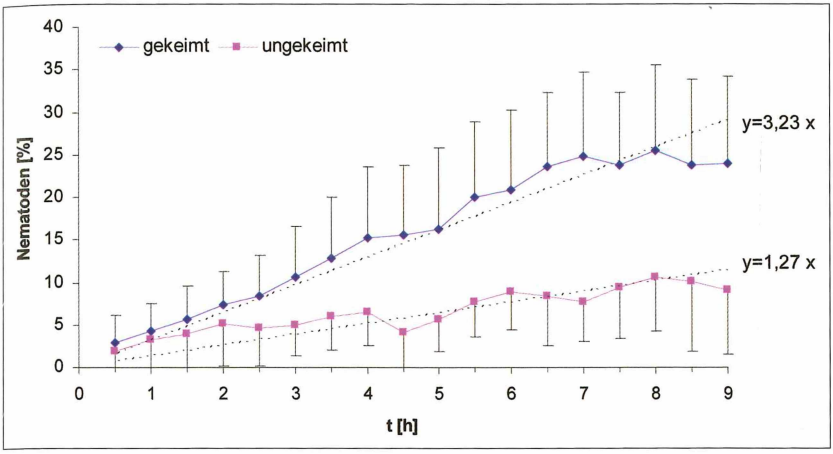


Abb. 29: V1. Prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=11), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder ungekeimter Rebsame) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten. (Grafik: K. Nickel)

der Anzahl der Nematoden zwischen den beiden Sektoren gering. Erst nach 3,5 Stunden nahm die Anzahl der Tiere im Sektor des Sämlings deutlich zu. Am ungekeimten Rebsamen stieg die Anzahl der Nematoden ebenfalls an, aber mit deutlich geringerer Geschwindigkeit. Dies spiegelt sich auch in der Steigung der Geradengleichungen wieder. Im letzten Zeitabschnitt des Versuches, von 7 bis 9 Stunden, waren teilweise nahezu dreimal so viele Nematoden am Sämling wie am ungekeimten Rebsamen zu finden.
Um zu überprüfen, um wie viel größer die Anzahl an Nematoden am gekeimten Samen war, wurde deren prozentualer Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt (Abb. 30). Dieses Verhältnis wurde in den folgenden Auswertungen, wie in Gleichung 1 (siehe 2.7.3) beschrieben, als Präferenz bezeichnet. Durch die Mittelwerte dieser Meßergebnisse wurde eine Regressionsgerade gelegt.
Anhand der Regressionsgeraden kann man erkennen, daß sich der Präferenzwert der Nematoden für den Sämling von zu Beginn durchschnittlich 34 % nach einer Stunde bis auf 54 % nach neun Stunden tendenziell vergrößerte (Abb. 30). Außerdem wird deutlich, daß bereits nach 30 Minuten 25 % der gewanderten Nematoden ihre Präferenz am gekeimten Samen hatten. Die Streuungen der Einzelwerte, die anfangs noch sehr groß waren (zwischen 100 und -100) verringerten sich hier bereits ab 4,5 Stunden (zwischen 100 und 0).

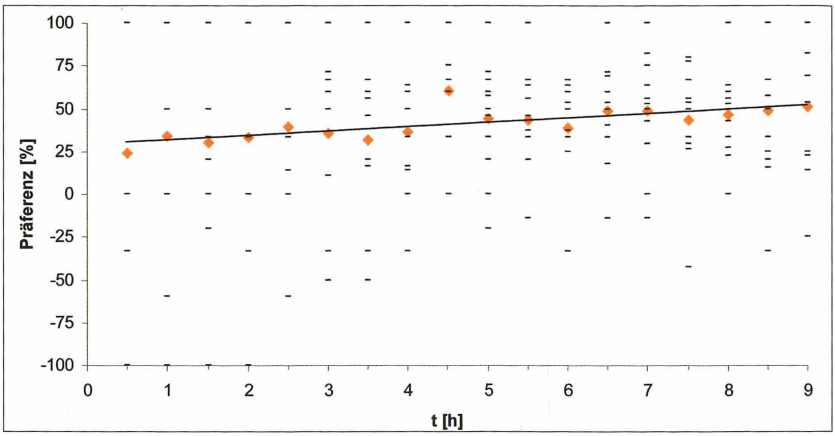


Abb. 30: Präferenzwerte (Einzelwerte) der gewanderten Nematoden für den Sektor des gekeimten Samens gegenüber dem Sektor des ungekeimten Samens (V1). Durch die eingezeichneten Mittelwerte (orange) wurde eine Regressionsgerade (Geradengleichung: y = 2,51 x + 29,14) gelegt. (Grafik: K. Nickel)

3.3.2 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber eines Steins

In einem zweiten Versuchsansatz wurden den Nematoden ein gekeimter Rebsame und ein Stein angeboten. Dieser Ansatz erfolgte, um auszuschließen, daß der in V 1 verwendete ungekeimte Same ebenfalls Stoffe abgibt oder die Nematoden allein auf einen im Agar befindlichen Gegenstand reagieren. Die Auswertung der Meßergebnisse wurde wie im vorangegangenen Versuchsansatz durchgeführt.

Die Ergebnisse des prozentualen Anteils an aufgesetzten Nematoden zeigen, daß eine Mehrheit der Nematoden den Sektor des gekeimten Rebsamens aufsuchte (Abb. 31). Die prozentuale Nematodenanzahl am Stein lag zu jedem Zeitpunkt der Messung unter der des Sämlings. Anhand der beiden Kurven kann man erkennen, daß sich die Anzahl der Nematoden, die in Richtung des gekeimten Samens wanderten, im zeitlichen Verlauf vergrößerte. Aus den Gleichungen der beiden Regressionsgeraden wird ersichtlich, daß die Steigung der Geraden der Nematoden am Sämling nahezu um das Dreifache größer ist. Dies weist daraufhin, daß im Laufe des Versuches deutlich mehr Nematoden den gekeimten Rebsamen aufsuchten, als den Stein. Diese Tendenz wurde bereits zu Beginn des Versuches beim Betrachten der Mittelwerte deutlich. Schon ab 2,5 Stunden waren zweieinhalb Mal so viele Nematoden am gekeimten Samen wie am Stein zu finden. Dies setzte sich bis 7 Stunden nach Inokulation fort. Bei 7,5 und 8 Stunden nach Inokulation der Platte konnte man

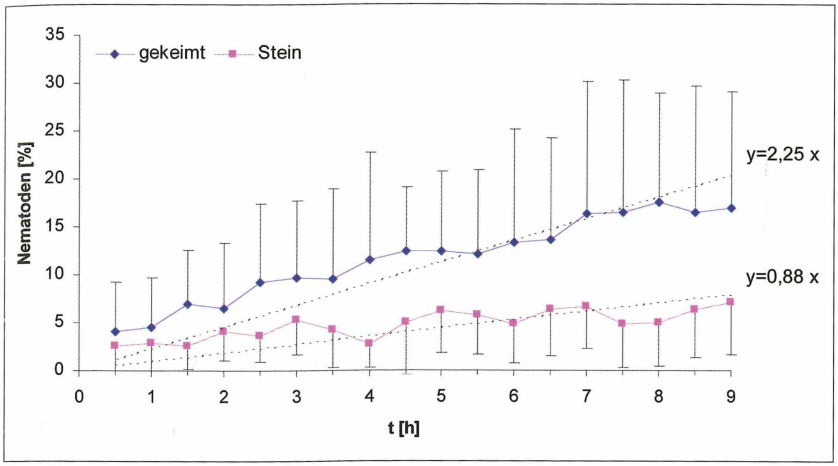


Abb. 31: V2. prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=13), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder Stein) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten. (Grafik: K. Nickel)

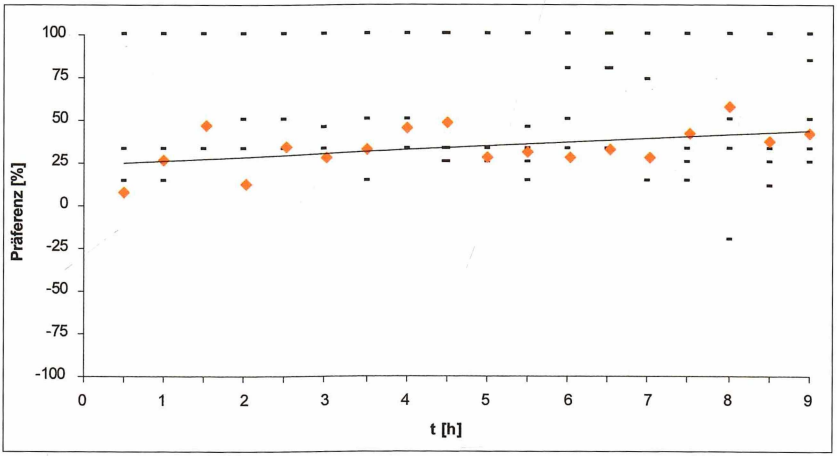


Abb. 32: Präferenzwerte (Einzelwerte) der gewanderten Nematoden für den Sektor des gekeimten Samens gegenüber dem Sektor des Steins (V2). Durch die eingezeichneten Mittelwerte (orange) wurde eine Regressionsgerade (Geradengleichung: y = 2,22 x + 23,96) gelegt. (Grafik: K. Nickel)

sogar nahezu die dreifache Anzahl Nematoden am Sämling beobachten. Diese Tendenz spiegelte sich auch in den Präferenzwerten wieder (Abb. 32).
Anhand der Regressionsgerade kann man erkennen, daß die Präferenz der Nematoden für den Sämling im Laufe des Versuches anstieg (Abb. 32). Der Präferenzwert der Nematoden für den gekeimten Samen erhöhte sich von zu Beginn durchschnittlich 24 % nach 1 Stunde, auf 54 % nach 9 Stunden um mehr als das Doppelte.
Vergleicht man die Steigungen der Regressionsgeraden des Versuches V1 (b = 2,51) mit der des Versuches V 2 (b = 2,22) so wird deutlich, daß diese nahezu identisch verlaufen (Abb. 30, 32).

3.3.3 Wirkung des leeren Keimungsbereiches eines Rebsämlings gegenüber einer Vertiefung im Agar

Um zu überprüfen, ob *X. index* den Keimungsbereich eines Rebsamens aufsucht, nachdem der Sämling entfernt wurde, wurde den Nematoden ein weiterer Versuchsansatz angeboten. Während ihnen in einem Sektor der Keimungsbereich eines entfernten Rebsämlings angeboten wurde, enthielt der andere Sektor eine Vertiefung im Agar. Das Ergebnis des Versuches ist in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abb. 33, 34).

