

Perforationen in der Cuticula von Weinbeeren als morphologischer Faktor der Botrytisresistenz

von

R. BLAICH, U. STEIN und R. WIND

Perforations in the cuticle of grape berries as a morphological factor of resistance to *Botrytis*

S u m m a r y . — Perforations in the cuticle of intact grape berries could be demonstrated indirectly by staining with an aqueous solution of fluoresceine, followed by a thorough rinsing in water and observation in UV light. Perforations, where the stain was able to penetrate and therefore could not be removed by rinsing, showed up as small spots of fluorescence of the berry skin.

It was generally not possible to detect perforations by light microscopy. After removing of the wax layer they could, however, be demonstrated by scanning electron microscopy (SEM). They appeared as roundish holes with smooth margins and a diameter of 0.5—2 μm .

A total of 25 grape varieties were investigated, including diploid and tetraploid forms of the same variety. The number of holes was increasing during maturation of the grapes, their relative number was, however, specific for the variety, those with a high susceptibility to *Botrytis* exhibiting more perforations than resistant ones. All diploids were more resistant and also had much less perforations than the corresponding tetraploids.

A lack or a small number of perforations in the cuticle is therefore considered to be a prerequisite for fungus resistance of grape berries in most cases.

SEM images did not indicate enzymatical attack of the cuticle by *Botrytis*. In one case, where the edge of the cuticle was digested by unknown microorganisms, a spongy skeleton was left back, whereas the cuticular structure of berries infected with *Botrytis* never showed any differences to those of healthy ones.

Einleitung

Die mechanisch-physikalischen Eigenschaften der Beerenhaut wurden schon oft als Faktoren der Resistenz bzw. Anfälligkeit von Weinbeeren gegenüber Pilzbefall in Betracht gezogen (z. B. BERNARD 1976, 1977, COPPOLA 1978, BERNARD und DALLAS 1979, ALLEWELDT *et al.* 1981, CONSIDINE 1981). So wird die unterschiedliche Benetzbarkeit der Oberfläche auf den verschiedenartigen Aufbau der Cutin- bzw. Wachsschicht zurückgeführt (Literatur bei CHAMBERS und POSSINGHAM 1963, RADLER 1965, GÄRTEL 1970); andere Autoren sehen in einer mit zunehmender Reife anwachsenden Permeabilität der Beerenhaut für verschiedenartige Inhaltsstoffe (vor allem Zucker und Aminosäuren) die Ursache der gleichzeitig ansteigenden Botrytisanfälligkeit (NELSON 1951, 1956, KOSUGE und HEWITT 1964), wobei die austretenden Substanzen als Nährsubstrate den Pilsporen die Keimung erleichtern bzw. erst ermöglichen würden. Ein Nachweis der Permeabilitätserhöhung wurde allerdings nicht erbracht, sieht man von offensichtlich mechanisch verursachten Rissen und Brüchen der Cuticula ab (STALDER 1954, BESSIS 1972, SWIFT *et al.* 1974, CONSIDINE 1982).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Weinbeeren tatsächlich submikroskopische Perforationen der Cuticula aufweisen können, daß deren Anzahl von der Rebsorte und dem Reifegrad der Beeren abhängt und in enger Beziehung zu ihrer Botrytisanfälligkeit steht.

Material und Methoden

a) Indirekter Nachweis von Perforationen

Färbung: 1,5–3 kg Beeren unterschiedlicher Reifeklassen wurden mit der Methode von STEIN *et al.* (1983) nach ihrem Mostgewicht sortiert, in einer 2,5%igen wäßrigen Lösung von Fluoreszeinnatrium (0,01 % Tween 20 als Netzmittel) 20 min gefärbt, danach mehrfach mit Wasser gespült, getrocknet und unter der UV-Lampe bei 365 nm untersucht.

Fotografien wurden auf Kodachrome 64 Diapositivfilm aufgenommen. Als Belichtungsrichtwerte können 15 min bei Blende 5,6 gelten (Abbildungsmaßstab 1 : 1).

b) Bestimmung der Botrytis anfälligkeit

Inokulation von Traubenbeeren im Labor: Konidien aus Petrischalen mit 10–12 d altem *Botrytis*-Myzel wurden in eine mit Wasser bzw. Bio-malz-Pepton-Lösung (1- bzw. 0,25%ig) gefüllte Schale abgeklopft, die Suspension mit einem Tropfen Tween 20 geschüttelt, Hyphenstücke durch Filtrieren über eine dünne Lage Glaswolle entfernt, die Sporendichte nach Auszählen in einer Zählkammer nach BÜRKER auf $0,5 \times 10^6$ Sporen/ml eingestellt und die Suspension mit einer Handspritze auf die Beeren aufgebracht.

Bonitur des Botrytisbefalls im Freiland: Die Befallsstärke wurde nach dem ungefähren Prozentsatz befallener Beeren je Traube in Klassen zwischen 0 (kein) und 9 (über 90 %) eingeteilt. Dafür wurden je Sorte mindestens 40, nach Möglichkeit 100–200 Trauben ausgewertet.

c) Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Präparation: Aus frischen bzw. wie oben gefärbten Beeren wurden quadratische Hautstücke von etwa 7 mm Seitenlänge ausgeschnitten und in einer Lösung von 2 % Glutaraldehyd in Wasser mindestens 12 h fixiert. Danach wurden die Stücke in feuchtem Zustand an einem auf -60°C vorgekühlten Peltierelement angefroren, in einer Hochvakuumapparatur (Vor- und Öldiffusionspumpe) bei bis zu 10^{-5} Torr getrocknet und mittels selbstklebendem Kupferband auf Aluminiumobjektträger aufgezogen. Bei der Hälfte der Präparate wurde nach der Trocknung das Oberflächenwachs durch Behandlung mit heißem Chloroform oder — schonender — durch Aethylazetat entfernt. Vorversuche mit unterschiedlich langem Einwirken heißen Aethylazets auf die Beerenoberfläche zeigten, daß keine rastermikroskopisch sichtbaren Veränderungen entstehen. Heißes Chloroform führt ebenfalls zu keinen mikromorphologischen Veränderungen, bräunt jedoch die Beerenhaut. Die Präparate wurden in einem Edwards Sputter Coater S150B mit Gold beschichtet.

Alternativen: Dieses Verfahren hatte sich aus einer Reihe von Varianten als das beste erwiesen, sowohl was die optimale Erhaltung der Oberflächenstrukturen als auch den Arbeitsaufwand betraf (siehe auch EVELING 1984). U. a. waren Schockgefrieren in flüssigem N_2 unter Vermittlung von Isopentan (2-Methylbutan) und normale Gefriertrocknung bei -20°C und 0,1 Torr getestet worden. Trocknung beim kritischen Punkt wurde vermieden, um das Oberflächenwachs nicht durch Azeton zu schädigen.

Elektronentransparenz-Rasterelektronenmikroskopie (ETR): Ein Nachteil der normalen REM ist die Tatsache, daß sie praktisch nur Oberflächendarstellungen erlaubt und etwa die Abschätzung von Dickenunterschieden der Cuticula nicht möglich ist. Um dies durchzuführen, wurde Beeren-cuticula von der abgezogenen Beerenhaut abpräpariert und mittels eines Drahrähmchens derart am

Objekträger befestigt, daß Rückstreuelektronen nicht direkt zur Meßzelle gelangen konnten (Abb. 1). An Löchern oder dünneren Stellen der Cuticula durchgedrungene Elektronen wurden hingegen vom Objekträger in die normale Richtung gelenkt, so daß eine Art Durchsichtsbild der abgezogenen Cuticula erhalten werden konnte.

