047-Koch, E.[1]; Kleespies, R.[1]; Enders, M.[1]; Ullrich, C.I.[2]
[1] Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz
[2] Technische Universität Darmstadt

**Histologische Untersuchungen zur Infektion und Ausbreitung des Schwarzfäuleerregers (*Guignardia bidwellii*) bei Reben**

Histological studies on the infection and development of the black rot pathogen (*Guignardia bidwelli*) in grape leaves

Seit 2002/2003 tritt die durch den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* [anamorph: *Phyllosticta ampelicida*] hervorgerufene Schwarzfäule regelmäßig in ökologisch bewirtschafteten Weinbergen an Mosel, Nahe und im Mittelrheintal auf. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Infektion und Ausbreitung des Pilzes in anfälligen Rebenblättern zu untersuchen. Dazu wurden ca. 7 Wochen alte Topfreben (ca. 40 cm hoch) der Sorte „Riesling“ mit Pyknidiosporen oder Ascosporen des Pilzes inokuliert, und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation wurden Proben für die Licht- und Elektronenmikroskopie genommen. Da bekannt ist, dass die Anfälligkeit mit zunehmendem Blattalter abnimmt, erfolgte die Probenahme unter Beachtung der Blattposition. Die typischen Krankheitssymptome, Nekrosen mit Pyknidien, traten ca. 2 Wochen nach der Inokulation auf. Der stärkste Befall war auf den jungen Blättern (Position 2 und 3) zu verzeichnen. Die ganz jungen Blätter (Position 1; zum Zeitpunkt der Inokulation kaum entfaltet) sowie die Blätter ab Position 5 (altersresistent) blieben nahezu befallsfrei. Unterschiede des Infektionsvorgangs bei Ascosporen und Pyknosporen wurden nicht beobachtet. Zwei Tage nach der Inokulation waren die Sporen mit Keimschläuchen ausgekeimt, an deren Spitze sich Appressorien gebildet hatten. Die Appressorien wurden bevorzugt über den antiklinalen Wänden der Epidermiszellen gebildet. Sowohl bei der Keimung wie auch bei der Appressorienbildung wurde kein deutlicher Einfluss des Blattalters beobachtet. Aus den Appressorien gingen ein bis zwei Infektionshyphen hervor, die die Kutikula durchdrangen, zwischen Kutikula und epidermalen Zellwänden weiter wuchsen, sich verzweigten, anastomisierten und ein dichtes Netz subkutikulärer Hyphen ausbildeten. Dabei war das Wachstum strikt auf die Bereiche über den antiklinalen Wänden der Epidermiszellen begrenzt. Nach Inokulation der Blattoberseite und der Blattunterseite waren der Infektionsprozess und die Ausbreitung des Pilzes gleich. Appressorien und subkutikuläre Hyphen wurden auch in Semidünnschnitten (Lichtmikroskopie) und Ultradünnschnitten (Elektronenmikroskopie) beobachtet. In den Epidermiszellen ließen sich entlang der Zellwände im Bereich der subkutikulären Hyphen im Elektronenmikroskop paramurale Körper mit zahlreichen Vesikeln nachweisen. Diese Vesikelakkumulation ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Pflanze die Gegenwart des Pilzes erkannt hatte. Subkutikuläre Hyphennetze entwickelten sich in der beschriebenen Weise nur in jungen Blättern. In voll entfalteten, altersresistenten Blättern verzweigte sich der Pilz nach dem Durchwachsen der Kutikula nur wenig und stellte schnell sein Wachstum ein. In einigen Proben aus Blättern mittleren Alters waren gut ausgebildete Hyphennetze vorhanden, während andere die für die Altersresistenz typischen kleinen Pilzkolonien enthielten. Es ist bekannt, dass die Blattgewebe vieler dikotyler Pflanzen im Bereich des Blattgrundes physiologisch älter sind als die im Bereich der Blattmitte und Blattspitze. Die beobachtete Variabilität des Pilzwachstums in den verschiedenen Proben könnte auf dieses unterschiedliche physiologische Alter zurückzuführen sein.Von den für die Mikroskopie der Ganzpräparate verwendeten Farbstoffen und Färbeverfahren ist für die Untersuchung der Infektionsstrukturen auf der Blattoberfläche aufgrund der Schnelligkeit der Methode insbesondere die Fluoreszensmikroskopie mit Calcofluor und Blankophor zu empfehlen. Für die Mikroskopie der subkutikulären Hyphen erwies sich die Fluoreszensmikroskopie nach Anfärbung mit Anilin-Blau als am besten geeignet. Hierbei zeigten die Hyphen eine starke gelbe Fluoreszenz, die gut mit dem Blattgewebe kontrastierte. Gute Ergebnisse wurden auch mit der Durchlichtmikroskopie nach Anfärbung der Totalpräparate mit Trypan-Blau erzielt.