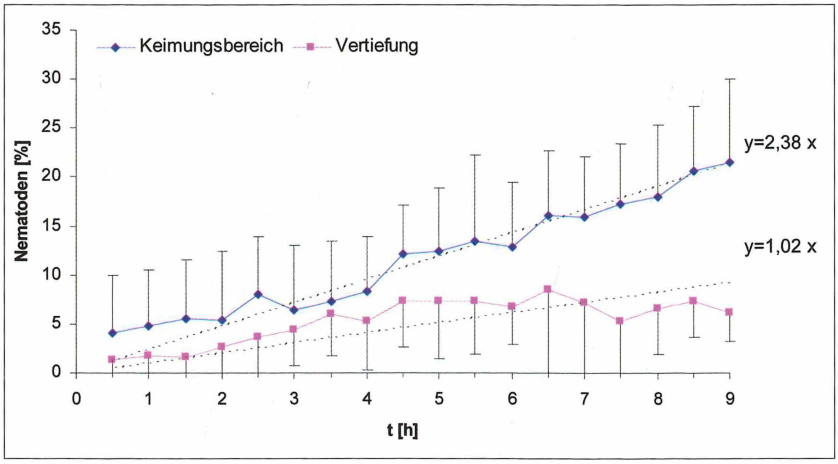


Abb. 33: V3. Prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=10), die sich in einem der beiden Sektoren (leerer Keimungsbereich des Sämlings oder Vertiefung) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten. (Grafik: K. Nickel)

Vergleicht man die Werte des prozentualen Anteils der aufgesetzten Nematoden des entfernten Sämlings mit den Werten, die an der Vertiefung im Agar ermittelt wurden, so wird deutlich, daß diese sich anfangs nur geringfügig voneinander unterschieden (Abb. 33).
Gerade im ersten Drittel bis 4 Stunden lagen die Mittelwerte sehr eng beieinander. Erst im letzten Drittel, ab 7 Stunden, nahm der prozentuale Anteil der Nematoden im Keimungsbereich des entfernten Rebsämlings deutlich zu. Beim Betrachten der beiden gestrichelten Trendlinien kann man feststellen, daß eine deutliche Mehrheit der Nematoden den Sektor des Keimungsbereiches des entfernten Sämlings bevorzugte. Die Gerade der Nematoden im Keimungsbereich des entfernten Samens überragt während des gesamten Versuchszeitraumes die Gerade der Nematoden an der Vertiefung. Im zeitlichen Verlauf kann man erkennen, daß mehr Nematoden in den Sektor des leeren Keimungsbereiches des Sämlings wanderten als in den Sektor der Alternative.
Um zu überprüfen, um wie viel größer die Anzahl an Nematoden im Sektor des entfernten Sämlings war, wurde deren prozentualer Anteil an allen gewanderten Nematoden bestimmt (Abb. 34).
Anhand der Regressionsgeraden durch die Präferenzwerte der gewanderten Nematoden kann man feststellen, daß die Präferenz für den Sektor des vakanten Keimungsbereiches bereits zu Beginn der Messung bei 33 % lag

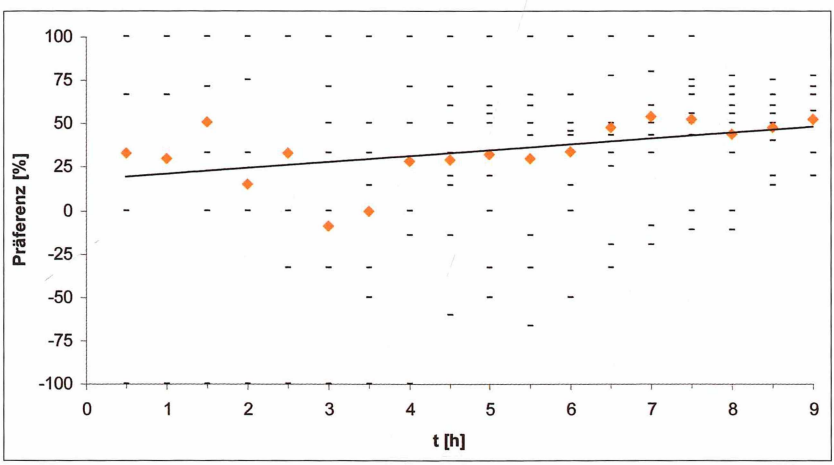


Abb. 34: Präferenzwerte (Einzelwerte) der gewanderten Nematoden für den Sektor des Keimungsbereiches des entfernten Sämlings gegenüber dem Sektor der Vertiefung (V3). Durch die eingezeichneten Mittelwerte (orange) wurde eine Regressionsgerade (Geradengleichung: y = 3,43 x + 17,29) gelegt. (Grafik: K. Nickel)

(Abb. 34). Das bedeutet, es waren 33 % mehr Nematoden in diesem Bereich als im Sektor der Vertiefung. Diese Präferenz nahm im Laufe des Versuches zu auf 52 % nach 9 Stunden. Die anfänglich starken Streuungen der Einzelwerte verringerten sich im Laufe des Versuches. Besonders deutlich zu erkennen war dies ab einer Versuchsdauer von 7 Stunden.

3.3.4 Wirkung eines gekeimten Rebsamens gegenüber des leeren Keimungsbereiches eines Rebsämlings

In einem letzten Versuchsansatz (V 4) wurden den Nematoden ein gekeimter Rebsame und der Keimungsbereich eines entfernten Rebsämlings angeboten (Abb. 35).
Hier lässt sich erkennen, daß sich die Mittelwerte des prozentualen Anteils an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden in den beiden Alternativen kaum unterschieden (Abb. 35). Es hielten sich nahezu gleich viele Nematoden im Sektor des Keimungsbereiches wie im Sektor des gekeimten Samens auf. Die Mittelwerte des gekeimten Rebsamens lagen nur sehr wenig über denen des Keimungsbereiches des entfernten Sämlings. Nach drei Stunden waren sogar mehr Nematoden am leeren Keimungsbereich als am gekeimten Säm-

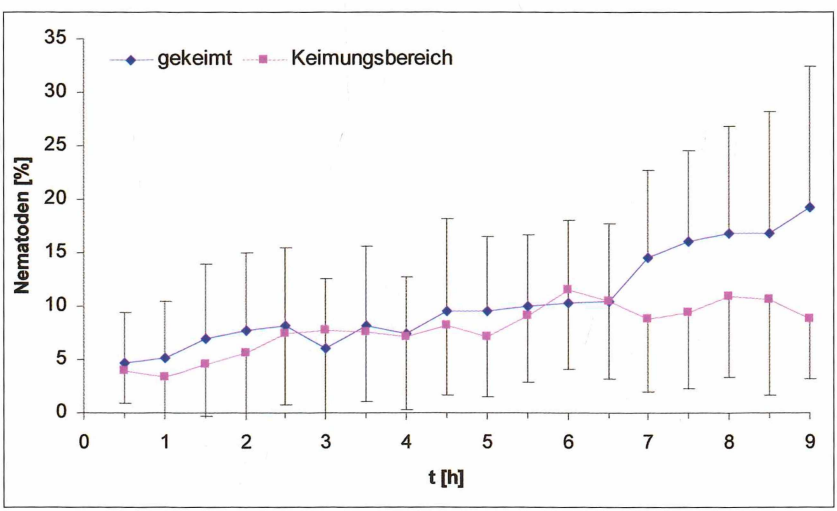


Abb. 35: V4. Prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der aufgesetzten Nematoden (Mittelwerte mit Standardabweichung; n=8), die sich in einem der beiden Sektoren (gekeimter Rebsame oder vakanter Keimungsbereich des Sämlings) zu verschiedenen Zeitpunkten aufhielten.

ling wiederzufinden. Hier war es nicht möglich Regressionsgeraden durch die Mittelwerte zu legen, da zwischen 0,5 und 6,5 Stunden kaum ein Anstieg der Mittelwerte in den Alternativen zu verzeichnen ist. Erst nach 6,5 Stunden begannen die Kurven zu divergieren.
Auch hier wurden die Präferenzwerte berechnet (Abb. 36).
Die Ergebnisse zeigen, daß die Mittelwerte der Präferenzwerte zu Beginn der Messungen bis etwa 6,5 Stunden sehr stark schwankten (Abb. 36). Auch die Streuung der Einzelwerte war sehr groß. Aus diesem Grund konnte keine Regressionsgerade durch die Mittelwerte gelegt werden. Die Präferenz der Nematoden für den gekeimten Samen war anfangs deutlich geringer als in den anderen Versuchen. Hier waren anfangs vermehrt auch Werte unter Null zu verzeichnen, was darauf hindeutet, daß die Nematoden auch die Stelle des entfernten Samens aufsuchten. Aus dieser Grafik wird allerdings deutlich, daß ein Trend ab ca. 6,5 Stunden hin zum Sektor des gekeimten Samens zu verzeichnen war. Die Streuungen der Einzelwerte wurden ab 7 Stunden geringer. Die prozentuale Anzahl der gewanderten Nematoden, die sich am gekeimten Samen befanden, nahm mit der Zeit zu.
In der Auswertung dieses Wanderungsversuchs wurde die Zeitreihe auf diese Trendänderung hin überprüft. Hierzu wurde der Vorzeichen-Trendtest von Cox und Stuart verwendet (Sachs, 1984). Dieser Test ergab, daß der Trend der gewanderten Nematoden hin zum gekeimten Samen mit einer 95% Wahrscheinlichkeit signifikant ist (P = 0,02).

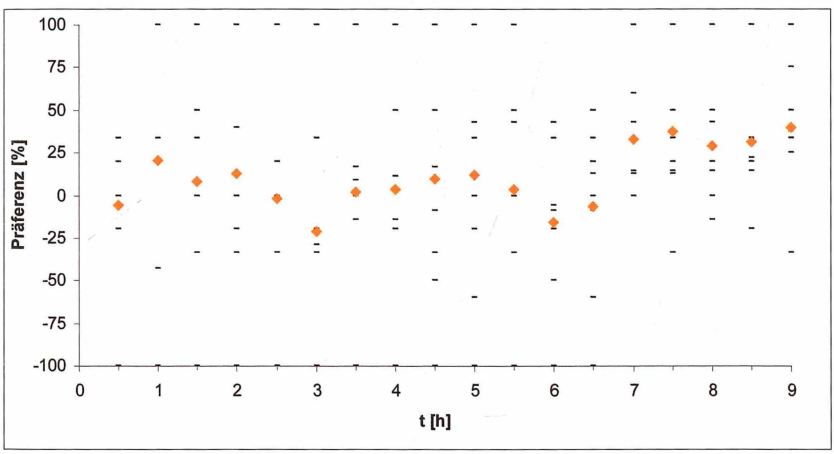


Abb. 36: Präferenzwerte (Einzelwerte) der gewanderten Nematoden für den Sektor des gekeimten Samens gegenüber dem vakanten Keimungsbereich eines entfernten Sämlings (V4). (Grafik: K. Nickel)

In den Versuchen V1 – V3 wurde der Regressionskoeffizient b_{xy} anhand des entsprechenden t-Tests gegen Null geprüft (SACHS, 1984). In allen drei Versuchen wurde $H_0 : b_{xy} = 0$ auf dem 0,01 % Niveau verworfen. Die Regressionskoeffizienten b_{xy} von V1 – V3 unterschieden sich hoch signifikant von Null.