Abpräparieren der Cuticula war möglich, nachdem die abgezogene Beerenhaut mindestens 24 h in verschiedenen Enzymgemischen (käufliche „Pektinase“, Onozuka-Zellulase usw.) inkubiert worden war.

Messen der Wachsschicht: Ihre durchschnittliche Dicke wurde ermittelt, indem das Wachs von etwa 2 kg Beeren mit heißem Aethylazetat abgewaschen und die Lösung im Rotationsverdampfer eingetrocknet wurde. Durch Vermessen der Beeren wurde deren Oberfläche bestimmt (unter Annahme einer Kugelgestalt) und die Wachsmenge auf die durchschnittliche Dicke der Wachsschicht umgerechnet.

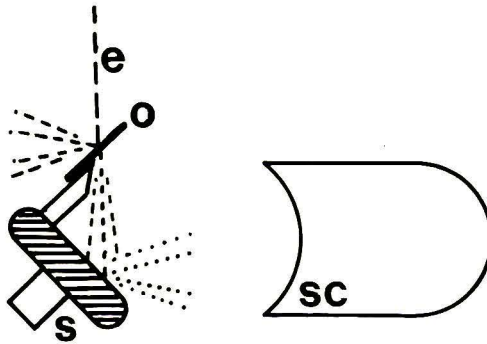


Abb. 1: Transmissionseinrichtung für Rasterelektronenmikroskopie. s = Objekträger, sc = Szintillationsverstärker, e = Elektronenstrahl, o = dünnes Objekt, seitlich gesehen.

Electron transmission device for scanning electron microscopy. s = stub, sc = scintillation amplifier, e = electron beam, o = thin specimen, view on edge.

Ergebnisse und Diskussion

1. Nachweis der Durchlässigkeit von Beerenhäuten und deren Beziehung zur Botrytisanfälligkeit

Bereits bei den ersten Versuchen zeigte es sich, daß auch völlig intakte reife Weinbeeren an manchen Stellen das Eindringen von Fluoreszeinlösung erlauben. Dabei war offensichtlich, daß dies nur sehr selten an Lentizellen geschieht, sondern überwiegend an solchen Stellen der Beerenoberfläche, die auch unter der Lupe kein Anzeichen für eine mechanische Beschädigung bieten.

Unmittelbar nach der Färbung sind die durchlässigen Stellen unter der UV-Lampe als kleine Pünktchen zu sehen, die sich jedoch rasch vergrößern und bei gehäufterem Auftreten auch ineinander fließen. Abb. 2 a zeigt dieses Stadium, da während der 30minütigen Belichtungszeit der Fluoreszenzfarbstoff von der Eindringstelle in das umliegende Gewebe diffundierte.

Die Ergebnisse von eingehenden Untersuchungen an 25 Rebsorten zu mehreren Zeitpunkten sind in den Abb. 3—5 dargestellt. Um das Verständnis der Abbildungen zu

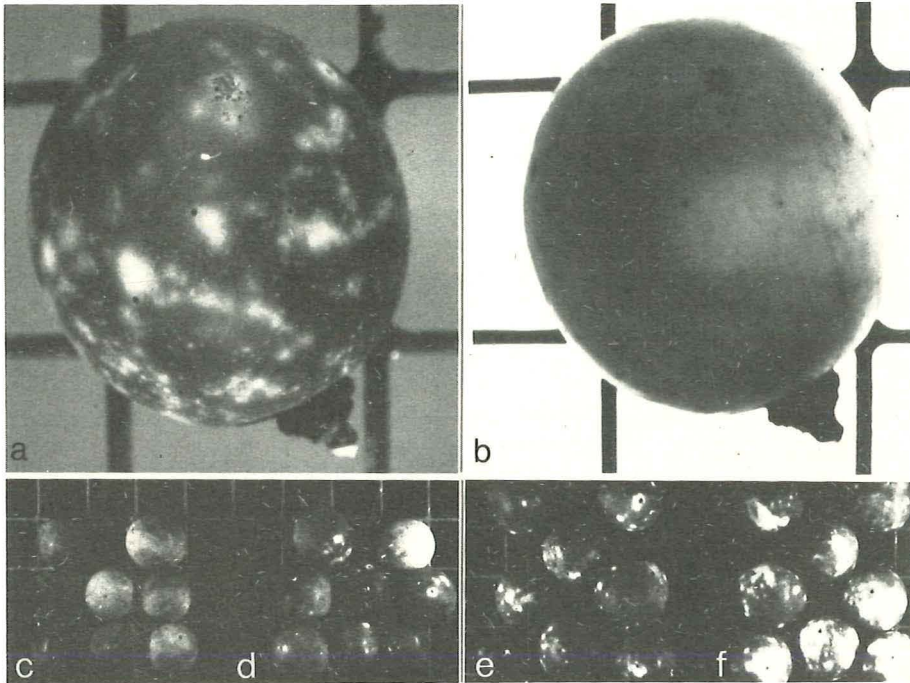


Abb. 2: Fluoreszeinfärbung von Weinbeeren zum Nachweis von Mikroperforationen. Alle Beeren haben dasselbe Mostgewicht. a) Gefärbte Beere in UV-Licht, b) dieselbe Beere in normalem Licht, c bis f) Nachweis von Perforationen in gesunden Beeren von 4 verschiedenen Rebsorten. — Resistente Sorten: c) Pollux, ohne fluoreszierende Flecken — der graue Schimmer auf den rechten Beeren kommt durch Einstrahlung sichtbaren Lichts; d) Ga-49-22, nur wenige Flecken, helle Beere s. o. — Nicht resistente Sorten: e) Müller-Thurgau, f) Foster's White Seedling mit einer großen Zahl ineinanderfließender Flecken.

Staining of grapevine berries with fluoresceine to detect microperforations. All berries with identical sugar content. — a) Stained berry in UV light, b) same berry in normal light, c through f) test for perforations in healthy berries of 4 different cultivars. — Resistant varieties: c) Pollux, without fluorescing spots, the grey shades being caused by reflexes of incident light, d) Ga-49-22, only few spots (white berry see above). — Non-resistant varieties: e) Müller-Thurgau, f) Foster's White Seedling with a great number of confluent spots.

erleichtern, wird erst hier genauer auf das jeweilige Verfahren eingegangen. Abb. 2 c–f zeigt einige typische Färbungen an Beeren verschiedener Sorten.