3.4 Wirkung von ausgewählten Substanzen auf *Xiphinema index*

Um zu untersuchen, welche Substanzen den Nematoden in seiner Orientierung in Richtung Wurzel beeinflussen könnten, wurden ausgewählte Substanzen sowie ein Extrakt von Feigenwurzeln getestet. Bei der Auswertung wurde in jedem Versuchsansatz der chemotaktische Index I_c der Substanzen bestimmt (Gl. 2, siehe 2.7.4).
Da die ausgewählten Substanzen insgesamt eher geringe Effekte erzielten, wurden die Versuche nur dreimal wiederholt. Neben der hohen Divergenz der Einzelwerte ist die geringe Stichprobenanzahl ein Grund für die hohen Standardabweichungen der Mittelwerte. Um die Divergenz der einzelnen Stichproben zu verdeutlichen, wurden diese in ein Diagramm zusammengefasst (Abb. 37). In einem weiteren Diagramm wurden die Mittelwerte der chemotaktischen Indices zusammengefasst, um einen Trend abschätzen zu können (Abb. 38).

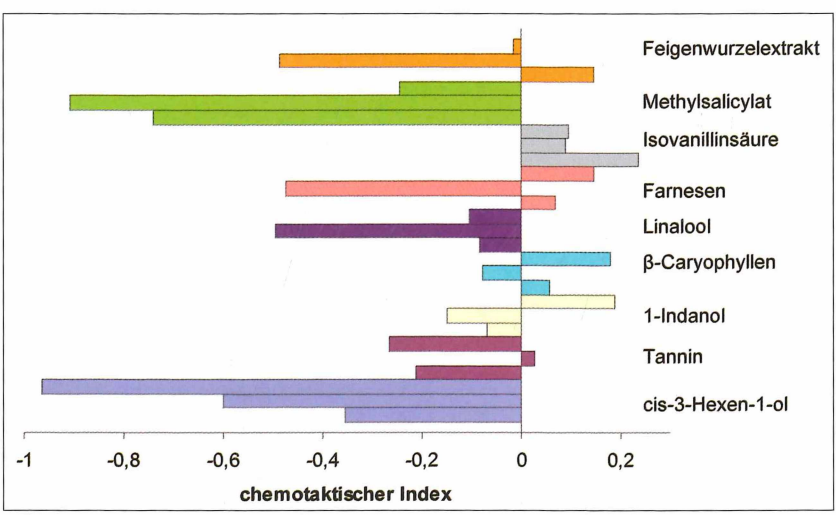


Abb. 37: Chemotaktische Reaktion von *X. index* auf ausgewählte Substanzen. Einzelwerte des chemotaktischen Index der jeweiligen Substanz (Stichprobe 1-3). (Grafik: K. Nickel)

Die ermittelten Werte der chemotaktischen Indices wurden mit den allgemeinen Wirkungsgrenzen von O'Halloran et Burnell (2003) verglichen. Anhand der Einzelergebnisse läßt sich erkennen, daß Methylsalicylat ebenso wie cis-3-Hexen-1-ol, in zwei der drei Stichproben repellent auf *X. index* wirkten (Abb. 37). Dies bestätigte sich in der Auswertung der Mittelwerte (Abb. 38). Die Substanzen Tannin, Farnesen und der Feigenwurzelextrakt werden aufgrund ihrer Mittelwerte als schwach repellent deklariert (Abb. 38). Das Linalool hatte mit –0,23 die Grenze hin zur Klassifizierung als repellent gerade überschritten.
1-Indanol und Farnesen zeigten in ihren Einzelwerten der chemotaktischen Indices keine eindeutige Tendenz (Abb. 37, 38). Der chemotaktische Index von 1-Indanol war nahezu Null. Farnesen wird aufgrund des Mittelwertes des chemotaktischen Index (-0,08) als schwach repellent eingestuft.
Anhand ihrer Mittelwerte gelten Isovanillinsäure und β-Caryophyllen als schwach attraktiv (Abb. 38). Die Mittelwerte des chemotaktischen Index lagen bei 0,14 für Isovanillinsäure und 0,05 für β-Caryophyllen. Keiner der eingesetzten Substanzen konnte eine stärker attraktive Wirkung nachgewiesen werden.

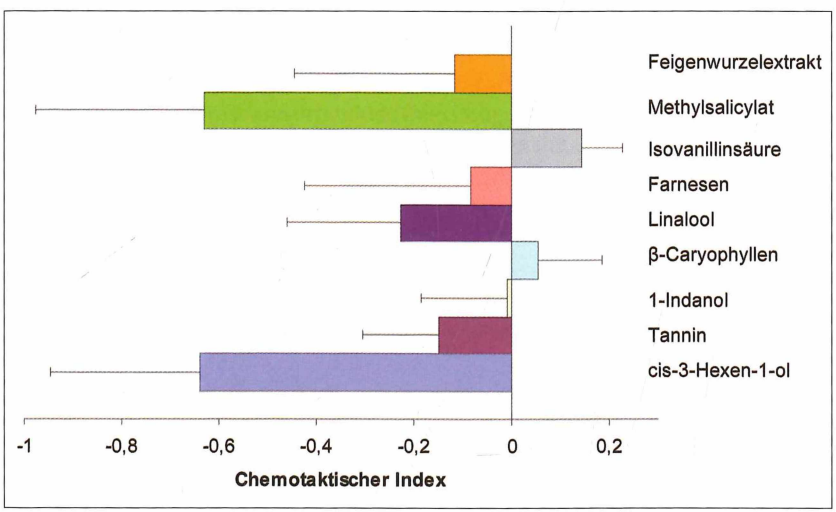


Abb. 38: Chemotaktische Reaktion von *X. index* auf ausgewählte Substanzen. Mittelwerte mit Standardabweichung der jeweiligen Substanz (n = 3). (Grafik: K. Nickel)

3.5 Nachweis des GFLV mittels DAS-ELISA und RT-PCR in verschiedenen Pflanzenteilen

Mittels zwei verschiedener Methoden, DAS-ELISA und RT-PCR, wurde untersucht, in welchen Pflanzenteilen sich das GFLV detektieren läßt. Die Überprüfung des Vorkommens des GFLV erfolgte in den Pflanzenteilen von Wurzel, Stengel, Blatt und Beere.

Mit Hilfe des ELISA-Tests konnte das Virus in allen untersuchten Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Als Kontrollen diente sowohl eindeutig krankes als auch gesundes Testmaterial aus dem Freiburger Sortiment. Bei einer visuellen Überprüfung des DAS-ELISA konnte in den Proben der nicht virösen Kontrollpflanzen keine Gelbfärbung in den wells festgestellt werden. Die Proben der virösen Pflanzenteile zeigten eine deutliche Gelbfärbung. Die Auswertung mit dem Photometer bestätigte das visuelle Ergebnis. Sowohl in den Wurzeln, dem Stängel, den Blättern als auch in den Beeren konnte das GFLV mit Hilfe des DAS-ELISA nachgewiesen werden.

Die Detektion des Virus mit Hilfe der RT-PCR brachte ähnliche Ergebnisse. Während keine der Proben der Kontrollpflanzen das GFLV aufwiesen, konnte eine Expression des Virus in den virösen Pflanzenteilen nachgewiesen werden (Abb. 39, 40). Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung wurden Primer für die 18S-rRNA verwendet. Sowohl in den Proben der Kontrollpflanzen, als auch in den Proben der GFLV-Pflanzen, war die Bande der 18S-rRNA im Bereich von 546 bp zu sehen. Die Kontrollpflanzen wurden ebenfalls auf das GFLV getestet. Hier konnte erwartungsgemäß keine Expression des GFLV detektiert werden (Abb. 39).

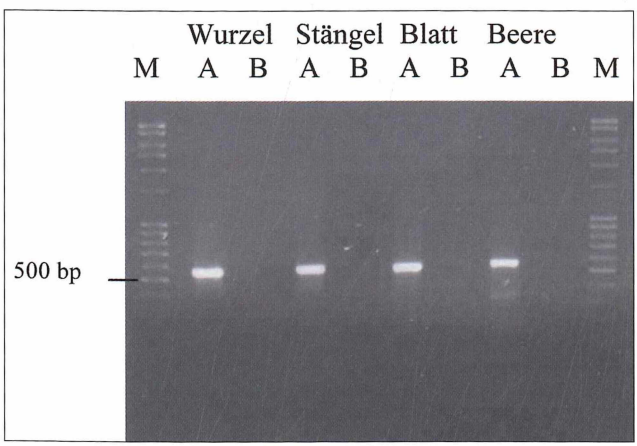


Abb. 39: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Kontrollpflanzen. M = DNA-Leiter, A = 18S-Primer, B = FV-Primer (Foto: K. Nickel)

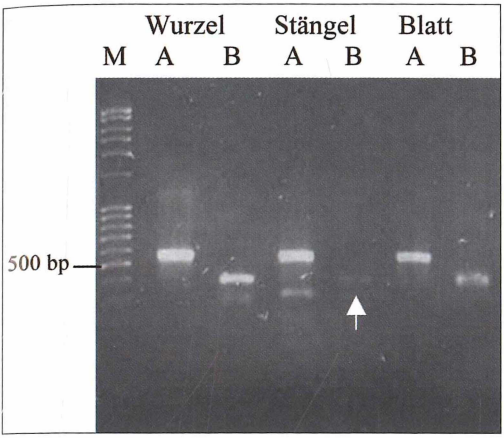


Abb. 40: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der GFLV-infizierten Pflanzen; M = DNA-Leiter, A = 18S-Primer, B = FV-Primer (Pfeil = GFLV in Stengel) (Foto: K. Nickel)

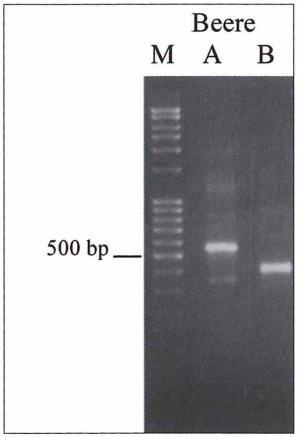


Abb. 41: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der GFLV-infizierten Pflanzen; M = DNA-Leiter, A = 18S-Primer, B = FV-Primer (Foto: K. Nickel)

In den Proben der virösen Pflanzenteile konnte die 18S-rRNA als Kontrolle in jeder Probe nachgewiesen werden. Das coat-Protein des GFLV wurde in allen untersuchten Pflanzenteilen exprimiert (Abb. 40).
Die Bande des Expressionsproduktes des Stengels der GFLV-infizierten Pflanzen ist nur schwach zu sehen (Abb. 40, Pfeil). Da die annealing-Temperaturen der beiden verwendeten Primer große Unterschiede aufweisen (18S-rRNA-Primer 61°C; FV-Primer 55°C), sind teilweise in den Spuren des 18S-rRNA-Primer Doppelbanden zu sehen (Abb. 40; 41).