Zunächst wurden gesunde Beeren von 7 verschiedenen Rebsorten nach der Methode von STEIN *et al.* (1983) zerstörungsfrei in verschiedene Reifeklassen eingeordnet, mit Fluoreszein gefärbt und festgestellt, wie hoch der jeweilige Anteil an färbbaren Beeren (unabhängig von deren Perforationsgrad) war. Danach wurden alle Beeren, nach Reifeklassen getrennt, in einer feuchten Kammer mit einer eingestellten Suspension (wässrig, ohne Zuckerzusatz!) von *Botrytis*-Sporen besprüht, nachdem jeweils die Hälfte einer Klasse durch einen etwa 2 mm tiefen Stich mit einer Präpariernadel verletzt worden war. Nach einer Inkubation von 7 d wurde der Botrytisbefall bonitiert, wobei zwischen Prozentsatz infizierter Beeren (Befallshäufigkeit) und Gesamtausdehnung der Botrytisläsionen (Befallsstärke) unterschieden wurde. Die Ergebnisse dieses Versuchs (1982) sind in Abb. 3 grafisch dargestellt.

Mit zunehmender Reife nahm — wie nicht anders zu erwarten — bei allen untersuchten Rebsorten die Botrytisanfälligkeit zu; gleichzeitig stieg auch der Prozentsatz an perforierten Beeren an. Zwischen den einzelnen Varianten ergaben sich dabei jedoch deutliche Unterschiede:

Die stark botrytisanfälligen Sorten Morio-Muskat 4n, Elbling 4n und Fosters White Seedling zeigten bereits in der untersten Reifegruppe bis zu 90 % anfärbbare Beeren. Die übrigen hatten offensichtlich eine wesentlich dichtere Beerenhaut und zeichneten sich gleichzeitig durch eine geringere Botrytisanfälligkeit aus.

Die Nadelstichverletzung der Beerenhaut führte erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Infektionsrate, jedoch ergaben sich auch hier sortenspezifische Unterschiede. Bei der wenig anfälligen und oberflächendichten Sorte Pollux (B—6—18) wurde die Anfälligkeit durch die Verletzung um ein Mehrfaches erhöht, während der Stich bei der ebenfalls gering anfälligen resistenten Neuzüchtung Ga—49—22 praktisch wirkungslos blieb. Dieses Verhalten bestätigt die auch schon in anderem Zusammenhang beobachteten Unterschiede zwischen Eindringungsresistenz und Ausbreitungsresistenz von Beeren gegen Botrytisbefall.

Vor allem bei reifen Beeren ($> 70^{\circ}\text{Oe}$) platzten zwischen 3 und 15 % während der Inkubation in der feuchten Kammer auf. Diese Beeren wurden nach 24 h entfernt, da zu diesem Zeitpunkt das Aufplatzen noch nicht als Folge einer Botrytisinfektion zu betrachten war.

Dieser Versuch aus dem Jahre 1982 wurde im folgenden Jahr in geringerem Umfang wiederholt und erbrachte im wesentlichen dieselben Ergebnisse. Da die untersuchten Trauben aus dem Freiland stammten, lassen sich geringe quantitative Unterschiede aus den stark unterschiedlichen Witterungsbedingungen erklären.

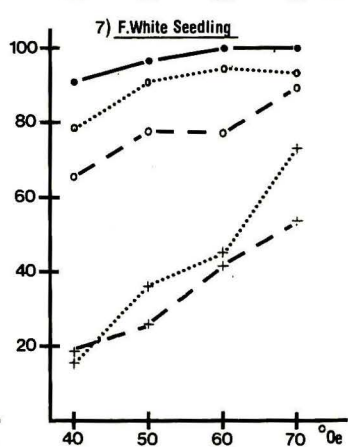
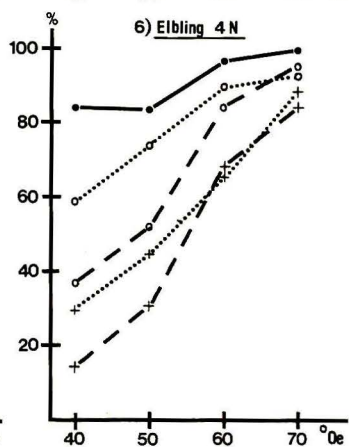
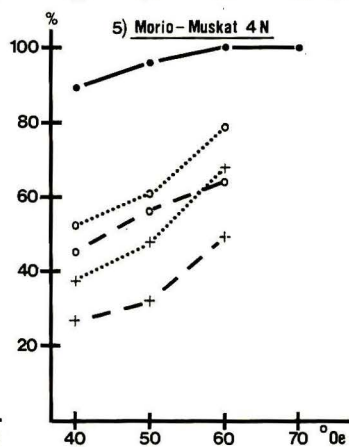
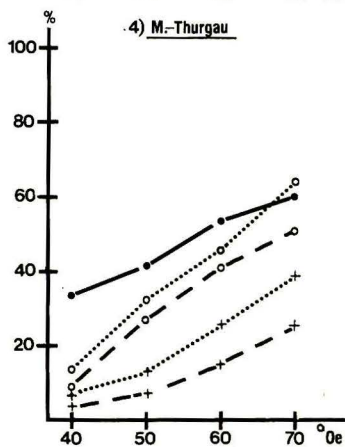
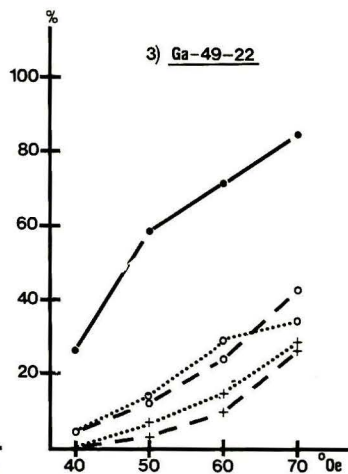
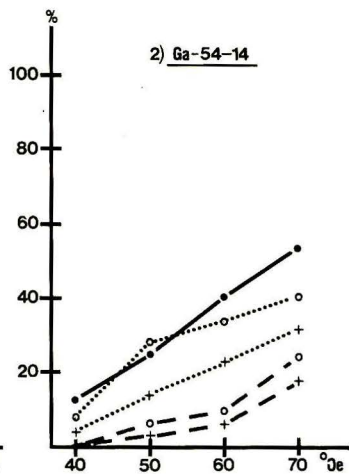
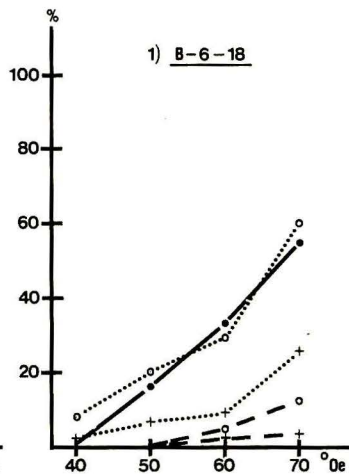
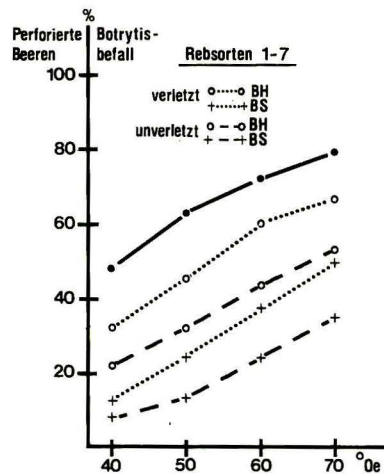
Zum nächsten Versuch wurden die Beeren verschiedener Sorten und Reifeklassen nach der Färbung in zwei Gruppen (perforiert, nichtperforiert) getrennt und diese auch getrennt infiziert.