3.6 Auswertung der visuellen Bonitur und Nachweis des GFLV mittels DAS-ELISA in der ausgewählten Rebanlage

Um das Vorkommen des GFLV im Freiland zu untersuchen, wurde eine ausgewählte Rebfläche in Sasbach einer visuellen Bonitur unterzogen und auffällige Rebstöcke in einem Pflanzplan markiert. Entnommene Blattproben wurden mit dem ELISA auf Infektion mit GFLV getestet.
Die visuelle Bonitur und der ELISA ergaben folgendes Ergebnis (Abb. 42):
Aus Übersichtlichkeitsgründen wurde nur ein charakteristischer Ausschnitt des Pflanzplans übernommen. Aus dem Pflanzplan wird ersichtlich, daß in dieser Fläche viele Pflanzen aufgrund ihres äußeren Erscheinungsbildes als verdäch-

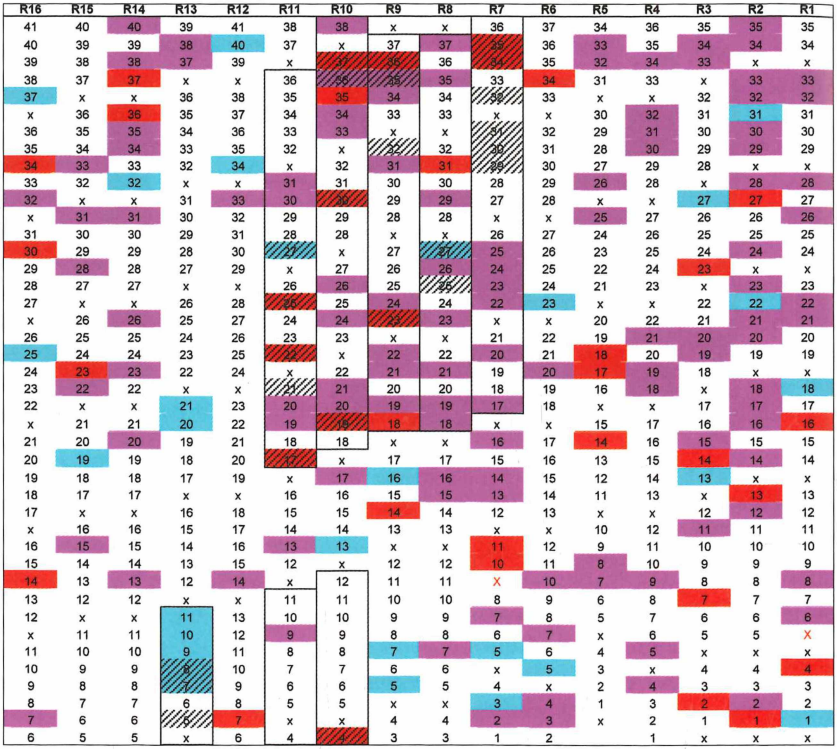


Abb. 42: Pflanzplan mit markierten auffälligen Stöcken. Verdächtige Pflanzen (lila), viröse Pflanzen (rot), potientiell kranke Pflanzen (hellblau), x Stickel, X Fehlstock. Aus den schwarz umrandeten Bereichen wurden die Blattproben für den ELISA entnommen. Die quer gestreiften Felder stellen die Pflanzen dar, die im ELISA positiv getestet worden waren. (Grafik: K. Nickel)

tig bonitiert wurden (Abb. 42). Doch aus den beprobten Bereichen konnte nur zweien der 33 verdächtigen Pflanzen ihre Virösität im ELISA nachgewiesen werden (R 9, 35; R 10, 36). Von den sieben potentiell kranken Pflanzen mit Petersilienblättrigkeit bestätigte sich bei vier Proben die Infektion mit dem GFLV durch einen positiven ELISA-Test (R 8/11, 27; R 13, 7/8).

Doch die Infektion von Pflanzen mit dem GFLV konnte mit Hilfe des ELISA auch detektiert werden, obwohl diese Pflanzen keinerlei äußere Anzeichen aufwiesen, aufgrund derer sie in einer visuellen Bonitur als virös deklariert worden wären (R 7, 29-32; R 9, 32; R 11, 21). Die aufgrund von Panaschüren

auf den Blättern als eindeutig virös eingestuften Rebstöcke, zeigten jedoch nahezu alle im ELISA eine Infektion mit dem GFLV. Hier wurden 12 von 15 Stöcken im ELISA positiv getestet (R 7, 34/35; R 9 23/36; R10 4/19/30/37; R11, 17/22/25; R12, 7). In den entnommenen Bodenproben wurde nach dem Auswaschen kein Individuum von *X. index* gefunden.

3.7 Wirkung von Herbiziden auf die Rebwurzeln und die Saugaktivität von *Xiphinema index*

In diesem Versuch wurde die Wirkung verschiedener Herbizide auf die Wurzeln der Rebstöcke mittels zweier Applikationsvarianten untersucht (siehe Tab. 7). Es sollte beobachtet werden, ob die Wurzeln nach der Herbizidbehandlung immer noch für die Nematoden attraktiv sind. Das Erscheinungsbild der Wurzeln wurde nach der Behandlung mit den Herbiziden dokumentiert (Abb. 43 – 50). Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl die Applikationsvarianten der Herbizide als auch deren Wirkstoffe unterschiedlichen Einfluss auf die Wurzeln der behandelten Rebstöcke hatten.
Die Wurzeln der beiden Kontrollen unterschieden sich in den Applikationsvarianten kaum. In beiden Varianten (Var. A 1, Var. B 1) waren die dünnen Feinwurzeln noch gut erhalten (Abb. 43, 44, Pfeile). Man konnte bei Variante B sogar sehen, daß die Wurzelspitzen hell verfärbt waren, was ein Wachstum der Wurzeln anzeigt. Dieses Wachstum setzte sich fort, wenn die Wurzeln in den Agar eingegossen wurden.

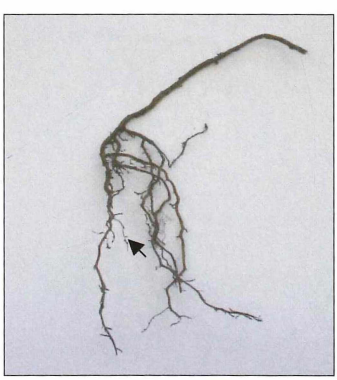


Abb. 43: Rebwurzel der Kontrolle (Var. A 1, Kontrolle, Bohrung; Pfeil = Feinwurzel) (Foto: K. Nickel)

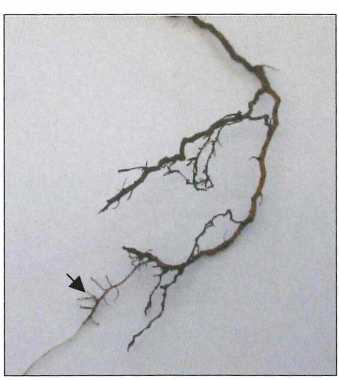


Abb. 44: Rebwurzel der Kontrolle (Var. B 1, Kontrolle abgesägt und bepinselt; Pfeil = Feinwurzel) (Foto: K. Nickel)

Bei der Behandlung mit den Herbiziden sind in den Applikationsvarianten teilweise deutliche Unterschiede zu erkennen.
Wurden die Rebstöcke mit dem Herbizid Basta behandelt, konnte man einen Unterschied in der Wirkung beobachten. Nach der Applikation des Herbizides in ein Bohrloch im Stamm, waren kaum noch Feinwurzeln sichtbar (Abb. 45). Diese feinen Wurzeln des Rebstockes waren größtenteils abgestorben. Es

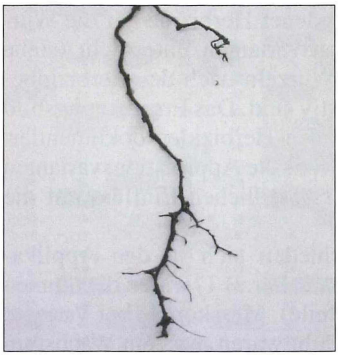


Abb. 45: Mit Basta behandelte Rebe (Var. A2, Basta, Bohrung) (Foto: K. Nickel)

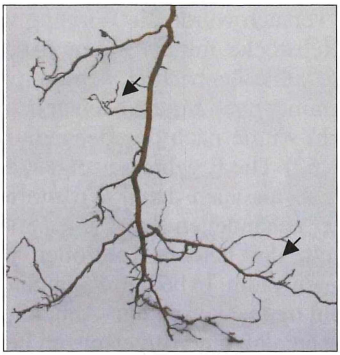


Abb. 46: Mit Basta behandelte Rebe (Var. B2, Basta, abgesägt und bepinselt; Pfeil = Feinwurzel) (Foto: K. Nickel)

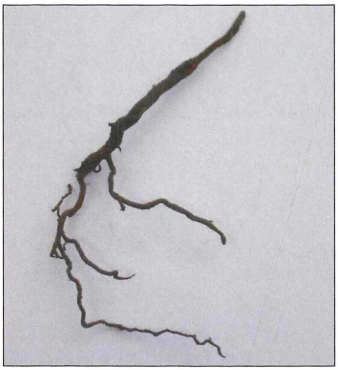


Abb. 47: Mit Glyfos behandelte Rebe (Var. A3, Glyfos, Bohrung) (Foto: K. Nickel)

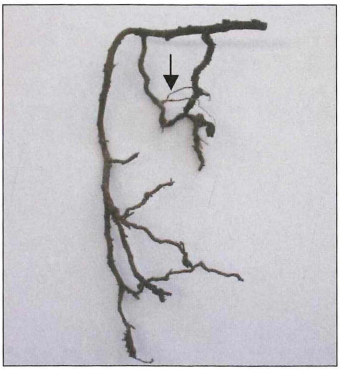


Abb. 48: Mit Glyfos behandelte Rebe (Var. B3, Glyfos, abgesägt und bepinselt, Pfeil = Feinwurzel) (Foto: K. Nickel)

konnte jedoch beobachtet werden, daß die eingegossene Wurzel sowohl neue Seitenwurzeln bildete als auch ein erneutes Längenwachstum einsetzte. Das Herbizid tötete die Wurzeln also nicht vollständig ab.
Wurde Basta hingegen auf den abgesägten Stamm gepinselt, konnte kaum ein Verlust an Feinwurzeln verzeichnet werden (Abb. 46, Pfeil). Hier zeigte sich ebenfalls Wurzelwachstum.
Nach einer Behandlung mit dem Herbizid Glyfos waren die Feinwurzeln in beiden Applikationsvarianten stark beschädigt. An den Wurzeln der Rebe, in die das Herbizid in ein Loch appliziert wurde, konnten keine dünnen Feinwurzeln mehr registriert werden (Abb. 47).
Dennoch konnte ein Wachstum nach dem Einbetten in Agar beobachtet werden. Die mit Glyfos bepinselten Reben wiesen noch vereinzelt Feinwurzeln auf (Abb. 48, Pfeil). Diese nahmen im Agar ebenfalls ihr Wachstum wieder auf.
Eine Behandlung mit dem Herbizid Garlon 4 brachte folgendes Ergebnis:
An den Wurzeln der mit Garlon 4 bepinselten Pflanze waren noch Feinwurzeln zu erkennen (Abb. 50, Pfeil). Doch trotz dieser Behandlung setzten die Wurzeln ihr Wachstum fort, nachdem sie in Agar eingebettet worden waren. Die Applikation des Herbizides Garlon 4 in den Stamm schädigte die Wurzeln sehr. Es konnten keine dünnen Feinwurzeln mehr beobachtet werden (Abb. 49). An keinem der vier behandelten Rebstöcke konnte eine Wiederaufnahme des Wurzelwachstums erfaßt werden.
Um festzustellen, ob die unterschiedlich behandelten Rebwurzeln ihre Attraktivität für *X. index* noch behalten, wurden die eingegossenen Wurzeln mit Nematoden inokuliert.