Aus Abb. 4 geht klar der enge Zusammenhang zwischen Perforationen und Botrytisanfälligkeit der Beeren, vor allem solcher aus niedrigeren Reifeklassen, hervor. Aus der Darstellung dürfen allerdings keinesfalls absolute Rückschlüsse auf die Resistenz der untersuchten Sorten gezogen werden, da hier der tatsächlich vorhandene Anteil perforierter Beeren, wie auch ihr Perforationsgrad und das Platzen nicht berücksichtigt wurden.

In den folgenden Freilanduntersuchungen an 9 verschiedenen Sorten wurden diese Faktoren mit erfaßt. Auf die aufwendigen Infektionsexperimente wurde zugun-

Abb. 3: Cuticulaperforationen und Anfälligkeit gegen *Botrytis* der Beeren von 7 Rebsorten in Abhängigkeit vom Zuckergehalt ($^{\circ}\text{Oe}$). Die Durchschnittswerte aller Sorten sind in der ersten Grafik aufgeführt. — Durchgezogene Linien: Prozentsatz an perforierten Beeren (unabhängig von deren Perforationsgrad). Die unterbrochenen Linien zeigen die Anfälligkeit gegen künstliche Botrytisinfektionen, ermittelt durch zwei verschiedene Verfahren sowohl an intakten wie an durch Nadelstich verletzten Beeren. — Prozentsatz überhaupt infizierter Beeren (BH) ohne künstliche Verletzung (o— —o), durch Nadelstich verletzt (o o). — Gesamtintensität (bonitiert) der Infektion (BS) unverletzter (+— —+), durch Nadelstich verletzter Beeren (+ +).

Cuticular microperforations and susceptibility to *Botrytis* of grapevine berries of 7 varieties, depending on their sugar content ($^{\circ}\text{Oe}$). The average values of all varieties are given in the first graph. — The solid line indicates the percentage of perforated berries (regardless of the intensity of perforations). The other lines represent the susceptibility to artificial inoculation with *Botrytis* estimated by two different methods in both intact and mechanically injured berries. — Percentage of infected berries (BH): uninjured (o— —o), injured by a needle prick (o o). — Overall intensity of infections of berries (BS): uninjured (+— —+), injured by a needle prick (+ +).



sten einer Bonitur des „natürlichen“ Botrytisbefalls verzichtet und auch die entnommenen, gesunden Beeren nicht nach dem Mostgewicht klassifiziert, sondern nur deren Gesamtmostgewicht festgestellt. Nach der Färbung wurden sie je nach Perforationsgrad in drei Klassen aufgeteilt (< 10 , $10-20$, > 20 Perforationen je Beere).

Während vor Versuchsbeginn eine langanhaltende Trockenperiode das Auftreten von *B. cinerea* weitgehend verhindert hatte, führte die zwischen den beiden Versuchsterminen vorherrschende feucht-kühle Witterung zu einem starken Anstieg des Botrytisbefalls.

Aus Abb. 5 dürfen ebenfalls keine absoluten Angaben über die Botrytisanfälligkeit einzelner Rebsorten entnommen werden, da aufgrund der unterschiedlichen Reifezeitpunkte — im Gegensatz zu den Daten in Abb. 3 — die relativen Infektionsbedingungen nicht gleich waren und außerdem die befallenen Beeren nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden. Die Werte sollen daher vor allem in Hinblick auf den Einfluß der Perforationen auf die Botrytisanfälligkeit interpretiert werden.

Auffällig ist besonders, daß die — unmittelbar vergleichbaren — tetraploiden Varianten der einzelnen Sorten trotz nur unwesentlich erhöhten Mostgewichts (im Schnitt $2,5$ °Oe beim ersten Termin, beim zweiten nur $0,5$ °Oe) eine meist um über 100% erhöhte Botrytisanfälligkeit besitzen. Dies ist bis auf zwei Ausnahmen mit einer beachtlichen Vermehrung der stark perforierten Beeren verbunden.

2. Mikromorphologische Aspekte der Durchlässigkeit von Beerenhäuten

Lichtmikroskopische Untersuchungen erbrachten, außer bei offensichtlichen mechanischen Beschädigungen, keine Auskünfte über die Ursachen der Permeabilität der Beerenhäute. Dies ist u. a. auf die Tatsache zurückzuführen, daß Auflichtuntersuchungen starke Einbußen an Kontrast und Auflösungsvermögen mit sich bringen. Eventuelle Beschädigungen beim Abpräparieren der Cuticula oder bei der Herstellung von Dünnschnitten für Durchlichtuntersuchungen hätten sich nicht von vorhandenen Perforationen unterscheiden lassen.

Hier bot sich die Anwendung des Rasterelektronenmikroskops (REM) an, das sich speziell für Oberflächenuntersuchungen bei gegenüber dem Lichtmikroskop 10fach erhöhtem Auflösungsvermögen eignet. Diese Untersuchungen wurden jedoch erst dadurch möglich, daß Perforationen zunächst mit einer makroskopischen Methode lokalisiert werden konnten.

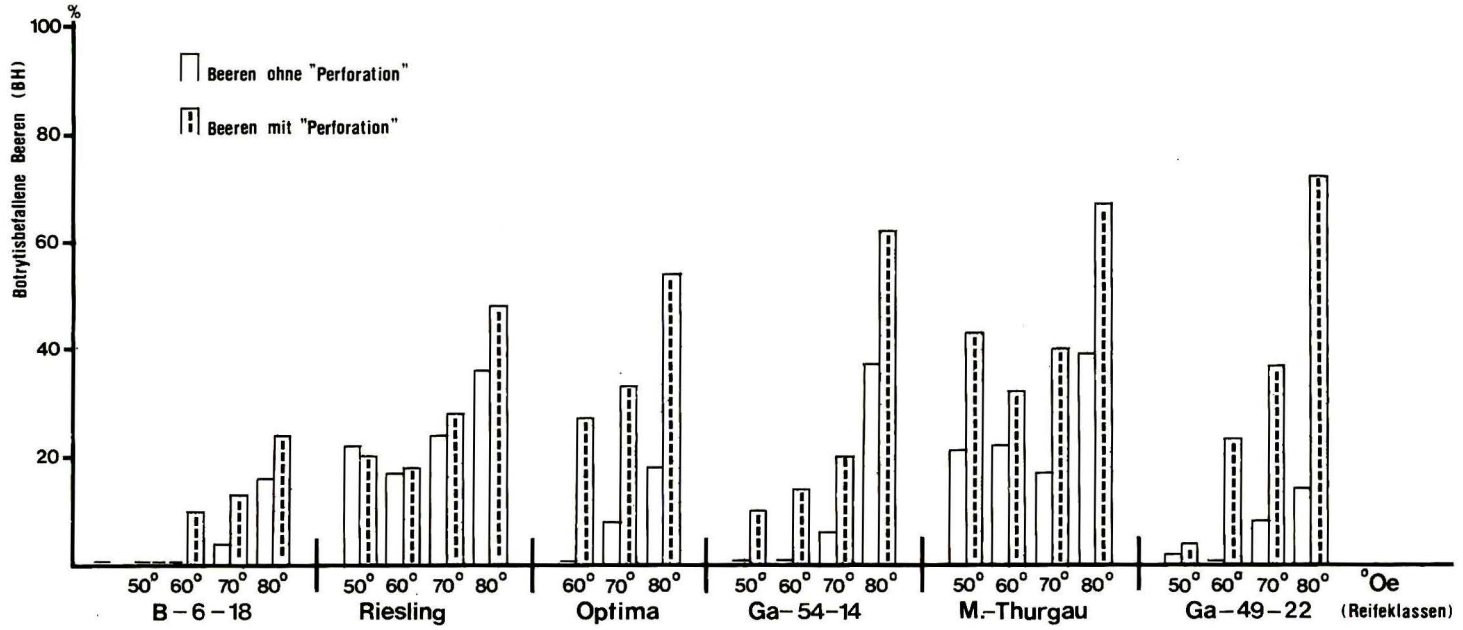
Zunächst waren die Untersuchungen wenig erfolgreich, da eine relativ grobschollige Wachsschicht den Blick auf die Cuticula versperrte (Abb. 6 a). Diese entspricht nach unseren Messungen einer homogenen Wachslage von etwa $3\ \mu\text{m}$ Dicke, verhindert aber offensichtlich nicht den Zutritt wäßriger Lösungen zur Cuticula. Dies bedeutet, daß auch ein Austritt gelöster Substanzen aus der Beere möglich ist.