Abb. 49: Mit Garlon 4 behandelte Rebe (Var. A4, Garlon 4, Bohrung) (Foto: K. Nickel)

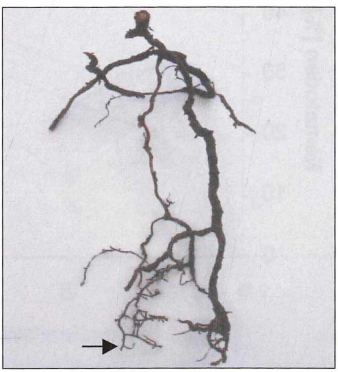


Abb. 50: Mit Garlon 4 behandelte Rebe (Var. B4, Garlon 4, abgesägt und bepinselt, Pfeil = Feinwuzel) (Foto: K. Nickel)

Tab. 9: Beobachtung von Saugtätigkeit an den verschiedenen Applikationsvarianten

Applikationsvariante	Beobachtung von Saugtätigkeit
Kontrolle Bepinselt	ja
Garlon 4 Bepinselt	ja
Glyfos Bepinselt	ja
Basta Bepinselt	ja
Kontrolle Bohrung	ja
Garlon 4 Bohrung	nein
Glyfos Bohrung	ja
Basta Bohrung	ja

Im Laufe des Versuches konnte nach der Herbizidbehandlung Saugtätigkeit von *X. index* beobachtet werden (Tab. 9). Die Nematoden saugten sowohl an den neu gebildeten Wurzeln als auch an den älteren Wurzeln der behandelten Reben. Bei der Behandlung der Rebstöcke mit den Herbiziden Basta und Glyfos konnten bei jeder Variante saugende Nematoden beobachtet werden. Bei der Applikation von Garlon 4 in das Bohrloch im Stamm wurde bei keiner der behandelten Pflanzen Saugtätigkeit registriert. Eine Quantifizierung der Saugereignisse der Nematoden war nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die

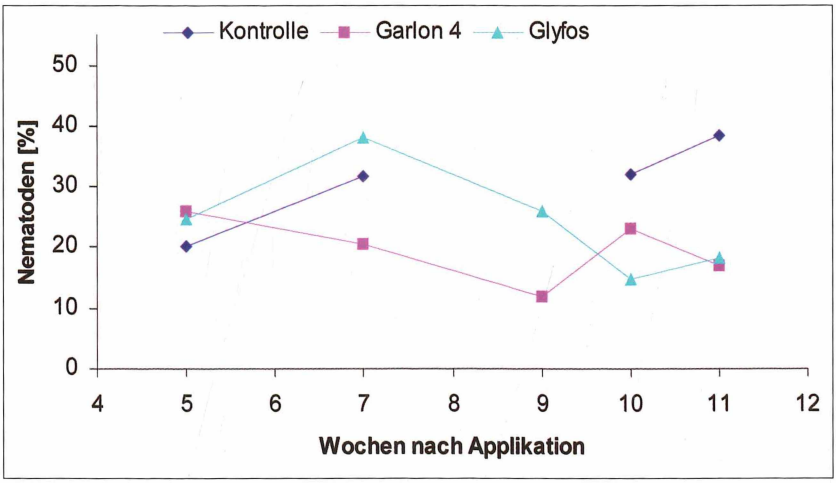


Abb. 51: Anzahl der Nematoden [%] an der Variante „Bepinselt" (Mittelwerte aus 16 Tagen Beobachtungszeitraum). Nach den jeweiligen Wochen wurde je ein Rebstock untersucht. Kontrolle nach 9 Wochen nicht auswertbar. (Grafik: K. Nickel)

prozentuale Anzahl der Nematoden bestimmt, die sich innerhalb des Beobachtungszeitraums von 16 Tagen direkt an der Wurzel befanden. Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt.
Da nach der Behandlung mit Basta kaum ein Unterschied in den Nematodenzahlen an den Wurzeln zwischen den beiden Applikationsvarianten zu sehen war, wurde Basta grafisch nicht ausgewertet. Die Anzahlen der Nematoden, die die Wurzeln nach dieser Behandlung aufsuchten, unterschieden sich kaum von denen der Kontrolle. Sie lagen sogar teilweise über den Werten der Kontrolle. Die Werte der Kontroll-Pflanze, die abgesägt und bepinselt worden war, konnten zum Zeitpunkt nach 9 Wochen nicht bestimmt werden, da die Wurzel aus dem Agar herausgerissen worden war.
Bei den beiden Herbizide Garlon 4 und Glyfos konnten unterschiedliche Anzahlen an Nematoden bei beiden Applikationsvarianten beobachtet werden. Am Herbizid Glyfos zeigten sich weniger Nematoden an der Wurzel, wenn es auf den abgesägten Stamm aufgepinselt worden war (Abb. 51). Das Herbizid Garlon 4 erzielte eine bessere Wirkung, wenn es in ein Bohrloch im Stamm appliziert wurde. Hier wurden weniger Nematoden an den Wurzeln aufgefunden als an der bepinselten Variante. Die prozentualen Anzahlen lagen zu jedem Zeitpunkt deutlich unter 20 % (Abb. 52).
Die prozentuale Anzahl an Nematoden, die die Wurzel aufsuchten, lag nach

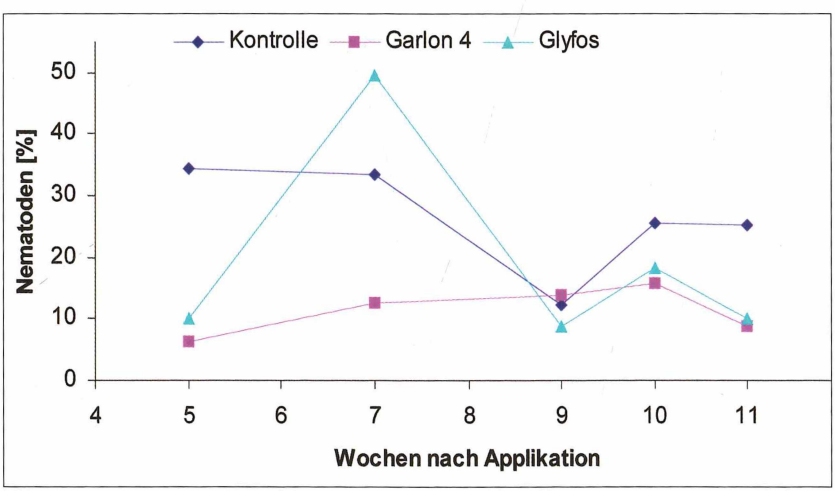


Abb. 52: Anzahl Nematoden [%] an der Variante „Bohrung" (Mittelwerte aus 16 Tagen Beobachtungszeitraum). Nach den jeweiligen Wochen wurde je ein Rebstock untersucht. (Grafik: K. Nickel)

der Garlon 4-Behandlung bei beiden Applikationsvarianten unter den Werten der Kontrolle. Während hingegen die Werte nach der Behandlung mit Glyfos bis zur 9. Woche über den Werten der Kontrolle lagen (Abb. 51; 52).

4 Diskussion

Das bedeutendste Virus im weltweiten Weinbau stellt das GFLV dar, das die Symptome der Reisigkrankheit hervorruft. Bei einem starken Befall mit diesem Virus sind, neben einer Reduzierung der Qualität, Ernteeinbußen von bis zu 80 % möglich (ANDRET-LINK et al., 2004). Dieses Virus, ein Nepovirus (**ne**matode-transmitted viruses with **po**lyhedral particles), wird durch den endoparasitären Nematoden *X. index* übertragen.
Zum momentanen Zeitpunkt kann weder das Virus noch sein Vektor bekämpft werden. Die empfohlene Langzeitbrache von mindestens 5 Jahren nach einer Rodung stellt die einzige Alternative dar. Die bisher erprobten Möglichkeiten zur Anpflanzung von Feindpflanzen von *X. index* oder einer tiefgründigen Bodenbearbeitung blieben bislang ohne den gewünschten Erfolg (BLEYER et FOX, 1995). Da in verschiedenen Untersuchungen vermeintlich resistente Rebunterlagen immer wieder einen Befall mit dem GFLV zeigten (IPACH et KLING, 2002), sollte in der vorliegenden Arbeit präzisere Einblicke in das Auffinden der Rebwurzeln als Nahrungsquelle des Nematoden *X. index* gewonnen werden. In diesem Zusammenhang sollte vorab beobachtet werden, welche Reaktionen sichtbar sind, wenn unterschiedliche Rebpflanzen von *X. index* besaugt werden. Dies wurde in verschiedenen Biotests und Wanderungsversuchen untersucht. Bei der Interpretation der Daten muß berücksichtigt werden, daß es sich um Biotests handelt, deren Schwankungen auf vielerlei Unterschiede im Tiermaterial zurückzuführen sind. So war beispielsweise in den kalten Monaten Januar bis Ende April eine gewisse Trägheit der Nematoden zu beobachten. Dies erklärt unter anderem auch die hohen Standardabweichungen.
In weiteren Versuchen wurden die Ausbreitung des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen und die unterschiedliche Symptomatik des GFLV im Freiland beobachtet.

4.1 Charakterisierung und Bedeutung der Reaktionen von Rebwurzeln auf den Anstich durch *Xiphinema index*

Der phytoparasitäre Nematode *X. index* ernährt sich von den fluiden Bestandteilen der Wurzelzellen seiner Wirtspflanze, indem er mit seinem Odontostilett in die Nähe des Zentralzylinders der Wurzel einsticht. Während des Saugens werden Speichelsekrete aus einer dorsalen sekretorischen Drüsenzelle in die Wurzelzellen injiziert, um feste Zellbestandteile aufzulösen. Wenige Tage nach

diesem Saugvorgang bilden sich an den besaugten Stellen große Gallen. Dieser Vorgang des Saugens und der Gallbildung wurde von WEISCHER et WYSS (1976) an *Vitis vinifera* var. Müller-Thurgau untersucht. Müller-Thurgau wird im Ertragsweinbau jedoch als Edelreissorte verwendet und stellt nicht den wurzelbildenden Teil der Pflanze dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen, die zum Teil bereits als Unterlagen im Weinbau eingesetzt werden, spiegeln die vorherrschenden Reaktionen der Pflanzen im Freiland wieder. An den verwendeten *Vitis*-Pflanzen, die mit *X. index* inokuliert worden waren, konnte ebenfalls eine Saugtätigkeit von *X. index* beobachtet werden. Diese *in-vitro*-Rebpflanzen wiesen nach der Besaugung meist Gallbildung auf. Eine besonders starke Bildung von Gallen konnte an den im Weinbau verwendeten Standardunterlagen 5BB und 125AA beobachtet werden. Es ist bekannt, daß die Standardunterlagen auf einen Anstich durch den Nematoden mit der Bildung von Gallen reagieren. Der Anstich der Nematoden und die resultierende Bildung von Gallen korreliert wohl mit einer allgemeinen Anfälligkeit für das GFLV. Dies bestätigten SOPP et al. (1998) in ihren Untersuchungen. Sie konnten feststellen, daß Unterlagssorten mit *Vitis-riparia*-Erbgut sowohl Wurzelgallen als auch Infektionen mit dem GFLV aufwiesen. Eine potentielle Virusabwehr scheint somit von der Unterbindung des Anstiches der Rebwurzeln oder der Eindämmung des Virus in der Pflanze abzuhängen.