Nach Entfernung der Wachsschicht durch Chloroform waren in allen Fällen an Stellen, wo Fluoreszeinlösung eingedrungen war, auch entsprechende Perforationen von etwa $0,5-2\ \mu\text{m}$ Durchmesser zu finden (Abb. 6 c und d). Nicht gefärbte Stellen zeigten eine leicht fasrige Oberflächenstruktur der Cuticula, aber keine Löcher (Abb. 6 b).

Abb. 4: Prozentsatz infizierter Beeren von 6 Rebsorten 7 d nach künstlicher Inokulation mit *Botrytis*. Die Beeren wurden nach ihrem Zuckergehalt sortiert, jede Klasse ist in perforierte (punktierte Balken) und nichtperforierte Beeren (helle Balken) aufgeteilt.

Percentage of infected grapevine berries of 6 varieties 7 d after artificial inoculation with *Botrytis*. The berries were sorted according to their sugar content. Each class was separated into two groups (perforated berries — dotted bars, berries with no perforations — white bars).

Perforationen in der Cuticula von Weinbeeren



Um zu demonstrieren, daß die beobachteten Löcher die Cuticula tatsächlich durchdringen, wurden Brüche durch tiefgekühlte, fixierte Beerenhäute in der Gegend von Lochzonen durchgeführt. Daran konnte die vollständige Perforation der gesamten Cuticula demonstriert werden (Abb. 6 g). Außerdem deuten gewisse Strukturen darauf hin, daß die Öffnungen vom Beereninneren her an präformierten dünnen Stellen der Cuticula entstehen (Abb. 6 e und f). Daß diese bei manchen Rebsorten eine sehr unterschiedliche Dicke aufweist, ist bereits von lichtmikroskopischen Untersuchungen an Dünnschnitten bekannt (BERNARD 1976, 1977). Mit dem REM konnte durch ETR eine flächige Durchleuchtung einer enzymatisch abpräparierten Cuticula vorgenommen werden (Abb. 7 a). Die unterschiedliche Elektronendurchlässigkeit zeigt die Schwankungen der Cuticuladicke. Ebenso wird daran deutlich, daß Perforationen durch die gesamte Cuticula reichen (Abb. 7 b).

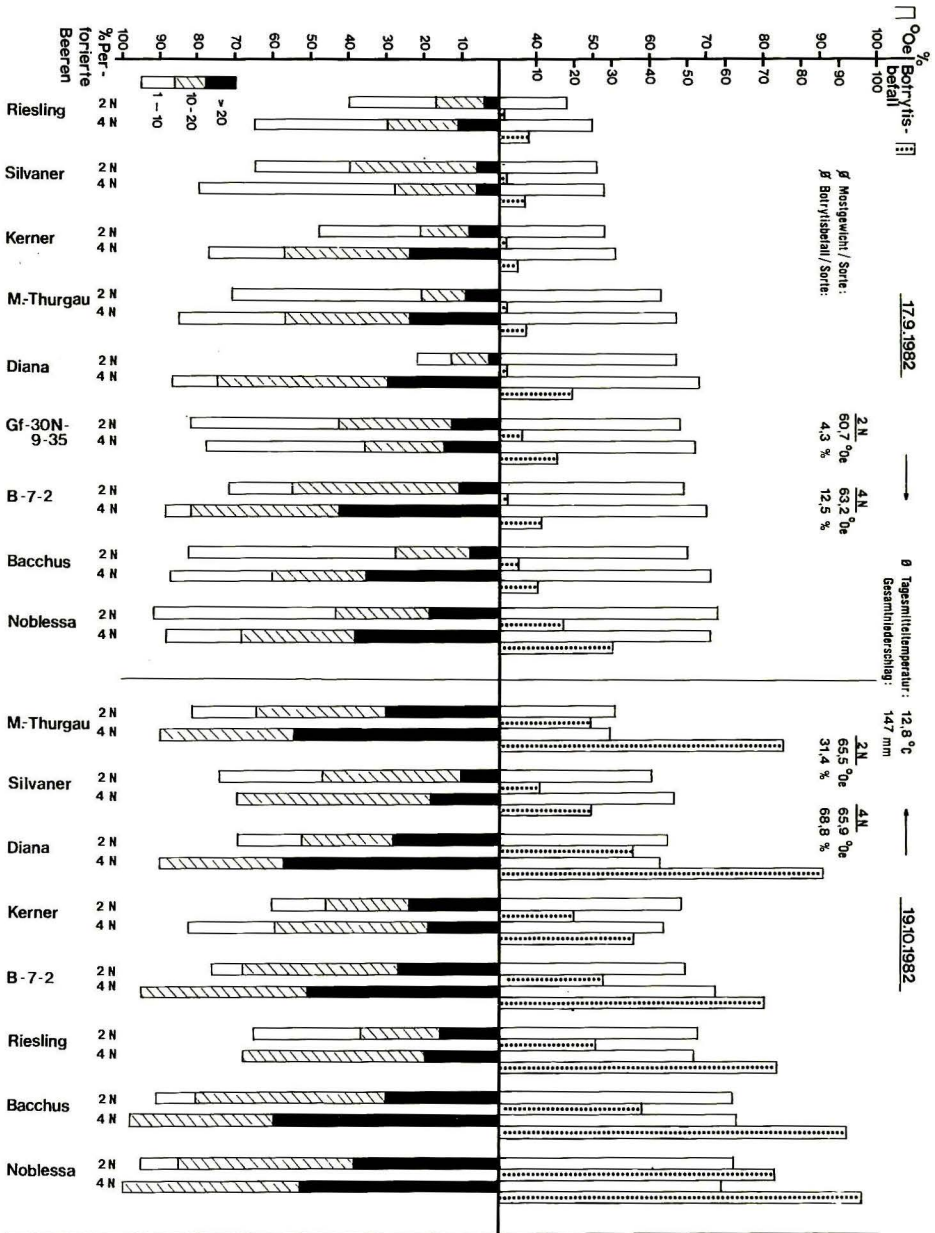
Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Rebsorten bestätigten die bekannten Sortenunterschiede in der Struktur von Beerenhaut und Cuticula (BERNARD 1976, 1977, COPPOLA 1978, ALLEWELDT *et al.* 1981). Hierüber soll an anderer Stelle berichtet werden. Wichtiger für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist die Frage, ob *Botrytis* durch Cutinasen in die Cuticula eindringen kann und ob die vorhandenen Löcher vielleicht Eintrittspforten für Pilzhyphen darstellen, oder ob sie nur durch eine indirekte Erhöhung der Keimfähigkeit von *Botrytis*-Sporen wirksam sind. Für *Botrytis* ist eine Cutinase zwar postuliert, aber nicht direkt bewiesen (LINSKENS und HAAGE 1963). Auch die sehr eindrucksvollen Aufnahmen eindringender *Botrytis*-Hyphen von MCKEEN (1974) im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) brachten keine endgültige Klärung dieser Frage. Einige unserer Beobachtungen deuten jedoch eher darauf hin, daß bei *B. cinerea* kein solches Enzym wirksam ist:

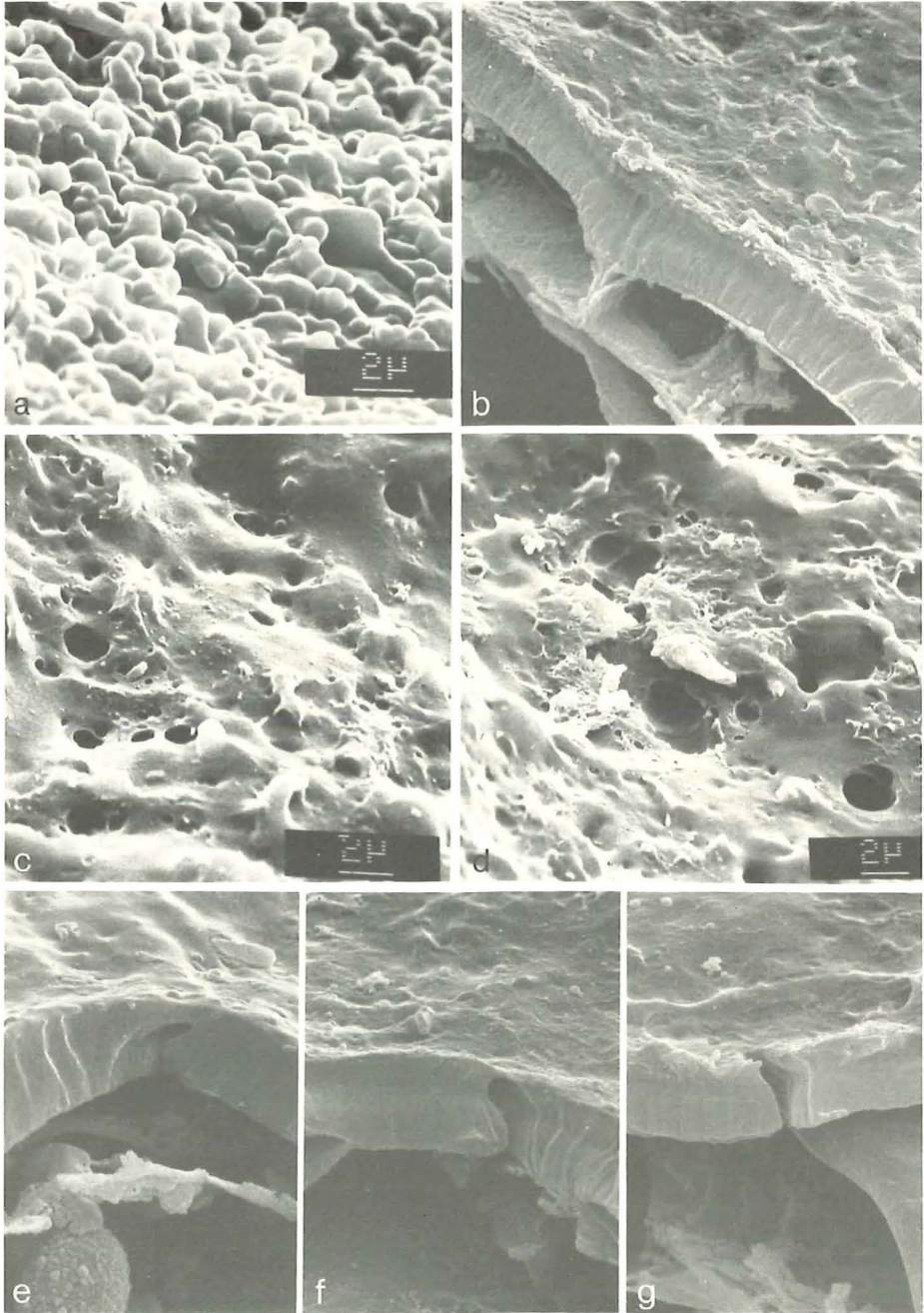
Die REM-Untersuchung eines Stückes Beerenhaut, das unfixiert in einer stark mit Bakterien und/oder Hefen infizierten zuckerhaltigen Präparationslösung verblieben war und dessen Cuticula sich am Rand durch Zurückrollen teilweise gelöst hatte, zeigt, daß diese offensichtlich stark enzymatisch angegriffen worden war. Vor allem am Rand oder an Stellen, an denen ihre Unterseite durch Hochrollen zugänglich geworden war, zeigte sie eine schwammige Struktur (Abb. 7 c und d). Normalerweise sind Bruchkanten der Beeren-cuticula im REM völlig strukturlos (Abb. 6 b). Zweifellos wurde die Cuticulamatrix an zugänglichen Stellen enzymatisch abgebaut, während die Oberfläche durch den Wachsbelag geschützt zu sein schien.

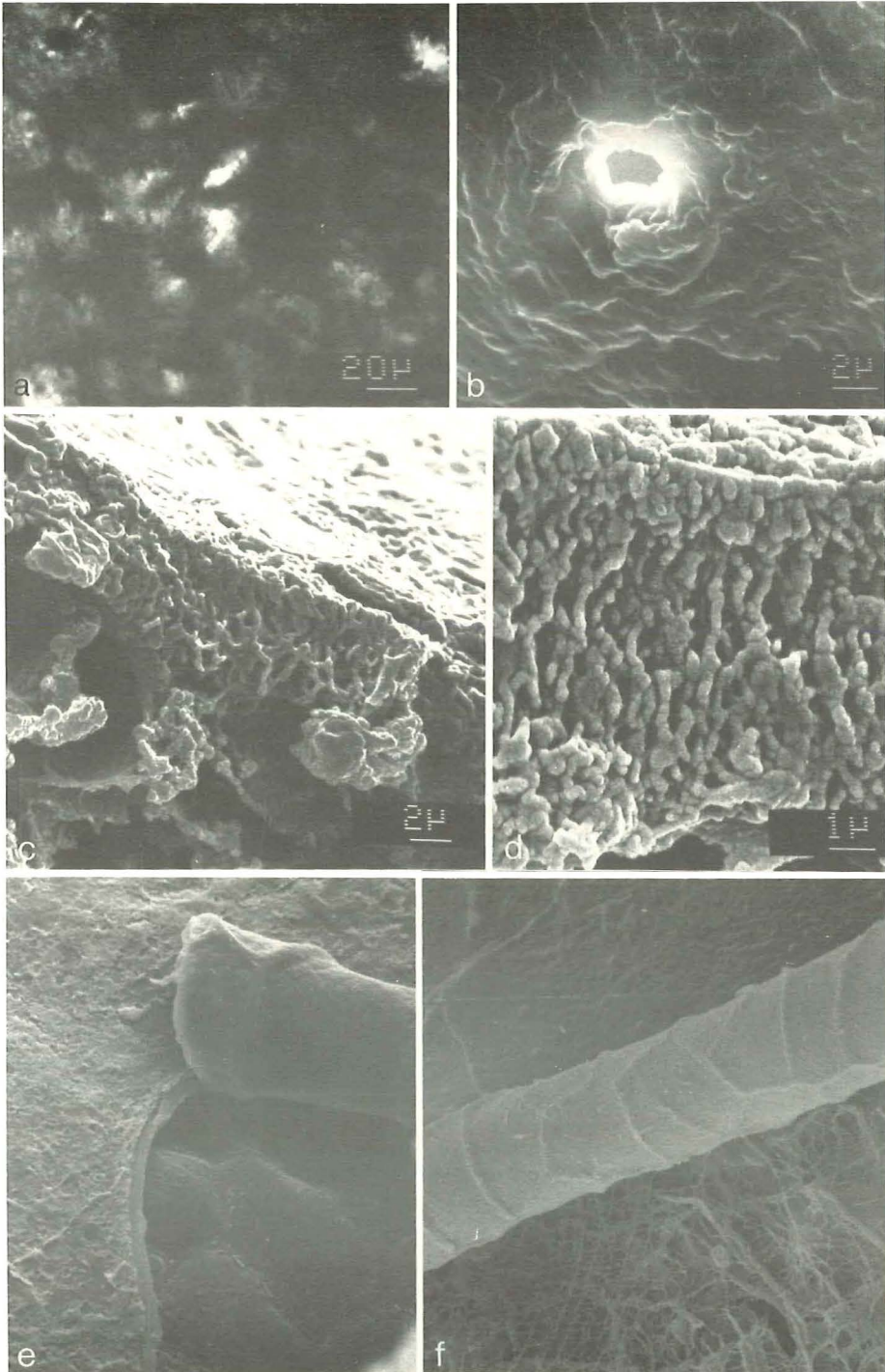
Nach TEM-Aufnahmen von JARVIS und WARDROP (1974) bei *Phormium* hat dessen Cuticula eine schwammige Grundstruktur, die in eine weniger elektronendichte Matrix eingebettet und nicht scharf von der aufliegenden Wachsschicht getrennt ist (s. auch MARTIN und JUNIPER 1970, CHAFE und WARDROP 1973). Dies paßt durchaus zu den oben beschriebenen Beobachtungen, welche direkt belegen, daß ein — zumindest partieller — mikrobieller Abbau der Cuticula durchaus möglich ist.

Abb. 5: Obere Hälfte: Botrytisinfektion (gepunktete Balken) und Zuckergehalt ($^{\circ}\text{Oe}$, weiße Balken) bei Freilandtrauben diploider und tetraploider Formen von 9 Rebsorten. — Untere Hälfte: Klassifizierung der Beeren nach Perforationsgrad. Die Säulenlänge gibt den Prozentsatz perforierter Beeren an. Unterteilung des Balkens: schwarz, > 20 Perforationen pro Beere; schraffiert, 10—20; weiß, < 10. — Der erste Versuch (linke Hälfte der Abbildung) wurde nach 32 d an denselben Pflanzen wiederholt, das zweite Mal war jedoch eine etwa 2wöchige Schlechtwetterperiode vorausgegangen.

Upper half: *Botrytis* infection (dotted columns) and sugar content ($^{\circ}\text{Oe}$, white columns) of outdoor grapes of both diploid and tetraploid forms of 9 varieties. — Lower half: Classification of the berries with respect to the degree of perforation. The column length represents the percentage of perforated berries. Subdivision of lower columns: black, > 20 perforations per berry; hatched, 10—20; white, < 10. — The first test (left half of the figure) was repeated after 32 d on the same plants. The second test was preceded by 2 weeks of bad weather.







Der Versuch, auf analoge Weise auch bei *B. cinerea* die Wirkung einer Cutinase nachzuweisen, war jedoch nicht möglich. Leider war unsere aggressive Infektionskultur schon vor der REM-Untersuchung verworfen worden, so daß die beteiligten Mikroorganismen nicht mehr zu bestimmen waren. Es handelte sich dabei aber mit Sicherheit nicht um *Botrytis*.

Der Versuch, ähnliche Abbaueffekte mit entsprechenden *Botrytis*-Kulturen bzw. Enzymgemischen zu erzielen, blieb stets erfolglos; auch erscheint, wie aus Abb. 7 f ersichtlich, selbst bei stärkstem Botrytisbefall der Beere die sich ablösende Cuticula nie enzymatisch angegriffen. Falls der Pilz eine Cutinase produzieren kann, dürfte sich diese Fähigkeit nur auf die Hyphenspitzen keimender Konidien beschränken.

Zusammenfassung

In der Cuticula äußerlich unbeschädigter Weinbeeren konnten indirekt durch Färbung der Beeren in einer wäßrigen Fluoreszeinnatriumlösung und nachfolgende Beobachtung im UV-Licht Perforationen nachgewiesen werden. Diese erlauben das Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffs, der dann durch Spülen mit Wasser nicht mehr entfernt werden kann und die Poren als kleine, fluoreszierende Flecke auf der Beerenhaut sichtbar macht.

Abb. 6: REM-Aufnahmen der Cuticula von Weinbeeren. Alle gleich stark vergrößert. — a) Oberflächenwachs der Sorte Niagara, b) intakte Cuticulaoberfläche (oben rechts) mit abgelöstem Wachs; Bruchkante der Cuticula (diagonal) mit unten anliegender, dünner Zellwand der Epidermiszellen (unten links). — c und d) Perforationen in der Cuticula einer färbbaren Stelle der Beerenhaut von Riesling. — e bis g) Möglicherweise beginnende Perforationen (e und f) und durchgehende Perforation (g), sichtbar in der Bruchkante der Cuticula aus einer gefärbten Stelle (Riesling).

SEM micrographs of the cuticle of grapevine berries, all of the same magnification. — a) Surface wax of cv. Niagara, b) intact cuticular surface with wax removed (upper right), the edge of the broken cuticle (diagonal) with adhering thin wall of epidermal cells (lower left) being visible. — c and d) Holes in the cuticle of a stained area of the berry shell (cv. Riesling). — e through g) Possibly beginning perforations (e and f) and a complete one (g) in the edge of a broken cuticle of a stained area (cv. Riesling).