Eine mögliche Eindämmung des Virus könnte über die Bildung von Nekrosen geschehen. Die Bildung von Nekrosen basiert im Allgemeinen auf der Grundlage der Abwehr von eindringenden Pathogenen. Hierbei sterben die Wirtszellen an der Befallsstelle ab und bilden einen Hof von totem Gewebe, den man als Abwehrnekrose bezeichnet (SCHOPFER und BRENNICKE, 2006). Dieses induzierte Absterben der Zellen erfolgt sehr rasch, um den Eindringling an einer Ausbreitung in das angrenzende Gewebe zu hindern. Vor diesem Hintergrund sollte die Testpflanze 141, mit *Vitis-rufotomentosa*-Erbgut, näher untersucht werden, da sie nach einem Anstich durch *X. index* ausschließlich Nekrosen bildete. Hier scheint die Bildung der multinukleären Zellen und damit der Gallen unterbunden zu werden. Diese Pflanzen haben offensichtlich einen Abwehrmechanismus gegen die Induktion von Gallen durch den Nematoden *X. index* entwickelt. Ob die Nekrosen die Pflanze tatsächlich zur Eliminierung der Ausbreitung des GFLV befähigen, muß noch genauer überprüft werden.

In den nekrosebildenden Pflanzen scheint eine potentielle Abwehrreaktion zu erfolgen, da in ihnen die Bildung von Superoxidradikalen nachgewiesen werden konnte. Die Bildung von aktiven Sauerstoffverbindungen, wie das Superoxidradikal O_2^-, das Hydroxylradikal OH^- oder Wasserstoffperoxid H_2O_2, ist allgemein unter dem Begriff „oxidative burst" bekannt. Dieser pathogeninduzierte „oxidative burst" gilt als schnelle induzierte Abwehrreaktion der Pflanzenzelle auf einen Pathogenangriff (SCHOPFER et BRENNICKE, 2006).

Eine weitere induzierte Abwehrreaktion von Pflanzen ist bei Befall mit Pil-

zen zu beobachten. Viele Pflanzen versuchen das Eindringen von Pathogenen zu verhindern, indem die Ablagerung von neuem Zellwandmaterial induziert wird. Hierbei entstehen lokale Wandverdickungen, sogenannte Papillen, die häufig Callose enthalten. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Anilinfärbung untersucht, ob nach Anstich der Wurzelzellen durch den Nematoden *X. index* die Bildung von Callose ausgelöst wird. Die Anilinfärbung der besaugten Stellen der Wurzeln zeigte jedoch weder in den Gallen noch in den Nekrosen eine Einlagerung von Callose.
Für präzisere Aussagen über den Charakter des potentiellen Abwehrmechanismus der nekrosenbildenden Pflanzen sollten molekularbiologische Untersuchungen auf bekannte Abwehrgene oder Resistenzgene erfolgen.

4.2 Wanderungsversuche – Wanderung der Nematoden auf einer Agarplatte bei Angebot einer potentiellen Nahrungsquelle

In der Literatur wird die Hypothese vertreten, daß phytoparasitäre Nematoden die Fähigkeit besitzen, die Wurzeln ihrer Wirtspflanzen über einige Distanzen zu lokalisieren (STEINER, 1925). Es wird postuliert, daß eine gerichtete Hinbewegung der Nematoden in Richtung der Wurzeln aufgrund abgegebener Lockstoffe der Wurzel erfolgt.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst untersucht, wie sich der Nematode auf einer Agarplatte verhält, wenn ihm kein Stimulus angeboten wird. Hier wurden seine Wanderungsbewegungen im zeitlichen Verlauf studiert. Als Ergebnis dieses Versuches konnte gezeigt werden, daß sich *X. index* auf einer Agarplatte ohne einen ihm angebotenen Stimulus gleichmäßig verteilt. Die Nematoden verharrten oder akkumulierten nicht an der Stelle, an der sie aufgesetzt wurden, sondern sie verteilten sich ungerichtet auf der Platte, wenn ihnen kein Stimulus angeboten wurde.
In weiteren Wanderungsversuchen wurde untersucht, ob eine gerichtete Wanderung von *X. index* zu einem ihm angebotenen Stimulus in Form eines Rebsämlings beobachtet werden kann. In den Versuchsansätzen, in denen den Nematoden die Wurzeln eines Rebsämlings zu verschiedenen Alternativen in Form eines ungekeimten Rebsamens oder eines Steines angeboten wurden, suchte eine deutliche Mehrzahl der Nematoden die Wurzeln des Sämlings auf. Die Nematoden suchten auch dann die Stelle eines gekeimten Samens auf, wenn dieser vor Beginn des Versuches entfernt wurde. Das Ergebnis zeigt, daß die Tiere mehrheitlich den Keimungsbereich des entfernten Sämlings aufsuchten, obwohl keine Wurzeln mehr vorhanden waren. Hier scheinen von den Wurzeln des Rebsämlings Stoffe in den Agar abgegeben worden zu sein, die eine Attraktivität auf den Nematoden ausüben. Diese Stoffe veranlassen die Tiere, gezielt diesen leeren Keimungsbereich des Sämlings aufzusuchen. Anhand der Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß der Nematode *X. index*

die Rebwurzeln gezielt aufsucht. Ein ungerichtetes und zufälliges Auffinden der Nahrungsquelle, wie von SCHAAF (2000) postuliert, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.
Interessanterweise suchten die Nematoden den Keimungsbereich eines entfernten Keimlings auch dann auf, wenn ihnen als Alternative ein bewurzelter Sämling dargeboten wurde. Hier wanderten die Tiere anfangs sowohl in den leeren Keimungsbereich, als auch in den Sektor, in dem die Wurzeln des Rebsämlings vorhanden waren. Diese Reaktion konnte vor allem bis 6,5 Stunden beobachtet werden. Erst nach 7 Stunden nahm der Trend hin zum Sämling zu. Dies konnte mit dem Vorzeichen-Trendtest statistisch abgesichert werden. Das anfängliche Gleichgewicht zwischen dem vakanten Bereich des Rebsämlings und dem realen Sämling könnte damit erklärt werden, daß es sich bei den chemotaktischen Stoffen um sehr flüchtige und instabile Substanzen handelt, von denen sich im Agar ein Gradient eingestellt hat. Nach Entfernung des Rebsamens scheint dieser zum Sämling gerichtete Gradient langsam zusammenzubrechen und seine Attraktivität auf den Nematoden zu verlieren. Die Tiere verließen nach einiger Zeit den leeren Keimungsbereich des entfernten Sämlings und wanden sich vermehrt den noch existierenden Wurzeln zu. In diesem Sektor waren vermutlich attraktive Substanzen in höheren Konzentrationen vorhanden. Diese wurden vermutlich von den Wurzeln des Sämlings in den Agar abgegeben und bildeten möglicherweise einen stabilen Gradienten aus.
Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Sämlinge über ihre Wurzeln attraktive Stoffe an ihre Umwelt abgeben, die die Chemotaxis der Nematoden in Richtung der Wurzeln auslösen. Die ermittelten Ergebnisse werden durch die Hypothese von ZHAO et al. (2000) bestätigt. ZHAO et al. (2000) postulieren die Notwendigkeit von Lockstoffen zur Wirtserkennung durch Nematoden, damit die Taxis gezielt in Richtung der Wurzeln erfolgt.
Eine Identifizierung dieser attraktiven Stoffe könnte zum besseren Verständnis des Auffindungsprozeß von Rebwurzeln durch die Nematoden hilfreich sein. So könnten rebsortenspezifische Verbindungen charakterisiert werden, die für das Auftreten von Resistenzen in den Pflanzen verantwortlich sind.

4.3 Wirkung ausgewählter Substanzen auf *Xiphinema index*

In einem Vorversuch wurden spezifische Substanzen auf ihre potentielle chemotaktische Wirkung getestet. Die Substanzen wurden sowohl aufgrund ihrer Wirkung in anderen Biotests, als auch aufgrund ihres Vorkommens in der Weinrebe ausgewählt (RASMANN et al., 2005, TASIN et al., 2005). Es werden hier nur die Stoffe näher betrachtet, deren Wirkung auf die Nematoden besonders auffällig war und deshalb weiterverfolgt werden sollten.
Aufgrund der Tatsache, daß die Feige neben der Rebe die Hauptwirtspflanze

von *X. index* ist, würde man erwarten, daß der verwendete Extrakt aus Feigenwurzeln sehr attraktiv auf die Tiere wirkt. Der Extrakt erzielte aber keinen anlockenden Effekt, sondern schien in einigen Versuchswiederholungen eher eine abstoßende Wirkung zu haben. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß es sich bei den attraktiven Stoffen der Wurzeln um volatile und instabile Substanzen handeln muß. In dem verwendeten Feigenwurzelextrakt sind vermutlich zu viele Komponenten enthalten, die die wesentlichen Substanzen oder Verbindungen überlagern. Die attraktiven Stoffe könnten auch bei der Herstellung des Feigenwurzelextraktes zerstört worden oder verloren gegangen sein und übten so im Biotest keine Attraktivität mehr auf die Tiere aus.
Tannin zeigte auf *X. index* ebenfalls eine abstoßende Wirkung. Tannine, also pflanzliche Polyphenole, sind in vielen Pflanzen verbreitet. Sie können die Pflanzen vor dem Befall durch Pathogene schützen, da diese für die meisten Herbivoren unverdaulich sind (HELDT, 1996). Vor diesem Hintergrund wäre auch die Wirkung des schwach repellent wirkenden Tannins zu erklären. Es ist durchaus möglich, daß der Nematode *X. index* das ihm angebotenen Tannin als unangenehm empfindet und dieses deshalb meidet.
Die Wirkung eines weiteren Pflanzenphenols wurde untersucht, die Phenolcarbonsäure Vanillinsäure. MAURYA et al. (2005) konnten zeigen, daß Vanillinsäure und andere Phenolsäuren in den Wurzeln der Kichererbse (*Cicer arietinum*) vorkommen. Dieses Polyphenol hat allerdings im Gegensatz zu Tannin eine attraktive Wirkung auf den Nematoden *X. index*. Mit Hilfe einer HPLC-Analyse könnte man nun untersuchen, ob und welche Phenolsäuren im Besonderen in den Wurzeln der Weinrebe vorkommen.
Bislang gibt es wenig Literatur, die sich mit den Inhaltsstoffen und der Zusammensetzung von Rebwurzeln beschäftigt. Aus diesem Grund wurde auf die Untersuchungen von TASIN et al. (2005) zurückgegriffen. Diese Arbeitsgruppe isolierte eine Vielzahl von Stoffen aus den verschiedenen oberirdischen Pflanzenteilen der Weinrebe. Aufgrund dieser Untersuchungen wurden verschiedene dieser Stoffklassen ausgewählt und spezifische Substanzen in der vorliegenden Arbeit getestet. Es wurden Linalool, ein Monoterpen, cis-3-Hexen-1-ol, ein Alkohol, beide isoliert aus den grünen Früchten der Weinrebe, und Methylsalicylat, ein Aromat, der in Blättern, Knospen und Blüten enthalten ist, ausgewählt. Bei Linalool konnte eine abstoßende Wirkung auf *X. index* beobachtet werden. In den Biotests zeigten die beiden Stoffe Methylsalicylat und cis-3-Hexen-1-ol eine deutlich abstoßende Wirkung auf den Nematoden *X. index*. Diese Stoffe scheinen entweder nicht in den Wurzeln der Rebe vorzukommen oder von anderen Substanzen so überlagert zu werden, daß sie von *X index* nicht wahrgenommen werden können.
Des Weiteren wurden zwei Substanzen aus der Stoffklasse der Sesquiterpene untersucht, β-Caryophyllen und Farnesen. Farnesen zeigte zwar in den Mittelwerten der Stichproben insgesamt eine abstoßende Wirkung, aber in zwei

von drei Versuchen war es für die Nematoden attraktiv. Nur in einem Versuch war eine abstoßende Wirkung zu verzeichnen. Da das Auswaschen aus dem Erdmaterial und das Sterilwaschen die Vitalität der Nematoden sehr beeinträchtigt, sollten diese Versuche in einer größeren Stichprobenanzahl überprüft werden. Das Sesquiterpen β-Caryophyllen wirkte auf den Nematoden *X. index* in einigen Versuchen attraktiv. Rasmann et al konnten die attraktive Wirkung von Sesquiterpenen bereits bei einem anderen Nematoden, dem Nematoden *Heterorhabditis megidis,* zeigen. Dieser reagiert positiv auf das von Maiswurzeln gebildete β-Caryophyllen. β-Caryophyllen wird von den Maiswurzeln abgegeben, wenn diese von den Larven des Maiswurzelbohrers angefressen werden. In Biotest konnten sie beobachten, daß dieses abgegebene Sesquiterpen den Nematoden *H. megidis* anlockt. Aus diesem Grund sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, ob die Stoffklasse der Sesquiterpene und der Phenolcarbonsäuren tatsächlich auch eine gewisse Attraktivität für den Nematoden *X. index* aufweist. Zusätzlich müßte man überprüfen, ob und welche Sesquiterpene die Rebwurzeln enthalten. Dies wäre ein erster Schritt, die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Rebwurzeln näher zu charakterisieren und Einblicke in die Wirtserkennung von *X. index* zu gewinnen.

4.4 Vorkommen des GFLV in verschiedenen Pflanzenteilen

Beim Saugvorgang des Nematoden *X. index* an den Wurzeln der Rebe überträgt dieser das GFLV (Hewitt et al., 1958). Das Virus breitet sich über Plasmodesmata in der Pflanze aus (Ritzenthaler et al., 1995). Untersuchungen von Staudt zufolge breitet sich das Virus von den Wurzeln über den Stamm bis in die Blätter aus (mündl. Mitteilung). Er konnte zeigen, daß bereits zwei bis vier Wochen nach der Inokulation mit virulenten Nematoden das GFLV in den Wurzeln der Rebe mittels ELISA detektiert werden kann. Die weitere Ausbreitung in der Pflanze scheint in der folgenden Zeit langsamer zu verlaufen. In Langzeituntersuchungen konnte Staudt zeigen, daß nach 20 Monaten die Triebe in einer Höhe von 180 bis 360 cm infiziert waren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzenteile stammen von Pflanzen, die aus Stecklingen von GFLV-infizierten Pflanzen gewonnen worden waren. In diesen Pflanzen konnte das Virus mittels ELISA sowohl in Wurzel, Stengel, Blättern, als auch in Beeren nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mit Hilfe der RT-PCR brachten die gleichen Ergebnisse. Man kann also sowohl die RT-PCR, als auch den DAS-ELISA nutzen, um das GFLV in den verschiedenen Pflanzenteilen nachzuweisen.
Der Vorteil der RT-PCR ist der Einsatz von geringen Mengen an Pflanzmaterial. Mit dieser Methode kann man bereits kleine Sämlinge von Testpflanzen, die mit virulenten *X. index* infiziert worden sind, auf die erfolgreiche Transmission des Virus testen. Man kann sehr geringe Mengen von Wurzeln und

Blättern verarbeiten, um zu untersuchen, ob das Virus auf die Pflanze übertragen wurde und inwieweit es sich bereits ausgebreitet hat. Hier muß man nur geringe Mengen an Pflanzenmaterial entnehmen und kann den Verlauf der Infektion verfolgen, ohne die Pflanze gleich völlig zu zerstören. So kann man innerhalb kürzester Zeit und mit wenig Materialaufwand eine Aussage über die potentielle Resistenz der Pflanze gegen das GFLV machen.

4.5 Symptomausprägung und Verbreitung des GFLV in einer infizierten Rebanlage

Eine direkte Bekämpfung des GFLV im Freiland ist zurzeit noch nicht möglich (HÖBAUS et NIEDER, 1992). Als indirekte Maßnahmen in der Bekämpfung des GFLV gelten sorgfältige Kontrollen von Vermehrungsbeständen und der Ausschluss von virusinfiziertem Pflanzgut von der Vermehrung. Die ist in der Pflanzgutverordnung seit 01.04.2002 auch gesetzlich festgelegt. Auf dieser Grundlage müssen die Mutterrebenbestände, aus denen das Basispflanzgut zur Vermehrung gewonnen wird, auf Viren getestet sein.
Das GFLV, das wie bereits erwähnt, eine vielseitige Symptomatik zeigt, kann an den meisten infizierten Rebstöcken nur in Einzelfällen eindeutig identifiziert werden. Dies liegt unter anderem daran, daß das Virus auch lange Zeit latent in der Pflanze vorkommt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, anhand welcher Symptome sich am ehesten eine Infektion mit dem GFLV abschätzen läßt. Aufgrund des Vergleiches der visuellen Bonitur mit dem Virusnachweis über ELISA läßt sich feststellen, daß die visuelle Bonitur nicht alleine ausreicht, um präzise Prognosen über die Verbreitung des GFLV in einer Rebfläche zu treffen. Die Ergebnisse bestätigen aber, daß das beobachtete Symptom der Panaschüre als ein eindeutiges Anzeichen für das GFLV angesehen werden kann. Das Symptom der so genannten Petersilienblättrigkeit, also die scharfe untypische Zahnung des Blattrandes, kann ebenfalls als Hinweis auf eine Erkrankung mit dem GFLV dienen. Dieses Symptom muß aber als weniger eindeutig eingestuft werden, als die auf den Blättern sichtbare Panaschüre. Die in diesen Fällen beobachtete scharfe Zahnung des Blattrandes scheint also auf eine weitere Erkrankung des Stockes hinzuweisen.Um präzisere Aussagen über den Zusammenhang zwischen visueller Bonitur und tatsächliche Erkrankung machen zu können, wären erneute Bonituren dieser Fläche in den Folgejahren erforderlich.
Anhand der in 3.6 dargestellten Ergebnisse für die untersuchte Rebfläche ist ersichtlich, daß die erkrankten Stöcke nicht herdförmig auftreten, wie man es bei einer Virusausbreitung durch Nematoden erwarten würde. Die virösen Rebstöcke treten zufällig verteilt auf der gesamten Fläche auf, was zu der Annahme führt, daß das GFLV in dieser Fläche aus verseuchtem Rebpflanzgut stammt. Die Tatsache, daß der Weinberg vor der Änderung der Rebpflanzgutverordnung vom 01.04.2002 angepflanzt wurde, bekräftigt diese Vermutung.

4.6 Möglichkeiten der Bekämpfung viröser Rebstöcke mit der Anwendung von Herbiziden

Besitzt ein Winzer eine mit dem GFLV infizierte Fläche, so bleibt ihm als einzige Maßnahme die Rodung der erkrankten Stöcke. Hierbei ist besonders darauf zu achten, daß infiziertes Holz und Wurzeln des Altbestandes sorgfältig entfernt werden. Dies gestaltet sich in der Praxis allerdings recht schwierig.
Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, die Wurzeln von infizierten Rebstöcken mit der Anwendung eines Herbizides zu vernichten und für den Nematoden *X. index* unattraktiv zu machen. Die Applikation von Herbiziden auf viröse Rebstöcke wurde auch schon vereinzelt im Freiland praktiziert.
Aufgrund der in 3.7 dargestellten Ergebnisse, sollte jedoch auf die Ausbringung eines Herbizides im Freiland verzichtet werden, da der erhoffte Erfolg sich bereits im Gewächshaus, zumindest in der zur Verfügung stehenden Zeit, nicht bestätigen ließ. Im Freiland muß davon ausgegangen werden, daß die Wurzeln des Rebstockes wesentlich tiefer in die Erde reichen, als man das im Gewächshaus simulieren konnte. Doch bereits die nur wenige cm in die Erde reichenden Wurzeln blieben durch die Applikation des Herbizides in der Lage, neue Seitenwurzeln zu bilden. Es bleibt noch zu klären, ob und für wie lange die Wurzeln im Anschluss an den Versuch ihr Wachstum fortsetzen. Hierzu wurden sie erneut eingetopft und sollen nun in einem weiteren Projekt beobachtet werden.
Innerhalb der beiden Applikationsvarianten der Herbizide auf die Rebstöcke waren teilweise unterschiedliche Schädigungen der Wurzeln zu beobachten. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß die freie Applikation der Herbizide auf den abgesägten Stamm in jedem Fall keine geeignete Möglichkeit darstellt. Die Applikation in ein Bohrloch im Stamm wäre vorzuziehen, da hier das Loch wieder verschlossen werden und das Herbizid so nicht entweichen kann. Das auf den abgesägten Stamm aufgebrachte Herbizid verdampft sehr schnell und es kann zu Herbizidschäden an benachbarten Pflanzen führen, was auch bei den Versuchen beobachtet werden konnte. Aufgrund der hohen Abtrift der Herbiziddämpfe und der hohen Toxizität dieser Substanzen sollten diese nicht für eine solche Anwendung genutzt werden.
Die Ergebnisse zeigen, daß eine Anwendung der Herbizide im Frühjahr kurz nach dem Austrieb in der Wachstumsphase nicht den gewünschten Erfolg der Wurzeleliminierung erbrachte. Da gegen Ende der Vegetationsperiode die Stoffflüsse in der Pflanze verändert sind, könnte dieser Zeitpunkt eine verbesserte Wirkung der Herbizide mit sich bringen. In einem weiterführenden Projekt sollte daher die Veränderung des Applikationszeitpunktes im Herbst untersucht werden.
Neben dem andauernden Wachstum der Wurzeln nach der Applikation der Herbizide wurde außerdem beobachtet, daß die Saugtätigkeit der Nematoden

nur bei einem von drei Herbiziden unterbunden war. Bei der Applikation von Garlon 4 in ein Bohrloch im Stamm wurde keine Saugtätigkeit an den Wurzeln registriert. Allerdings ist die Beobachtung oder gar eine Quantifizierung der Saugereignisse der Nematoden sehr schwierig. Die Nematoden stellten ihre Saugtätigkeit ein, sobald die Proben unter dem Mikroskop betrachtet und belichtet wurden. Oftmals wurde auch das Stilett sofort aus den Zellen herausgezogen. Aus diesem Grund war dann keine Kontraktion des Bulbus, die ein Saugen anzeigt, zu beobachten. Die Ergebnisse sollten daher in weiteren Versuchen überprüft und verfestigt werden. Aufgrund der Tatsache, daß schon ein einziges Saugereignis eines Nematoden von 5-15 min ausreicht, um den Virus an virösem Pflanzenmaterial aufzunehmen (Das et Raski, 1968), wird die Entfernung von infizierten Wurzeln durch die Applikation von Herbiziden in Frage gestellt. Bei der Herbizidbehandlung kann nicht ausgeschlossen werden, daß viröse Wurzeln überleben, an denen sich die Nematoden infizieren können.

Neuesten Untersuchungen von Demangeat et al. (2005) zufolge, kann *X. index* in einem Weinberg mindestens 4 Jahre ohne potentielle Nahrungsquelle im Boden überleben. Außerdem konnten sie zeigen, daß adulte und juvenile Tiere im letzten Larvenstadium (J 4) selbst nach 4 Jahre noch virös waren und das GFLV übertragen können. Aus diesen Gründen kann bei einer vorherrschenden Nematodenpopulation in einer mit GFLV befallenen Rebfläche auf die empfohlene Langzeitbrache von mindestens 5 Jahren nach der Rodung nicht verzichtet werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muß zum momentanen Zeitpunkt von der Herbizidapplikation zur Abtötung viröser Rebstöcke im Freiland vor der Rodung der Pflanzen abgeraten werden. Die Risiken für Umwelt und Anwender übersteigen deutlich den effektiven Nutzen. Im Moment gibt es also außer Langzeitbrache kein geeignetes Mittel den Virus und seinen Vektor zu bekämpfen. Da die ausgedehnte Langzeitbrache aus ökonomischen Gründen kaum durchführbar ist und somit keine zufrieden stellende Alternative zu den verbotenen Nematiziden darstellt, müssen neue Strategien zur Bekämpfung des GFLV und seines Vektors *X. index* gefunden werden. Die Zukunft liegt hier in der Entwicklung oder Züchtung von resistenten Pflanzen gegen das Virus und seinen Vektor.

5 Literatur

Andret-Link, P.; (2004):
Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. –
J. Plant Pathol. **86**: 183 - 195.

ADAM, A.; et al. (1989):
Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: Deterioration of membrane lipids. Physiol. Mol. Plant Pathol. **34:** 13 - 26

AUMANN, J. (1997):
Monoxenic culture of *Xiphinema index* (Nematoda: Longidoridae) on *Ficus carica*. – Nematol. medit. **25**: 209 - 211.

BACK, M. A.; HAYDOCK, P. P. J.; JENKINSON, P. (2002):
Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. – Plant Pathology **51**: 683 - 697.

BARGMANN, C. I.; HORVITZ, H. R. (1991):
Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. – Neuron **7**: 729 - 742.

BLEYER, G.; FOX, R. (1995):
Auswirkungen von unterschiedlichen Rigoltiefen und Brachenutzungen auf die Populationsdichte des Nematoden *Xiphinema index*. – Deutsches Weinbau-Jahrbuch **46**: 101 - 107.

BRENDEL, G. (1988):
Einsatz der *in-vitro*-Kultur bei *Vitis* zur Erzeugung von virusfreiem Pflanzgut. – (Dissertation, Univ. Hohenheim).

BROWN, D. J. F.; COIRO, M. I. (1985):
The reproductive capacity and longevity of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) from three populations on selected host plants. – Revue Nématol. **8**: 171 - 173.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. (1977):
Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. – J. Gen. Virol. **34**: 475 - 483.

COOMANS, A. (1996):
Phylogeny of the Longidoridae. – Russ J. Nematol. **4**: 51 - 59.

COIRO, M.; et al. (1990):
Resistance of grapevine rootstocks to *Xiphinema index*. – Nematol. medit. **18**: 119 - 121.

DAS, S.; RASKI, D. J. (1968):
Vector-efficiency of *Xiphinema index* in the transmission of Grapevine Fanleaf Virus. – Nematologica **14**: 55 - 62.

DEMANGEAT, G.; et al. (2005):
Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of *Grapevine fanleaf virus* over extended time in the absence of host plants. – Phytopathology **95**: 1151 - 1156.

FLEGG, J. J. M. (1967):
Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. – Ann. Appl. Biol. **60**: 429 - 437.

HELDT, H. W. (1996):
Pflanzenbiochemie. – Heidelberg; Berlin.

HEWITT, W. B.; RASKI, D. J.; GOHEEN, A. C. (1958):
Nematode vector of soil-borne virus of grapevines. – Phytopathology **48**: 586 - 595.

HILLEBRAND, W.; LOTT, H.; PFAFF, F. (1998):
Taschenbuch der Rebsorten. (12. Auflage). – Mainz.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. L. (1938):
The water-culture method for growing plants without soil. – Univ. Calif., Coll. Agri., Agri. Exp. Station, Berkely, Calif., Circular **347**: 39 ff.

HÖBAUS, E.; NIEDER, G. (1992):
Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge im Weinbau. (2. Auflage). – Wien (A).

HÜCKELHOVEN, R.; KOGEL, K. H. (1998):
Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and suscsptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). – Mol. Plant-Microbe Interact. **11**: 292 - 300.

IPACH, U.; KLING, L. (2002):
Anfälligkeit von *Cinerea*-Kreuzungen gegenüber dem Grapevine Fanleaf Virus. – Deutsches Weinbau-Jahrbuch **53**: 191 - 196.

KNOP, W. (1860):
Über die Ernährung der Pflanzen durch wässerige Lösungen unter Ausschluss des Bodens. – Landwirtsch. Versuchsstat. **2**: 65 - 99, 270 - 293.

MAURYA, S.; et al. (2005):
Secondary metabolites of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in pathogenesis after infection by *Sclerotium rolfsii*. – J. Plant Disease and Protection **112**: 118 - 123.

MOHR, H. D. (2005):
Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. – Stuttgart.

O'HALLORAN, D. M.; BURNELL, A. M. (2003):
An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. – Parasitology **127**: 375 - 385.

PROT, J. C. (1980):
Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. – Revue Nématol. **3**: 305 - 318.

RASKI, D.J.; MAGGENTI, A. R.; JONES, N. O. (1973):
Location of Grapevine Fanleaf and Yellow Mosaic virus particles in *Xiphinema index*. – J. Nematol. **5**: 208 - 211.

RASKI, D. J.; et al. (1983):
Strategies against Grapevine Fanleaf virus and its nematode vector. – Plant Dis. **67**: 335 - 339.

RASMANN, S.; et al. (2005):
Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. – Nature **434**: 732 - 737.

RITZENTHALER, C.; et al. (1995):
Grapevine Fanleaf Nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules *in vivo*. – Mol. Plant-Microbe Interact. **8**: 379 - 387.

RITZENTHALER, C.; et al. (2002):
Grapevine Fanleaf Virus replication occurs on endoplasmatic reticulum-derived membranes. – J. Virol. **76**: 8808 - 8819.

RÜDEL, M. (1985):
Grapevine damage induced by particular virus-vector combinations. – Phytopath. medit. **24**: 183 - 185.

RÜDEL, M. (1987):
Bekämpfung von Rebvirosen: notwendig und durchführbar? – Rebe und Wein **40**: 344 - 346.

SACHS, L. (1984):
Angewandte Statistik. (6. Auflage). – Berlin.

SCHAAF, C. (2000):
Untersuchungen zur Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen und Feindpflanzen auf die phytoparasitären Nematoden *Xiphinema index* THORNE & ALLEN 1950 und *Meloidogyne incognita* (KOFOID & WHITE 1919) CHITWOOD 1949. – Stuttg.

SCHOPFER, P.; BRENNICKE, A. (2006):
Pflanzenphysiologie. (6. Auflage). – Heidelberg; Berlin.

SOPP, E.; RÜHL, E. H.; HOLST, H. (1998):
Resistance of rootstocks to the virus transmitting nematode *Xiphinema index*. – Viticult. Enol. Sci. **53**: 3 - 6.

STAUDT, G.; WEISCHER, B. (1992):
Resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index* in *Vitis rotundifolia* and *Vitis munsoniana*. – Vitic. Enol. Sci. **47**: 56 - 61.

STEINER, G. (1925):
The problem of host selection and host specialization of certain plant-infesting nemas and its application in the study of nemic pests. – Phytopathology **15**: 499 - 534.

TASIN, M.; et al. (2005):
Antennal and behavioural responses of grapevine moth *Lobesia botrana* females to volantiles from grapevine. – J. Chem. Ecol. **31**: 77 - 87.

TAYLOR, C. E.; BROWN, D. J. F. (1997):
Nematode vectors of plant viruses. – Cambridge (GB).

TAYLOR, C. E.; RASKI, D. J. (1964):
On the transmission of grape fanleaf by *Xiphinema index*. – Nematologica **10**: 489 - 495.

THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J. W. (2002):
Improved method for purification of RNA from stem tissue of grapevine and its use in mRNA profiling. – Am. J. Enol. Vitic. **53**: 231 - 234.

THORNE, G.; ALLEN, M. W. (1950):
Paratylenchus hamatus n. sp. and *Xiphinema index* n. sp. two new nematodes associated with fig roots, with a note on *Paratylenchus anceps* COBB. – Proceedings of the helminthological Society of Washington **17**: 27 - 35.

TRUJILLO, M.; KOGEL, K. H.; HÜCKELHOVEN, R. (2004):
Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. – Mol. Plant-Microbe Interact. **17**: 304 - 312.

UNGER, S. (2001):
Untersuchungen zur Wirt-Parasit-Wechselwirkung zwischen dem Erreger des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) und verschiedenen Vitaceen. – (Unveröff. Dipl.-Arbeit, Univ. Freiburg).

VOGT, E.; SCHRUFT, G. (2000):
Weinbau. (8. Auflage). – Stuttgart.

WEISCHER, B.; WYSS, U. (1976):
Feeding behaviour and pathogenicity of *Xiphinema index* on Grapevine roots. – Nematologica **22**: 319 - 325.

WYSS, U. (1978):
Root and cell response to feeding by *Xiphinema index*. – Nematologica **24**: 159 - 166.

WYSS, U. (1999):
Maintenance of human, animal, and plant pathogen vectors. – Enfied (USA).

WYSS, U.; LEHMANN, H.; JANK-LADWIG, R. (1980):
Ultrastructure of modified root-tip cells in *Ficus carica*, induced by the ectoparasitic nematode *Xiphinema index*. – J. Cell Sci. **41**: 193 - 208.

WYSS, U.; ROBERTSON, W. M.; TRUDGILL, D. L. (1988):
Oesophageal bulb function of *Xiphinema index* and associated root cell responses, assessed by video-enhanced contrast light microscopy. – Revue Nématol. **11**: 253 -261.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, M. C. (2000):
Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behaviour. – Phytopathology **90**: 1239 - 1245.

Anschrift der Verfasserin:
Dipl.-Biol. Karolin Nickel
Langgasse 44
D-97334 Nordheim am Main