Abb. 7: a und b) Elektronentransmissions-REM-Bild einer über einem färbbaren Fleck von der Beerenepidemis abpräparierten Cuticula (Riesling): a) Übersicht; sie zeigt die unterschiedliche Dicke der Cuticula und eine vollständige Perforation in der Bildmitte. b) Perforation stärker vergrößert, von der Oberseite gesehen; der Elektronenstrahl trifft auf der Gegenseite auf. — c und d) Bruchkante einer durch unbekannte Mikroorganismen angedauten Beerenhaut: c) Übersicht über Epidermiskante, d) Detail des schwammigen Rests der Cuticula. — e und f) Beerenepidermen mit teilweise zurückgerollter Cuticula; die Oberfläche der Epidermiszellen hinterläßt einen Negativabdruck auf der Cuticulaunterseite: e) Intakte Epidermis; f) Epidermis einer vollständig verfaulten Beere; eine dünne Myzelschicht verdeckt die Epidermiszellen, die Struktur der Cuticula scheint vollständig intakt.

a) and b) Electron transmission SEM image of a cuticle peeled off from a stainable area of a berry shell (cv. Riesling): a) Overview, demonstrating variable thickness of the cuticle and a complete perforation in the center; b) complete perforation at a larger magnification, viewn from the upper surface, the electron beam hitting on the lower surface. — c and d) Edge of a broken berry shell partly digested by unknown microorganisms: c) Overview of epidermis, d) detail of spongy rest of cuticle. — e and f) Epidermis of berries with the cuticle partly rolled off, the surface of the epidermal cells leaving a negative cast on the lower surface of the cuticle: e) Intact epidermis, f) epidermis from a completely rotten berry, a layer of *Botrytis* mycelium covering the epidermal cells, the cuticular structure seeming completely intact.

Außer bei offensichtlichen mechanischen Schäden war es nicht möglich, die Perforationen lichtmikroskopisch nachzuweisen. Nach Entfernung der Wachsschicht konnten sie jedoch im Rasterelektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Sie erscheinen als rundliche Löcher mit einem Durchmesser von etwa 0,5–2 µm.

Insgesamt wurden 25 Rebsorten untersucht, u. a. diploide und tetraploide Formen derselben Zuchtstämme. Die Anzahl der Poren nimmt zwar mit der Reife der Beeren zu; sie ist bei gleicher Reife jedoch sortenspezifisch, wobei botrytisanfällige Trauben mehr Perforationen aufweisen als resistente. Tetraploide sind stets anfälliger und haben weit mehr Poren als die entsprechenden Diploiden.

Das Fehlen von Poren oder deren geringe Anzahl in der Beerencuticula kann deshalb als eine mögliche Ursache der Pilzresistenz von Trauben angesehen werden.

Rastermikroskopische Aufnahmen erbrachten keine Anhaltspunkte für einen enzymatischen Angriff von *B. cinerea* auf die Beerencuticula. In einem Fall war die Bruchstelle einer Cuticula in einem Präparat durch unbekannte Mikroorganismen angedaut und in ein schwammiges Netzwerk verwandelt worden. Durch Angriff von *Botrytis* konnte ein solcher Effekt jedoch nie erzielt werden. Selbst bei total verfaulten Beeren zeigte die Cuticula stets ein völlig intaktes Erscheinungsbild.

Allen Mitarbeitern der BAFR, die zu dem Gelingen dieser Untersuchungen beigetragen haben, sei an dieser Stelle herzlich gedankt, ebenso dem Forschungsring des Deutschen Weinbaues und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

Literatur

- ALLEWELDT, G., ENGEL, M. und GEBBING, H., 1981: Histologische Untersuchungen an Weinbeeren. *Vitis* **20**, 1–7.
- BERNARD, A. C., 1976: Résistance mécanique des baies de *Vitis vinifera* au *Botrytis cinerea* PERS. France Viticole **8**, 301–307.
- — —, 1977: Observations histologiques sur la pellicule des baies de *Vitis vinifera* en relation avec *Botrytis cinerea* PERS. France Viticole **9**, 7–20.
- — — et DALLAS, J. P., 1979: Effets particuliers de l'action du cuivre sur les baies des grappes de *Vitis vinifera* L. Progr. Agric. Vitic. **96**, 393–395.
- BESSIS, R., 1972: Etude en microscopie électronique à balayage des rapports entre l'hôte et le parasite dans le cas de la pourriture grise. C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér. D, **274**, 2991–2994.
- CHAFE, S. C. and WARDROP, A. B., 1973: Fine structural observations on the epidermis. II. The cuticle. *Planta* **109**, 39–48.
- CHAMBERS, S. C. and POSSINGHAM, J. V., 1963: Studies of the fine structure of the wax layer of sultana grapes. Austral. J. Biol. Sci. **16**, 818–852.
- CONSIDINE, J. A., 1981: Correlation of resistance to physical stress with fruit structure in grape. Austral. J. Bot. **29**, 475–482.
- — —, 1982: Physical aspects of fruit growth: cuticular fracture and fracture patterns in relation to fruit structure in *Vitis vinifera*. J. Horticult. Sci. **57**, 79–91.
- COPPOLA, V., 1978: Contributo alla conoscenza dell'epicarpo di alcune cultivars di uve da vino. Riv. Viticult. Enol. (Conegliano) **31**, 17–24.
- EVELING, D. W., 1984: Examination of the cuticular surfaces of fresh delicate leaves and petals with a scanning electron microscope: a control for artefacts. New Phytologist **96**, 229–237.
- GARTEL, W., 1970: Über die Eigenschaften von *Botrytis cinerea* als Rebenparasit unter besonderer Berücksichtigung von Infektion und Inkubation. Weinberg und Keller **17**, 15–52.
- JARVIS, L. R. and WARDROP, A. B., 1974: The development of the cuticle in *Phormium tenax*. *Planta* **119**, 101–112.
- KOSUGE, T. and HEWITT, B., 1964: Exsudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology **54**, 167–172.
- LINSKENS, H. F. und HAAGE, P., 1963: Cutinase-Nachweis in phytopathogenen Pilzen. Phytopathol. Z. **48**, 306–311.

- MARTIN, J. T. and JUNIPER, B. E., 1970: The cuticle of plants. Edward Arnold Publishers Ltd.
- MCKEEN, W. E., 1974: Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **64**, 461—467.
- NELSON, K. E., 1951: Factors influencing the infection of table grapes by *Botrytis cinerea* PERS. *Phytopathology* **41**, 319—326.
- —, 1956: The effect of *Botrytis* infection on the tissue of Tokay grapes. *Phytopathology* **46**, 223—229.
- RADLER, F., 1965: The surface waxes of the sultana vine (*Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless). *Austral. J. Biol. Sci.* **18**, 1045—1056.
- STALDER, L., 1954: Untersuchungen über die Graufäule (*Botrytis cinerea* PERS.) an Trauben. 2. Mitteilung. Über den Zucker- und Säureverbrauch des Pilzes und die Wirkung einiger Nährstoffe auf das Wachstum. *Phytopathol. Z.* **22**, 345—380.
- STEIN, U., BLAICH, R. und WIND, R., 1983: Eine neue Methode zur Mostgewichtsbestimmung und Klassifizierung unverletzter Weinbeeren. *Vitis* **22**, 15—22.
- SWIFT, J. G., MAY, P. and LAWTON, E. A., 1974: Concentric cracking of grape berries. *Vitis* **13**, 30—35.
- VERHOEFF, K. and WARREN, J. M., 1972: *In vitro* and *in vivo* production of cell wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. *Neth. J. Plant. Pathol.* **78**, 179—185.

Eingegangen am 16. 6. 1984

Prof. Dr. R. BLAICH
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen