Forschungsring des Deutschen Weinbaus
bei der DLG e. V.

JAHRESBERICHT 2014

(Kurzfassungen)

herausgegeben
von der DLG e. V.
Fachzentrum Landwirtschaft
Frankfurt am Main

Forschungsring des Deutschen Weinbaus
bei der DLG e. V.

JAHRESBERICHT 2014

(Kurzfassungen)

herausgegeben
von der DLG e. V.
Fachzentrum Landwirtschaft
Frankfurt am Main

Inhaltsverzeichnis

Seite:

Vorworte 5

Mitglieder des Forschungsausschusses 7

Arbeitskreis: Bodenkunde und Rebenernährung

M. Sc. Yvonne Lehmann, Prof. Dr. Otmar Löhnertz 8
Hochschule Geisenheim University, Zentrum für Angewandte Biologie, Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung, Von-Lade-Str. 1, 65366 Geisenheim
Untersuchungen zur Emission von Lachgas und anderen klimarelevanten Gasen im Weinbau in Abhängigkeit von der mineralischen Stickstoffdüngung und vom Bodenbewirtschaftungssystem

Arbeitskreis: Rebenzüchtung

Sonja Grundler, Prof. Dr. Joachim Schmid 15
Institut für Rebenzüchtung, Zentrum für Angewandte Biologie, Hochschule Geisenheim
Untersuchungen der phänotypischen und genetischen Varianz innerhalb der Art *Vitis berlandieri* Planchon

Franziska Huber, Florian Schwander, Rudolf Eibach, Reinhard Töpfer 20
Julius Kühn-Institut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen
Identifizierung von „Qualitäts“-Chromosomen in Vitis zur Frühdiagnose von Weinqualität

Prof. Dr. Renate Horn 24
Universität Rostock, Albert-Einstein-Str.3, 18059 Rostock
Molekulare Untersuchungen zur Optimierung der Triebhaltung bei der Weinrebe (*Vitis vinifera*)

Arbeitskreis: Physiologie der Rebe und Rebenveredelung

M. Sc. Khalil Bou Nader, Dr. Manfred Stoll 34
Institut für allgemeinen und ökologischen Weinbau (HSGM), Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim
Prof. Dr. Doris Rauhut, Dr. Armin Schüttler, Institut für Mikrobiologie und Biochemie
Prof. Dr. Otmar Löhnertz, Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung
Dr. Claus-Dieter Patz, Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung
Prof. Dr. Rainer Jung, Institut für Oenologie
„Alte“ vs. „junge“ Reben: Einfluss des Rebalters auf physiologische und generative Parameter sowie auf Beeren-, Most- und Weininhaltsstoffe

Seite:

Arbeitskreis: Pflanzenschutz

Dr. Karl-Josef Schirra, Stefanie Alexander, PD. Dr. Eva Maria Griebeler, Dr. habil. Jes Johannesen
Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz – (DLR), Abteilung Phytomedizin, 67435 Neustadt a. d. Weinstraße, Breitenweg 71
Untersuchungen zur Phänologie und Populationskontrolle von Essigfliegen (Diptera: Drosophilidae) und Wespen (Hymenoptera: Vespidae) als Überträger unerwünschter Mikroorganismen auf Trauben in Rebanlagen 37

Nicolai Haag
Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- u Weinbau, Geilweilerhof, 76833 Sibeldingen
Pflanzmaterial als eine mögliche Infektionsquelle der Esca-Krankheit der Weinrebe: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie des Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* im Bereich Rebschule 41

Arbeitskreis: Betriebs- und Marktwirtschaft

M. Sc. Maximilian Iselborn
Zentrum für analytische Chemie und Mikrobiologie, Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung, Hochschule Geisenheim University, Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim
Analyse und Vergleich der Erfolgsfaktoren von biologisch und integriert wirtschaftenden direkt vermarktenden Weingütern unter besonderer Berücksichtigung des Zielsystems, der Lebenszufriedenheit und den Persönlichkeitseigenschaften der Unternehmerfamilie 47

M. Sc. Marianne E. Steinschulte
Zentrum für Ökonomie, Institut für Betriebswirtschaft und Marktforschung Hochschule Geisenheim University, Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim
Erstellung einer Wein-Warenstromanalyse für Rheinland-Pfalz zur Marktpotenzialabschätzung heimischer Weine 49

Prof. Dr. Edith Rüger-Muck, Prof. Dr. Gerhard Raab
Hochschule LU, Ernst-Böhe-Str. 4, 67059 Ludwigshafen am Rhein
Erfolgsfaktoren für den Online-Verkauf von Wein im Internet: eine neuroökonomische und verhaltenspsychologische Untersuchung 51

Arbeitskreis: Kellerwirtschaft und Weinbehandlung

M. Sc. (Oeno.) Engela Kritzinger, Dr. Pascal Herr, Prof. Dr. Ulrich Fischer
Kompetenzzentrum Weinforschung im Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Abteilung Weinbau & Oenologie, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße,
Physikalische und Chemische Alternativen zur Fasskonservierung mittels schwefeliger Säure 53

Seite

Ausschuss für Technik im Weinbau

Norbert Breier 72
Durchführende Einrichtung
Gasmanagement in Winzerbetrieben

Arno Becker 75
DLR Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Standort Oppenheim
Stammrücknahme mit anschließendem Stockneuaufbau („RESET-Methode“): ein wirtschaftliches Instrument zur Verlängerung der Lebensdauer von Rebanlagen?

Prof. Dr. Rainer Jung, Christoph Schüßler 81
Institut für Oenologie, Hochschule Geisenheim University
Nationale und internationale Weinlogistik – Rahmenbedingungen und Einflussfaktoren auf die Weinqualität

Matthias Schmitt 84
Hochschule Geisenheim Univeresity, Institut für Oenologie
Behebung von Gärproblemen durch teilweise Alkoholreduzierung von Wein

50 Jahre FDW

Grußwort des 1. Vorsitzenden des Forschungsringes des Deutschen Weinbaus (FDW)

Seit nunmehr 50 Jahren prägt der Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) die angewandte Forschung in der Weinwirtschaft. Herausragend ist die länderübergreifende Zusammenarbeit in der Forschungsfinanzierung der Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz. An den Vorgaben eines 1995 modifizierten Forschungsprogramms, das Wettbewerbsfähigkeit, Nachhaltigkeit, Marktorientierung und Qualitätssicherung interdisziplinär berücksichtigt, soll auch die künftige Ausrichtung der Weinbauforschung angelehnt sein.

Wie in kaum einem anderen Wirtschaftszweig konnten auf Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse so immense technologische Fortschritte realisiert werden wie im Weinbau. Erwähnenswert erscheinen mir insbesondere die Erfolge der Weinbaumechanisierung und in jüngster Zeit die Steillagenmechanisierung.
Während den Anfang dieser fünf Jahrzehnte grundlegende technische Fragen aber auch Aspekte der Produktionssicherung prägen, kam es in den Folgejahren immer wieder zu Verschiebungen und zur Diversifizierung der Forschungsinhalte. Als beispielhaft sind die Weiterentwicklungen im Bereich Rebenzüchtung, Pflanzenschutz und Pflanzenernährung zu nennen. Dieser vorwiegend von Rationalisierung geprägten Phase folgte, auch aufgrund des steigenden Umweltbewusstseins der Bevölkerung eine Periode, die sich der Nachhaltigkeit des Weinbaus in ihren unterschiedlichen Facetten widmete. Mit fortschreitenden analytischen und sensorischen Möglichkeiten konnte – insbesondere in den letzten beiden Jahrzehnten – ein Antwortenspektrum auf viele wirtschaftlich bedeutende oenologische Fragen gefunden werden. Aus der jüngsten Vergangenheit sind hier Beispiele wie Gesundheit und Weinkonsum, Qualitätssicherung, Stressfaktoren und Weinqualität aber auch Säureproblematik hervorzuheben. Im Mittelpunkt der ökonomischen Fragestellungen standen von jeher die Verbesserung der Wirtschaftlichkeit sowie die Zukunftsfähigkeit der Weinbaubetriebe. Seit Mitte der 90er Jahre rückt zunehmend die Untersuchung von Verbraucherverhalten aber auch die Nachfrageentwicklung mit dem Ziel der Existenzsicherung der deutschen Weinunternehmen in den Fokus der Betrachtung.

Der Wandel von der landwirtschaftlichen Urproduktion zum modernen Dienstleister – als die sich viele der kleinstrukturierten Unternehmen der deutschen Weinwirtschaft verstehen – wäre ohne eine praxisrelevante öffentliche Forschungs- und Entwicklungstätigkeit in Deutschland nicht möglich gewesen. Hier hat der Forschungsring in den unterschiedlichsten Facetten seiner Arbeit in der Vergangenheit richtungsweisende Impulse gegeben, die eindrucksvoll in der Rückschau der Arbeitskreise dokumentiert sind. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ist es vor dem Hintergrund eines auch zukünftig wichtigen und interessanten Wirtschaftsbereiches – dem Weinbau in Deutschland – erforderlich, in die Zukunft zu blicken. Um auch weiterhin auf allen Ebenen der weinbaulichen Produktion und Vermarktung wettbewerbsfähig zu bleiben, möchte ich auf die Notwendigkeit der öffentlich finanzierten Weinbauforschung durch den Forschungsring aufmerksam machen.
Durch gezielte Projektförderung in den einzelnen Arbeitskreisen erlaubt diese Form der Forschungsorganisation den effizienten, flexiblen und zeitlich begrenzten Einsatz von Forschungsgeldern. Neben den für die Praxis wichtigen und schnell verwertbaren Erkenntnissen können zudem wissenschaftliche Nachwuchskräfte herangebildet werden. Diese erweitern nicht selten den Kreis der Wein- und Weinbauforscher und bleiben somit der Branche als Vordenker und Lösungsanbieter erhalten.

Die interessierte Öffentlichkeit steht stets im Mittelpunkt der Forschungsbemühungen. Durch jährliche Tagungen an wechselnden Forschungsstandorten innerhalb Deutschlands informieren die FDW-Arbeitskreise einen eher wissenschaftlichen Teilnehmerkreis. Durch Publikationen, Vorträge und Symposien wird die breitere Schicht der Praktiker erreicht. Dadurch gelingt der unmittelbare Transfer der Forschungsergebnisse in die Weinwirtschaft.

Auch im neuen Jahrtausend stellt sich der Forschungsring des Deutschen Weinbaus diesen Herausforderungen mit dem Ziel, die Wettbewerbsfähigkeit und somit die Existenz der Branche zu sichern.

Mainz, 17. April 2002
Dr. Peter Fuchß
(1.Vorsitzender)

Vorwort des 1. Jahresberichtes

Der Forschungsring des Deutschen Weinbaues bei der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft wurde am 15. Juni 1961 zu zeitlich nicht begrenzter Arbeit gegründet, und zwar in der Erkenntnis, daß Fortschritt und Rentabilität des Weinbaues von der wissenschaftlichen Forschung abhängig sind und die klimatisch bedingte Benachteiligung der deutschen Weinerzeugung gegenüber der Weinproduktion anderer Länder zu einer Vertiefung und Auswertung der wissenschaftlichen Weinbauforschung zwingt, um die Ertragssicherung zu erhöhen, die Qualität des Weines zu verbessern, die Erzeugungskosten zu senken und das bestehende Preisgefälle abzubauen.

Im Forschungsring des Deutschen Weinbaues (FDW) haben sich Wissenschaftler mit Vertretern staatlicher Einrichtungen innerhalb der Bundesrepublik zur gemeinsamen Arbeit zusammengeschlossen. Der FDW ist der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) als übergebietlicher neutraler Institution angegliedert und organisatorisch verbunden.

Der FDW soll die weinbauliche Forschung auf dem Gesamtgebiet des Weinbaues und der Kellerwirtschaft intensivieren, rationalisieren und koordinieren sowie eine von staatlicher Lenkung freie wissenschaftliche Gemeinschaftsarbeit fördern, vordringliche Forschungsaufgaben finanzieren, deren Ergebnisse der Öffentlichkeit bekannt machen und für die Praxis auswerten, Fühlung mit den Forschungsgremien anderer verwandter Wissenschaften des In- und Auslandes aufnehmen und die Zusammenarbeit mit ausländischen Forschungsgruppen im Hinblick auf die wirtschaftliche Vereinigung Westeuropas vorbereiten und ermöglichen.

Der FDW besteht aus dem Forschungsausschuss und den Arbeitskreisen. Die Arbeitskreise werden von Federführenden geleitet. Der Forschungsausschuss setzt sich aus den Federführenden, den Weinbaureferenten des Bundes und der Länder und dem Vorsitzenden des Ausschusses für Weinbau der DLG zusammen. Diese wählen den Vorsitzenden des Ausschusses. Die Geschäftsführung liegt bei der Abteilung für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der DLG. Die beim Ministerium für Landwirtschaft, Weinbau und Forsten von Rheinland-Pfalz bereits vor der Gründung bestehenden Arbeitskreise wurden 1962 übernommen und auf eine breitere Arbeitsgrundlage durch Aufnahme von Mitarbeitern aus Instituten und Lehranstalten der Länder Baden-Württemberg, Bayern und Hessen gestellt. Die laufenden Forschungsarbeiten wurden weiter finanziert und neue hinzugenommen. Seit der Gründung wurden bis zum 31. Dezember außer kleineren Sitzungen folgende Arbeitstagungen durchgeführt:

am 30. August bis 01. September 1961 in Neustadt a.d.W.,
am 02. bis 04. Mai 1962 in Bad Kreuznach,
am 15. bis 17. Mai 1963 in Freiburg i.Br. und
am 04. Dezember 1962 eine öffentliche Vortragstagung in Mainz.

Auf den Arbeitstagungen wird jeweils über den Stand der Forschungsarbeiten und über wichtige Probleme berichtet und diskutiert. In der alle zwei Jahre stattfindenden öffentlichen Vortragstagung wird über einige abgeschlossene, die Allgemeinheit interessierende Forschungsthemen berichtet.

Im vorliegenden Heft werden die Zusammenfassungen der Jahresberichte mit Hinweisen über die Veröffentlichung der finanzierten Forschungsarbeiten aus dem Jahre 1963 bekanntgegeben und damit erstmals eine in Zukunft jährliche Veröffentlichung aufgenommen, um einen größeren Kreis über die Tätigkeit des Forschungsringes in Kenntnis zu setzen.

Frankfurt a.M., im Dezember 1964

Der Vorsitzende des Forschungsringes
gez. Dr. F. Renz †

Mitglieder des Forschungsausschusses

Caspary, Helmut	Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten, Rheinland-Pfalz, Mainz
Maltzahn, Joachim-Eberhard	Hessisches Ministerium für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Wiesbaden
Schultz, Dir. und Prof. Dr., Hans. R	Hochschule Geisenheim University
Oberhofer, Dr., Jürgen	Dienstleistungszentrum Rheinpfalz, Neustadt a.d.W.
Schwarz, Prof. Dr., Hans-Peter	Hochschule Geisenheim University
Köble, Min. Dirig., Otto	Ehrenvorsitzender, Saulheim
Löhnertz, Prof. Dr., Otmar	Hochschule Geisenheim University
Louis, Dr., Friedrich	Dienstleistungszentrum Rheinpfalz, Neustadt a. d. W.
Mend, Dr., Matthias	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, München
Rauhut, Prof. Dr., Doris	Hochschule Geisenheim University
Rühl, MR, Dr., Konrad	Ministerium für ländlichen Raum, Baden-Württemberg, Stuttgart
Töpfer, Direktor und Prof. Dr., Reinhard	Julius-Kühn-Institut (JKI), Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen
Köhler, Dr., Michael	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
Haupt, Dr., Dirk	Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten, Rheinland-Pfalz, Mainz
Schonebeck, Heidy	DLG e. V., Geschäftsführung, Frankfurt am Main

Untersuchungen zur Emission von Lachgas und anderen klimarelevanten Gasen im Weinbau in Abhängigkeit von der mineralischen Stickstoffdüngung und vom Bodenbewirtschaftungssystem

M. Sc. Yvonne Lehmann, Prof. Dr. O. Löhnertz

Hochschule Geisenheim University, Zentrum für Angewandte Biologie, Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung, Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim

1 Einleitung

Seit einigen Jahren befasst man sich bei der Produktion von Wein mit der Berechnung des CO_2-Fußabdrucks. Die Bedeutung der Lachgasverluste in CO_2-Äquivalenten wird dabei nicht berücksichtigt. Die Untersuchungen der direkten CO_2-Verluste und der N_2O-Verluste sollen daher dazu beitragen, die Berechnung des CO_2-Fußabdruckes für die Produktion von Wein zu verbessern.

Umweltschonender Weinbau erfordert den gezielten Einsatz von Produktionsmitteln und eine ständige Verbesserung der Anbauverfahren. Dabei bleibt die Optimierung der Nährstoffversorgung der Trauben, insbesondere die Stickstoffversorgung, ein Kernproblem der Pflanzenernährung im Weinbau. In der Vergangenheit wurde mit weit überhöhten Stickstoffgaben von 200 - 300 kg N/ha versucht die Aufnahme durch ein hohes Angebot zu gewährleisten. In den Folgejahren führten zunehmende Umweltprobleme - insbesondere ein erhöhter Nitrataustrag aus weinbaulich genutzten Flächen - und ein steigendes Umweltbewusstsein zu einer dramatischen Reduzierung der Stickstoffaufwandmengen. Langjährige Düngungsversuche im Weinbau weisen auf eine geringe Stickstoffausnutzung durch die Rebe hin. Dies gilt sowohl für die physiologische Effizienz (PE = Traubenertrag/Aufnahme aus Dünger) als auch für die Aufnahme Effizienz (RE = N-Aufnahme/Düngermenge). Während die Verluste an Nitrat im Weinbau umfangreich untersucht wurden, bestehen große Unsicherheiten hinsichtlich des Umfangs an Verlusten gasförmiger N-Verbindungen im Weinberg. Dabei stehen die Verluste in Form von Lachgas (N_2O) im Vordergrund. Die weltweiten jährlichen N_2O-N-Emissionen werden im IPCC-Bericht von 2007 auf etwa 6.7 Mio. t geschätzt (IPCC, 2007).

Als eine der Hauptquellen von Lachgasemissionen wird die mikrobielle Umsetzung von Stickstoffverbindungen in Böden und damit die Stickstoffdüngung angesehen. Der Umfang an Verlusten von N_2O wurde in land- und forstwirtschaftlichen Systemen umfangreich untersucht. Im Weinbau ist die Erfassung von Lachgasverlusten in unterschiedlich mit Stickstoff versorgten Anlagen, bzw. Weinbergen, ein wesentlicher Beitrag zur Verbesserung der Stickstoffeffizienz bzw. Verringerung der Umweltbelastung. Erste Ergebnisse gibt es mit einem Versuch aus dem Traisental in Österreich, in dem8 ein Anstieg der Verluste durch die mineralische Stickstoffdüngung nachgewiesen wurde (Soja et al., 2010).

2 Versuchsaufbau

Die Durchführung der geplanten Untersuchungen findet in einem etablierten Stickstoff-Langzeitversuch bei Schloss Vollrads statt. In dem mit vier Feldwiederholungen randomisiert angelegten Dauerversuch wird seit 1984 sowohl die Höhe (Null bis 150 kg N/ha) als auch der Zeitpunkt (Austriebsdüngung, Nachblütedüngung) der mineralischen Stickstoffdüngung variiert (Abb. 1). Seit Anlage des Versuchs wird ein konstantes Bodenpflegesystem realisiert: eine begrünte Reihe wechselt mit einer Reihe Dauerbegrünung ab (Abb. 2). Dadurch können stark differenzierte Kohlen- und Stickstoffgehalte im Boden festgestellt werden. Diese führen zu einem differenzierten Ertragsverhalten, Einlagerung

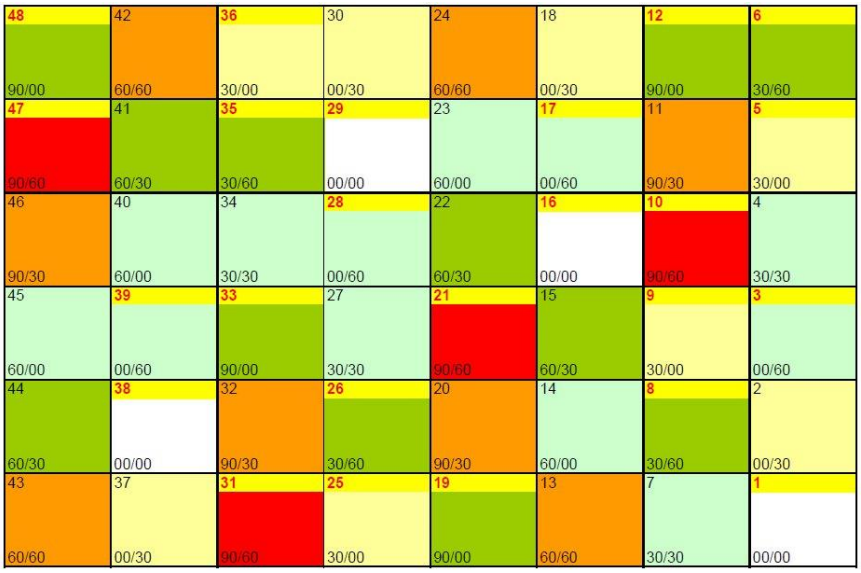


Abb. 1: Versuchsglieder und Randomisation des Langzeitstickstoffversuches; Lage: Schloss Vollrads, Rheingau; Sorte: Riesling; Versuchsbeginn 1984, Legende: 0/0= ungedüngt; 90/60= 90 kg N/ha zum Austrieb/60 kg N/ha Nachblütedüngung

an hefeverwertbarem Stickstoff, Befall mit *Botrytis cinerea* (Linsenmeier & Löhnertz, 2006; Linsenmeier, 2007), aber auch zu einem deutlich unterschiedlichen Aufwuchs der einjährigen Begrünungspflanzen.

In diesem Versuch kann damit der Einfluss der N-Düngung, des Bodenpflegesystems und der jeweiligen Wechselwirkungen ermittelt werden. Außerdem kann der Einfluss der Mineraldüngung hinsichtlich der Verluste an klimarelevanten Gasen untersucht werden.

3 Bisherige Arbeiten

3.1 Methodische Arbeiten

Für die Erfassung klimarelevanter Gasverluste aus dem Boden wurde ein System erprobt und im Freiland installiert. In den beschriebenen Versuchen wird der Verlust an klimarelevanten Gasen erfasst. Hierzu wird mit Hilfe von gasdicht verschlossenen Versuchsgefäßen, (in Abänderung von der Antragstellung wurden Kammern aus Edelstahl gebaut und eingesetzt) mit einer Grundfläche von 40 cm x 40 cm und unterschiedlicher Höhe, aus dem Boden entweichendes Gas erfasst. Die Messung erfolgt direkt im Weinberg mit Hilfe eines photoakustischen Messverfahrens, welches die Messungen im infraroten Bereich durchführt (Fa. Innova AirTech instruments). Dieses System erlaubt eine kontinuierliche Gasmessung, da keine Gasgewinnung notwendig ist und bis zu 12 Kammern angeschlossen werden können.
Es werden 9 Kammern gleichzeitig zur Gaserfassung eingesetzt.

Abb. 2: Aufwuchs an *Phacelia sp.* in den bearbeiteten Flächen in Abhängigkeit von der langjährigen N-Düngung; Oktober 2010. Oben: Parzelle 38: ohne Stickstoff seit 1984; Unten links: Übergang Parzelle 38 zu Parzelle 39 (60 kg N/ha nach der Blüte); Unten rechts: Parzelle 41 (60 kg N/ha nach dem Austrieb; 30 kg N/ha nach der Blüte)(Fotos Winfried Schönbach)

Dauer der Gaserfassung: In umfangreichen Messreihen wurde der zeitliche Verlauf der Gaserfassung untersucht um neben den Konzentrationen auch Gasflüsse erarbeiten zu können. Dabei hat sich eine Messung im 15-minütigen Abstand als sinnvoll erwiesen. Es wird in der Regel nach dem Wert der Umgebungsluft nach 15, 30, 45 und 60 Minuten (in Ausnahmefällen) gemessen.
Mitte des Jahres 2012 wurden 18 zusätzliche Rahmen auf der Fläche eingebaut, sodass eine bessere räumliche Auflösung der Gasemissionen ermöglicht wird. Es sind somit je-

weils drei Kammern pro Parzelle in einer unbegrünten Zeile eingebaut. Untersucht werden innerhalb des Mineraldüngeversuchs 9 Parzellen mit jeweils drei Parzellen je Düngestufe (0 kg N/ha/Jahr, 60 kg N/ha/Jahr und 150 kg N/ha/Jahr).
Für die Berechnung der Gasflüsse aus den gemessenen Konzentrationen wird die Steigung der Regressionsgeraden ermittelt. Alle Kammermessungen ohne linearen Anstieg über die Zeit, oder einem Bestimmtheitsmaß (R^2) unter 0.8 werden verworfen. Die Formel zur Berechnung der Gasflüsse ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden (ΔC), dem Zeitintervall der Messung (Δt), sowie dem Volumen (V) und der Grundfläche (A) der Messkammer. Der Gasfluß wird an die vorherrschenden Bodentemperaturen (T) und den Luftdruck (p) angepasst (Gl. 1).

$$F = \frac{\Delta C}{\Delta t} * \frac{V}{A} * MG * 10^{y} * \frac{(p*100)}{(R*T)} \qquad (1)$$

Das Molekulargewicht (MG) von Kohlenstoffdioxid bzw. Distickstoffmonoxid wird in mg bzw. µg umgerechnet, um die jeweilige Einheit beim Gasfluß zu erhalten.
Da es im Laufe der Messungen wiederholt zu erhöhten Konzentrationen bei den Anfangswerten gekommen ist, wurde eine Korrektur der Berechnung der linearen Regression durchgeführt. Dabei wurde der erste Wert der Messung verworfen und durch den Messwert nach einer Minute Akkumulationszeit ersetzt. Eine mögliche Problemquelle kann der Anwender sein, da die Deckel der Kammer erst bei hörbarem Einsaugen des Gases geschlossen werden. Es kann auch sein, das durch die Bewegungen in unmittelbarer Umgebung der Kammer, mit der Luft Gas mit erhöhten Konzentrationen transportiert wird. Diese Einflüsse sind nicht immer vermeidbar.

3.2 Bodenpflegesystem

Die Adaption des Messverfahrens wurde in einem Systemvergleich der Forschungsanstalt Geisenheim durchgeführt. Dabei wurde insbesondere der Effekt der Bodenbearbeitung als Einflussgröße beachtet.

3.3 Mineraldüngeversuch

Die Düngung hat einen starken Effekt auf die Höhe der CO_2-Emissionen. Es wurde beobachtet, dass in gedüngten Flächen besonders während der Wachstumsphase (Juni-September) erhöhte CO_2-Verluste gegenüber ungedüngten Flächen auftraten (Ding et al., 2007; Shahidi et al., 2014). Dies zeigte sich auch auf den untersuchten Flächen, dass die über knapp 30 Jahre ungedüngten Flächen eine sichtbar geringere Emission aufwiesen, als die mit 150 kg/ha/Jahr gedüngten Flächen.
Auffällig bei den CO_2-Emissionen im Untersuchungszeitraum war der ausgeprägte Jahresgang. In den Sommermonaten wurde deutlich mehr CO_2 aus dem Boden abgegeben als in den Wintermonaten. Auch außerhalb der Vegetationsperiode wurde eine CO_2-Emission beobachtet, was für die Durchführung von ganzjährigen Messungen spricht (Brooks et al., 2005; Fang & Moncrieff, 2001; Han et al., 2012).
In den durchgeführten Messungen im Langzeitdüngeversuch wurde ein erhöhter N_2O-Fluss mit zunehmender Düngermenge festgestellt, aber insgesamt gab es nur nach einer Bodenbearbeitung und nach einem Niederschlagsereignis im Sommer 2013 eine deutli-

che Erhöhung der Werte besonders in der hochgedüngten Variante. Es konnte aber kein klarer Zusammenhang mit der applizierten Düngermenge in den untersuchten Standorten ermittelt werden. Velthof & Oenema (1995a,b) haben eine Erhöhung des N_2O-Flusses nach der Düngerapplikation für ein bis zwei Wochen beobachten können. Dies wurde auch im Jahr 2012 beobachtet. In diesem Jahr wurde eine erhöhte N_2O-Emission eine Woche nach Bodenbearbeitung und Düngung ermittelt.
Zur Abschätzung der jährlichen Gasverluste in Abhängigkeit von der Düngermenge wurde für den Zeitraum zwischen zwei Messterminen die Emission nach Gleichung 2 interpoliert.

$$y = y_1 + \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \qquad (2)$$

Durch diese Berechnung wurde für jeden Tag der drei Messjahre ein Wert für die Emission von CO_2 und N_2O ermittelt. Mit Hilfe dieser Werte ließen sich jährliche Summen für die Emission berechnen (Abb. 3). Im Jahr 2011 wurden deutlich geringere Summen ermittelt, da in diesem Jahr mit der Messung auf der Versuchsfläche begonnen und daher nur Daten ab September gesammelt werden konnten. Insgesamt wurde wieder die bekannte Abstufung zwischen den verschiedenen Düngestufen sichtbar. Bei der CO_2-Emission

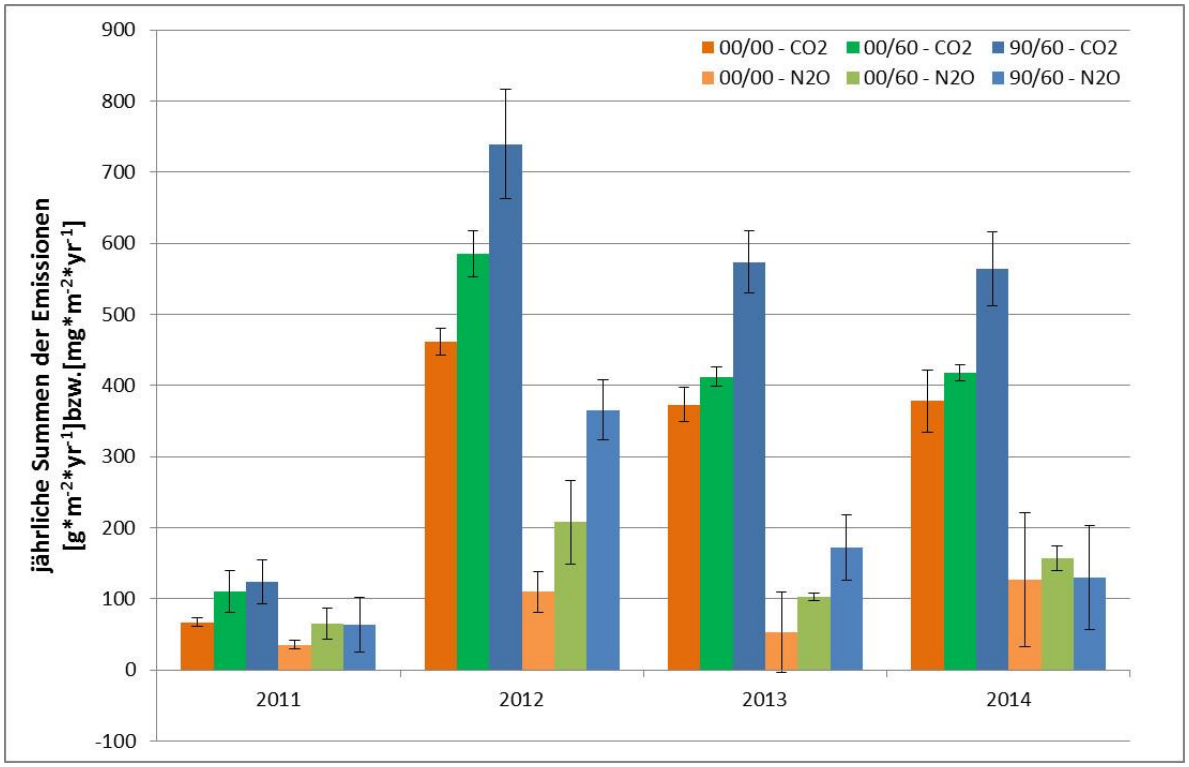


Abb. 3: Jährliche Summen der CO_2- und N_2O-Emissionen in Abhängigkeit von der langjährigen Mineraldüngergabe für die Untersuchungsjahre

wurde die höchste jährliche Emission in der Variante mit 150 kg N/ha/Jahr im Jahr 2012 berechnet. Mit der zunehmenden Düngermenge wurde auch die N2O-Emission gesteigert. Allerdings wurde im Jahr 2014 die größte Jahressumme für die mittlere Düngestufe

berechnet.
Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass es durch die Zufuhr von stickstoffhaltigem Dünger zu einem gesteigerten Ausstrom der klimarelevanten Spurengase CO_2 und N_2O kommt. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Jahren gefunden ($p < 0.05$), die verdeutlichen, dass die klimatischen Einflüsse während des Jahres eine wichtige Rolle spielten.
Viele der durchgeführten Messungen von klimarelevanten Spurengasen wurden bisher in landwirtschaftlichen Systemen, Grünländern, oder FACE-Anlagen durchgeführt. Nur wenige Studien sind bisher in weinbaulich genutzten Anlagen durchgeführt worden. Die hier ermittelten Ergebnisse bestätigen die hohe räumliche und zeitliche Variabilität der CO_2- und besonders auch der N_2O-Emissionen (Firestone & Davidson, 1989, zitiert in Velthof & Oenema (1995a)). Die Höhe der Gasemissionen wird hauptsächlich durch die Faktoren Düngermenge, Bodenbewirtschaftung und klimatische Verhältnisse beeinflusst. Dabei spielen auch die Art des Düngers (Clayton et al., 1997) und die Art der Applikation (Garland et al., 2014) eine wichtige Rolle. Durch eine an die pflanzliche Aufnahme angepasste bzw. tief platzierte Düngung können zusätzliche Emissionen aus dem Boden reduziert werden, da die Nutzungseffizienz des Düngers erhöht wird.

Literatur

Brooks, P. D., McKnight, D., & Elder, K. (2005). Carbon limitation of soil respiration under winter snowpacks: potential feedbacks between growing season and winter carbon fluxes. *Global Change Biology*, 11(2), 231-238.

Clayton, H., McTaggart, I. P., Parker, J., Swan, L., & Smith, K. A. (1997). Nitrous oxide emissions from fertilised grassland: A 2-year study of the effects of N fertiliser form and environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 25(3), 252-260.

Ding, W., Meng, L., Yin, Y., Cai, Z., & Zheng, X. (2007). CO2 emission in an intensively cultivated loam as affected by long-term application of organic manure and nitrogen fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 669-679.

Fang, C. & Moncrieff, J. B. (2001). The dependence of soil CO2 efflux on temperature. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(2), 155-165.

Firestone, M. K. & Davidson, E. A. (1989). Microbiological basis of NO and N2O production and consumption in soil. In M. O. Andreae, D. S. Schimel, & G. P. Robertson (Eds.), *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*, volume 47 of *Dahlem workshop reports* (pp. 7-21). Chichester and New York: Wiley.

Garland, G. M., Suddick, E., Burger, M., Horwath, W., & Six, J. (2014). Direct N2O emissions from a Mediterranean vineyard: Event-related baseline measurements. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 195, 44-52.

Han, G., Yu, J., Li, H., Yang, L., Wang, G., Mao, P., & Gao, Y. (2012). Winter Soil Respiration from Different Vegetation Patches in the Yellow River Delta, China. *Environmental Management*, 50(1), 39-49.

IPCC (2007). Climate Change 2007: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

Linsenmeier, A. (2007). *Einfluss der Stickstoffversorgung der Rebe (Vitis vinifera L. v. riesling) auf den untypischen Alterungston*. PhD thesis, Justus Liebig Universität Gießen, Geisenheim.

Linsenmeier, A. & Löhnertz, O. (2006). Einfluss von Stickstoffdüngung auf Wuchs, Ertrag, Most- und Weinqualität der Sorte 'Riesling' in einem zwanzigjährigen Langzeitversuch I: Vom Boden zum Blatt. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 56, 199-212.

Shahidi, B., Dyck, M., & Malhi, S. (2014). Carbon dioxide emissions from tillage of two long-term no-till Canadian prairie soils. *Soil and Tillage Research*, 144, 72-82.

Soja, G., Zehetner, F., Rampazzo-Todorovic, G., Schildberger, B., Hackl, K., Hofmann, R., Burger, E., Grünberger, S., & Oman, I. (2010). Weinbau im Klimawandel: Anpassungs- und Mitigationsmöglichkeiten am Beispiel der Modellregion Traisental.

Velthof, G. L. & Oenema, O. (1995a). Nitrous oxide fluxes from grassland in the Netherlands .1. Statistical analysis of flux-chamber measurements. *European Journal of Soil Science*, 46(4), 533-540.

Velthof, G. L. & Oenema, O. (1995b). Nitrous oxide fluxes from grassland in the Netherlands .2. Effects of soil type, nitrogen fertilizer application and grazing. *European Journal of Soil Science*, 46(4), 541-549.

Untersuchung der phänotypischen und genetischen Varianz innerhalb der Art *Vitis berlandieri* Planchon

Sonja Grundler, Prof. Dr. Joachim Schmid

Institut für Rebenzüchtung, Zentrum für Angewandte Biologie, Hochschule Geisenheim

Hintergrund

Durch die Einführung von Unterlagen aus amerikanischen Wildreben Ende des 19. Jahrhunderts konnte man die Reblaus auf biologische Weise sehr gut bekämpfen. Die amerikanischen Wildrebenarten gerieten nun durch ihre Rolle als Unterlagen verstärkt in das Interesse der Forschung:

Langjährige Untersuchungen zeigten, dass die meisten Wildarten zwar eine ausreichend gute Reblaustoleranz zeigen, aber teilweise sehr unterschiedliche Charakteristika aufweisen, die sich mehr oder weniger stark auf ihre Eignung als Unterlage auswirken.

So zeichnet sich *Vitis riparia* durch eine gute Bewurzelungsfähigkeit, hohe Frostfestigkeit und eine kurze Vegetationsperiode aus, hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr kalkempfindlich ist. Da die europäischen Böden einen teilweise sehr hohen Kalkgehalt aufweisen (wie beispielsweise die traditionellen deutschen Kalkstandorte in der Pfalz, in Rheinhessen und im Rheingau), führt dies zu Problemen mit Chlorose.

Als vielversprechender Kreuzungspartner diesbezüglich hat sich die Wildart *Vitis berlandieri* erwiesen, da sie unter den amerikanischen Wildrebenarten die höchste Kalkverträglichkeit aufweist. Nun hat auch diese Art zwei Schwächen. Sie benötigt für die Reife eine lange Vegetationsperiode und lässt sich nur sehr schlecht bewurzeln. Durch Kreuzungen von *V. berlandieri* mit gut bewurzelbaren Arten, wie *V. riparia* oder *V. rupestris* (Schmid et al., 2009b), entstanden Unterlagen-Sorten, wie beispielsweise “Ruggeri 140“ oder “Kober 5BB“, die bei ausreichender Bewurzelung eine gute Kalktoleranz aufweisen.

Es ist zu vermuten, dass die für die Züchtung verwendeten *V. berlandieri* aus einem nur sehr geringen Genpool stammen. Damals wurden nur wenige *V. berlandieri* -Pflanzen überhaupt in der europäischen Unterlagenzüchtung eingesetzt. So ist anzunehmen, dass die genetische Bandbreite und damit auch die phänotypischen Ausprägungen der *V. berlandieri* –Art weit größer bzw. vielfältiger ist, als bisher aufgrund des verwendeten engen Genpools bekannt ist.

Um die Möglichkeit zu schaffen, diese genetische/phänotypische Vielfalt einmal näher eruieren zu können, wurde 2005 *V. berlandieri*-Material in deren natürlichem Verbreitungsgebiet in Zentraltexas gesammelt und hier in Geisenheim ausgepflanzt (Schmid et al., 2009a).

Das gesammelte Material stammt aus unterschiedlichen geographischen Standorten in Texas. Die Population in Geisenheim setzt sich somit aus mehreren Familien zusammen, die jeweils die Nachkommenschaft einer Mutterrebe umfassen. Für dieses Projekt wurden 21 Familien ausgewählt.

Untersuchungen zur phänotypischen Variabilität:

Zur Bestimmung der phänotypischen Variabilität wurden alle Mitglieder der ausgesuchten 21 Familien anhand 16 ampelographischer Merkmale an Triebspitze und Blatt im Feld bonitiert. Eine endgültige statistische Auswertung der erhobenen 34.000 Daten wird bis Sommer 2015 erfolgen.

Da die Bewurzelungsfähigkeit eines der beiden Schwachpunkte der *V. berlandieri* aus züchterischer Sicht ist, wurde auch dieses physiologische Merkmal näher untersucht. Nach den bereits 2011-2013 untersuchten 9 Familien wurden 2014 nochmals 3 weitere Familien getestet. Hier konnten zwar ebenfalls Unterschiede beobachtet werden, jedoch fallen diese hier eher gering aus (Abb.1). Der Anteil der gut bewurzelnden Stecklinge (3=grün) mit 21% bei PC, 24% bei SH und 27% bei MR liegt nicht weit auseinander. Betrachtet man jedoch das Verhältnis von Stecklingen mit guter Wurzelbildung (3=grün) und fehlender Wurzelbildung (0=rot), zeigt Familie MR gegenüber den beiden anderen Familien SH und PC ein besseres Verhältnis.

Eine endgültige Aussage über die Unterschiede in der Bewurzelungsfähigkeit lässt sich allerdings erst nach der statistischen Gesamtauswertung treffen.

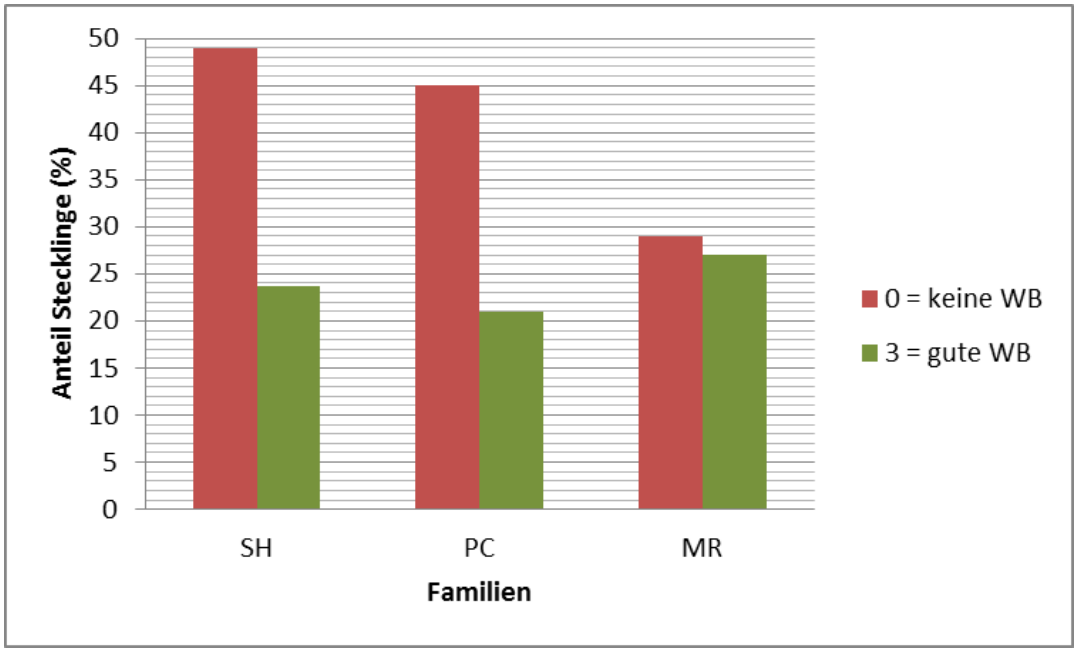


Abb. 1: Vergleich der Bewurzelungsfähigkeit zwischen 3 *Vitis berlandieri* -Familien
gezeigt ist der Anteil der Stecklinge (%) innerhalb der jeweiligen Familie (SH, PC und MR) mit guter Wurzelbildung (grün) und schlechter Wurzelbildung (rot).

Untersuchung der genetischen Variabilität:
Aufgrund der großen Gesamtprobenzahl (ca. 2.120 Reben) und der stark unterschiedlichen Individuenzahl der Familien (zwischen 26 und 211), wurden für die genetischen Untersuchungen aus jeder der 21 *V. berlandieri* –Familien 23 Stichproben ausgewählt. Insgesamt 556 Rebstöcke (483 *V. berlandieri* und 73 diverse Wildreben) fließen in die durchgeführte Mikrosatellitenanalyse ein.
Das Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof des JKI in Siebeldingen verwendet bereits in der Routine für seine SSR-Analysen verschiedene Multiplex-Sets (u.a. nach Laucou et al., 2011). Aus diesem Panel wurden nun 6 Multiplex-Sets zu jeweils 4-5 Mikrosatellitenmarker ausgewählt. Aufgrund unterschiedlicher technischer Gegebenheiten wurden jedoch einige Marker ausgetauscht (Liste der verwendeten Marker siehe Tab.1) und die Protokolle geringfügig verändert.

Tab.1: Liste der verwendeten Mikrosatelliten-Marker:

Marker	Repeat	Chromosom	Quelle
VMC1B11	AAG	8	*V.vinifera*
VMC4f3.1	CT	12	*V.vinifera*
VRZAG12	GA	?	*V. riparia*
VRZAG62	GA	7	*V. riparia*
VRZAG67	TC	10	*V. riparia*
VRZAG79	GA	5	*V. riparia*
VVIB01	(CT)(GA)	2	*V.vinifera*
VVIH54	CT	13	*V.vinifera*
VVIN16	CT	18	*V.vinifera*
VVIN73	(CA)(GA)	17	*V.vinifera*
VVIP31	GA	19	*V.vinifera*
VVIP60	GA	1	*V.vinifera*
VVIQ52	CT	9	*V.vinifera*
VVIV37	GA	10	*V.vinifera*
VVIV67	GA	15	*V.vinifera*
VVMD05	CT	16	*V.vinifera*
VVMD07	CT	7	*V.vinifera*
VVMD21	TC	6	*V.vinifera*
VVMD24	(GA)(TG)	14	*V.vinifera*
VVMD25	(TA)(GT)	11	*V.vinifera*
VVMD27	CT	5	*V.vinifera*
VVMD28	TC	3	*V.vinifera*
VVMD32	GA	4	*V.vinifera*
VVMD36	CT	3	*V.vinifera*
VVS02	(TC)(TA)	11	*V.vinifera*
VVS05	TG	6	*V.vinifera*

Die nach Beendigung der Fragmentanalyse erhaltenen 14.500 Rohdaten befinden sich aktuell in der Aufbereitung für die statistische Analyse.
Aber auch hier sind bereits erste Unterschiede in den Markerprofilen zwischen den Familien erkennbar.
Betrachtet man die beiden häufigsten Fragmentgrößen im Marker VRZAG79 am Beispiel von acht Familien (Abb.2), zeigt sich, dass die Verteilung sehr unterschiedlich ist. So weisen die drei Familien OK, RC und DH identische Fragmentlängen (251/253) auf, wohingegen die Familie TC zwei völlig andere Hauptfragmentlängen (247/257) besitzt (Bsp.1, linke Seite Abb.2). Die vier Familien AH, CA, PCH und SG3 hingegen haben nur das Fragment 251 gemeinsam, während das zweite Hauptfragment jeweils unterschiedlich ist (Bsp.2, rechte Seite Abb.2).

Die beiden häufigsten Fragmentlängen repräsentieren hier auch die beiden Mutterallele der jeweiligen Familienmitglieder. Jedoch sind solche Beobachtungen über Ähnlichkeiten innerhalb eines einzelnen Markers nur als vorsichtige evtl. Hinweise zu bewerten. Es müssen die gesamten genetischen Daten über alle 26 Marker hinweg für eine fundierte Aussage über die verwandtschaftliche Beziehung der Familien zueinander betrachtet werden.

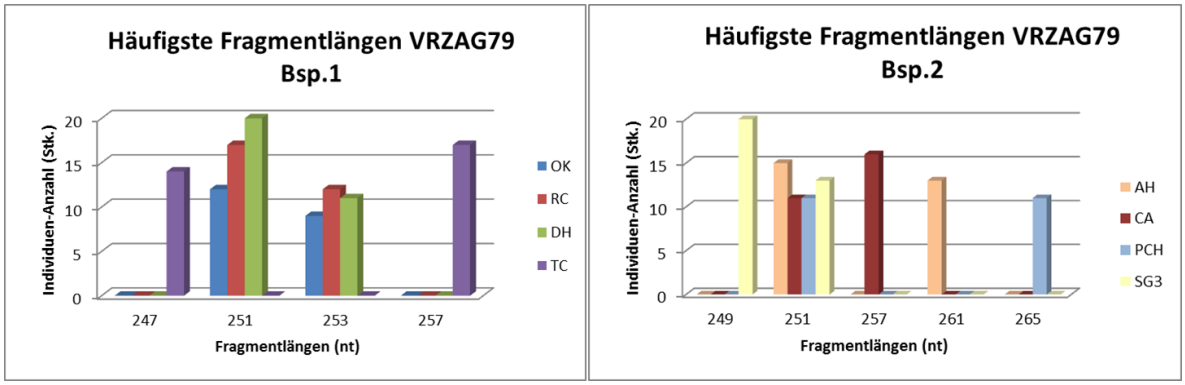


Abb.2: Häufigste Fragmentlängen VRZAG79
Auf der linken Seite (Bsp.1) zeigen die Familien OK (blau), RC (rot) und DH (grün) identische Fragmentlängen bei 251 nt und 253 nt. Familie TC (lila) hingegen weist völlig unterschiedliche Fragmentlängen bei 247 nt und 257 nt auf. Auf der rechten Seite (Bsp.2) sind vier weitere Familien (AH/orange, CA/bordeaux, PCH/hellblau und SG3/gelb) zu sehen, die zwar alle die Fragmentgröße 251 nt gemeinsam haben, das zweite Fragment jedoch jeweils unterschiedliche Größen aufweist.

Auch bezüglich der Anzahl der verschiedenen Fragmentgrößen, die bei den jeweiligen Markern gefunden wurden, sind deutliche Unterschiede zwischen den Familien zu erkennen. Bei VVMD24, ein Mikrosatellitenmarker mit allgemein vergleichsweise eher wenig Variabilität, zeigt die Familie CA nur zwei verschiedene Fragmentlängen (Abb.3, links). Im Gegensatz dazu ist bei Familie PC das 3-fache mit sechs verschiedenen Fragmentlängen zu beobachten (Abb.3, rechts).
Die größere Variabilität von Familie PC bzgl. der gefundenen Fragmentgrößen (die den Eltern-Allelen entsprechen) zeigt, dass in dieser Familie eine größere Anzahl unterschiedlicher Vaterreben beteiligt ist, als bei Familie CA.

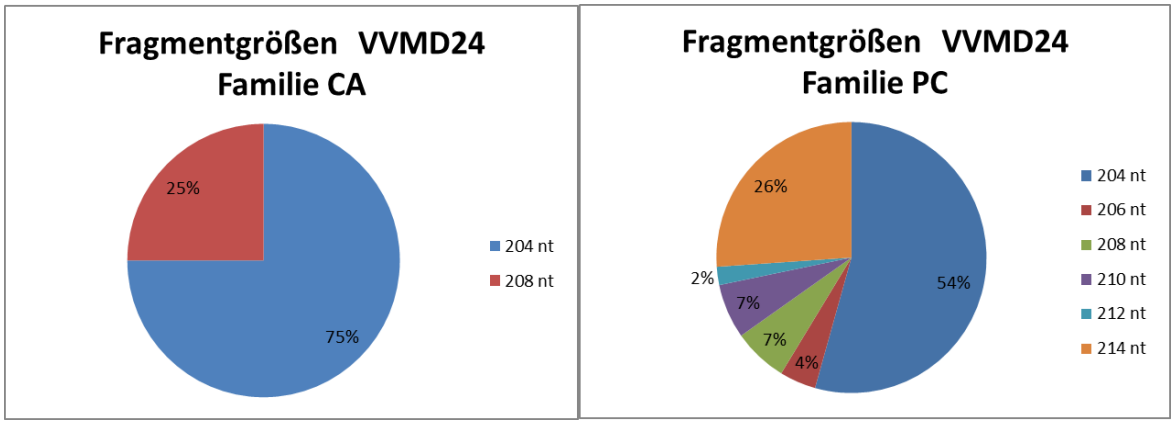


Abb.3: gefundene Fragmentgrößen VVMD24 bei Familie CA und PC
Bei Familie CA (links) konnten nur zwei verschiedene Fragmentgrößen (204nt und 208nt) gefunden werden. Bei Familie PC (rechts) zeigte sich mit sechs unterschiedlichen Fragmentgrößen (204nt; 206nt; 208nt; 210nt; 212nt und 214nt) wesentlich mehr Variabilität.

Die insgesamt in diesem Projekt erhobenen rund 58.000 Daten sind noch statistisch auszuwerten. Erst dann kann eine konkrete abschließende Aussage zur phänotypischen und genetischen Variabilität der untersuchten Geisenheimer *V. berlandieri*-Subpopulation gemacht werden. Das Ende des Projektes ist für den Sommer 2015 geplant.

Literatur

Babo, A. und **Mach**, E. (1923): Handbuch des Weinbaues.
4. Auflage Berlin,Parey, 1923

Branas, J. (1974): Viticulture. Montpellier: Dehan, 1974

Cousins, P. (2005): Evolution, genetics and breeding: Viticultural applications of the origins of our rootstocks. 2005 Rootstock Symposium. - Osage Beach, Missouri, Southwest Missouri State University, Mountain Grove Campus, Mid-American Viticulture and Enology Center

OIV, 2. Auflage der OIV Merkmalsliste für Rebsorten und *Vitis*-Arten

Pongracz, D.P. (1983): Rootstocks for Grape-vines, Verlag David Philip, Original von Cornell University

Rühl, E.H.; **Schmid**, J. (2010): Vitis-Wildformen für die Unterlagenzüchtung – Umsetzung & Nutzung i. d. Praxis; Mitteilungen Klosterneuburg 60 (2010): 382-386

Schmid, J.; Manty, F. and Cousins, P. (2009a): Collecting Vitis berlandieri from native habitat sites. Acta Horticulturae 827: 151-153

Schmid, J.; Manty, F.; Lindner, B. (2009b): Geisenheimer Rebsorten und Klone. Geisenheim, Forschungsanstalt Geisenheim.

Sefc, K.M.; Regner, F.; Turetschek, E.; Glössel, J.; Steinkeller, H. (1999)**:** identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome 42: 367-373

Identifizierung von „Qualitäts“-Chromosomen in Vitis zur Frühdiagnose von Weinqualität

Franziska Huber, Florian Schwander, Rudolf Eibach, Reinhard Töpfer

Julius Kühn-Institut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, 65366 Siebeldingen

Projektlaufzeit: 01.09.2013 bis 30.09.2016
Berichtzeitraum: 01.02.2014 bis 31.01.2015

Nordamerikanische Wildreben, wie z.B. *Vitis labrusca*, sind wichtige Donoren für Pathogenresistenzen in der Rebenzüchtung. Bei der Kreuzung mit der europäischen Kulturart *V. vinifera* werden jedoch neben den Resistenzen oftmals Qualitätseigenschaften und bestimmte Aromastoffe vererbt, die im Wein nicht erwünscht sind. Die dadurch notwendigen Rückkreuzungsschritte und die Zeitspanne bis zur jeweiligen ersten Fruchtbildung (drei bis vier Jahre) verzögern die Entwicklung von Neuzüchtungen erheblich. Um das Zuchtprogramm zu beschleunigen und zu optimieren, werden zwischenzeitlich bereits moderne, molekulare Techniken wie die Marker-gestützte Selektion (MAS – „**M**arker **A**ssisted **S**election“) genutzt. Bisher beschränkt sich der routinemäßige Einsatz genetischer Marker jedoch v.a. auf die Frühselektion von Resistenzeigenschaften gegenüber den wichtigsten Pathogenen der Weinrebe. Im Rahmen dieses Projektes sollen auch im Hinblick auf die Weinqualität, speziell in Bezug auf unerwünschte Aromakomponenten, molekulare Marker zur Frühselektion entwickelt werden.
In *V. labrusca* wurden bereits sortenspezifische Aromastoffe beschrieben, die für den charakteristischen sog. Hybrid- bzw. „Foxton“ verantwortlich sein sollen. Dazu zählt Methylanthranilat als der Leitaromastoff des sog. „Mottenkugel“-Tons (Power and Chesnut 1921, Wang and Luca 2005). *Seine* Biosynthese in Pflanzen beginnt stets ausgehend von Anthranilsäure - einem Zwischenprodukt des Shikimisäure-Synthesewegs, der auch u.a. für die Synthese von aromatischen Aminosäuren verantwortlich ist (Köllner, Lenk et al. 2010). Weder Anthranilsäure noch Methylanthranilat kommen in den zu der Art *V. vinifera* gehörenden traditionellen, europäischen Rebsorten vor (Wang and Luca 2005).
Für die Untersuchungen wurde die Kreuzungspopulation aus `Lemberger´ und der Labrusca-Hybriden `Catawba´ herangezogen. Die Analyse des Mostes in den Jahren 2011 bis 2013 zeigte eine Segregation des Methylanthranilats in der Kreuzungsnachkommenschaft. Die Analysedaten wurden mit der parallel erstellten SSR-Kopplungskarte für eine QTL-Berechnung genutzt.
Aus den QTL-Berechnungen resultierte ein Haupt-QTL auf Chromosom 4 (Abb. 1). In diesem Bereich befindet sich das Gen GSVIVT01018916001, das eine hohe Ähnlichkeit zum Anthranilsäure-Methyltransferase-Gen *aamt1* aus Mais aufweist. In Mais und anderen Pflanzen ist dieses Enzym für die Methylanthranilat-Biosynthese verantwortlich. Dort ist die Methylanthranilat-Produktion eine Folge von Fraßschäden und wahrscheinlich an der Pflanzenabwehr zur Anlockung von natürlichen Feinden der Herbivoren beteiligt (Köllner, Lenk et al. 2010).

Für die Sorte `Concord´ wurde die Alkohol-Acyltransferase AMAT als Schlüsselenzym im Syntheseweg beschrieben. In `Concord´ nehmen der Gehalt an Anthranilsäure und Methylanthranilat in den Beeren, sowie die AMAT-Enzymaktivität mit zunehmendem Reifegrad stetig zu (Wang and Luca 2005). Ein analytischer Vergleich von `Catawba´ und `Concord´ zeigte, dass der Methylanthranilat-Gehalt in `Concord´ fast 100-mal höher ist (Quantifizierung mittels GC-MS). Auch sensorisch ist der sog. Mottenkugel-Ton bei der Sorte `Concord´ deutlich stärker wahrnehmbar. Die Sorte `Concord ist ein Nachkomme von `Catawba´ und einer V. labrusca-Akzession. `Catawba´ wiederum stammt von der Vinifera-Sorte `Sémillon´ und ebenfalls einer Labrusca-Akzession ab (Abb. 2). Aus den Untersuchungen kann man schließen, dass der Einfluss des zweiten Labrusca-Elternteils in dieser Abstammungslinie für den höheren Gehalt in `Concord´ verantwortlich ist und es dort offensichtlich einen anderen und/oder einen zusätzlichen Stoffwechselweg gibt, der zur (stärkeren) Produktion von Methylanthranilat führt.

Chromosom 04

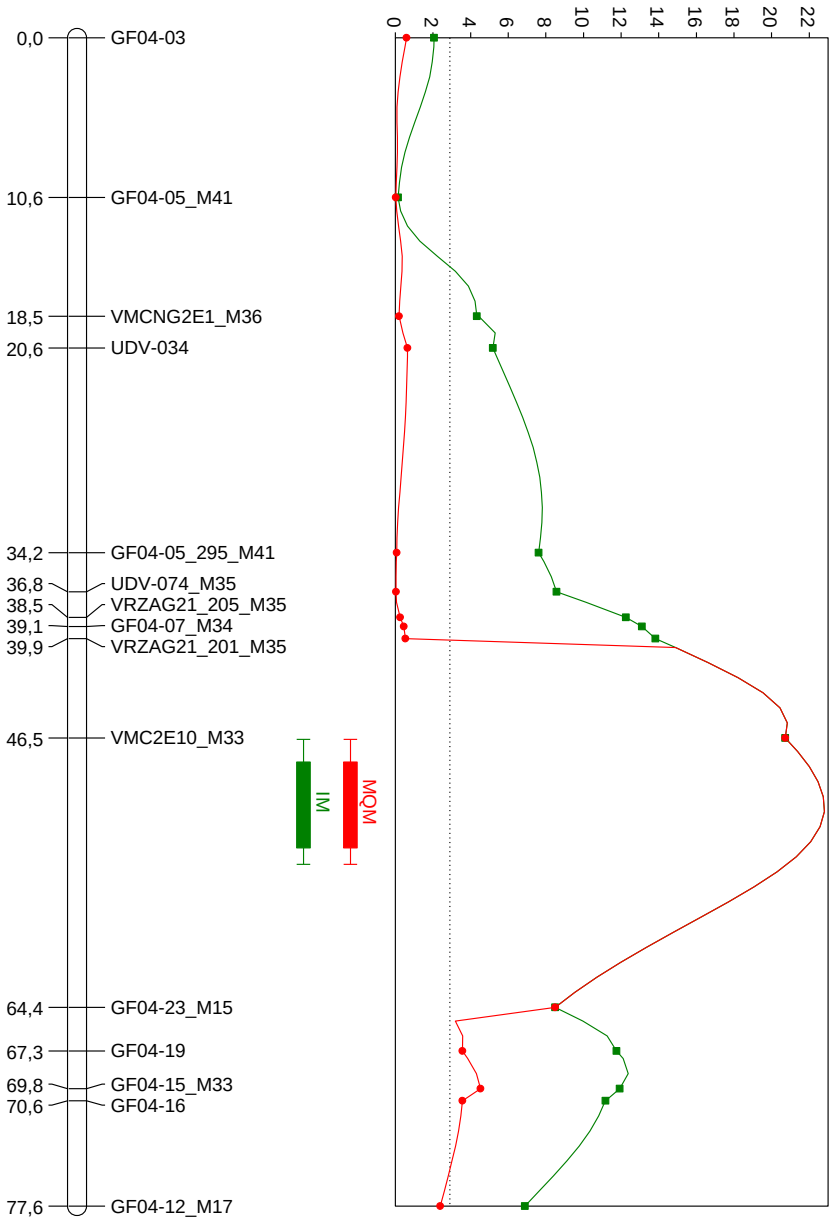


Abb. 1 Die QTL-Analyse der `Lemberger´ x `Catawba´-Population für die Methylanthranilat-Gehalte im Most resultierte in einen Haupt-QTL auf Chromosom 4. Die phänotypischen Daten der Jahre 2011 bis 2013 wurden als Methylanthranilat vorhanden (= 1) oder nicht vorhanden (= 0) ab einer Konzentration von 0,5 µg/L kodiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlich verteilten Daten wurden die Messdaten standardisiert und die resultierenden Z-Werte in fünf Klassen eingeteilt: Z < -0,33 = 1, Z < -0,25 = 3, Z ≤ 0 = 5, Z < 2 = 7 und Z > 2 = 9. Der LOD-Wert beträgt 22,8 und er erklärt 59,9% der genetischen Varianz. IM = **I**nterval **M**apping, MQM = **M**ultiple **Q**TL **M**apping.

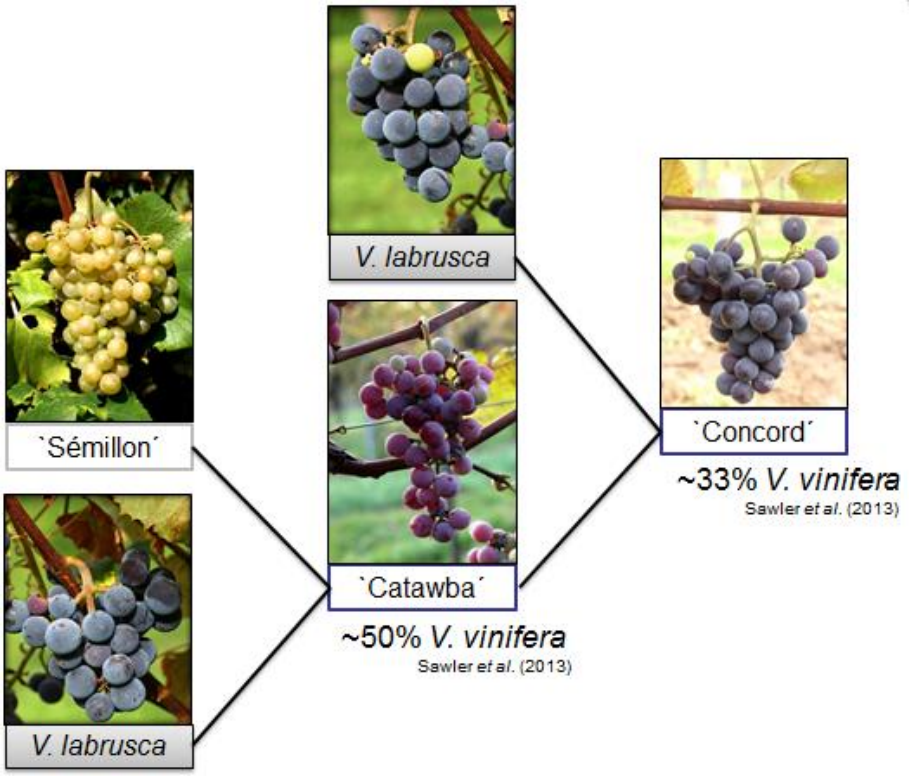


Abb. 2 Die Abstammung von `Concord´ konnte über SSR-Marker bestätigt werden. Bei den Wildart-Eltern handelt es sich um zwei unterschiedliche Akzessionen der nordamerikanischen Art *Vitis labrusca*. Die Labrusca-typische Aromakomponente Methylanthranilat ist 100-mal stärker in `Concord´ zu finden, als in der Elternsorte `Catawba´.

Literatur

Köllner, T. G., et al. (2010). "Herbivore-Induced SABATH Methyltransferases of Maize That Methylate Anthranilic Acid Using S-Adenosyl-l-Methionine." Plant Physiology **153**(4): 1795-1807.

Power, F. B. and V. K. Chesnut (1921). "The occurence of methyl anthranilate in grape juice." J. Amer. Chem. Soc. **43**(1741): 1006-1007.

Wang, J. and V. D. Luca (2005). "The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including ‘foxy’ methylanthranilate." The Plant Journal **44**(4): 606-619.

Molekulare Untersuchungen zur Optimierung der Triebhaltung bei der Weinrebe (*Vitis vinifera*)

Prof. Dr. Renate Horn

Universität Rostock, Albert-Einstein-Str.3, 18059 Rostock

I Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
G	Guanin
JKI	Julius Kühn-Institut
kb	Kilobasen
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
SNP	Single nucleotide polymorphism

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Triebhaltung der 13 untersuchten Rebensorten 7 Wochen nach Stecken der Holzstecklinge in Jiffy 7 Quelltöpfe und Umsetzen in Erde (Topfbreite 15 cm)
Abb. 2: Isolierte DNA aus den Rebensorten der Arten *Vitis vinifera* und *V.s aestivalis*
Abb. 3: PCR Produkte von *TAC1* der Arten *Vitis vinifera* und *V. aestivalis*
Abb. 4: PCR Produkte von *LAZY1* der Arten *Vitis vinifera* und *V. aestivalis*
Abb. 5: Long Range PCR mit der Sorte 'Augster' und der Primerkombination Vitis_1for/Vitis_5rev
Abb. 6: Vergleich der amplifizierten Genabschnitte des *VvTAC1*-Gens (Vitis_1, Vitis_2, Vitis_3, Vitis_4, Vitis_5) der Sorte 'Augster' mit aufrechter Triebhaltung mit der Referenz PN40024 (*GSVIVG01027402001*)

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wuchstypen der untersuchten Weinreben

1 Einleitung

Ziel des Projektes ist es, molekulare Marker für die frühzeitige Erkennung der Triebhaltung bei der Weinrebe zu entwickeln. Hierzu sollen aus 13 verschiedenen Weinrebensorten, von denen die OIV 006 Bonitur bekannt ist, die beiden Gene *VvTAC1* und *VVLAZY1* isoliert und auf Sequenzebene auf relevante Unterschiede untersucht werden. Beim Pfirsich sind die beiden homologen Gene ursächlich an der Ausbildung des Verzweigungswinkels der Äste beteiligt. Zusätzliche Expressionsanalysen sollen die Rolle dieser Gene bei der Weinrebe verifizieren.

2 Literaturübersicht

Amerikanische Züchter konnten in Zusammenarbeit mit uns über einen Next Generation Sequencing Ansatz das Gen beim Pfirsich identifizieren, das für den säulenförmigen Wuchs verantwortlich ist (Dardick et al. 2013). Mutationen in dem Gen *PpeTAC1* führen dazu, dass dieses Gen nicht mehr exprimiert wird und die Pfirsichbäume einen säulenförmigen Wuchs aufweisen, da die Äste verstärkt vertikal wachsen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem *TAC1* Gen, ebenso wie bei seinem Gegenspieler *LAZY1*, dessen Mutation zu horizontalem Wuchs der Äste führt, um Gene handelt, die weit verbreitet im Pflanzenreich vorhanden sind und auch bei *Vitis vinifera* (GSVIVG01027402001 und GSVIVG01010528001) vorkommen (Dardick et al. 2013). Die beiden Gene *TAC1* und *LAZY1* spielen eine zentrale Rolle für den Pflanzenwuchs. Ursprünglich waren diese Gene nur bei Reis (Li et al. 2007, Xu et al. 2007, Yoshihara und Lino 2007) und Mais (Ku et al. 2011) beschrieben worden. Die Erfassung der genetischen Diversität dieser beiden Gene bei der Weinrebe kann weitreichenden Aufschluss über den Pflanzenwuchs in *Vitis vinifera* geben und einen entscheidenden Beitrag für die Optimierung der Triebhaltung leisten. Bei Weinreben liegen bisher noch keine Untersuchungen zu diesen beiden Genen vor. Erste Ergebnisse zu dem Projekt konnten auf der GPZ-Tagung in Kiel mit einem Poster dargestellt werden (Kaiser et al. 2014).

3 Material und Methoden

3.1 Anzucht der Weinreben aus Holzstecklingen

Insgesamt 13 Rebensorten (Tabelle 1) wurden aus Holzstecklingen, die uns von Prof. Dr. Reinhard Töpfer dankbarerweise zur Verfügung gestellt wurden, entsprechend der mitgelieferten Anleitung herangezogen. Versehentlich hatten wir ‘Petra’ und V. aestivalis GF22 statt ‘Regent’ und ‘Cabernet Sauvignon’ erhalten. Diese werden wir im Frühjahr nachholen. Es wurden jeweils 10 Holzstecklinge in Torfballen eingesetzt, um sicherzustellen, dass schließlich mindestens fünf Pflanzen für eine gesicherte statistische Auswertung vorhanden sind. Alle Reben wurden erfolgreich angezogen und Blattproben für die DNA Isolierung genommen und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 1: Wuchstypen der untersuchten Weinreben

Nr	Rebensorte	Triebhaltung	Nach OIV006	Züchter
1	Augster gelb	aufrecht	1-2	JKI Geilweilerhof
2	Garnacha tinta	aufrecht	1	JKI Geilweilerhof
3	Monastrell	aufrecht	1	JKI Geilweilerhof
4	Muscat Ottonel	halb aufrecht	3	JKI Geilweilerhof
5	Sauvignon blanc	halb aufrecht	3	JKI Geilweilerhof
6	Barbera	waagerecht	5	JKI Geilweilerhof
7	Vermentino	waagerecht	5	JKI Geilweilerhof
8	Aramon	halb hängend	7	JKI Geilweilerhof
9	Dattier de Beyrouth	halb hängend	7	JKI Geilweilerhof
10	Couderc 3309	hängend	9	JKI Geilweilerhof
11	Merzling	hängend	7-9	JKI Geilweilerhof
12	V. aestivalis GF 22	?	?	JKI Geilweilerhof
13	Petra	?	?	Petar Cindric; Kovac, V.

3.2 Isolierung der DNA aus den Reben

Genomische DNA wurde zunächst mit der CTAB Methode nach Doyle & Doyle (1990) isoliert. Bei einigen Sorten musste aber der DNA Isolierungskit von Epicentre eingesetzt werden.

3.3 Ableitung der Primer für *VvTAC1* und *VvLAZY1*

Durch BLAST der Gensequenzen *PpeTAC1* und *PpeLAZY1* aus Pfirsich gegen die Referenzgenomsequenz von Reben (PN40024), hinterlegt in Phytozome (http://www.phytozome.org), konnten die beiden Gene *GSVIVG01027402001* (*VvTAC1*) und *GSVIVG01010528001* (*VvLAZY1*) für *Vitis vinifera* identifiziert werden. Mit Hilfe von WebPrimer (http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer) wurden für *VvTAC1* fünf und für *VvLAZY1* sechs überlappende Primerkombinationen abgeleitet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Triebhaltung der Weinreben

Sieben Wochen nach Stecken der Stecklinge wurde die Triebhaltung der 13 Weinsorten dokumentiert (Abb. 1) und die Winkel vermessen (nicht dargestellt). Dabei zeigten sich bereits deutliche, für die Sorten charakteristische Unterschiede in den Triebhaltungen.

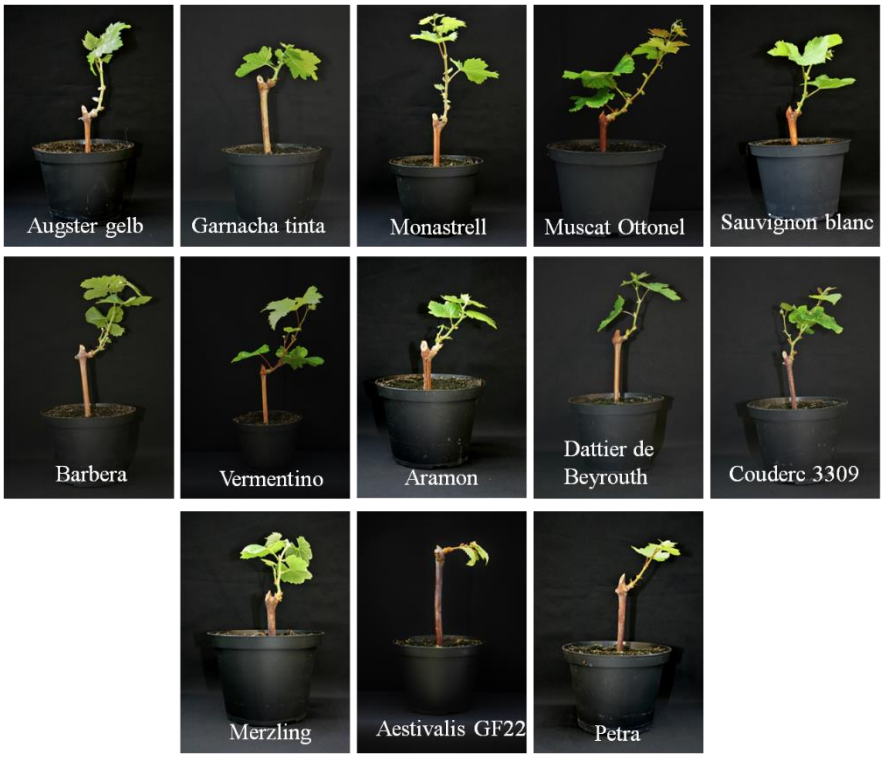


Abb. 1: Triebhaltung der 13 untersuchten Rebensorten 7 Wochen nach Stecken der Holzstecklinge in Jiffy 7 Quelltöpfe und Umsetzen in Erde (Topfbreite 15 cm)

4.2 Extraktion der DNA aus den Weinreben

Die Extraktion der DNA nach Doyle and Doyle (1990) funktionierte für neun der Rebensorten sehr gut, allerdings für die vier Sorten, die sich entweder durch einen hohen Gehalt an Phenolen (‘Dattier’ und ‘Muscat’) oder aber durch eine starke Behaarung (V. aestivalis GF22 und ‘Vermentino’) auszeichneten, musste der DNA Isolierungskit von Epicentre eingesetzt werden. So konnte aus allen Sorten erfolgreich DNA isoliert werden (Abb. 2).

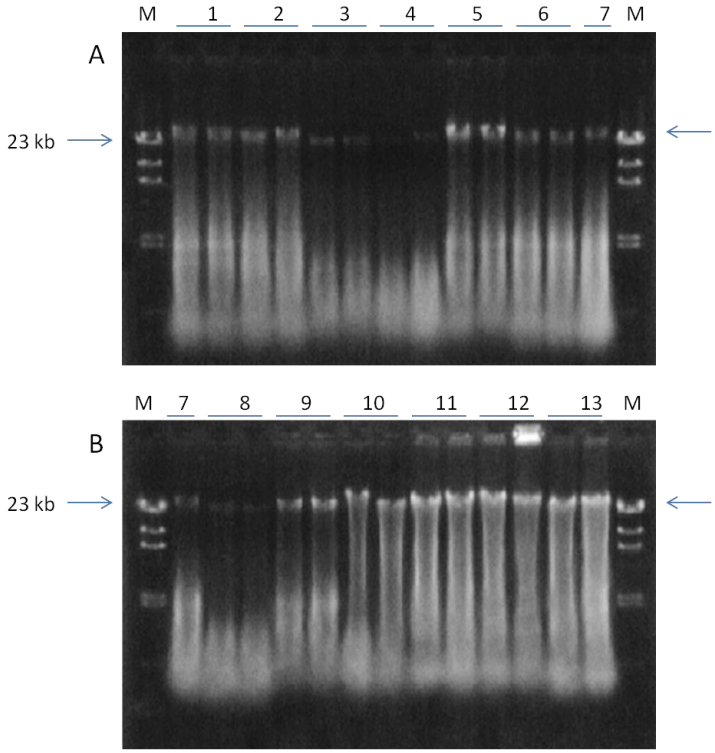


Abb. 2: Isolierte DNA aus den Rebensorten der Arten *Vitis vinifera* und *V. aestivalis.* 1: Aramon (Nr. 8), 2: Augster (Nr. 4), 3: Barbera (Nr. 10), 4: Couderc (Nr. 8), 5: Garnacha tinta (Nr. 2), 6: Merzling (Nr. 2), 7: Monastrell (Nr. 6), 8: Petra (Nr. 4), 9: Sauvignon (Nr. 6), 10: V. aestivalis GF22 (Nr. 7), 11: Dattier (Nr. 4), 12: Muscat (Nr. 2), 13: Vermentino (Nr. 6), . M: *λ HindIII* Marker.

4.3 PCR-Amplifizierung der Gene VvTAC1 und VvLAZY1

Durch BLAST der Gensequenzen *PpeTAC1* und *PpeLAZY1* aus Pfirsich gegen die Referenzgenomsequenz von Reben (PN40024), hinterlegt in Phytozome, konnten die homologen Gene *GSVIVG01027402001* (*VvTAC1*) und *GSVIVG01010528001* (*VvLAZY1*) für *Vitis vinifera* identifiziert werden. *VvTAC1* hat eine Größe von 3187 bp und kodiert für ein Protein von 344 Aminosäuren.

VvLAZY1 umfasst auf genomischer Ebene eine Gesamtgröße von 4412 bp und kodiert für ein Protein von 381 Aminosäuren. Die fünf abgeleiteten Primer für *VvTAC1* wurden erfolgreich für die PCR Amplifizierung der Genfragmente aus allen 13 Rebensorten eingesetzt. Alle Amplifikate hatten die gewünschte Größe (um die 700 bp groß), allerdings ließen sich keine Längenpolymorphismen aufzeigen (Abb. 3).

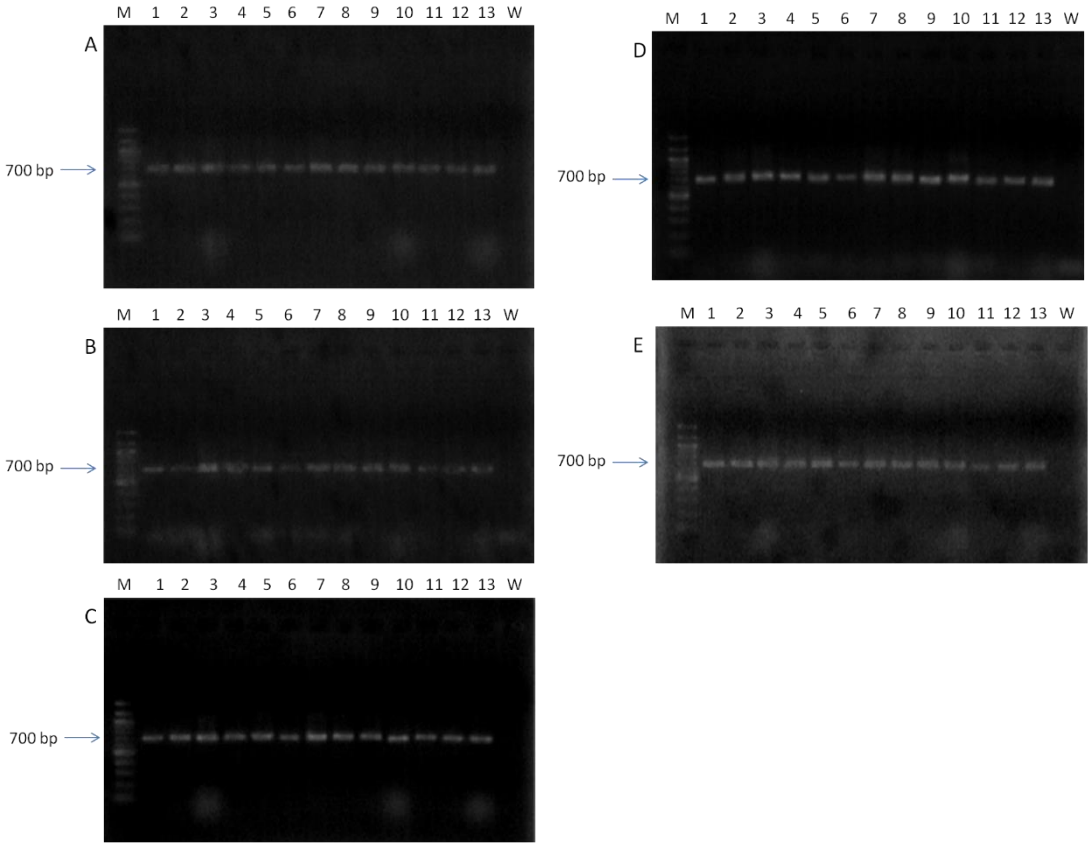


Abb. 3: PCR Produkte von *TAC1* der Arten *Vitis vinifera* und *V. aestivalis*. A. Vitis_1for/rev (erwartet: 687 bp), B. Vitis_2for/rev (erwartet: 684 bp), C. Vitis_3for/rev (erwartet: 692), D. Vitis_4for/rev (erwartet: 690 bp), E. Vitis_5for/rev (erwartet: 700 bp); 1: Aramon, 2: Augster, 3: Barbera, 4: Couderc, 5: Garnacha tinta, 6: Merzling, 7: Monastrell, 8: Petra, 9: Sauvignon, 10: V. aestivalis GF22, 11: Dattier, 12: Muscat, 13: Vermentino, W: Wasserprobe, M: 100 bp Marker

Auch mit allen sechs Primerkombinationen von *VvLAZY1* ließen sich in allen Reben die gewünschten Amplifikate erhalten. Auch hier waren keine Längenpolymorphismen erkennbar (Abb.4).

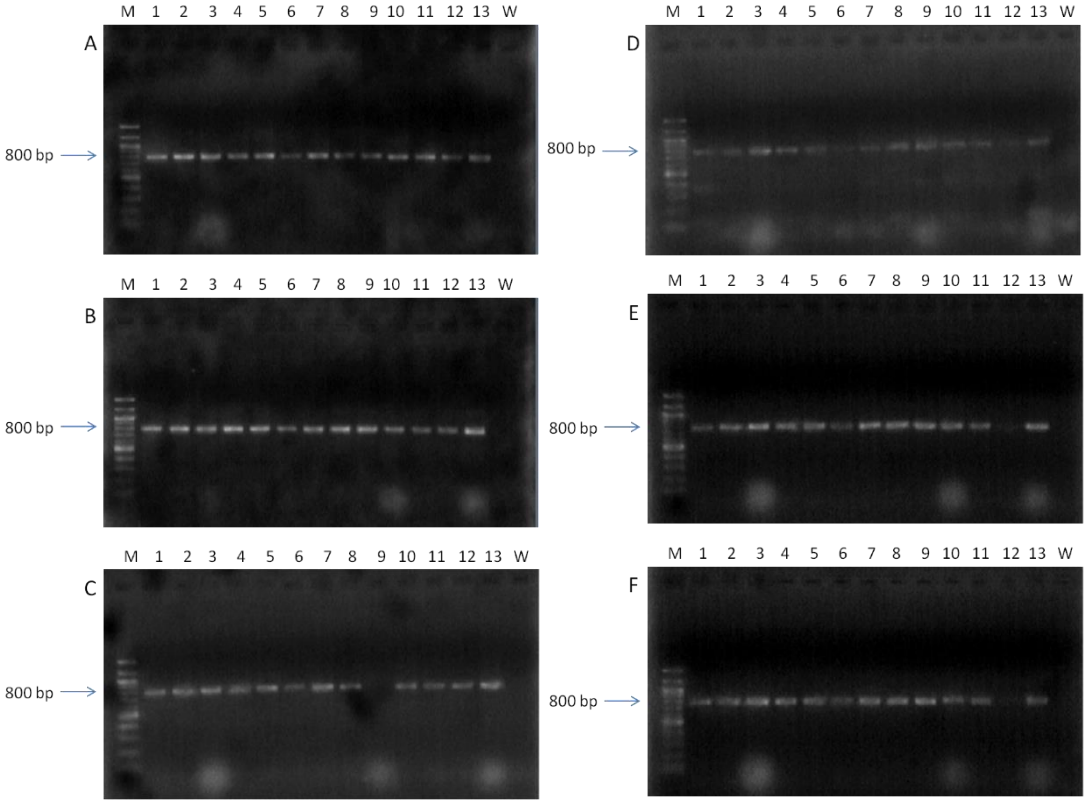


Abb.4: PCR Produkte von *LAZY1* der Arten *Vitis vinifera* und *V. aestivalis*. A. Vvlazy_1for/rev (erwartet: 790 bp), B. Vvlazy_2for/rev (erwartet: 777 bp), C. Vvlazy_3for/rev (erwartet:778 bp), D. Vvlazy_4for/rev (erwartet: 781 bp), E. Vvlazy_5for/rev (erwartet: 769 bp), F. Vvlazy_6for/rev (erwartet: 781 bp); M: 100 bp Marker, 1: Aramon, 2: Augster, 3: Barbera, 4: Couderc, 5: Garnacha tinta, 6: Merzling, 7: Monastrell, 8: Petra, 9: Sauvignon, 10: V. aestivalis GF22, 11: Dattier, 12: Muscat, 13: Vermentino, W: Wasserprobe

4.4 Beginn der Klonierung von VvTAC1 aus der Sorte 'Augster'

Um Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) oder kleinere Insertionen/ Deletionen zu identifizieren, wurde begonnen, die PCR Amplifikate zu klonieren und zu sequenzieren. Gestartet wurde mit der Sorte 'Augster', die eine aufrechte Triebhaltung aufweist. Es wurden die PCR-Amplifikate in den Vektor pGEM-T kloniert und zum Sequenzieren zu der Fa. GATC geschickt. Die Sequenzen wurden mit der in Phytozome hinterlegten *VvTAC1* Gensequenz (*GSVIVG01027402001*) für den Rebengenotyp PN40024 verglichen. PN40024, wurde ursprünglich von der Rebensorte 'Pinot noir' abgeleitet und ist durch wiederholte Selbstungen nahezu homozygot. Die Sorte 'Pinot noir' selbst ist durch eine waagerechte Triebhaltung gekennzeichnet. Die Sequenzen sind entsprechend der Amplifikate dargestellt (Abb. 6). Eine Long Range PCR, durchgeführt unter Verwendung der Phusion DNA Polymerase, bestätigte zum einen die SNPs und Insertionen/Deletionen und zum anderen konnten Mutationen den Allelen zugeordnet werden (Abb. 5). Es zeigten sich insgesamt 4 SNPs und 3 Deletionen/Insertionen. Die Sorte 'Augster' liegt heterozygot für *VvTac1* vor. Ein Allel entspricht PN40024, also einem Allel des 'Pinot noir', während das andere die identifizierten Mutationen trägt. Nur ein SNP an Position 168 (C->G) im PCR-Amplifikat Vitis_2 for/Vitis_2 rev liegt in

einem Exonbereich. Alle anderen Mutationen liegen in nicht kodierenden Bereichen, den Intronbereichen 3 und 4. Um festzustellen, welche Auswirkungen die Mutation (C->G) auf die Aminosäuresequenz hat, wurde eine Analyse mit dem Programm Expasy (www.expasy.org) durchgeführt. Das Vergleichsgen *VvTAC1* der Sorte 'Pinot noir' (*GSVIVG01027402001*) kodiert für ein Protein mit 344 Aminosäuren. Die Mutation (C->G) führt zu einem Aminosäureaustausch L156V in Exon 3. Es handelt sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, der wahrscheinlich keinen gravierenden Effekt auf die Funktion des Proteins haben dürfte. Die Mutationen in den Intronbereichen 3 und 4 könnten einen Einfluss auf das Spleißen der mRNA haben. Transkriptanalysen müssen jetzt zeigen, ob beide Allele von *VvTac1* in 'Augster' transkribiert werden oder nicht. Die Allele lassen sich durch die Punktmutation in Exon 3 voneinander differenzieren.

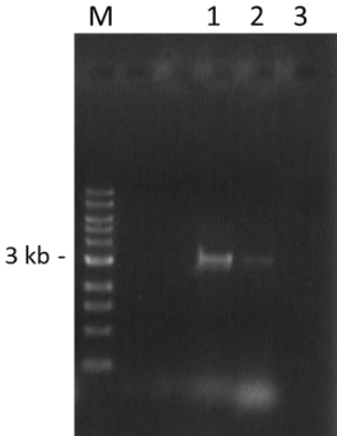


Abb. 5: Long Range PCR mit der Sorte 'Augster' und der Primerkombination Vitis_1for/Vitis5rev. 1: Augster, 2: Augster, 3: H_2O, M: 1 kb Marker

Sorte 'Augster' (aufrecht)

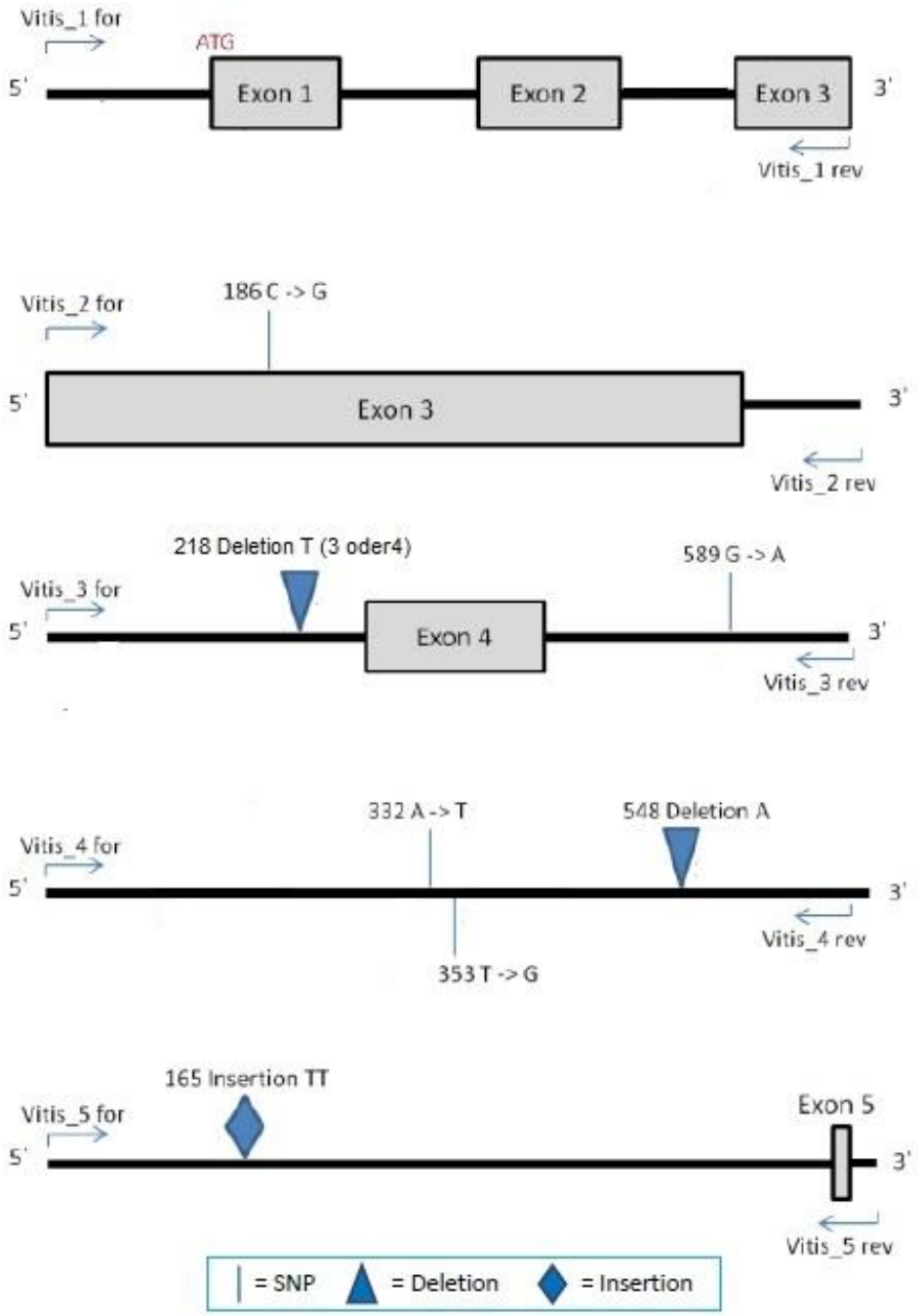


Abb. 6: Vergleich der amplifizierten Genabschnitte des *VvTAC1*-Gens (Vitis_1, Vitis_2, Vitis_3, Vitis_4, Vitis_5) der Sorte 'Augster' mit aufrechter Triebhaltung mit der Referenz PN40024 (*GSVIVG01027402001*); Exons (graue Kästen); Introns (schwarze Striche)

5 Diskussion

Es wurde erfolgreich ein Sequenzvergleich zwischen der Genomsequenz von PN40024 und 'Augster' mit aufrechter Triebhaltung für *VvTac1* durchgeführt. Die ersten Ergebnisse für die Sorte 'Augster' deuten darauf hin, dass diese Sorte heterozygot für *VvTAC1* vorliegt, wobei ein mutiertes Allel und ein PN40024 entsprechendes Allel identifiziert wurden. Ob die Mutationen in den Intronbereichen zu einem Verlust des Transkriptes führen, muss noch geklärt werden. Die jetzt zunächst an der Sorte 'Augster' durchgeführten Untersuchungen sollen im kommenden 2. Jahr auch an den anderen 12 Rebensorten durchgeführt werden, um auch hier Sequenzveränderungen in *VvTAC1* zu erfassen und mit der Triebhaltung in Verbindung zu bringen. Parallel dazu wird mit den Expressionsanalysen begonnen.

6 Zusammenfassung

Die 13 angezogenen Weinrebensorten, die sich aufgrund ihrer Bonitur nach der OIV006 in ihrer Triebhaltung unterscheiden, zeigten deutlich Unterschiede in der Triebhaltung, die dokumentiert und vermessen wurden. Die DNA konnte erfolgreich aus allen Weinsorten isoliert werden. Unter der Verwendung der fünf bzw. sechs abgeleiteten Primerkombinationen für *VvTAC1* bzw. *VvLAZY1* wurden die entsprechenden Genabschnitte erfolgreich aus allen 13 Sorten amplifiziert. Dabei zeigten sich keine Längenpolymorphismen, so dass jetzt mit der Klonierung der Gene begonnen wurde. Dies konnte, nachdem inzwischen auch erfolgreich die Long Range PCR durchgeführt wurde, für die erste Sorte 'Augster' mit aufrechter Triebhaltung bereits abgeschlossen werden. Die Sorte 'Augster' liegt heterozygot für *VvTac1* vor. Ein Allel entspricht PN40024, also einem Allel des 'Pinot noir', während das andere Mutationen trägt. Es konnten insgesamt 4 SNPs und 3 Deletionen/Insertionen identifiziert werden. Nur ein SNP an Position 168 (C->G) liegt in einem Exonbereich und führt zu einem konservativen Aminosäureaustausch L156V. Alle anderen Mutationen liegen in nicht kodierenden Bereichen, den Intronbereichen 3 und 4. Die Mutationen in den Intronbereichen könnten einen Einfluss auf das Spleißen der mRNA haben.

7 Literaturverzeichnis

Dardick C., Callhan A., Horn R., Ruiz K.B., Zhebentyayeva T., Hollender C., Whitaked M., Abbott A., Scorza R. (2013) PpeTAC1 promotes the horizontal growth of branches in peach trees and is a member of a functionally conserved gene family found in diverse plants species. Plant J. online first, doi:10.1111/tpj.12234.

Doyle, J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12**:** 13-15.

Kaiser R., Kruse E., Töpfer R., Horn R. (2014) Molecular studies for optimizing the vertical growth and branch angle in grapevine varieties (*Vitis vinifera*). GPZ-Tagung Kiel (Poster)

Ku L., Wei X., Zhang S., Zhang J., Guo S., Chen Y. (2011) Cloning and characterization of a putative *TAC1* ortholog associated with leaf angle in maize (*Zea mays* L.). PLoS One 6: e20621.

Li P., Wang Y., Qian Q., Fu Z., Wang M., Zeng D., Li B., Wang X., Li J. (2007) *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. Cell Res. 17: 402-410.

Yoshihara T., Iino M. (2007) Identification of the gravitropism-related rice gene *LAZY1* and elucidation of *LAZY1*-dependent and -independent gravity signaling pathways. Plant Cell Physiol. 48: 678–688.

Yu B., Lin Z., Li H., Li X., Li J., Wang Y., Zhang X., Zhu Z., Zhai W., Wang X., Xie D., Sun C. (2007) *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. Plant J. 52: 891–898.

„Alte“ vs. „junge“ Reben: Einfluss des Rebalters auf physiologische und generative Parameter sowie auf Beeren-, Most- und Weininhaltsstoffe

M. Sc. Khalil Bou Nader, Dr. Manfred Stoll

Institut für allgemeinen und ökologischen Weinbau (HSGM), Von-Lade-Str. 1, 65366 Geisenheim

Prof. Dr. Doris Rauhut, Dr. Armin Schüttler

Institut für Mikrobiologie und Biochemie

Prof. Dr. Otmar Löhnertz

Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung

Dr. Claus-Dieter Patz

Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung

Prof. Dr. Rainer Jung

Institut für Oenologie

Ziel dieses Forschungsprojektes ist es, die physiologischen und generativen Auswirkungen des Rebalters auf Beereninhaltsstoffe sowie Weininhaltsstoffe und Weinsensorik zu untersuchen.
Hierzu steht eine homogene, ausreichend große Versuchsfläche der HSGM zur Verfügung, die mit Reben gleichen Klons und gleicher Unterlage bestockt ist. Die Reben haben ein unterschiedliches Rebalter zwischen derzeit 43 Jahren (Pflanzjahr 1971), 19 Jahren (Pflanzjahr 1995) und ein erstmals ab dem Jahr 2014 traubentragendes Jungfeld (Pflanzjahr 2012). Gleichfalls ist es möglich, ausreichend Trauben zu produzieren, um die gesamte Prozesskette für die drei Versuchsvarianten, bis hin zum Weinausbau, abzubilden und auch die Weine sensorisch weiterzuverfolgen zu können.

Für das beantragte Forschungsvorhaben stellen sich folgende Versuchsfragen (Auszug aus dem Projektantrag an den Forschungsring des Deutschen Weinbaus bei der DLG):

- Wie ändert sich über die Zeit die Ertragsleistung und welche Auswirkung hat dies auf die Traubenstruktur oder das Mikroklima?
- Wie wirkt sich das Rebalter auf das Wachstum, den Wasserhaushalt und die photosynthetische Aktivität aus?
- Wie unterscheidet sich in Abhängigkeit des Rebalters möglicherweise die Nährstoffaufnahme und -einlagerung?
- Wie wirkt sich das Rebalter auf die Most- und Weininhaltsstoffe aus und wie äußert sich dies im Alterungspotential sowie der Weinsensorik?
- Können Kriterien oder Leitsubstanzen zur Charakterisierung spezifische Qualitätsparameter herangezogen werden?
- Welche Bedeutung haben Änderungen im Gesundheitszustand der Stöcke?
- Wirkt sich das Alter der Rebstöcke auf sensorisch feststellbare Attribute des Weingeschmacks aus?

Zur Beurteilung des Stammvolumens wurden verschiedene Messtechniken angewendet. Ergebnisse aus diesen Messungen ergaben bezüglich des Holzvolumens signifikante Unterschiede zwischen allen drei Varianten.
Auch bei Beurteilung der Laubwandarchitektur zeigten sich zwischen den Reben aus den verschiedenen Pflanzjahren Unterschiede: die Anzahl der innenliegenden Blätter war bei den beiden älteren Varianten (43 bzw. 19 Jahre) fast doppelt so groß wie bei den „jungen Reben“ (drittes Standjahr).

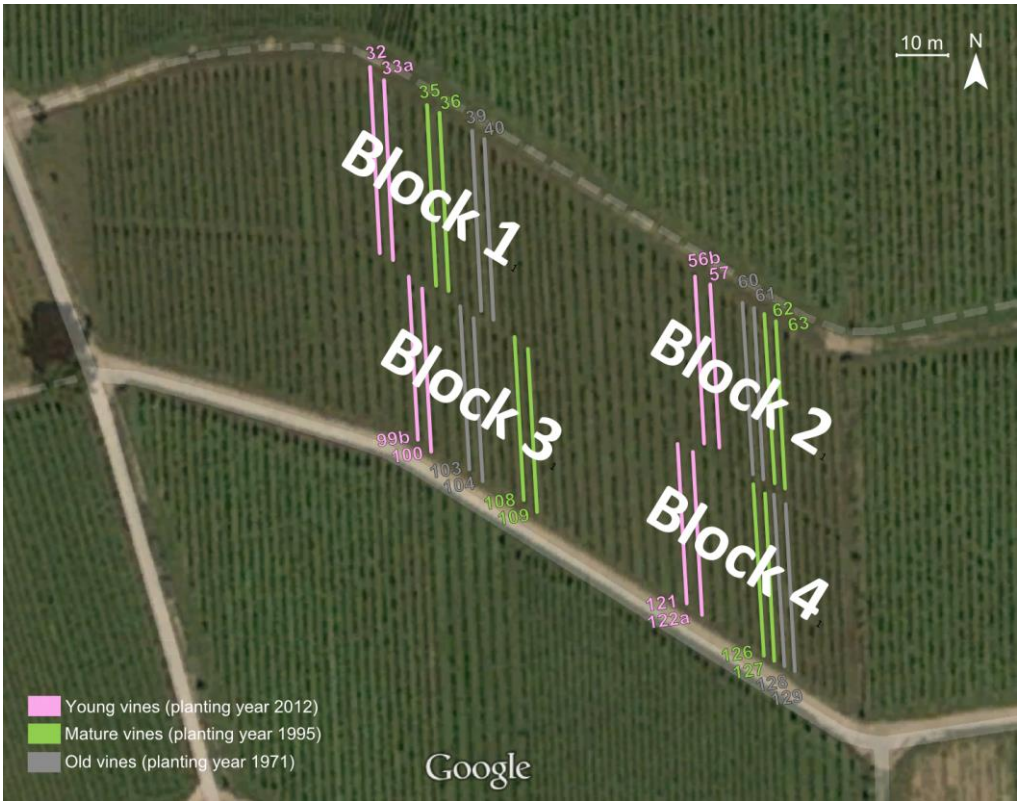


Abb. 3: **Satellitenaufnahme der Rebfläche mit Anordnung der Feldwiederholungen aus den verschiedenen Pflanzjahren (Quelle: ©2014 Digitalglobe, Map data ©2014 Geobasis-DE/BKG (©2009), Google).** ***(Quelle: Bou Nader 2015)***

Bezüglich der Nährstoffversorgung konnten mittels Messungen der Chlorophyllfluoreszenz Unterschiede in der Grünverfärbung der Blätter sowie des Blattstickstoffgehaltes festgestellt werden. Hier war eine Unterscheideung der drei Versuchsglieder, auch über den Verlauf der Vegetationsperiode, feststellbar. Hinsichtlich des Reifeverlaufs konnten keine Unterschiede bei den Parametern Mostgewicht, Säure oder pH-Wert festgestellt werden. Jedoch unterschieden sich während der Vegetationsperiode 2014 die Einzelbeerengewichte. Hierbei hatten die „jungen Reben“ signifikant kleiner Beeren. Dies könnte möglicherweise auf Unterschiede in der Wasseraufnahme während des sehr niederschlagsreichen Sommers dieses Jahres zurückzuführen sein.
Bezüglich der Weinsensorik dienten Versuchsweine ausgewählter Jahrgänge (2002; 2005 und 2012) dazu Geschmacks- und Geruchsatribut zu sammeln und Erfahrungen bzw. Vokabular für zukünftige Profilprüfungen zu erarbeiten.

Danksagung
Die Projektleitung bedankt sich für die finanzielle Unterstützung durch den Forschungsring des Deutschen Weinbaus seit November 2014.
Zur Datengrundlage dieses Berichtes trugen unter anderem die Arbeiten von Elise Laize (Dijon), Jan Hallerbach (Bachelor, HSGM) und Khalil Bou Nader (Masterthesis Vinifera) bei. An dieser Stelle sei den Studierenden sowie Dipl.-Ing Magali Lafontaine und Dipl.-Ing. Bernhard Gaubatz, für deren Zuverlässigkeit und Mitarbeit im Projekt, seitens der Projektleitung herzlich gedankt!

Untersuchungen zur Phänologie und Populationskontrolle von Essigfliegen (Diptera*:* Drosophilidae) und Wespen (Hymenoptera*:* Vespidae) als Überträger unerwünschter Mikroorganismen auf Trauben in Rebanlagen

Dr. Karl-Josef Schirra, Stefanie Alexander,
PD. Dr. Eva Maria Griebeler, Dr. habil. Jes Johannesen,

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz – (DLR),
Abteilung Phytomedizin, 67435 Neustadt a. d. Weinstraße, Breitenweg 71

Johannes Gutenberg

Universität Mainz, Institut für Zoologie, Abteilung 5: Ökologie

1 Einleitung

Besonderes Augenmerk lag 2014 auf der räumlichen und zeitlichen Verbreitung der 2011 erstmals in Deutschland nachgewiesenen invasiven Art *Drosophila suzukii* (MATSUMURA 1931), von der ein hohes Gefahrenpotential für Beerenobst, inklusive Weintrauben, ausgeht. Auf Grund der äußerst kritischen Situation im rheinland-pfälzischen Weinbau während der Traubensaison 2014 hat sich der Fokus der Arbeit auf diesen Schwerpunkt verschoben. Die Untersuchungen hinsichtlich der Faltenwespen mussten daher aus zeitlichen Gründen eingestellt werden.

2 Material und Methoden

In den Vorjahren wurde im Rahmen des umfangreichen Monitorings das Vorkommen der Kirschessigfliege über gesamt Rheinland-Pfalz nachgewiesen. Entsprechend wurde die Flugüberwachung und die Erfassung des Wirtsspektrums der Kirschessigfliege fortgesetzt, jedoch auf insgesamt 14 Dauerfallen im Raum Neustadt und Bad Neuenahr-Ahrweiler an geografisch und faunistisch interessanten Standorten beschränkt (Waldgebiete, Vergleich Rebfläche und angrenzende Saumstrukturen/Randgebiete).
Im Freiland wurde der mögliche Einfluss einer Freistellung der Traubenzone auf den Befall mit *D. suzukii* getestet. Dazu wurden Anfang August in zwei Anlagen (Portugieser und Spätburgunder) beidseitig entblätterte Parzellen angelegt. Neben der mechanischen Populationskontrolle wurde in drei Rebanlagen mit Vorbefall (Dornfelder, Acolon und Cabernet Dorsa) die Wirkung folgender Insektizide und Pflanzenstärkungsmittel getestet:

- SpinTor (160 ml/ha; Wasseraufwand: 800l/ha; ganze Laubwand)
- Spintor + Combi-protec (5 ml SpinTor + 1000 ml Combi-protec/ha; Wasseraufwand: 20l/ha)
- Kaliwasserglas (5kg/ha; Wasseraufwand: 800 l/ha)
- Steward (187,5 ml/ha; Wasseraufwand: 800 l/ha)
- Karate Zeon (75 ml/ha; Wasseraufwand: 800 l/ha)

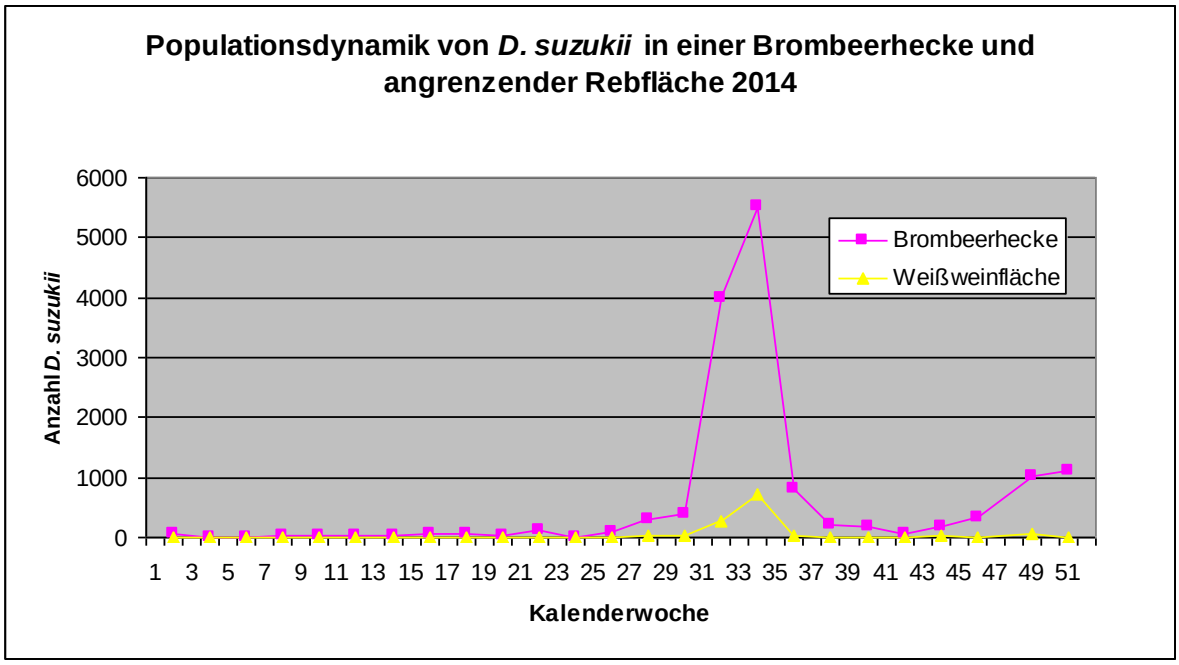
Die Bonitur erfolgte in beiden Versuchen optisch auf Eiablage von *D. suzukii* (50 Beeren aus 15 Teiltrauben).

In ergänzenden Laborversuchen wurde der Einfluss verschiedener Speisepilze (*Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron, Suillus granulatus* und *Boletus luridus,* vergleiche BESL et al. 1987, MIER et al. 1996) auf Larven der Arten *D. melanogaster* und *D. suzukii* untersucht. Dazu wurde das gefriergetrocknete und pulverisierte Pilzmaterial mit Standard-Futtermedium vermengt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Monitoring

Flug: 2014 wurden insgesamt 87.585 *D. suzukii* erfasst, wobei besonders der extreme Anstieg der Flugzahlen über die Wintermonate bei warmer Witterung in Waldgebieten erwähnenswert ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Tiere dort nach geeigneten, frostgeschützten Stellen zur Überwinterung suchen.
Der Vergleich von Rebflächen und angrenzenden Saumgebieten erbrachte folgendes: gelangen außerhalb der Traubenreife nur vereinzelt Kirschessigfliegen in die Rebanlagen, so wird in Zeiträumen mit hohem Befallsdruck innerhalb der umliegenden Fruchtkulturen – wie dies im August 2014 der Fall war – ein abundantes Auftreten von *D. suzukii* in den angrenzenden Rebflächen verzeichnet (Abbildung 1). Die Tiere fliegen dann auf der Suche nach neuen Reproduktionswirten in die Anlagen.



1. Abbildung 1: Populationsdynamik von *D. suzukii* im Vergleich zwischen einer Brombeerhecke und der angrenzenden Rebfläche, Neustadt-Haardt 2014.

Wirtsspektrum: 2014 kam es schon früh im Jahr zum Aufbau von großen Populationen, begünstigt durch den milden Winter 13/14 und einem warmen Frühjahr mit zeitig einsetzender Vegetationsperiode. Ab Mitte März wurden die ersten Eier tragenden Weibchen in Köderfallen erfasst. Die erste Eiablage und somit die erste Generation des

Jahres konnte 2014 erstmals in den Früchten von Gemeinem Efeu (*Hedera helix*) nachgewiesen werden. Neben den Hauptwirten Brombeere und Schwarzer Holunder nutzten die Tiere 2014 zudem Süß- und Sauerkirschen, Felsenkirschen, Himbeeren, Rote Holunderbeeren, Feigen, Maulbeeren, Erdbeeren, Rote Johannisbeeren, Jostabeeren, Kirschlorbeer, Roter Hartriegel, Zwetschgen, Aprikosen sowie Tafel- und Keltertrauben zur Reproduktion.

Befallsverlauf im Weinbau: 2014 konnten Anfang August die ersten Eiablagen von *D. suzukii* in Traubenbeeren der Sorten Acolon, Cabernet Dorsa und Frühburgunder festgestellt werden. Es folgten dokumentierte Fälle in Dornfelder, Portugieser, Spätburgunder, Regent, St. Laurent, Cabernet Sauvignon, Cabernet Cubin, Siegerrebe, Huxelrebe, Grauburgunder, Weißburgunder, Chardonnay, Roter Muskateller, Silvaner, Riesling und Ortega. Unter den Weißweinsorten waren besonders rötlich färbende Beeren betroffen. Zu starkem Befall kam es vor allem in Rebanlagen mit direktem Kontakt zu befallenen Obstkulturen (z. B. kommerzielle Obstplantagen oder wilde Brombeerhecken), sowie in Anlagen mit Minimalschnitt. Generell waren vor allem frühreife Rotweinsorten betroffen. Bei den aufgeführten Weißweinsorten war der Befall deutlich geringer und vor allem bei bereits verletzten Beeren festzustellen. Häufig dominierte hier massiv die einheimische *Drosophila melanogaster*. Auffällig war die zeitverzögerte Entwicklung sowie die hohe Mortalitätsrate von Eiern und L1 Larven an Trauben im Vergleich zu anderen Reproduktionswirten.

3.2 Populationskontrolle im Freiland

Freistellen der Traubenzone: In beiden Versuchsanlagen war ein zeitverzögerter Anstieg der Eiablage um ein bis zwei Wochen in den entblätterten Bereichen gegenüber den Kontrollparzellen zu erkennen. Bei der letzten Auswertung war die Befallshäufigkeit in den freigestellten Bereichen im Portugieser um 44 % (Abbildung 2), im Spätburgunder um 86 % gegenüber den Kontrollparzellen reduziert.

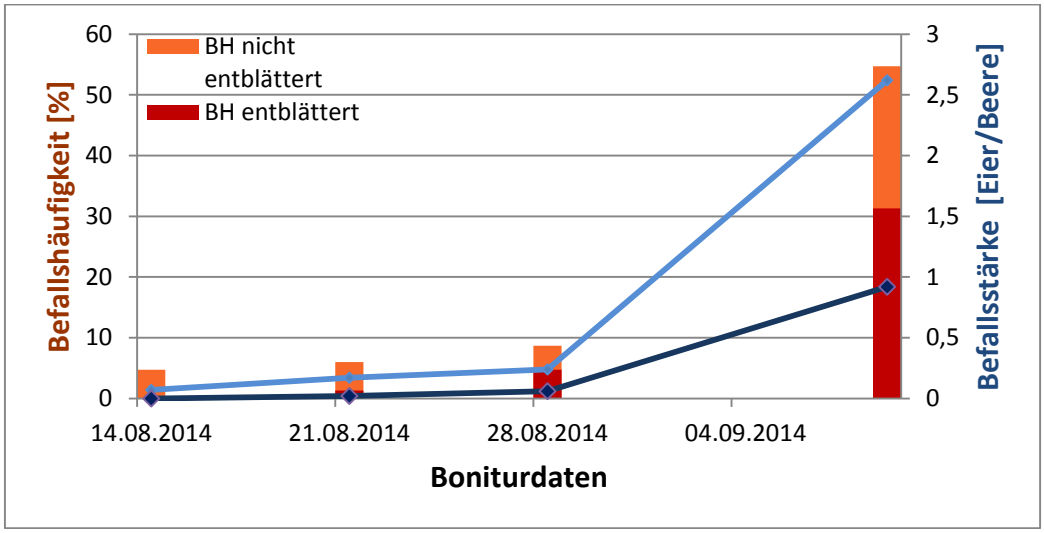


Abbildung 2: Befallsverlauf mit *D. suzukii*-Eiern in einer Portugieseranlage in entblätterten und nicht-entblätterten Parzellen, Neustadt-Mußbach 2014.

Dieser Effekt ist auf die Belüftung und Besonnung der Traubenzone zurückzuführen. Adulte Kirschessigfliegen bevorzugen moderate Temperaturen in Kombination mit einer hohen Luftfeuchte. Hitze und Trockenheit dagegen [illegible]dlich für die Tiere.

Anlagen mit Minimalschnitt und hohem Unterwuchs bilden dagegen ein optimales Mikroklima, in dem sich diese Fliegen gerne aufhalten.

Mitteltests: Die größte Wirkung gegenüber der Befallsstärke von Traubenbeeren mit *D. suzukii*-Eiern zeigte das Insektizid SpinTor mit einem Wirkungsgrad nach ABBOTT (1925) von 75 % (aufgrund der hohen Streuung keine Signifikanz). Die Wirkung der anderen getesteten Mittel war gering bis nicht nachweisbar.

3.3 Laborversuche

Insektizides Potential von Speisepilzen auf Drosophila-Maden: D. melanogaster-Larven, welche in Kontakt mit *Xerocomus chrysenteron, Boletus edulis* oder *B. luridus* kamen, zeigten im L1-Stadium eine Mortalitätsrate von 100 % innerhalb der ersten 3 Tage nach Exposition. Das Gleiche galt für *D. suzukii*-Larven, welche auf *X. chrysenteron* oder *B. luridus* gehalten wurden. *B. edulis* hingegen wirkte auf diese Art entwicklungsverzögernd. Bislang ist nicht geklärt, welche Inhaltsstoffe der untersuchten Pilze für die Hemmwirkung in der Drosophila-Entwicklung verantwortlich sind.

4 Ausblick 2015

Im Jahre 2015 werden die begonnen Untersuchungen zur Überwinterung der Kirschessigfliegen, sowie das Dauermonitoring fortgeführt. Bis zum Abschluss des Projektes Ende April stehen zudem die Determination weiterer, in 70%-igem ETOH gesammelter Drosophiliden-Proben, sowie die Auswertung der in den letzten Jahren gewonnenen Daten im Vordergrund.

Literatur

ABBOTT, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.

BESL, H. , KRUMP, C., SCHEFCSIK, M. (1987): Die Wirkung von Pilzfruchtkörpern auf Drosophila-Maden. Zeitschrift für Mykologie 53, 273-282.

MIER, N., CANETE, S., KLAEBE, A., CHAVANT, L., FOURNIER, D. (1996): Insecticidal properties of mushroom and toadstool carpophores. Pergamon 41, 1293-1299.

Pflanzmaterial als eine mögliche Infektionsquelle der Esca-Krankheit der Weinrebe: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie des Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* im Bereich Rebschule

Nicolai Haag

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen

Projektlaufzeit: 01.09.2013 – 31.08.2016
Berichtzeitraum: 01.02.2014 – 31.12.2014

1 Einleitung

Die Esca-Krankheit ist ein durch mehrere holzbewohnende Pilze verursachter Krankheitskomplex der Weinrebe[1]. Hauptverursacher dieser Holzkrankheit sind in Europa die Deuteromyceten *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) sowie der Basidiomycet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*)[2]. Die ökonomischen Schäden, die durch diese Krankheit verursacht werden, sind beachtlich und schon seit Jahren in der Zunahme. Bereits Junganlagen und Pflanzgut können von Erregern der Esca-Krankheit betroffen sein[3]. Direkte Bekämpfungsmaßnahmen stehen bis dato nicht zur Verfügung, u.a. bedingt durch Mangel an Informationen in Bezug auf Biologie, Vorkommen, Infektions- und Ausbreitungsverhalten der Erreger. Daher sollen in diesem Projekt epidemiologische Faktoren für *Pch*, den wohl wichtigsten Erreger für eine mögliche Frühinfektion während der Pflanzguterzeugung erfasst werden[4]. Untersuchungen im Freiland und zu den innerbetrieblichen Abläufen stehen dabei im Vordergrund[5].
Um epidemiologische Aspekte von *Pch* besser verstehen zu können, sollen daher alle essentiellen Bearbeitungsschritte des Pflanzmaterials, vom Zuschnitt und Tauchen des Veredlungsholzes über die Standzeit der Reben im Freiland bis zum Ausschulen der fertigen Pfropfreben, während des Pflanzguterzeugungsprozesses erfasst werden. Hierfür sollen an drei verschiedenen Rebschulstandorten Befallsbonituren an verschiedenen Edelreis- und Unterlagensorten vor dem Einschulen und nach dem Ausschulen sowie während der Standzeit der Pfropfreben im Freiland durchgeführt werden[6]. Dies geschieht überwiegend durch visuelle Bonituren der Holzsymp-

[1] Graniti et al. (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? Phytopathologia Mediterranea 39: 16-20
[2] Fischer, M. (2013a). Esca-Krankheit der Weinrebe, Informationsblatt des JKI
[3] Fischer, M. (2013b). Antrag auf Förderung des Forschungsvorhabens: „Pflanzmaterial als eine mögliche Infektionsquelle der Esca-Krankheit der Weinrebe: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie des Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* im Bereich Rebschule“
[4] Fischer, M. (2013b)
[5] Fischer, M. (2013b)
[6] Fischer, M. (2013b)

tome und bei auffälligen Proben zusätzlich durch Kulturmaßnahmen und/oder molekularbiologische Nachweisverfahren[7]. Desweiteren sollen Vortriebsubstrate, Flüssigproben aus Tauchbädern während des Veredlungsprozesses sowie Bodenproben und Sporenfallen aus dem Freiland hinsichtlich des Auftretens von *Pch* untersucht werden[8]. Hierfür gilt es zuverlässige und nach Möglichkeit quantitative Nachweisverfahren zu erarbeiten und zu überprüfen[9].

2 Literaturübersicht

Seit Jahren sind zunehmend Absterbeerscheinungen, die mit der Esca-Krankheit in Verbindung gebracht werden, auch in Junganlagen zu beobachten[10,11,12]. Beginnend in außer-europäischen Weinanbaugebieten[13,14], konnten diese Beobachtungen in Deutschland erstmals 2003 gemacht werden[15].
Womöglich sind die pilzlichen Erreger aus südlichen Weinanbaugebieten Europas eingewandert bzw. eingeschleppt worden[16].
Diese Absterbeerscheinungen in Junganlagen werden mittlerweile als eigenständige Krankheit, die sogenannte „Petri disease“ oder Petri-Krankheit, angesehen[17].
Für Junganlagen und Pflanzgut wird grundsätzlich der Pilz *Pch* als einer der Hauptverursacher betrachtet[18,19]. Dieser Erreger konnte bisher u.a. in Rebenholz, Wasser, Luft und Erde[20,21], aber auch in Tauchbäder, Wassertanks, Vortriebsubstraten, Bearbeitungswerkzeugen und Mutterrebstöcken nachgewiesen werden[22,23,24,25,26].
3 Material und Methoden

[7] Fischer, M. (2013b)
[8] Fischer, M. (2013b)
[9] Fischer, M. (2013b)
[10] Scheck et al. (1998). Three *Phaeoacremonium* spp. causing young Grapevine Decline in California. Plant Disease 82: 590
[11] Edwards et al. (2001). Young esca in Australia. Phytopathologia Mediterranea 40: 303-310.
[12] Fischer, M. (2013b)
[13] Scheck et al. (1998)
[14] Edwards et al. (2001)
[15] Fischer, M. (2003). Esca jetzt auch in Junganlagen? Der Badische Winzer 11: 26-27
[16] Fischer, M. (2009). Untersuchungen zu den Übertragungswegen der Esca-Erkrankung im Weinbau und Erarbeitung von Verfahren zur Erzeugung gesunden Rebenpflanzguts. Forschungsvorhaben BLE 06HS022
[17] Surico G. (2001). Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca. Phytopathologia Mediterranea 40: 487-490.
[18] Fischer, M. (2013b)
[19] Fischer M. (2009)
[20] Larignon P. & Dubos B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. Phytopathologia Mediterranea 39: 184-189.
[21] Rooney et al. (2001). Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. Phytopathologia Mediterranea 40: 351-356.
[22] Retief et al. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. European Journal of Plant Pathology 115: 331-339.
[23] Fischer, M. (2009)
[24] Aroca et al. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens
[25] Serra et al. (2011). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevine planting material in Sardinia and its control with combined hot water and cyproconazole treatments. Phytopathologia
[26] Agustí-Brisach et al. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. Plant Soil 364: 5-13

3.1 Erarbeitung zuverlässiger Nachweismethoden für *Phaeomoniella chlamydospora* in verschiedenen Matrizes

Im Jahr 2013 und insbesondere 2014 galt es zuverlässige Verfahren für den Nachweis von *Pch* in Holz, Vortriebsubstrat- und Flüssigproben sowie Sporenfallen (für den Nachweis in der Luft) zu erarbeiten und v.a. hinsichtlich Funktionalität der Verfahren und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.
Für den physischen Nachweis des Erregers in Rebenholz, Vortriebsubstrat (VTS) und Flüssigproben wurde ein Nachweisverfahren durch Isolation der Pilze aus den jeweiligen Matrizes auf festes Kulturmedium (Potato Dextrose Agar (PDA) und z.T. Malzextrakt- Agar mit Chloramphenicol (Antibiotikum)) überprüft. Dabei wurden für die Isolation aus Holz verschiedene Oberflächensterilisationsverfahren erprobt. Zum einen geschah die Oberflächensterilisation mittels Calciumhypochlorit oder Natriumhypochlorit. Zum anderen wurden die Holzproben durch kurzes Abflammen (mit und ohne vorheriges Eintauchen der Holzproben in 80% EtOH) des Holzes in der Bunsenbrennerflamme oberflächensterilisiert und kleine „Holzchips“ mit einem sterilen Skalpell aus dem Holz geschnitten. Anschließend wurden die Holzstücke in Kultur genommen. Für die Kultur der Pilze aus VTS wurde dieses in sterilem Leitungswasser suspendiert, sedimentiert und anschließend auf Kulturmedium ausplattiert. Flüssigproben wurden direkt auf Kulturmedium ausplattiert. Die Kulturen wurden bei 25°C und Dunkelheit inkubiert.
Für den molekularbiologischen Nachweis von *Pch* in Holz, Flüssigproben, VTS und Sporenfallen (Objektträger mit Vaseline bestrichen) wurden zum einen aus den unterschiedlichen Matrizes die darin vorhandene DNA extrahiert und diese in einer anschließenden geschachtelten (nested-PCR) eingesetzt und zum anderen wurden die unterschiedlichen Proben z.T. für einen direkten Einsatz in einer nested-PCR vorbereitet.
Für einen direkten Nachweis aus Holz wurden oberflächensterilisierte „Holzchips“ in flüssigem Nährmedium mit Chloramphenicol inkubiert und das Nährmedium als Matrize in einer nested-PCR eingesetzt (Protokoll modifiziert nach Martín et al.[27]). VTS-Proben wurden in sterilem Leitungswasser suspendiert, sedimentiert und eine nested-PCR mit dem Überstand als Matrize durchgeführt. Flüssigproben wurden direkt in einer nested-PCR verwendet.

3.2 Probenahme und Erreger-Nachweis in unterschiedlichen Rebveredlungsbetrieben

Über das Jahr 2014 wurden in drei verschiedenen Rebschulen in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg in den einzelnen Stadien des Rebveredlungsprozesses unterschiedliche Proben entnommen und hinsichtlich des Vorkommens von *Pch* untersucht.
Zu Beginn des Jahres 2014 wurden zum Zeitpunkt der Anlieferung des Veredlungsholzes bereits Holzproben (verschiedene Edelreis- und Unterlagensorten), Flüssigproben aus unterschiedlichen Tauchbädern und z.T. VTS-Proben entnommen. Zum Zeitpunkt der Veredlung und des Vortreibens der veredelten Reben wurden unterschiedliche Pfropfreben und Vortriebsubstrat aus den jeweiligen Vortriebkästen entnommen. Während der Standzeit der Reben im Freiland (Verwachsen der Veredlungsstellen) und kurz vor dem Ausschulen der fertigen Pfropfreben wurden ebenfalls

[27] Martín et al. (2012). Real-Time PCR Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. Applied and Environmental Microbiology 78: 3985-3991

Holzproben untersucht. Daneben wurden teilweise Sporenfallen im Ein-Wochen-Turnus im Freiland aufgestellt.
Die Holzproben wurden stets hinsichtlich *Pch*-charakteristischer Holzsymptome bonitiert und zu Beginn des Jahres und zum Veredlungsstadium durch Kulturmaßnahmen und direkt mittels nested-PCR (siehe 3.1) untersucht. Im weiteren Verlauf des Jahres wurden diejenigen Pfropfreben, die die auffälligsten Symptome im Holz zeigten, selektiert und durch Kulturmaßnahmen und nested-PCR mit extrahierter DNA näher beprobt (siehe 3.1). Sporenfallen, VTS- und Flüssigproben wurden, wie unter 3.1 beschrieben, auf das Vorhandensein des Esca-Erregers untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Nachweismethoden für *Phaeomoniella chlamydospora* in verschiedenen Matrizes

Hinsichtlich des Nachweisverfahrens von *Pch* in Rebenholz hat sich bislang der Nachweis durch nested-PCR mit extrahierter DNA als die Methode der Wahl herausgestellt, da sie in Bezug auf Funktionalität und Reproduzierbarkeit zuverlässig ist.
Der direkte Nachweis in inokuliertem Flüssigmedium ist möglich, jedoch ist hier das Kriterium der Reproduzierbarkeit bislang nicht gegeben und bedarf weiterer Optimierung. Den bisherigen Beobachtungen zufolge ist zu vermuten, dass der Nachweiserfolg in Flüssigmedium von der vorhandenen DNA-Menge und der Konzentration von Inhibitoren abhängt und jede Probe somit individuell behandelt werden müsste. Der Nachweis durch Kulturmaßnahmen ist ebenfalls möglich, war jedoch nur in Einzelfällen erfolgreich.
Der Erreger konnte in künstlich inokulierten VTS-Proben und Sporenfallen mittels nested-PCR mit extrahierter DNA zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. In VTS-Proben aus den Rebschulen konnte der Pilz mittels nested-PCR mit extrahierter DNA und durch eine direkte nested-PCR jeweils in einer Probe (unterschiedliche Proben) nachgewiesen werden. Die geringe Nachweisrate konnte auf eine zu geringe DNA-Menge bzw. eine zu hohe Konzentration an Inhibitoren in der Reaktion zurückzuführen sein. Für den Erreger-Nachweis in Flüssigkeiten besteht noch Optimierungsbedarf, da der Nachweis bisher nur in einer Wasserprobe durch direkten Einsatz des Wassers in eine nested-PCR erfolgte. Für die DNA-Extraktion aus Wasser gilt es die angewandte Methode nach Retief et al. (2006)[28] weiter zu verfeinern und ggf. weitere Methoden zu erarbeiten und zu überprüfen. Eine Isolation von *Pch* aus VTS und Flüssigkeiten auf Nährmedium war bis dato nicht erfolgreich, was zum einen am sehr geringen Probenumfang liegen könnte oder zum anderen, dass der Erreger in zu geringen Mengen vorhanden bzw. bereits abgestorben war und somit durch andere schneller wachsende Pilz überwachsen wurde und nicht mehr erfasst werden konnte.

4.2 *Pch*-Nachweis in unterschiedlichen Rebveredlungsbetrieben

Bereits zu Beginn des Pflanzguterzeugungsprozesses konnte *Pch* in Einzelfällen in den Rebschulen nachgewiesen werden. So konnte beispielsweise in Rebschule **A** der Erreger in zwei Unterlagenruten und einem Tauchbad und in Rebschule **B** und **C** jeweils in einer Vortriebsubstratprobe festgestellt werden.

[28] Retief et al. (2006)

In Bezug auf das Unterlagenholz bereits veredelter Reben konnte im August, also zum Zeitpunkt des Verwachsens der Veredlungsstelle im Freiland, eine deutlich höhere Nachweisrate durch nested-PCR mit extrahierter DNA beobachtet werden. Dies kann zum einen teilweise durch einen größeren Probenumfang und zum anderen durch eine Ausbreitung des Pilzes im Holz über die Zeit oder eine Infektion im Freiland zu erklären sein. So konnte in Rebschule **A** in 75% der auffälligsten und beprobten Pfropfreben der Esca-Erreger festgestellt werden, gefolgt von Rebschule **B** mit 33,4% und Rebschule **C** mit 25%. Kurz vor dem Ausschulen der fertigen Pfropfreben war *Pch* in Rebschule **A** und **C** in 33,4% und in Rebschule **B** in 16,7% der beprobten Reben nachzuweisen. Somit war die Nachweisrate kurz vor dem Ausschulen der Reben niedriger als noch im August, obwohl generell die Symptome im Holz deutlich ausgeprägter waren. Da grundsätzlich der Erreger-Nachweis nicht immer mit den Holzsymptomen in Einklang gebracht werden konnte, lässt vermuten, dass Holzsymptome und die Anwesenheit des Pilzes an einer bestimmten Stelle im Holz nicht zwangsläufig korrelieren. Prinzipiell war in Bezug auf die Symptome im Holz eine stetige Zunahme über das Jahr zu beobachten, sowohl in der Häufigkeit ihres Auftretens als auch in ihrer Ausprägung.

5 Fazit und Ausblick

Der Erreger-Nachweis in Holz durch nested-PCR mit extrahierter DNA ist im Hinblick auf Funktionalität und Reproduzierbarkeit zuverlässig und daher bislang die Methode der Wahl. Der Nachweis in künstlich inokulierten VTS-Proben und Sporenfallen ist bereits zuverlässig und reproduzierbar erfolgt und muss für Proben aus den Rebschulen weiter angepasst bzw. optimiert werden. Für den Nachweis in Flüssigproben besteht noch Optimierungsbedarf; ggf. wären weitere Methoden zu erarbeiten. Das Augenmerk wird in Zukunft auf Nachweismethoden durch nested-PCR mit extrahierter DNA aus den verschiedenen Matrizes liegen. Nach Möglichkeit soll ebenfalls die Erprobung schneller und kostengünstigerer Nachweisverfahren erfolgen. Diese sollen schließlich mit bereits etablierten Methoden verglichen werden. Darüber hinaus ist die Etablierung eines quantitativen Nachweisverfahrens durch real-time PCR mittels Taqman-Sonden angestrebt.

In den Rebschulen konnte der Erreger bereits zu Beginn des Pflanzguterzeugungsprozesses vereinzelt in diversen Matrizes nachgewiesen werden. Die *Pch*-charakteristischen Holzsymptome nahmen im Lauf des Jahres stetig zu und der Erreger-Nachweis war zur Mitte der Standzeit der Reben im Freiland am höchsten und gegen Ende wider Erwarten etwas geringer.

Der Probenumfang soll im Jahr 2015 bereits zu Beginn erhöht und vereinheitlicht werden. Zudem, sollen nach Möglichkeit in allen Betrieben Sporenfallen im Freiland zum Einsatz kommen und beprobt werden.

6 Literaturverzeichnis

Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jeménez J., Armengol J. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. Plant Soil 364: 5-13

Aroca Á., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez J., Raposo R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. European Journal of Plant Pathology 126: 165-174

Edwards J., Marchi G., Pascoe I.G. (2001). Young esca in Australia. Phytopathologia Mediterranea 40: 303-310.

Fischer, M. (2003). Esca jetzt auch in Junganlagen? Der Badische Winzer 11: 26-27

Fischer, M. (2009). Untersuchungen zu den Übertragungswegen der Esca-Erkrankung im Weinbau und Erarbeitung von Verfahren zur Erzeugung gesunden Rebenpflanzguts. Forschungsvorhaben BLE 06HS022

Fischer, M. (2013a). Esca-Krankheit der Weinrebe, Informationsblatt des JKI

Fischer, M. (2013b). Antrag auf Förderung des Forschungsvorhabens: „Pflanzmaterial als eine mögliche Infektionsquelle der Esca-Krankheit der Weinrebe: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie des Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* im Bereich Rebschule“

Graniti A., Surico G., Mugnai L. (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? Phytopathologia. Mediterranea 39: 16-20

Larignon, P. & Dubos B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. Phytopathologia Mediterranea 39: 184-189.

Martín M.T., Cobos R., Martín L., López-Enríquez L. (2012). Real-Time PCR Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. Applied and Environmental Microbiology 78: 3985-3991

Retief E., McLeod A., Fourie P.H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. European Journal of Plant Pathology 115: 331-339.

Rooney S.N., Eskalen A., Gubler W.D. (2001). Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. Phytopathologia Mediterranea 40: 351-356.

Scheck H.J., Vasquez S.J., Gubler W.D. (1998). Three *Phaeoacremonium* spp. Causing Young Grapevine Decline in California. Plant Disease 82: 590

Serra S., Mannoni M.A., Ligios V., Fiori P.P. (2011). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevine planting material in Sardinia and its control with combined hot water and cyproconazole treatments. Phytopathologia Mediterranea 50: 61-76

Surico G. (2001). Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca. Phytopathologia Mediterranea 40: 487-490.

Analyse und Vergleich der Erfolgsfaktoren von biologisch und integriert wirtschaftenden direkt vermarktenden Weingütern unter besonderer Berücksichtigung des Zielsystems, der Lebenszufriedenheit und den Persönlichkeitseigenschaften der Unternehmerfamilie

M. Sc. Maximilian Iselborn,

Hochschule Geisenheim University, Zentrum für analytische Chemie und Mikrobiologie, Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung, Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim

Im Jahr 2014 wurde weiterführende Literatur im Bereich der Erfolgsfaktorenforschung studiert sowie eine erste Untersuchung der Datenbasis durchgeführt, welche zeigt, dass 140 Betriebe im Zeitfenster von fünf Jahren einer näheren Betrachtung unterzogen werden können. Die nachfolgenden Abschnitte schildern den Stand der Arbeit im Abriss.

Wettbewerbstheoretisch lassen sich direktvermarktende Weinbaubetriebe wie folgt einordnen. Während sich der Trauben- und Fassweinmarkt näherungsweise einer einer polypolistischen Marktstruktur zuordnen lässt, welche sich durch homogene Güter und eine Vielzahl von Anbietern und Nachfragern charakterisiert, zeigt der Flaschenweinmarkt, der von in- und ausländischen Genossenschaften, Kellereien und direktvermarktenden Weinbaubetrieben beliefert wird, die Struktur einer monopolistischen Konkurrenz. Die monopolistische Konkurrenz charakterisiert sich durch eine Marktstruktur, in welcher viele Anbieter vorliegen, wobei Anbieter partielle Substitute (Flaschenwein) anbieten, die sich in Teilen von Konkurrenzprodukten differenzieren. Weiter findet sich aus Sicht der Nachfrage und der starken Konzentration im LEH ein partielles Nachfrageoligopol wieder. Während Genossenschaften und Kellereien primär Größenvorteile nutzen können, können kleinstrukturierte Direktvermarkter sowohl Kosten- als auch Differenzierungspotentiale zum Aufbau strategischer Erfolgsfaktoren nutzen.

Aufgrund der Kleinstunternehmensstruktur ist der Erfolg eines weinbautreibenden Unternehmens eng mit der unternehmerischen Ausrichtung von Unternehmerfamilie sowie dem Betriebsleiter, welcher die Unternehmensleitung innehält, abhängig. Dem Betriebsleiter in Weinbauunternehmen kommen somit zwei zentrale Rollen zu, die zu einer erfolgreichen Betriebsausrichtung führen können. Zum einen muss der Betriebsleiter, stellvertretend für die Unternehmerfamilie, einen klaren strategischen Kurs verfolgen. Dieser strategische Leitfaden sollte dabei der Unternehmerfamilie als Orientierung dienen sowie am Markt die Möglichkeit der Positionierung schaffen. Zum zweiten muss der Betriebsleiter für die operative Umsetzung in Form von Handlung sorgen. Dabei lässt sich die Annahme treffen, dass ökonomisch erfolgreiche Betriebe von Betriebsleitern geführt werden, welche überdurchschnittliche Betriebsleiterfähigkeiten hinsichtlich der Kenntnis, dem Aufbau und Erhalt von Erfolgspotentialen besitzen sowie eine klare strategische Richtung verfolgen.

Der aktuelle Stand der Forschung konnte die umfangreiche Literatur zum Stand der Erfolgsfaktorenforschung auf die Betriebsspezifika dv. Weinbaubetriebe eingrenzen. Ersichtlich wird die Bedeutung des Betriebsleiters als zentrale Stellschraube zum Aufbau und Erhalt von Erfolgspotentialen. Deshalb wird sich die Forschung weiterführend auf die Einstellung des Betriebsleiters als zentrale Stellschraube zum Aufbau und Erhalt von Erfolgspotentialen konzentrieren, da hierbei die Annahme zu treffen ist, dass diese einen kritischen Erfolgsfaktor darstellt. Des Weiteren wird die Datenbasis um die neue Erhebung aus dem Wj. 12/13 erweitert.
Aus dem bestehenden Aufbau der Arbeit werden Forschungsfragen zum Erfolg abgeleitet, so dass es im Spätjahr 2015 zu einer Erhebung kommen kann, welche in Verbindung mit den wirtschaftlichen Daten die bestehende Forschungslücke schließt.

Erstellung einer Wein-Warenstromanalyse für Rheinland-Pfalz zur Marktpotenzialabschätzung heimischer Weine

M. Sc. Marianne E. Steinschulte

Zentrum für Ökonomie/ Institut für Betriebswirtschaft und Marktforschung
Hochschule Geisenheim University, Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim

Der deutsche Weinmarkt ist weltweit einzigartig, da der vergleichsweise hohe Weinkonsum (ca. 20,3 Mio. hl in 2013) einer nicht ausreichenden heimischen Produktion (ca. 9,1 Mio. hl in 2013) gegenüber steht. Um die Nachfrage zu decken, ist die deutsche Weinwirtschaft auf Weinimporte angewiesen, was zusammen mit der freien Marktstruktur für ein sehr umfangreiches und vielfältiges Angebot auf dem Weinmarkt in Deutschland führt. Gleichzeitig stehen dadurch die heimischen Erzeugnisse in einem intensiven Wettbewerb, insbesondere im Preiseinstiegssegment. Ein sehr wichtiger Absatzmarkt für diese Weine ist der Handel. In unterschiedlichen Erhebungsmethoden stimmen die Studien der Hochschule Geisenheim mit den Zahlen des Deutschen Weininstituts bzw. GfK-Konsumerpanels darin überein, dass die Vertriebskanäle im Handel (Discounter und Lebensmittelhandel) zusammen mind. 60 % des Hauskonsums von Wein abdecken. Das Deutschwein-Segment in diesem Bereich wird hauptsächlich auf dem Fassweinmarkt gehandelt und über Weinkellereien vermarktet. Für den Erfolg der deutschen Weine und die heimische Weinwirtschaft nimmt der Fassweinmarkt daher eine Schlüsselrolle ein. Dies gilt insbesondere für den Fassweinmarkt in Rheinland-Pfalz, der den überwiegenden Teil (knapp 70 %) der heimischen Weinproduktion über diesen Vertriebsweg vermarktet.

Mit der vorliegenden Studie der Warenströme auf dem Fassweinmarkt in Rheinland-Pfalz soll das Beziehungsgeflecht auf diesem Teilmarkt erklärt werden. Das Ziel der Analyse ist es, Lenkungseffekte, Substitutionsbeziehungen und Reaktionen auf Marktschocks zu erläutern, um das Marktpotenzial der heimischen Weine besser abschätzen zu können. Dafür wurde zunächst eine deskriptive Analyse der Warenströme des rheinland-pfälzischen Weinmarktes anhand der Daten der amtlichen Begleitscheindokumente sowie weiterer Daten der amtlichen Statistik in den Jahren 2000 bis 2012 erstellt. Es lässt sich in dem betrachteten Zeitraum v.a. ein sehr deutlicher Strukturwandel innerhalb der Branche erkennen, der in den verschiedenen Anbaugebieten sehr unterschiedlich verläuft. Es handelt sich hierbei um eine langfristige Veränderung des Marktes, als mutmaßliche Reaktion auf die Anforderungen der Konsumenten und des Handels. Die Veränderung in der Struktur der Weinbranche verläuft dabei in den drei größten Anbaugebieten Rheinhessen, Pfalz und Mosel sehr unterschiedlich. Darüber hinaus zeigt sich eine starke Vernetzung der Unternehmen untereinander, die zu der ausgeprägten Komplexität des deutschen Weinmarktes beitragen. Jahrgangsbedingte Verfügbarkeitsschwankungen scheinen darüber hinaus auf die Entwicklung des Marktes keinen langfristigen Einfluss zu haben.

Es handelt sich um einen sehr komplexen Markt, der intensiv vernetzt ist und dessen Unternehmensstruktur einen starken Einfluss auf die Entwicklung hat. Entgegen den Erwartungen konnten für den sehr kleinen Jahrgang 2010 keine signifikanten Reaktionen nachgewiesen werden. Darüber hinaus werfen die Ergebnisse der deskriptiven

Analyse der Statistik weitere, neue Fragen auf, die anhand der bisher verfügbaren Daten nicht ausreichend erklärt werden können. Dies gilt insbesondere für qualitative Themen, die jedoch bei einem Genussmittel wie Wein eine besondere Bedeutung haben.

Zur weiteren Überprüfung der Beobachtungen aus der Datenanalyse wurden aus den Ergebnissen Forschungshypothesen abgeleitet und weiterführende Fragen gesammelt. Die Ergebnisse wurden insgesamt in vier Themenkomplexe unterteilt: 1. Die Gesamtmarktentwicklung des Fassweinmarktes in Rheinland-Pfalz, 2. Der gebietsspezifische Strukturwandel, 3. Die Rebsortenspezifische Entwicklung und 4. Der Importhandel mit Fasswein. Diesen vier Themengebiete sind sieben Arbeitshypothesen zugeordnet, deren Überprüfung Inhalt der derzeitigen Forschung ist.

Da für die Verifizierung einiger Hypothesen und die Beantwortung einer neuer offener Fragen, die verfügbaren Daten und Statistiken nicht ausreichend sind, wird die Studie um eine weitere, qualitative Methodik erweitert. Die Hypothesen, Zwischenergebnisse und Fragen werden in Einzelgesprächen mit Experten der Branche diskutiert. Die Vorgehensweise entspricht dabei einer Variante der Delphi-Methode, bei der validierbare Ergebnisse ermittelt werden können. Die Befragung der Experten, die auch untereinander anonym bleiben, erfolgt in Einzelgesprächen, die persönlich geführt werden. In einer ersten Runde werden die Hypothesen und offenen Fragen mit den Experten in einem offenen Gespräch erörtert. Diese Gespräche werden ausgewertet und die Zwischenergebnisse den Experten in einer zweiten Gesprächsrunde vorgestellt. Diese Rückkopplung ermöglicht eine Konsensbildung innerhalb der Expertengruppe als eindeutiges Ergebnis der Befragung. Auf diese Weise sollen statistisch nicht erfasste Entwicklungen in der Weinbranche, wie z.B. Veränderungen im Qualitätsmanagement bei der Weinbereitung, aufgezeigt werden. Die Erkenntnisse aus dieser Studie bieten zusammen mit der Statistik ein umfassendes und detailliertes Bild des deutschen Fassweinmarktes.

Erfolgsfaktoren für den Online-Verkauf von Wein im Internet: eine neuroökonomische und verhaltenspsychologische Untersuchung

Prof. Dr. Edith Rüger-Muck, Prof. Dr. Gerhard Raab

Hochschule Ludwigshafen, Ernst-Böhe-Str. 4, 67059 Ludwigshafen am Rhein

Seit dem Start am 4.9.2014 des Forschungsvorhabens untersuchen Frau Prof. Rüger-Muck, Herr Prof. Raab und Herr Merdian die Erfolgsfaktoren für den Online-Verkauf von Wein im Internet. Wie im Projektplan vorgesehen befindet sich das Projekt in der zweiten von vier Phasen und weist demnach keine projektgeschuldeten Verschiebungen auf.

In der ersten Phase des Projekts wurde die intensive Literaturrecherche in nationalen und internationalen Artikeln für das Projekt vertieft und überarbeitet. Darüber hinaus stellte Frau Prof. Rüger-Muck im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes das Projekt am renommierten Ehrenberg-Bass-Institute for Marketing Science der University of South Australia am 20. August 2014 vor, um weitere Anregungen von den dortigen Forschern zu erhalten.

Dabei bestätigten sich die bisherigen Aussagen über die Forschungslücke des Projektes zu den „Erfolgsfaktoren für Wein im Internet“, die im Antrag auf Förderung des Forschungsvorhabens bereits genannt wurden. Des Weiteren wurde die Auswahl der Zielgruppe für den Pre- und Haupttest diskutiert. Die Analyse von Webseitenbesuchern anhand von expliziten und impliziten Messmethoden ist in dem Bereich „Online-Weinhandel“ bisher einmalig und verspricht daher einen hohen Mehrwert für die Forschung. Anzumerken ist, dass das Reisebudget durch den Forschungsaufenthalt nicht belastet wurde.

Der Pretest wird wie vorgesehen im ersten Quartal 2015 durchgeführt und leitet somit die zweite von vier Phasen ein. Im Detail beginnen die Erhebungen am 19.02.2015 am Weincampus Neustadt / DLR Rheinpfalz, um eine weinaffine Zielgruppe zu befragen. Weitere Erhebungen werden im Laufe des Februars an der Bibliothek an der Hochschule Ludwigshafen durchgeführt.

Der Pretest soll sicherstellen, dass die im Vorfeld ausgewählten Websitedesigns die intendierten Emotionalitätsschwerpunkte (Dominanz, Balance, Stimulanz sowie „Neutral“) eingängig widerspiegeln und von den Konsumenten entsprechend wahrgenommen bzw. zugeordnet werden. Hierzu sollen 60 Personen zu den einzelnen Entwürfen befragt und gebeten werden, eine Einschätzung in Bezug auf die Art der Emotionalität abzugeben.

Nach Durchführung des Pretests wird im Laufe des Jahres dann die Auswertung der Ergebnisse und eine Überarbeitung bzw. Feinjustierung des Untersuchungsdesigns stattfinden. Damit in der späteren Hauptuntersuchung ein reibungsloser Untersuchungsablauf mit maximalen Erfolgsaussichten sichergestellt wird, erfolgt im Rahmen der zweiten Projektphase eine intensive Einarbeitung mit den anspruchsvollen Messgeräten.

Es ist geplant, das Projekt auf der FDW-Fachtagung am 29. April am DLR Rheinhessen-Nahe-Hunsrück an der Dienststelle in Oppenheim vorzustellen. Eine weitere anvisierte Tagung auf der geplant ist einen Artikel einzureichen ist die Tagung der Gesellschaft für angewandte Wirtschaftspsychologie GWPs (Anfang 2016).

Nach derzeitigem Stand werden wir wie geplant die dritte Projektphase inklusive der Hauptuntersuchung im Herbst/Winter 2015 beginnen.

Physikalische und Chemische Alternativen zur Fasskonservierung mittels schwefeliger Säure

M. Sc. (Oeno.) Engela Kritzinger, Dr. Pascal Herr,
Prof. Dr. Ulrich Fischer

Kompetenzzentrum Weinforschung, Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, 67435 Neustadt an der Weinstraße

1. Introduction

Oak barrels form an integral part of wine production, especially that of high quality wines (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2006; Ortega-Heras et al., 2007) where they are implemented as fermentation or ageing vessels. Their procurement is, however, expensive and their management challenging. Given high barrel prices, many wineries will repeatedly use barrels for many years. Furthermore, the increasing international emphasis on the sustainability of natural resources for example oak trees, serve as a driving force to maximise their functionality and improve their viability (Theron, 2010; Porter et al., 2011). Wine barrels are particularly known as an ecological niche for microbial proliferation. For this reason it is of utmost importance to sanitise barrels before further use to minimise the risk of in-barrel wine spoilage caused by spoilage microorganisms such as *Brettanomyces*/*Dekkera* or acetic acid bacteria. In-barrel wine spoilage as a result of incomplete or insufficient barrel sanitation is a major problem faced by the industry. It results in great financial losses. Not only are financial losses caused by a downgrade in quality or wine losses, further financial loss is due to the fact that the wine has, at this specific point in time, already received 75% of its input cost. Proper barrel cleaning and sanitation strategies ensure microbial soundness and might even extend the effective lifetime of a barrel. Beyond any doubt, the most widely-used sanitisation method for barrels is the use of sulphur dioxide. However, since a moratorium on its use has been issued by die European Commission, its use as biocide for barrel sanitation is threatened. Alternative sanitising treatments that are currently being used by the industry include chemical agents (sodium percarbonate, ozone) or physical methods (hot water, steam, UV radiation, ultrasound, microwave). The chemical agents, having strong oxidising potential, work on the basis of oxidation, whereas the physical treatments work on the basis of physical factors, such as temperature, pressure and radiation to kill microorganisms. Literature regarding these treatments are, however, scattered and to date, no comprehensive study has been undertaken to compare the different treatments under controlled conditions in terms of their efficiency to reduce spoilage microorganisms in oak wood. Therefore, the need arises for an exploratory study to identify and evaluate sanitising treatments that would ultimately reduce or eliminate spoilage organisms. In addition, these treatment should have no detrimental impact on desirable oak derived compounds that are extracted into wine during maturation and contribute to the quality of the wine. Such compounds include lignins, tannins, gallic acid, ellagic acid and various volatile compounds. Among these compounds, ellagitannins, which resort under hydrolysable tannins, can represent up to 10% of the oak heartwood (Scalbert et al., 1988). The most abundant ellagitannins

in oak wood are the isomers, vescalagin and castalagin (Nonier et al., 2005). Ellagitannins (which release ellagic acid after hydrolysis) are involved in many physiochemical reactions in wine. They have antioxidant activities (Alañón et al., 2011) and are involved in polymerization reactions between flavanols and between flavanols and anthocyanins (Timberlake and Bridle, 1976; Vivas and Glories, 1996) which, in turn, affect wine astringency and colour, respectively. The main volatile compounds that migrate from oak wood to wine are the cis and trans isomers of whisky lactones, furfural and its derivates, phenolic aldehydes such as vanillin and syringaldehyde and volatile phenols such as guaiacol, eugenol and syringol. It could be proposed that the chemical and physical barrel sanitation treatments may not only kill the unwanted microorganisms, but also bring about changes in the desirable compounds in wood. Literature investigating this hypothesis is rather limited. Our aim is to undertake an exploratory study to investigate, under controlled conditions, the effect of different physical and chemical barrel sanitisation treatments on various spoilage microorganisms harboured in oak wood. Furthermore, these treatments will be evaluated in terms of their effect on oak ellagitannins and volatiles. To the best of our knowledge, such a study has not been undertaken. This report focuses on the methods used to detect and enumerate spoilage microorganisms as well as the LC-MS ad GC-MS methods that have been developed for the identification of oak ellagitannins and volatile compounds.

2. Material and methods

2.1 Model system for microbial contamination of oak wood

New French oak blocks (fire toasted to a medium grade) provided by Stavin (Sausalito, CA, U.S.A.) were inoculated with different microorganisms generally associated with in-barrel wine spoilage. The microorganisms that were studied in preliminary tests, include the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis*, the lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni* and the acetic acid bacteria, *Acetobacter aceti*. *S. cerevisiae* and *O. oeni* are considered as reference species because of their winemaking relevance. Oak squares were suspended in synthetic wine medium (Ugliano et al., 2003) where after adapted cells were inoculated in the medium at 10^6 cells/mL and incubated for five days at 28°C. (This represents the higher end of the concentration range in which spoilage organisms usually occur in wine.) The squares were then removed and dried for one hour in a sterile environment. Two millimetre layers of the wood surface were rasped off with a specific wooden rasp (Microplane, Russellville, AR, U.S.A.). The shavings were weighed where after the microorganisms were extracted with 0.9% sodium chloride solution (AppliChem, Darmstadt, Germany) supplemented with 0,1 % Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany).

2.2 Inoculation of oak stave blocks with microorganisms

New French oak blocks (2,4 x 1 x 0,8 cm, fire toasted to a medium grade, **Figure 1**) provided by Stavin were soaked in Yeast Peptone Dextrose broth (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). To prevent the blocks from floating on the surface which could result in uneven inoculation, the blocks were submerged by using an autoclaved coffee plunger (**Figure 2**, Bodum Inc.,Triengen, Switzerland). *Brettanomyces bruxellensis* (AWRI 1499), *Hanseniaspora uvarum* (ATCC 64296) and *Saccharomyces cerevisae* (DSM 70449) were inoculated into three respective media at 10^6 cells/ml and incubated at 30°C for 1 day. The oak blocks were removed from the medium and directly subjected to the different treatments.

Figure 1. French oak blocks used in the model system. Untoasted (left) and medium toasted (right).

2.3 Ozone treatment of inoculated oak blocks

Ozone gas was produced by a corona discharge generator (Univog 500, GeD mbH, Usingen, Germany) and bubbled into a stainless steel tank of recirculating water. The Univog 500 (**Figure 3**) equipped with a corona discharge was connected to a high pressure water pump operated at 40 bar (Kärcher K 2.14, Winnenden, Germany) fitted with a misting nozzle. The blocks were treated with ozone mist inside a stainless steel canister (volume 90 liter) for 15 and 30 minutes respectively. In a third treatment, blocks were submerged in a beaker that was continuously filled with ozonated water for a total of 5 minutes. The ozone concentration was indirectly measured over the oxidation reduction potential (ORP) of the water by a portable redox meter (PCE 228, PCE Instruments, Meschede, Germany). The ORP measured 900 mV which corresponds to an ozone concentration of approximately 2 mg/L. Control samples were left untreated and treatment times were based on those that are generally applied in the wine industry. Directly after the treatments, excess moisture was discarded and the blocks were transferred to sterile disposable 15 ml centrifuge tubes. Five millilitres of a sterile 0.9% sodium chloride solution (AppliChem, Darmstadt, Germany) supplemented with 0,1 % Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) were added to each tube which was then subjected to orbital shaking for 24 hours (250 rpm, Edmund Bühler SM25, Hechingen, Germany) to extract microorganisms from the wood.

Figure 2. Autoclaved coffee plunger used for the inoculation of oak wood with respective microorganisms.

Figure 3. The Univog 500 ozone generator.

2.4 Detection and enumeration of microorganisms

The extract was serially diluted and plated onto appropriate agar medium for enumeration. Yeast strains were cultivated at 28°C on 50 g/L YPD Agar Medium (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). *Oenococcus oeni* was cultivated on MRST agar containing MRS and Bacteriological agar supplemented with 10% preservative free tomato juice with the pH adjusted to 5.2 with 1M hydrochloric acid (HCl, Merck). *Acetobacter aceti* was cultivated on Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate agar consisting of 50 g/L D(+)-glucose (AppliChem, Darmstadt, Germany), 10 g/L yeast extract (AppliChem), 5g/L $CaCO_3$ (Merck) and 20 g/L Bacteriological agar (Merck) with pH adjusted to 5.5 with 1M HCl.
An aliquot of the extract was also used for flow cytometric quantification of cells. "Live-dead" staining was carried out in order to distinguish between damaged or dead cells from viable, healthy cells. For this procedure, 1mL cell suspension was washed with PBS buffer (4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl and 2.0 mM KCl, pH 7.2). The suspension was centrifuged, the supernatant discarded and the pellet re-suspended in 5 mL PBS buffer. Fluorescein diacetate (FDA) was added to obtain a final concentration of 0.5 mg/mL. The suspension was incubated at room temperature in the dark for 5 minutes and then propidium iodide (PI) in isotonic saline was added to achieve a final concentration of 14 µg/mL. The suspension was vortexed and immediately subjected to flow cytometric analysis at 488 nm (CyFlow® Cube 6 flow cytometer, Partek, Münster, Germany).

2.5 *Extraction of oak wood for HPLC/MS and GC/MS analysis*

The extraction method of Viriot et al. (1994) was used to extract soluble ellagitannins as well as volatile compouds from oak wood samples. French oak wood (*Q. petraea*), fire toasted to a medium intensity level, was rasped with a flat blade snap-in rasp (Microplane, Russellville, AR, U.S.A). 100 mg shavings of each sample were extracted with 5 mL acetone:water (7:3, v/v) at room temperature on an orbital shaker (250 rpm, Edmund Bühler SM25) for 180 min. Prior to extraction, internal standard for LC/MS analysis (geraniin) was added at a concentration of 2 mg/mL. The respective wood extracts **(Figure 4)** were microfiltered using a 0.45 µm PTFE filter (DIA Nielsen). The extract as is, was directly used for GC/MS analysis whereas LC/MS analysis required further concentration by concentrating a 4 mL aliquot under a nitrogen stream to remove the acetone. The resultant concentrate was made up to a final volume of 2 mL with ultrapure deionised water (ELGA, Veolia Water, Marlow, UK) and submitted to LC/MS analysis for the detection of ellagitannins.

Figure 4. Vials with oak wood extracts used for HPLC and GC analyses. Untoasted oak (left) and medium toasted oak wood extracts (right).

2.6 HPLC- QToF/MS Analysis

HPLC- QToF-MS analyses were performed on a Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to Agilent 1260 Infinity Binary Pump and a 6530 Accurate-Mass QToF mass spectrometer (Agilent Technologies). A Synergi™ 4 *µ* Fusion-RP 80 Å column (4 µm, 150 mm x 3 mm, Phenomenex, Torrance, CA) thermostated at 40°C was used for separation. Mobile phases consisted of 5% (v/v) acetronitrile containing 0.2% (v/v) formic acid in water (phase A) and 5% (v/v) water containing 0.2 % (v/v) formic acid in acetonitrile (phase B). The gradient program is outlined in **Table 1**. Zero grade air served as nebulizer gas (35 psi). Both the sheath gas and auxiliary gas were nitrogen. The sheath (drying) gas temperature was 400 °C and the flow rate 12 L/min. The MS capillary voltage was set at 3.5 kV. Spectra were recorded in the negative ion mode with a scan range of 100-1700 m/z at a fragmentation voltage of 170 V.

Table 1. Solvent concentration in the eluting gradient.

Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0
2	100	0
12	70	30
12.5	0	100
16	0	100
17	100	0

Eluent A: water/ acetonitrile 5% (v/v) / formic acid 0.2 % (v/v)
Eluent B: water/ acetonitrile 94.8 % (v/v) / formic acid 0.2% (v/v)

2.7 GC/MS Analysis

GC analyses were performed on an Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany) equipped with a programmed temperature vaporizing injector (PTV) and coupled to an ion trap PolarisQ mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific). Compounds were separated on a Rxi-5 Sil MS capillary column (Restek, Interscience, Belgium), 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL/min. PTV was done in solvent split mode. A glass liner (0.2 mm i.d.) packed with Tenax TA (80-100 Mesh, Restek) was used. Splitless mode was set after 3 minutes. The PTV was maintained at 62 °C for 1 min at a flow rate of 50 ml/min. Thereafter the temperature was increased at 10 °C/sec to 105 °C (1 min hold), 14.5 °C/sec to 250 °C (2 min hold) and finally at 14.5 °C/sec to 300 °C (10 minute hold). The oven temperature was held at 50°C for 5.5 min, ramped at 5 °C/min to 200 °C, held for 0.5 min and finally ramped at 25 °C/min to 280 °C, held for 5 min. Samples (5 µL) were injected in splitless mode. Xcalibur 1.2 was used for data acquisition. Detection was carried out by positive electron impact mass (EI) in full scan mode, using an ionisation energy of 70 eV.

3. Results and Discussion

3.1 Detection and enumeration of microorganisms

Enumeration of microorganisms is possible by using selective media and suitable conditions for incubation. This technique, however, presents a major drawback in the sense that colony growth is time-consuming, especially in the case of lactic acid bacteria or *Brettanomyces* strains. Furthermore, colony counts might be erroneous as to not represent the true microbial population. This can either be due to the inability to detect novel microorganisms that might not be cultivatable on known media (Comas-Riu and Rius, 2009) or due to the phenomenon of a viable but non-culturable (VBNC) state of microorganisms. VNBC phenotypes are characterised by the inability to be cultured on microbiological media although the cells are alive and metabolically and cellularly active. Transition into the VBNC state is augmented by stressors and negated with the removal thereof (Oliver, 1993). The VBNC state of wine related microorganisms was first proposed by Millet and Lonvaud- Funel (2000) and since then it has

been demonstrated to exist in *Oenococcus oeni* (Millet and Lonvaud- Funel, 2000), *A. aceti* and *A. pasteurianus* (Millet and Lonvaud- Funel, 2000; Du Toit et al., 2005), *S. cerevisiae, C. stellata and Z. bailii* (Divol and Lonvaud- Funel, 2005) as well as in *Brettanomyces* (Du Toit et al., 2005; Barata et al., 2008; Agnolucci et al., 2010; Serpaggi et al., 2012). Chemical and physical factors that are reported to induce the VBNC state in microorganisms include nutrient starvation, extreme temperatures, oxygen concentration, preservatives, osmotic concentrations, heavy metals as well as exposure to white light (Oliver, 2010). Nevertheless, the recognition of such a state in microorganisms highlights the importance to use, in addition to culture-dependent techniques, culture-independent techniques, particularly when stress related studies on microorganisms are to be conducted. Nearly all the studies pertaining to barrel cleaning efficacy used culture-dependent techniques to determine reductions in microbial populations after treatment. It is worthy of note that the stress factors applied (microwave, ultrasound, heat, ozone exposure) may have induced the VBNC state in microorganisms, obscuring results to a large extent. For this reason, we have decided to do both plate count method as well as flow cytometric quantification of cells. We were able to successfully extract microorganisms from mono-culture contaminated oak blocks and re-culture them on appropriate selective media (**Figure 5**). The shaving method permitted the isolation of microorganisms harboured within the wood. Under our experimental conditions, it has been established that the microorganisms can penetrate the wood deeper than 4 mm, which corresponds to data from Malfeito-Ferreira et al. (2004). Flow cytometric quantification in combination with “live-dead” staining allowed us to distinguish and quantify live cells from dead cells. The “live-dead” staining is displayed in **Figure 6.** PI can only penetrate cells with damaged cell membranes. These cells emit red when excited with the 488 nm spectral line. Live cells, on the other hand, have esterase activity which converts FDA to the fluorescent form to emit green light under excitation at 488nm. In this way, dead cells can easily be distinguished and enumerated from live cells.

Figure 5. *B. bruxellensis* colonies on YPD plated for enumeration purposes.

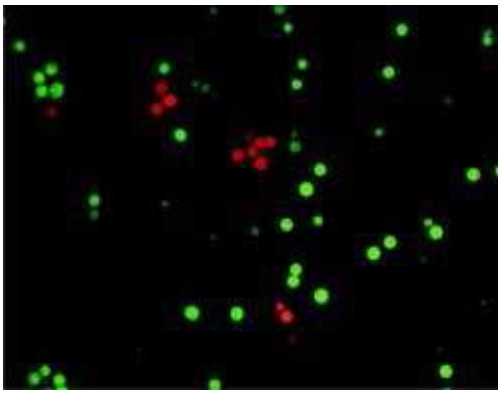


Figure 6. Viability staining examined under fluorescence microscope (S.Sommer).

Figure 7 displays the evaluation of a microbial population (*S.cerevisiae*) subjected to "live-dead" staining. The FSC/SSC plot (Figure 6, left) provides basic information on the size and granularity of the cells in the population, whereas the FL1-/FL3 plot (Figure 3, right) provides information on the fluorescence spectra obtained. In this way, the live population (green) can be enumerated separately from the dead (red) or injured cells (emitting both green and red light). Enumeration of yeast strains were possible with a minimum detection limit of 10^3 cells/mL. Optimisation of the method, however, is still required for the quantification of bacterial cells which seems to be more problematic owing to their small size. As expected, flow cytometric quantification values of yeast strains often exceeded numbers obtained by the plate count method. This observation has been made by other authors as well (Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012) and can be explained by the inability of certain cells to grow on selective media. Nevertheless, this will be the first approach to compare these two enumeration methods in a barrel sanitation study.

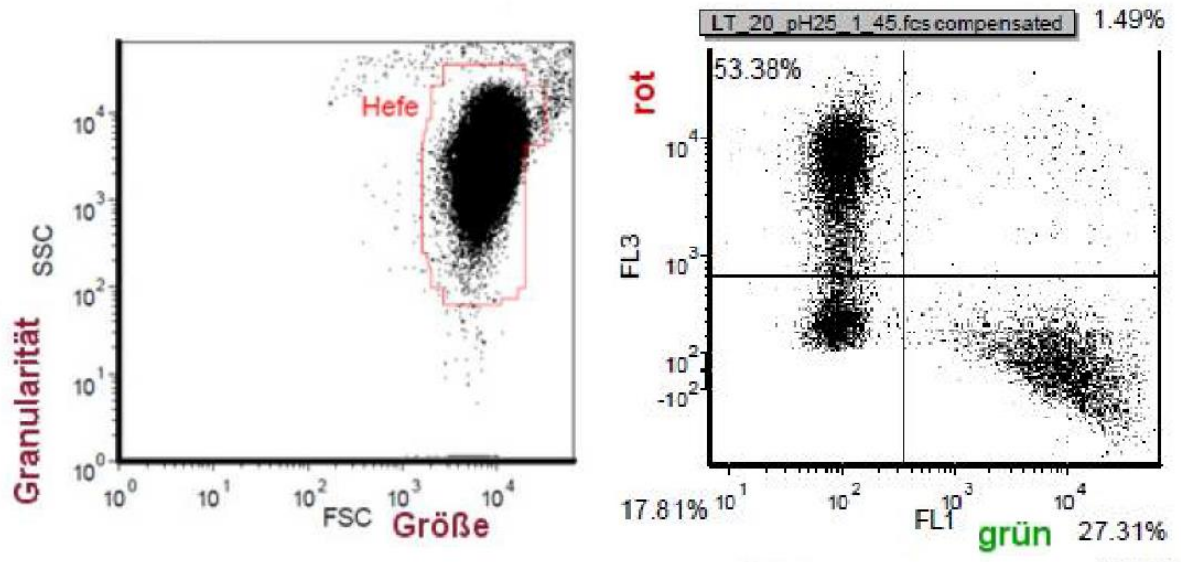


Figure 7. Viability staining of microbial population by means of flow cytometric analysis.

3.2 Efficiency of ozone treatments to reduce microbial contamination in oak wood

Although the use of ozone in wineries is widely gaining popularity, published literature on the use of ozone for winery sanitation, and more specifically barrel sanitation, is scant. An experiment was undertaken to evaluate the efficiency of different ozone treatments that are commonly applied for barrel sanitation purposes. French oak blocks contaminated with three different yeasts, *B. bruxellensis, H. uvarum* and *S. cerevisiae,* were subjected to different ozone treatments in order to evaluate the efficiency of the different treatments in reducing microbial counts in oak wood. Results relative to the reduction in yeast concentration as a result of the ozone treatments are shown in **Figure 8**. All three treatments (ozone mist 15 minutes, ozone mist 30 minutes and ozonated water 5 minutes) were effective in lowering the yeast count in the oak wood for all three yeasts tested. The reduction in cell count for the yeasts tested are comparable for the different treatments, with the exception of *S.cerevisiae* which seems to have been more sensitive to the ozonated water treatment. This treatment resulted in a 1.3 log reduction compared to the control treatment which corresponds to a more than

90% eradication of cells. For all the other treatments, the reduction observed corresponded to approximately 0.35 log units which translates to 55% of the yeast population being eliminated. This corroborates with data by Guzzon et al. (2011) who monitored the reduction in yeast population inside empty, 3 year old oak barrels in a Tuscan winery after the barrels had been subjected to different sanitation treatments. In their experiment, gaseous ozone (40 mg/cm^3 for 30 min) as well as aqueous ozone (2 mg/L for 30 min) were equally effective, resulting in a 70% decrease in total yeast counts. Noteworthy is the observation that longer treatment times do not necessarily result in greater microbial reductions since similar reduction are observed for the 15 and 30 minute ozone mist treatments. Similarly, the 5 minute ozonated water treatment resulted in comparable reductions. The efficiency of the treatment seems to depend mainly on the ozone concentration rather than on the duration of the treatment. Nevertheless, these results show that ozone treatment has the ability to reduce yeast numbers in contaminated oak wood, which contradicts previous results by Cantacuzene et al. (2003) who concluded that aqueous ozone (1, 3 and 5 mg/L for 3 minutes) had no effect on a *B. bruxellensis* population in contaminated oak cubes. The overriding aim of this experiment was to evaluate an ozone generator which is currently being used in the wine industry for sanitation purposes in terms of its efficiency in reducing yeast populations in oak wood. Current studies are evaluating the efficiency of different ozone concentrations in reducing yeast counts in contaminated oak blocks.

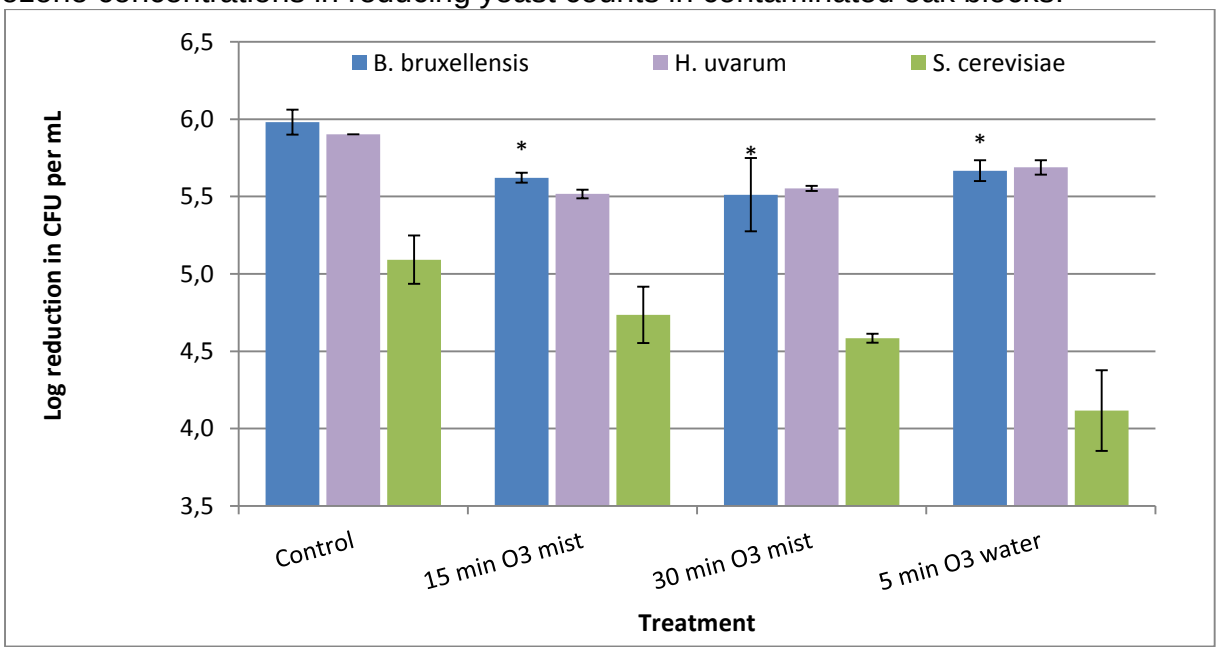


Figure 8. Reduction in microbial contamination (log CFU/ml) for different ozone treatments applied to oak wood blocks.

3.3 Extraction of oak wood for HPLC/MS and GC/MS analysis

Generally, alcoholic solvents such as aqueous methanol and ethanol have been used for the extraction of ellagitannins from wood. However, several authors have proven that alcoholic solvents are detrimental to ellagitannins (Viriot et al., 1993; Puech, et al., 1999). They are subject to hydrolysis to yield ellagic acid (Viriot et al., 1993), with increasing ethanol concentrations causing increased hydrolysis (Puech et al. 1999). Furthermore, ellagitannins can also undergo oxidation in aqueous ethanol solutions, giving rise to ellagitannin derivatives. (Puech et al. 1999). Vivas et al. (1996) and Lei (2002) have shown that aqueous acetone was a better solvent than aqueous methanol at extracting ellagitannins from wood samples. It provides higher yields of ellagitannins and also shows better stability of the compounds (Lei 2002). For this reason, aqueous acetone, was the extraction media of choice for the extraction of ellagitannins. The high solvent power of aqueous acetone also facilitates the extraction of volatile compounds from wood, allowing dual LC/MS and GC/MS analysis from the same wooden extract. For LC/MS analysis, it was decided to concentrate the sample from 4 ml to 2 ml since double concentrated samples resulted in increased sensitivity and intensity. All in all, the extraction is rapid and easy which allows the routine analysis of many samples.

3.4 Selection of internal standard

The quantification from mass data necessitates the use of an internal standard to correct the variability in mass signals. Internal standards have to structurally resemble the compounds that are to be quantified while, at the same time, they should not be present in the sample as such. Despite its structural difference as well as a much lower molecular mass, chlorogenic acid has been used in previous studies as internal standard for quantitative analysis of oak ellagitannins (Lee et al., 2005; Saucier et al., 2006). However, García-Estévez et al. (2012) showed that castalagin concentrations declined in the presence of chlorogenic acid compared to solutions lacking chlorogenic acid. We have identified geraniin, an ellagitannin present in geraniums, as a good candidate for internal standard. It closely resembles the molecular structure of the oak ellagitannins as seen in **Figure 9**. Furthermore, its molecular mass of 952.64 g/mol is also well comparable to the molecular mass of vescalagin/castalagin which is 934.63 g/mol.

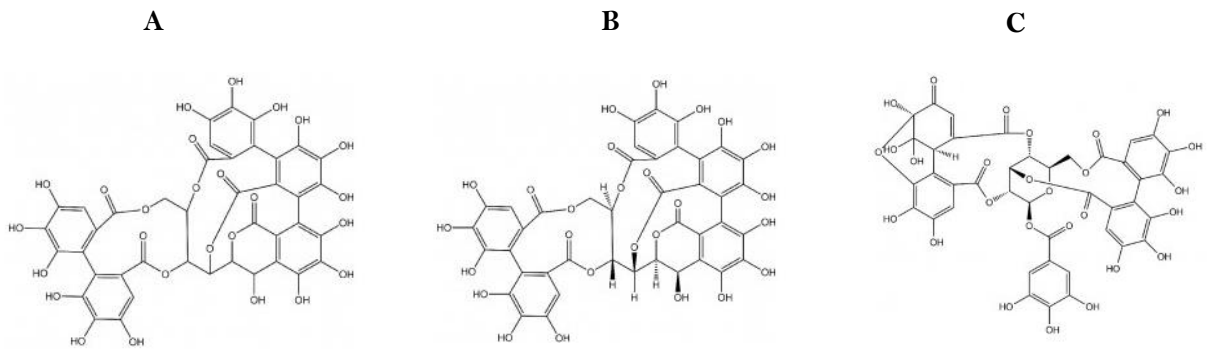


Figure 9. Molecular structures of castalagin **(A)**, vescalagin **(B)** and geraniin **(C)**.

3.5 Identification of ellagitannins by HPLC/MS

Analytical standards of vescalagin, castalagin and ellagic acid were injected to obtain appropriate mass spectra and retention times of the compounds under our experimental conditions. The characterisation results are listed in **Table 2**. Oak extract was then injected in order to identify ellagitannins and ellagitannin derivatives present in the sample. The chromatographic separation of the oak extract, is shown in **Figure 10** whereas the mass spectra of the three peaks are represented in **Figure 11**, **12**, and **13**. By comparing the mass spectra, it was shown that vescalagin (peak 1) elutes at 4.2 min, followed by castalagin (peak 2) at 6.5 min. Ellagic acid, the hydrolysis product of castalagin and vescalagin, elutes at 11.5 min. Castalagin fragments differently than its beta-33 isomer, vescalagin. Both ellagitannins show the peak with *m/z* value of 301. This is the diagnostic peak of ellagitannins derived from the loss of ellagic acid. The chromatographic peaks are well separated and sharp with good intensity, indicating that our current extraction method yields sufficient concentrations of the respective analytes. The application of the HPLC/MS method shows that it can unambiguously identify the major monomeric oak ellagitaniins, namely vescalagin and castalagin as well their degradation product, ellagic acid.

Table 2. Characteristic HPLC/ MS data of castalagin, vescalagin and ellagic acid.

				Major Ions *(m/z)*	
Compound	**MW (g.mol^{-1})**	**(M-H)$^{-}$**	**Retention time (min)**	**Base Peak**	**Other**
Ellagic acid	302	301	11.5	301	145, 283
Vescalagin	934	933	4.2	933	301, 425, 631
Castalagin	934	933	6.5	933	301, 467, 569

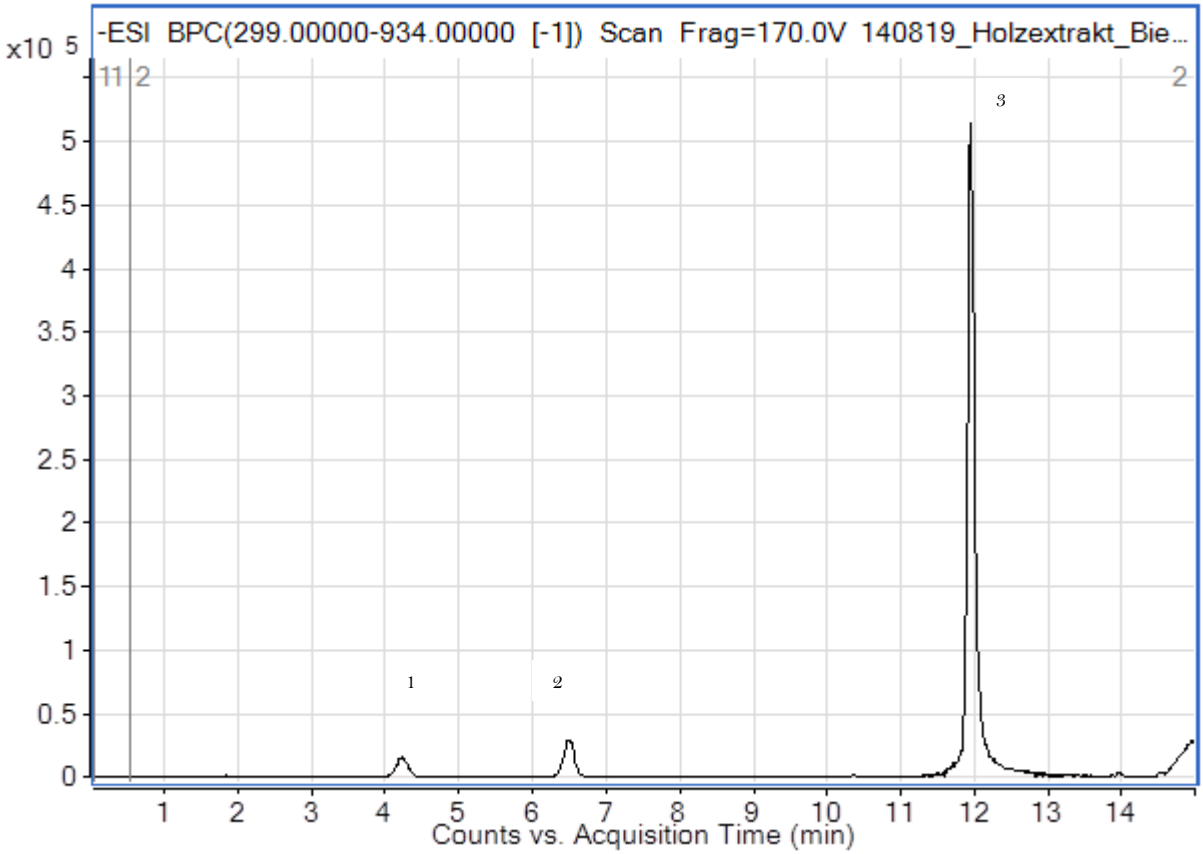


Figure 10. Chromatographic separation and detection of ellagitannins and an ellagitannin derivative in oak wood extract. Peaks 1: vescalagin, 2: castalagin, 3: ellagic acid.

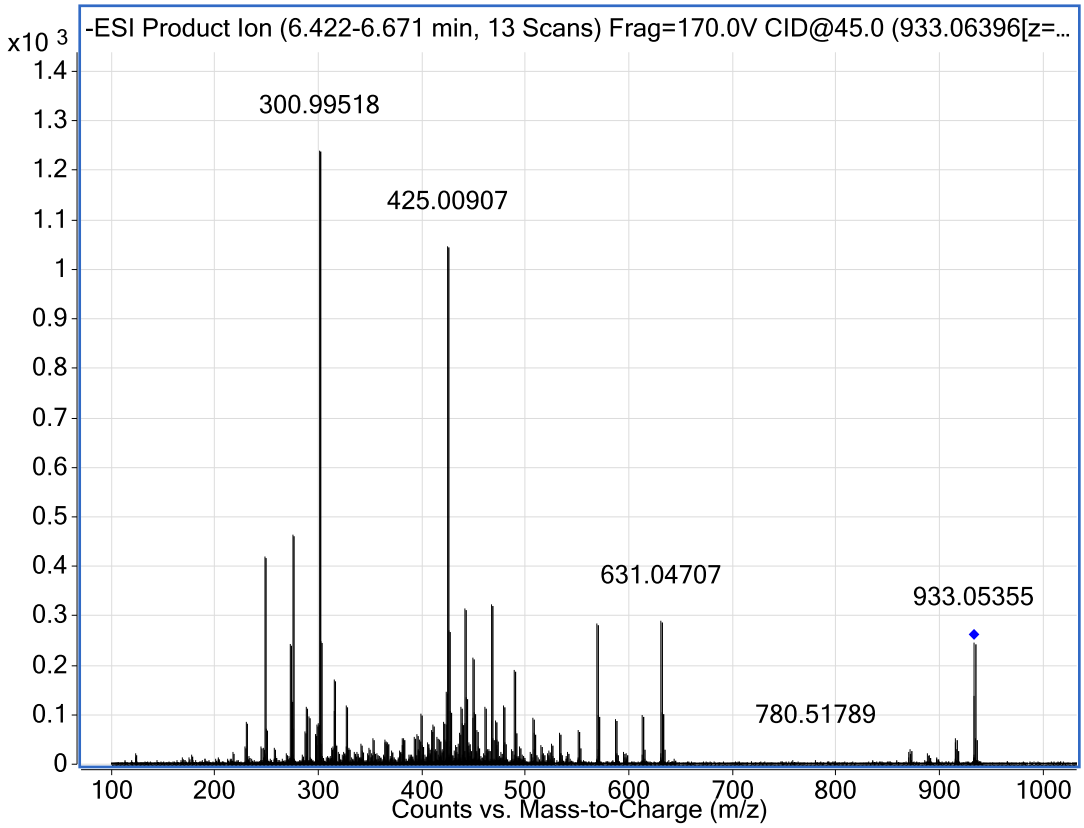


Figure 11. Mass spectra of vescalagin (Peak 1) in acetone/water extract of *Q.petraea*

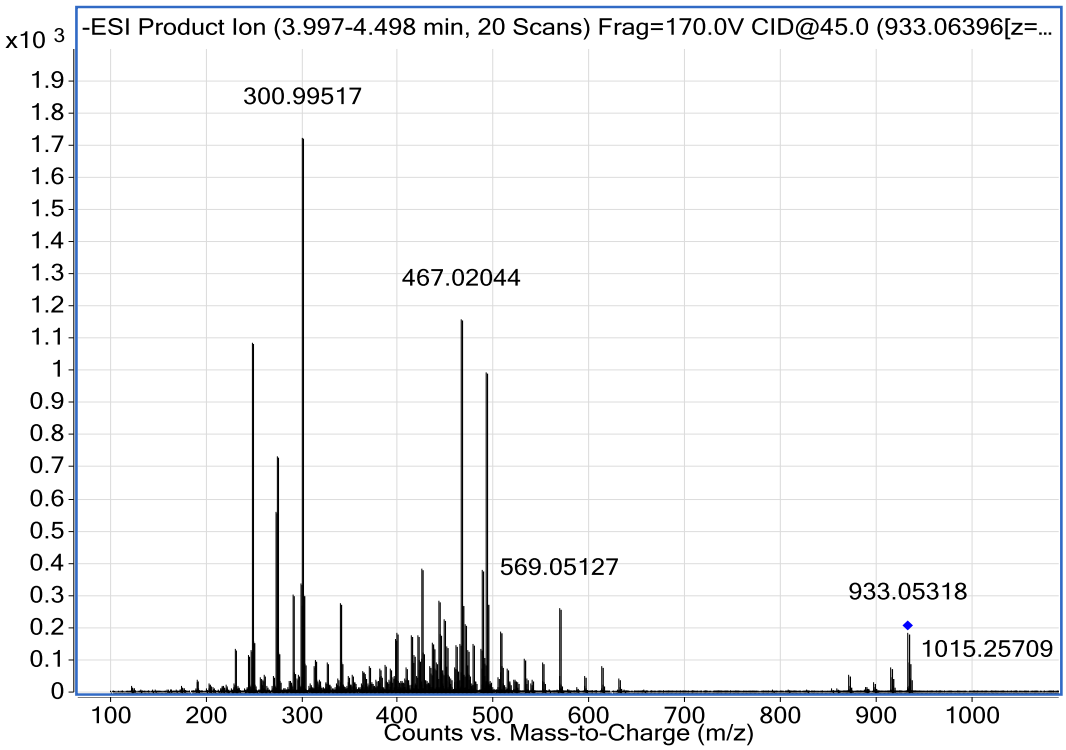


Figure 12. Mass spectra of castalagin in acetone/water extract of *Q.petraea*

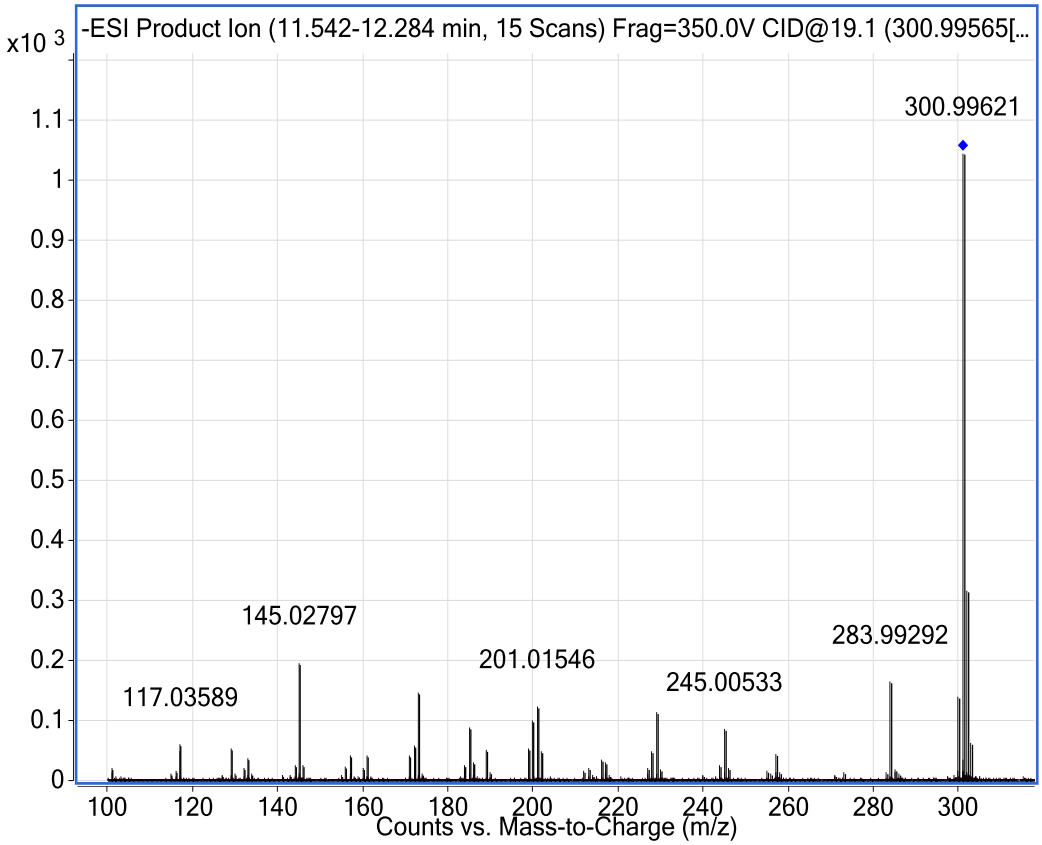


Figure 13. Mass spectra of ellagic acid in acetone/water extract of *Q.petraea*

3.6 Identification of volatile compounds in oak extract

The GC/MS analysis of the oak extracts revealed the presence of the majority of the compounds previously identified in French oak by other authors. **Table 3** lists the 19 peaks characterised that are most relevant from a sensory standpoint along with their retention times and identification methods. Chromatographic peaks were identified by comparing retention times and mass spectra with those of standards or those reported in literature. Finally, all the detected compounds were characterised by their mass spectral fragmentation and by Kovat's retention indices determined on a ZB-5 chromatographic capillary column. **Figure 14** presents the chromatogram of volatile compounds present in the oak extract, showing well separated peaks with good intensity.

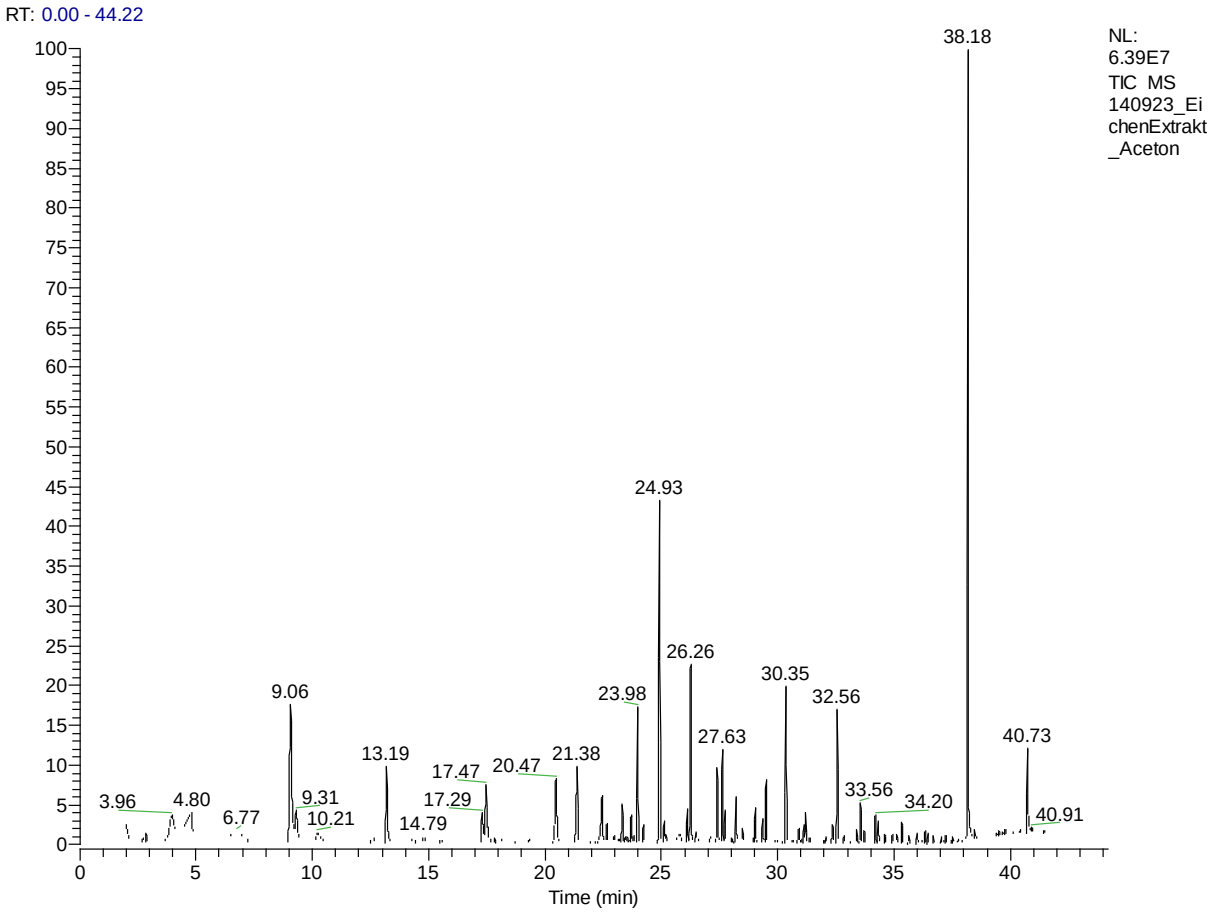


Figure 14. Chromatogram of volatile compounds in medium toasted French oak wood extracted in acetone:water (7:3, v/v)

Table 3. Volatile Compounds detected in extracts of medium fire toasted French Oak by GC/MS.

	IUPAC Name	Common name	RT (min)	Identification
1	2-furancarboxaldehyde	furfural	9.06	S,MS, RT
2	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	5-methylfurfural	13.19	S,MS, RT
3	2-methoxyphenol	guaiacol	17.47	S,MS, RT
4	4-methyl-2-methoxyphenol	4-methylguaiacol	20.54	S, MS, RT
5	5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde	5-hydroxymethylfurfural	21.38	S,MS, RT
6	4-ethyl-2-methoxyphenol	4-ethylguaiacol	22.97	S,MS, RT
7	trans-4-methyl-5-butyldihydro-2(3H)-furanone	trans-β-methyl-γ-octolactone	23.32	S,MS, RT
8	cis-4-methyl-5-butyldihydro-2(3H)-furanone	cis-β-methyl-γ-octolactone	24.22	S,MS, RT
9	4-vinyl-2-methoxyphenol	4-vinylguaiacol	23.98	S,MS, RT
10	2,6-dimethoxyphenol	syringol	24.93	S,MS, RT
11	2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol	eugenol	25.12	S,MS, RT
12	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	vanillin	26.26	S,MS, RT
13	4-methyl-2,6-dimethoxyphenol	4-methylsyringol	27.41	S,MS, RT
14	2-methoxy-4-(1-propenyl)phenol	isoeugenol	27.63	S,MS, RT
15	4-viny-2,6-dimethoxyphenol	4-vinylsyringol	30.35	MS, RT
16	4-allyl-2,6-dimethoxyphenol	4-allylsyringol	31.19	S,MS, RT
17	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	syringaldehyde	32.56	S,MS, RT
18	3-methoxy-4-hydroxycinamaldehyde	coniferaldehyde	34.33	MS, RT
19	3,5-dimethoxy-4-hydroxycinamaldehyde	sinapaldehyde	38.81	MS, RT

S: identification by comparison with standard compounds
MS: tentatively identified by mass spectra
RT: tentatively identified by retention time

4. Future Prospects

The validation of the LC/MS and GC/MS methods are currently being undertaken. Furthermore, ongoing experiments where oak blocks are subjected to different chemical and physical treatments as listed in **Table 4** are being undertaken. The outlay presented in **Figure 15** summarises the various aims of the study. Oak blocks are being treated in ongoing experiments with different microorganisms which are then subjected to different chemical and physical treatments as listed in **Table 4**. The efficiency of each treatment is evaluated in terms of the reduction in cell count in the oak wood. Two different methods are used to establish the population reduction, namely count plating and flow cytometry to overcome biased results based on the VBNC state in microorganisms. In a parallel experiment, treated oak blocks will be submerged in Pinot noir wine for a specific time to mimic the refilling of treated barrels and to monitor changes during barrel maturation. Samples will be taken periodically to monitor the cell count during the maturation period. In conjunction, samples for GC/MS analysis will also be taken to monitor the common spoilage taints (4-ethylguaiacol, 4-ethylphenol, acetic acid, acetaldehyde and ethyl acetate) during maturation. Subsequently wine will be subjected to sensory analysis to establish whether analytical differences have an organoleptic impact on the wines.

The physical and chemical treatments are also directly applied to uncontaminated oak wood which are then extracted to establish whether, and to which extent, barrel sanitation treatments affect desirable oak derived compounds.

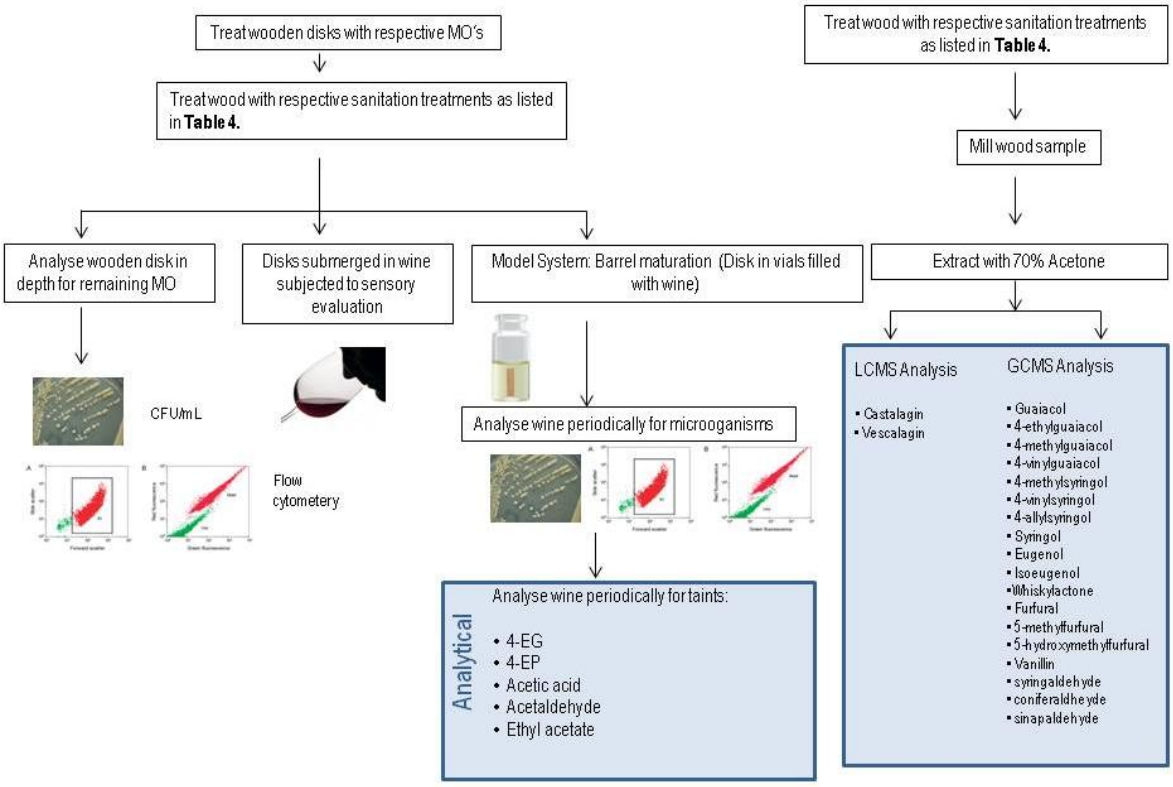


Figure 15. Outlay of ongoing research work.

Table 4. List of chemical and physical treatments with control treatments, conditions and treatment time.

Treatment	Treatment time (min)	Concentration or intensity (where applicable)	Control treatment	Control time (min)
PHYSICAL TREATMENTS				
Hot water (60°C)	5		Water at 20°C	5
Hot water (80°C)	5		Water at 20°C	5
HPU, water at 60°C	5	17 W/L	Water at 60°C	5
Steam	15	90-100°C	Untreated sample	
Microwave	3	3000 W	Untreated sample	
CHEMICAL TREATMENTS				
Ozone (L)	3	2.5 mg/L	Water at 20°C for 3 minutes	3
Ozone (g)	30	20 ppm (40 mg/m^3)	Untreated sample	
	1h	20 ppm (40 mg/m^3)		
Ethanol	24 h	70%	Water at 20°C	24 h
Peroxy acetic acid	24 h	200 mg/L	Water at 20°C	24 h
SO_2 (L)	24h	200 mg/L + 5g/L citric acid	Water at 20°C + 5 g/L citric acid	24h
SO_2 (g)		3 g sulphur burnt in 225 L volume	Untreated sample	
Sodium percarbonate	24 h	1 g/L	Water at 20°C	24h
		3 g/L		
DMDC	24 h	200 mg/L	Water at 20°C	24 h
$KMnO_4$	48h	50 g/L (0.5-1%)	Water at 20°C	48 h

5. Conclusion

This report describes the microbial enumeration methods that will be employed to study the efficiency of different chemical and physical barrel sanitation treatments in reducing microbial counts in wood. In addition to the classical plate count method, flow cytometry were used to enumerate microorganisms extracted from wood. Plate count often resulted in lower cell count values as a result of the VBNC state of organisms. With flow cytometric quantification, we were able to distinguish live cells from dead cells. In addition, we demonstrated that ozone treatment of oak blocks contaminated with three different yeasts, resulted in reduced yeast populations. The three different treatments (ozone mist with an ozone concentration of 2 mg/l for 15 and 30 minutes and ozonated water at 2 mg/l for 5 minutes) resulted in comparable reductions for the three yeasts. Approximately 55% of *B.bruxellensis, H.uvarum* and *S.cerevisiae* populations was killed by the respective treatments. Current studies are examining the efficiency of different ozone concentrations in reducing yeast populations in oak wood. Furthermore, we developed a LC/MS and GC/MS method for the detection of ellagitannins and volatile oak compounds, respectively. The current extraction protocol, has proven to extract sufficient analytes which is reflected in the good intensity of the chromatographic peaks. The same extract can be used for both the LC/MS and GC/MS analysis

(with the exception of a further concentration step for LC/MS analysis) and both methods can ambiguously distinguish between the different analytes of interest, namely the major ellagitannins as well as the key volatile compounds that are of sensory interest in oak aged wines.

References

Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by< i> *Brettanomyces*/*Dekkera bruxellensis*. International Journal of Food Microbiology 143, 76-80.

Alañón, M., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M., Gordon, M., Pérez-Coello, M., 2011. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. Food Chemistry 128, 997-1002.

Barata, A., Caldeira, J., Botelheiro, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. International Journal of Food Microbiology 121, 201-207.

Cantacuzene, N., Dormedy, E., Smilanick, J., Fugelsang, K., Wample, R., Bacon, D., Dormedy, D. (2003). Treating Brettanomyces in oak cubes with gaseous and aqueous ozone. ASEV 54th annual meeting, Reno, Nevada.

Comas-Riu, J., Rius, N., 2009. Flow cytometry applications in the food industry. Journal of industrial microbiology & biotechnology 36, 999-1011.

Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. Journal of Applied Microbiology 99, 85-93.

Du Toit, W., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. Journal of Applied Microbiology 98, 862-871.

García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M.T., Rivas-Gonzalo, J.n.C., Alcalde-Eon, C., 2012. Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. Journal of agricultural and food chemistry 60, 1373-1379.

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., 2006. Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. Trends in Food Science & Technology 17, 438-447.

Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O., Nicolini, G., Larcher, R., 2013. Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. Australian Journal of Grape and Wine Research.

Guzzon, R., Widmann, G., Malacarne, M., Nardin, T., Nicolini, G., Larcher, R., 2011. Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. European Food Research and Technology 233, 285-291.

Lee, J.-H., Johnson, J.V., Talcott, S.T., 2005. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 6003-6010.

Malfeito-Ferreira, M., Laureano, P., Barata, A., D'Antuono, I., Stender, H., Loureiro, V., 2004. Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood. American Journal of Enology and Viticulture 55, 3.

Marko, S.D., Dormedy, E.S., Fugelsang, K.C., Dormedy, D.F., Gump, B., Wample, R.L., 2005. Analysis of oak volatiles by gas chromatography-mass spectrometry after ozone sanitization. American Journal of Enology and Viticulture 56, 46-51.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. Letters in Applied Microbiology 30, 136-141.

Nonier, M.F., Vivas, N., Gaulejac, D., Vivas, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E., 2005. Global fractionation of oak heartwood extractable polymers (lignins, polysaccharides and ellagitannins) by selective precipitations. Journal of the Science of Food and Agriculture 85, 343-353.

Oliver, J.D.,1993. Formation of viable but nonculturable cells. In: Kjelleberg, S. (Eds.), Starvation in Bacteria. New York, Plenum Press, pp. 239-271.

Oliver, J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS microbiology reviews 34, 415-425.

Ortega-Heras, M., González-Sanjosé, M.L., González-Huerta, C., 2007. Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. Food Chemistry 103, 1434-1448.

Porter, G.W., Lewis, A., Barnes, M., Williams, R., 2011. Evaluation of high power ultrasound porous cleaning efficacy in American oak wine barrels using X-ray tomography. Innovative Food Science & Emerging Technologies 12, 509-514.

Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., Quideau, S., 2006. Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 7349-7354.

Scalbert, A., Monties, B., Favre, J.-M., 1988. Polyphenols of *Quercus robur*: Adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. Phytochemistry 27, 3483-3488.

Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “viable but nonculturable”(VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiology 30, 438-447.

Theron, C., 2010. Innovative technology and oak products – The Phoenix revolution. Wynboer 247,

Timberlake, C., Bridle, P., 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. American Journal of Enology and Viticulture 27, 97-105.

Ugliano, M., Genovese, A., Moio, L., 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 5073-5078.

Viriot, C., Scalbert, A., Hervé du Penhoat, C.L., Moutounet, M., 1994. Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing. Phytochemistry 36, 1253-1260.

Vivas, N., Glories, Y., 1996. Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging Am. J. Enol. Vitic. 47, 103-107.

Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C., 1996. The heartwood ellagitannins of different oak (Quercus sp.) and chestnut species (Castanea sativa Mill.). Quantity analysis of red wines aging in barrels. J. Sci. Tech. Tonnellerie 2, 51-75.

Gasmanagement in Winzerbetrieben

Norbert Breier

DLR Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Oppenheim, Wormser Str. 111, 55276 Oppenheim

Gasmanagement in der Kellerwirtschaft, Sauerstoff und Kohlensäure, beschäftigt in letzter Zeit immer mehr Betriebe, und ist somit zu einem Schwerpunktthema in den letzten Jahren geworden. Wie kann man die Qualität der erzeugten Produkte ab Gärende bis zur Flaschenfüllung erhalten? Ein schonender Ausbau und oder gerade die Abfüllung sind kleine Mosaiksteine im Qualitätsgedanken. Welchen Einfluss haben die verschiedenen Gase im Weinausbau auf Qualität und Alterung? Hier sind vor allem Stickstoff (N_2), Kohlensäure (CO_2) und Sauerstoff (O_2) zu nennen.

Die Bedeutung der Gase, vor allem Kohlensäure und Sauerstoff wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Versuchsansätzen vor allem im Weißwein untersucht:

- Abstich, Pumpen im Vergleich
- Filtration
- Abfüllung

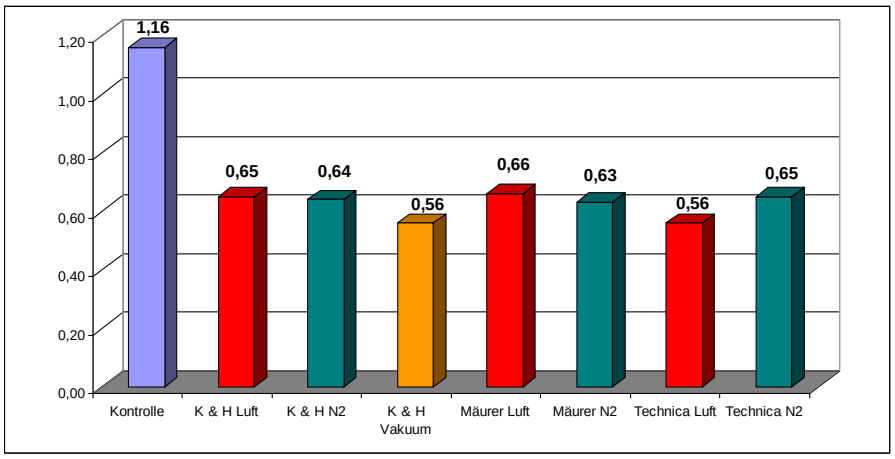
Untersucht wird auch der Einsatz von hydrophoben Membranen zur Steuerung des CO_2-Managements. Der Einsatz der technischen Geräte wird sowohl im Weißwein, als auch im Rotwein zum Gasaustausch erprobt. Zum einen wird der Zusatz von CO_2 im Weißwein zum anderen bei Rotwein auch die Reduzierung der CO_2 geprüft. Natürlich werden die Auswirkungen mit sensorischen Verkostungen begleitet.

Mehrere Anbieter von hydrophoben Membranen (siehe Tabelle, Stand Mai 2014) haben sich in den letzten Jahren eingehend mit dieser Technik befasst, und Anlagen für das Medium Wein konzipiert. Steuerungen und Messtechniken haben sich verändert. Diese Entwicklungsschritte werden beleuchtet, auch im Vergleich zu älteren Techniken (Bsp.: Carbofresh-Gerät).

Hydrophobe Membran (Membrankontaktor)

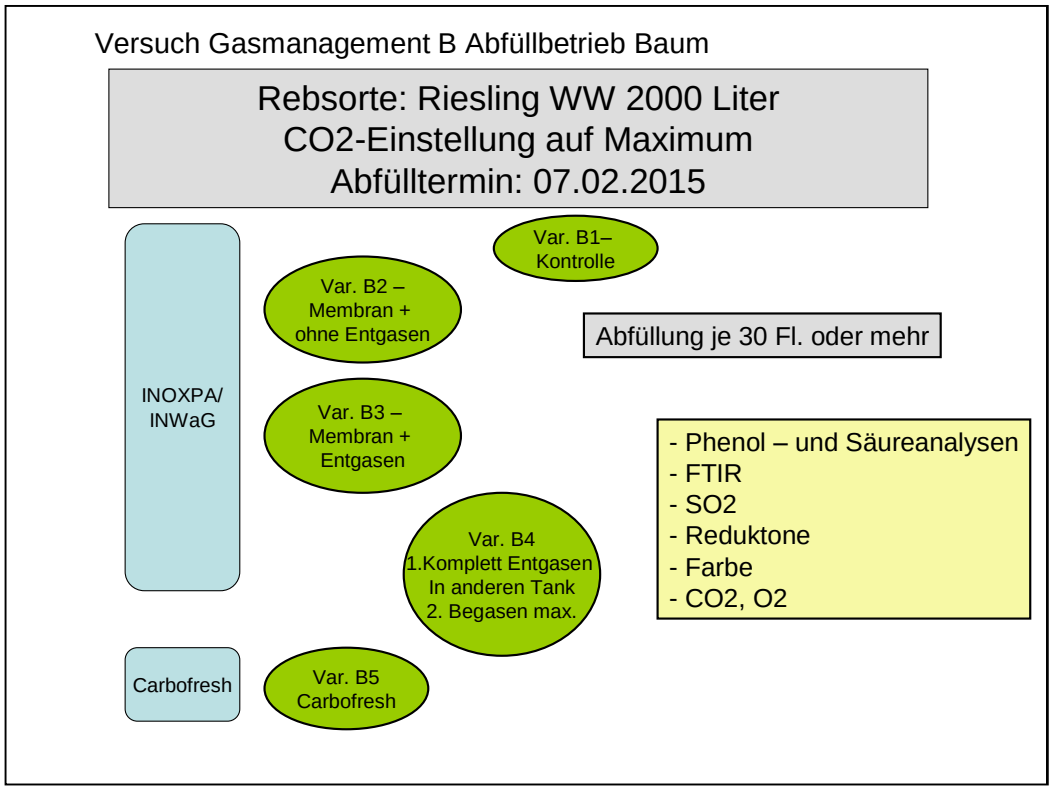
Anlage	Leistung (l)	Preis in €
Romfil		
kleine Anlage (1/2 Modul)	3500	5500,00
große Anlage	6500	7200,00
Halbautomat	variabel	34900,00
Emrich		
kleine Anlage	3500	5000,00
Kunzmann und Hartmann		
Vino Mem 50	5000	22000,00
mit Steuerungsmöglichkeiten und Vakuumpumpe		
Kiesel		
	4000	7800,00
Frage der Steuerung	6300	15000,00
Mäurer		
kleine	3000	5000,00
große	6000	6800,00
prop. Durchflussmesser 0,2 sec. online in die Abfüllanlage eingebaut		3500,00 - 5800,00
1 µ Vorfilter		400,00
Technica		
Carbofresh	2000	2267,00
Inoxpa		
"WineBrane" Vollautomat	4000 - 20.000	75000,00

Im ersten Jahr wurden vor allem die Arbeit und die Handhabung der einzelnen Geräte geprüft. Die analytischen Untersuchungen wurden parallel durchgeführt und werden sich bis zum Ende des Vorhabens in sensorischen Begleitungen wiederfinden. Weiterhin sollen Einwirkungen von Vergärung, Temperatur, Pumpen, Filtration und Abfüllung gerade auch bei Weißwein begleitet werden.
Im Frühjahr 2014 wurde bei der Rebsorte Spätburgunder mit verschiedenen Membransystemen (Herstellerfirmen) die Kohlensäuregehalte eingestellt. Anschließend wurden die Varianten abgefüllt und sowohl sensorisch als auch analytisch begleitet. Nachfolgende Abbildung zeigt die Gehalte der CO_2 im Vergleich zur Kontrolle. Alle Varianten konnten um die 0,6 g/l CO_2eingestellt werden. Weiterhin wurde auch die Bedienungsweise der Anlagen geprüft.



Nachfolgende Abbildung 3 zeigt die von den Herstellern für die Versuche zur Verfügung gestellten Geräte. Unterstützend zeigten sich die Firmen: Technica (Carbofresh) Mäurer, Kiesel und Kunzmann & Hartmann. Die Einstellung und die Funktionswiese der einzelnen Geräte sind sehr unterschiedlich.

Im Frühjahr 2015 wird mit einem Abfüllbetrieb (Baum, Ingelheim) die Einstellung der Inoxpa-Membran und der Vergleich zum Carbofresh im Großeinsatz getestet werden. Hier geht es vor allem um die Be- und Entgasung – Bsp: Riesling - und natürlich die Möglichkeit des praktischen Einsatzes in den Abfüllbetrieben. Es ist festzustellen dass sich im Jahr 2014 sehr viele Abfüllbetriebe für den Einsatz von hydrophoben Membranen interessieren. Das Problem besteht im Moment noch in der exakten Auswertung der Steuerungs- und Messtechnik im laufenden Abfüllbetrieb.


Versuch Gasmanagement B Abfüllbetrieb Baum
Rebsorte: Riesling WW 2000 Liter
CO2-Einstellung auf Maximum
Abfülltermin: 07.02.2015
INOXPA/
INWaG
Var. B1–
Kontrolle
Var. B2 –
Membran +
ohne Entgasen
Abfüllung je 30 Fl. oder mehr
Var. B3 –
Membran +
Entgasen
- Phenol – und Säureanalysen
- FTIR
- SO2
- Reduktone
- Farbe
- CO2, O2
Var. B4
1.Komplett Entgasen
In anderen Tank
2. Begasen max.
Carbofresh
Var. B5
Carbofresh

Stammrücknahme mit anschließendem Stockneuaufbau („RESET-Methode“): ein wirtschaftliches Instrument zur Verlängerung der Lebensdauer von Rebanlagen?

Arno Becker

DLR Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Standort Oppenheim

Esca ist zu einem der bedeutendsten Probleme des Weinbaus in der Welt geworden. Trotz intensiver Bemühungen jedoch konnte bisher keine direkte Bekämpfung gegen diese Stammkrankheit gefunden werden. Zumindest für die Rettung eines Teils der erkrankten Reben hat sich indes als indirekte Maßnahme die „Esca-Sanierung durch Stammrücknahme bewährt“.

Esca-Sanierung durch Stammrücknahme -

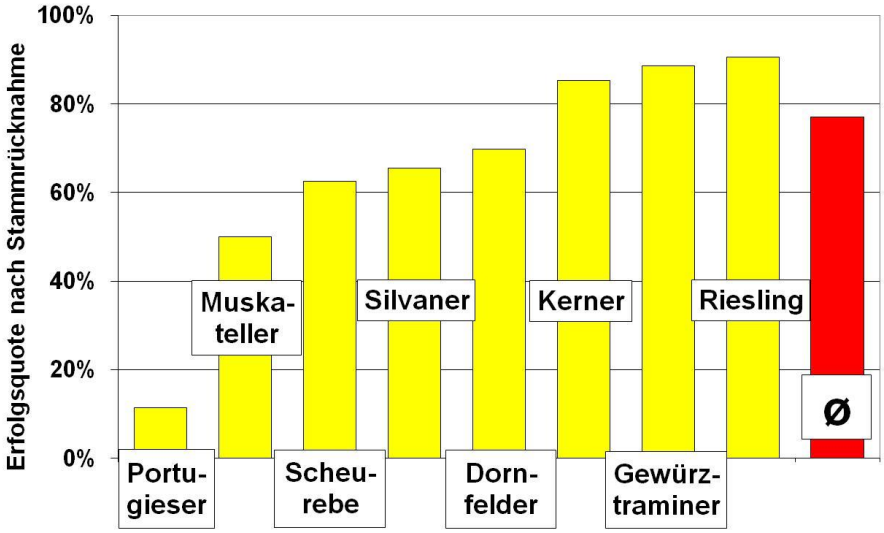


Abb. 1: Erfolg bei „Esca- Sanierung“: Erfolgsquote (%) nach Stammrücknahme bei verschiedenen Rebsorten (n= 4.036 versuchte Rücknahmen, Bonitur im September 2009)

Eine vorliegende Auswertung bei fünf Weingütern aus der Pfalz, die zwischen 2003 und 2007 entsprechende „Amputationen“ vornahmen, bescheinigt der Methode in den meisten Fällen gute Erfolge. Voraussetzung ist dabei das korrekte Vorgehen sowie eine gute Pflege beim Neuaufbau der vormals erkrankten Stöcke durch bodennahe Triebe.

Wie in Becker und Oberhofer (2014) dargestellt, hängt die Rentabilität dieses Verfahrens im Wesentlichen vom zu erwartenden Weinpreis und der Restnutzungsdauer der Anlage ab. Demnach lohnt sich die Maßnahme bei einer Restnutzungsdauer der Anlage von 10 Jahren und einem Weinpreis von 0,8 Euro pro Liter ab etwa 20 % Erfolgsquote (dauerhafter Wiederaustrieb nach Stammrücknahme und kein Neubefall bis zur Rodung). Bei 60 % Erfolgsquote kostet eine erfolgreiche Sanierung 3,00€.

Beim Nachpflanzen hingegen kann man in der Tendenz sagen, dass eine Restnutzungsdauer der Anlage von mindestens 10 Jahren erforderlich ist, damit die Maßnahme betriebswirtschaftlich sinnvoll ist (bei 0,80 €/l Weinpreis). Eine Rebe nachzupflanzen kostet insgesamt rund 9,00 € (Entfernen des alten Stammes eingerechnet). In einem Langzeitversuch der 2008 begann und von da an jährlich ausgewertet wurde, konnte der Maßnahme ein anhaltender Erfolg attestiert werden.

- bewährt und mit anhaltendem Erfolg

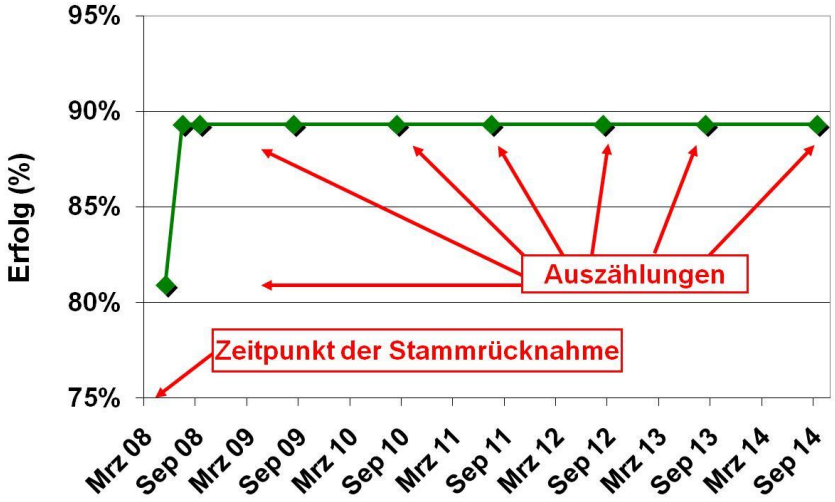


Abb.2: Erfolg und Nachhaltigkeit bei „Esca- Sanierung“: Erfolgsquote (%) nach Stammrücknahme im zeitlichen Ablauf von 2008 bis 2014 bei der Rebsorte Silvaner (n= 131)

Außer bei an der Stammbasis schwach treibenden Sorten wie z.B. Portugieser verspricht demnach die Sanierungs-Methode wirtschaftlichen und anhaltenden Erfolg.

Einerseits: Suche nach optimaler Ausführung stellt vor neue Fragen

In diesem ATW-Vorhaben sollte nun zunächst die Frage geklärt werden wann der günstigste Zeitpunkt und wie die beste Herangehensweise an diese Methode sei. Dazu diente ein Versuch auf insgesamt etwa einem Hektar Fläche, in dem die im Kasten dargestellten Varianten in i.d.R. 3-facher Wiederholung Umsetzung fanden.

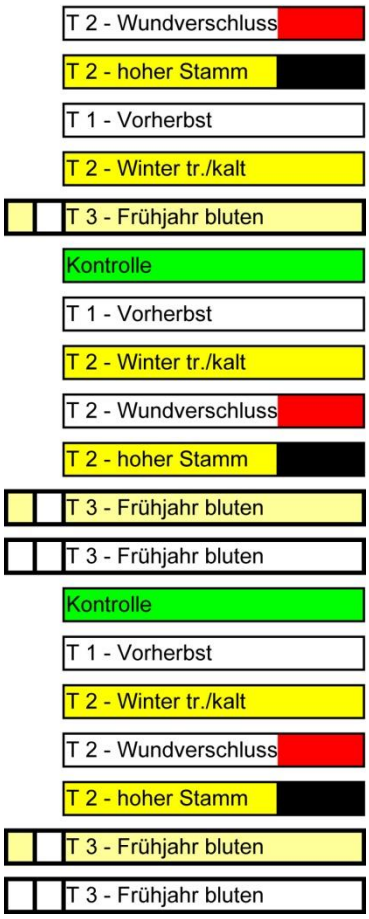


Abb. 3: Wann ist der optimale Zeitpunkt und wie die beste Vorgehensweise für die Stammrücknahme zur Esca-Sanierung? Versuchsplan Silvaner, Pflanzjahr 1988, Gemarkung Uelversheim

Durchführung mit folgenden Varianten:

Termin 1 (T 1):	„Vorherbst“ (24.08.2013)
Termin 2 (T 2):	„Trocken-Kalt“ (um den Jahreswechsel) (17.01.2014)
Termin 3 (T 3):	„Frühjahr bluten“ (08.04.2014)
T 2 plus Wundverschluss	
T 2 hoher Stamm 30-	Absägen der Stämme bis auf 40cm oberhalb der Veredlungsstelle
Kontrolle	symptomtragende Stöcke bleiben unverändert bestehen

Die gleiche Versuchsanordnung wurde in den Sorten Riesling, Gewürztraminer und Müller-Thurgau praktiziert. Dabei kam es jeweils zu Stammrücknahmen an ausschließlich symptomtragenden Stöcken, also zum Absägen jener Stämme bis auf 10-15cm oberhalb der Veredlungsstelle. Ziel war der anschließende Neuaufbau mit bodennahen Trieben.

Ergebnis: Der Versuch zeigte trotz der hohen Anzahl an Stammrücknahmen (743 Stück), davon Chronisch (321), Akut (217), Sonstige [stark chlorotisch, Stammschäden, Schwarzholzkrankheit, Eutypa, …] (205) einen Erfolg der mit jedweder Herangehensweise gegen Null tendierte. Daher wurden die erfolgreich sanierten Stöcke gar nicht erst zahlenmäßig erfasst.

Andererseits: Gute Ergebnisse beim Neuaufbau ganzer Weinbergsanlagen

Eine weitere Beobachtung aus der Praxis stimmte wiederum zuversichtlich. So trat ein Winzer mit folgender Aussage an uns heran: in zweien seiner Weinberge herrschen zwar nahezu identische Ausgangsbedingungen. Offensichtlich aber große Unterschiede bei den Stockausfällen, zugunsten eines nach Frostschaden komplett neu aufgebauten Weinbergs.

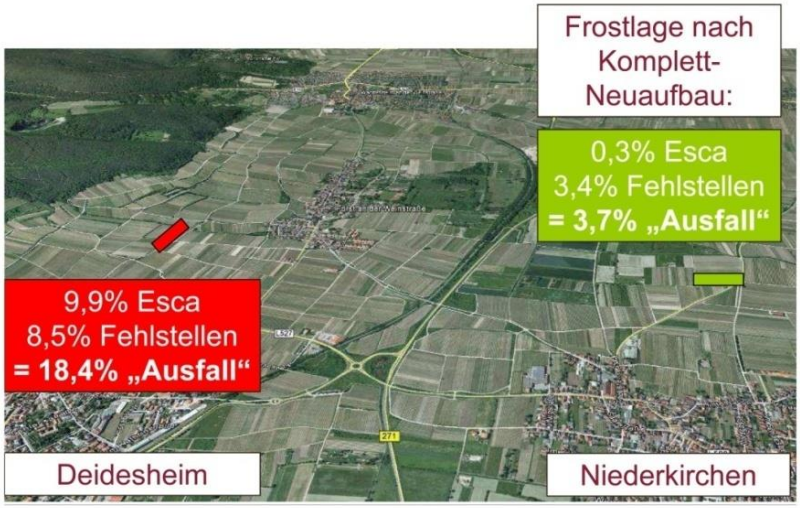


Abb. 4: Vergleich zweier Riesling Anlagen in Deidesheim desselben Bewirtschafters [Entfernung 2,6 km]. Jeweils: Pflanzjahr 1988, Klon Gm 239 auf 5C, 2,2m² Standraum. Reben vom selben Rebveredler, Edelreiser aus der gleichen Vermehrungsanlage. Bonitur: 27.08.2013

Ergebnis: Die anschließende Auswertung zeigte dass während der eine Teil des Vergleichspaares von gut 18% Stockausfall heimgesucht war der gleiche Schaden in der Frostlage bei lediglich knapp 4% rangierte. Erschwerend für die „Nicht-Frostanlage“ kommt hinzu, dass dort bereits weitere 15,4% neu aufgebaute Stöcke enthalten waren. Solche also, die nach Angaben des Winzers zuvor an Esca erkrankt waren und daraufhin bereits einer Stammrücknahme unterzogen wurden.

Das würde soviel bedeuten wie:
werden alle Reben durch Stammrücknahme verjüngt (ungeachtet ob Esca- symptomtragend oder nicht) („RESET“) kann dass die Lebensdauer der Anlage um viele Jahre erhöhen.

Vorteil dieser Methode wäre, das etablierte Wurzelwerk der Stöcke weiterhin zu nutzen, auch im Sinne einer positiven Weinqualität. Die Lebensdauer des Weinbergs könnte deutlich verlängert werden.
Mittlerweile schließlich geben Esca- aber auch weitere Stammerkrankungen oft den Rodungstermin einer Rebanlage vor. Die vielfach stabil gestalteten Drahtrahmen ließen jedoch viele weitere Jahre Bewirtschaftung zu.
Dies testeten wir nun zunächst bei 356 Stück 24 Jahre alten Silvaner Reben in einem Weinberg des Staatsweinguts in Oppenheim. Ungeachtet dessen, ob Esca-Symprome vorhanden waren oder nicht.

Abb. 5: Tastversuch „RESET“: gemischte Bilanz beim Wiederaustrieb nach genereller Stammrücknahme

Abb. 6: ca. 4 Monate nach Stammrücknahme: Intakte, saftführende Leitbahnen, Rebe jedoch ohne Wiederaustrieb

Diesmal war also kein Frost im Spiel, der den Wiederaufbau von der Stammbasis her erforderlich machte. Die Stämme wurden daher im April 2014 kurz über der Veredlungsstelle eingekürzt.

Ergebnis: Daraufhin zeigten insgesamt 51% der Versuchsobjekte Misserfolg, wohingegen 49% wieder austrieben. In den Stämmen ohne Wiederergrünen fanden wir nach anschließenden Untersuchungen intakte, saftführende Leitbahnen (Abb. 6). Aus unerklärlichen Gründen fand jedoch keine Triebentwicklung bzw. keine Aktivierung schlafender Knospen statt. Dass hier auch vermeintlich gesunde Reben ohne Austrieb bleiben, rückt speziell eine Frage in den Vordergrund:

Was hemmt bzw. fördert den Austrieb an der Stammbasis?

Versuche in Vorbereitung

Auf den bisherigen Erfahrungen basierend wird daher seit Beginn des Jahres 2014 eine umfangreiche Untersuchung vorbereitet, welche die optimale Herangehensweise an das Thema „Reset“ klären soll. Darin integriert ist zum Beispiel die Frage, ob verschiedene biotische oder abiotische Faktoren die Triebentwicklung an der Stammbasis hemmen. Hierzu zählen:

- Vorauflaufherbizid
- Mittel zum Entfernen der Stocktriebe A
- Mittel zum Entfernen der Stocktriebe B
- Nachauflaufherbizid
- Alter der Rebanlage

Die aufgeführten Wirkstoffe werden dazu zwei Jahre lang in mindestens 3-facher Wiederholung ausgebracht. Das geschieht in einer Silvaner-Anlage, Pflanzjahr 1993, Gemarkung Nierstein (ca. 2.000m²) und in einer Riesling-Anlage, Pflanzjahr 1980, Gemarkung Nackenheim (ca. 1.500m²).

Außerdem wird in diesen Test eine weitere Fragestellung integriert, und zwar, ob es keine Möglichkeiten gibt, die Triebfreudigkeit an der Stammbasis gezielt zu steigern? Um Antworten hierauf zu finden wurde im zurückliegenden Jahr ein Tastversuch mit dem Wirkstoff Cyanamid (Handelsname „Dormex“) in das Vorhaben eingebracht. Im Weinbau der Tropen und Subtropen wird jener Wirkstoff zur Erhöhung des Knospenaustriebs bei Mangel an Winterkälte angewandt. Allerdings nicht am Rebstamm sondern im Bereich der Bogrebe bzw. des Kordonarms. Das Präparat findet zudem beispielsweise bei der Stockverjüngung von bis zu 100 Jahre alten Teebüschen Einsatz. Folgende Varianten waren in der Erprobung enthalten:

Kontrolle			
Dormex 4 %		am 06.03.2014	
Dormex 8 % + Netzmittel		am 06.03.2014	
Dormex 4 % + Netzmittel		am 06.03.2014	
Dormex 4 % + Netzmittel		am 06.03.2014	Stämme kurz zuvor abgesägt
Dormex 4 % + Netzmittel		am 06.03.2014	Stammfuß zuvor geschält
Dormex 4 % + Netzmittel		am 06.03.2014	zuvor Wasser auf Stammfuß appliziert
Dormex 4 % + Netzmittel	„spät“	am 20.03.2014	

Abb. 7: Versuchsplan Tastversuch Silvaner, Pflanzjahr 1989, Gemarkung Oppenheim, Lage Sackträger

Ergebnisse sollen an dieser Stelle wegen des geringen Probenumfangs nicht veröffentlicht werden. Es scheint jedoch ein austriebsfördernder Effekt des Wirkstoffs vorhanden zu sein und es gibt offenbar auch unterschiedliche Erfolge je nach Herangehensweise.

Alle Erkenntnisse und Vorarbeiten werden ab 2015 in dem oben beschriebenen Versuch zusammengeführt.

Esca ist zu einem der bedeutendsten Probleme des Weinbaus in der Welt geworden. Zumindest für die Rettung eines Teils der symptomtragenden Reben hat sich die Esca-Sanierung durch Stammrücknahme bewährt. Dabei scheint die Herangehensweise an diese Methode bedeutend für den zu erwartenden Erfolg zu sein.
Ein erweiterter Blick auf das Thema signalisiert aber noch mehr und zwar die Chance zur generellen Wiederbelebung abgängiger Anlagen!
Die Ergründung des zu erwartenden Erfolgs und die Suche nach dem optimalen Vorgehen für diese „RESET“-Methode sind Thema dieses ATW- Vorhabens.

Nationale und internationale Weinlogistik – Rahmenbedingungen und Einflussfaktoren auf die Weinqualität

Prof. Dr. Rainer Jung, Christoph Schüßler

Institut für Oenologie, Hochschule Geisenheim University

Im Rahmen der im Institut für Oenologie der Hochschule Geisenheim University durchgeführten Untersuchungen wurden Weiß-, Rosé und Rotweine unterschiedlicher Herkünfte über längere Strecken per Lkw bzw. Simulation eines Schiffstransports transportiert.
Proben die innerhalb Europas per Lkw über Zeiträume von 2-5 Tagen transportiert worden waren, wurden sensorisch und analytisch gegenüber solchen Proben untersucht, die per Express innerhalb weniger Stunden den gleichen Transportweg absolvierten. Die Transporte per Lkw waren realistische, tatsächliche Lieferungen aus den Ländern Portugal, Frankreich und Italien nach Deutschland.
Schiffstransporte wurden anhand von Simulationen im Klimaschrank durchgeführt. Hierbei wurden Zeit- und Temperaturprogramme zugrunde gelegt, die während realer Transporte von Weinen nach Japan per Datalogger vorab erfasst worden waren. Weiß-, Rosé- und Rotweine, die über einen Zeitraum von rd. 6-8 Wochen diesen Transportbedingungen unterlagen, wurden mit solchen analytisch und sensorisch verglichen, die während der Versuchsdauer konstant bei 15°C gelagert wurden.
Neben der Untersuchung des Einflusses der sich ändernden Temperaturen während des Transports wurde auch der Einfluss der Bewegung bzw. Erschütterung des Weines während des Transports bewertet.
Analytisch wurden die Weine mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) auf allgemeine analytische Parameter, Farbveränderungen (CIE L*a*b), sowie die Gehalte an freier und gesamter schwefliger Säure mittels Fließ-Injektions-Analyse (FIA) vergleichend untersucht. Nachfolgende sind einige Ergebnisse der Untersuchungen variierender Transportbedingungen innerhalb Europas dargestellt.

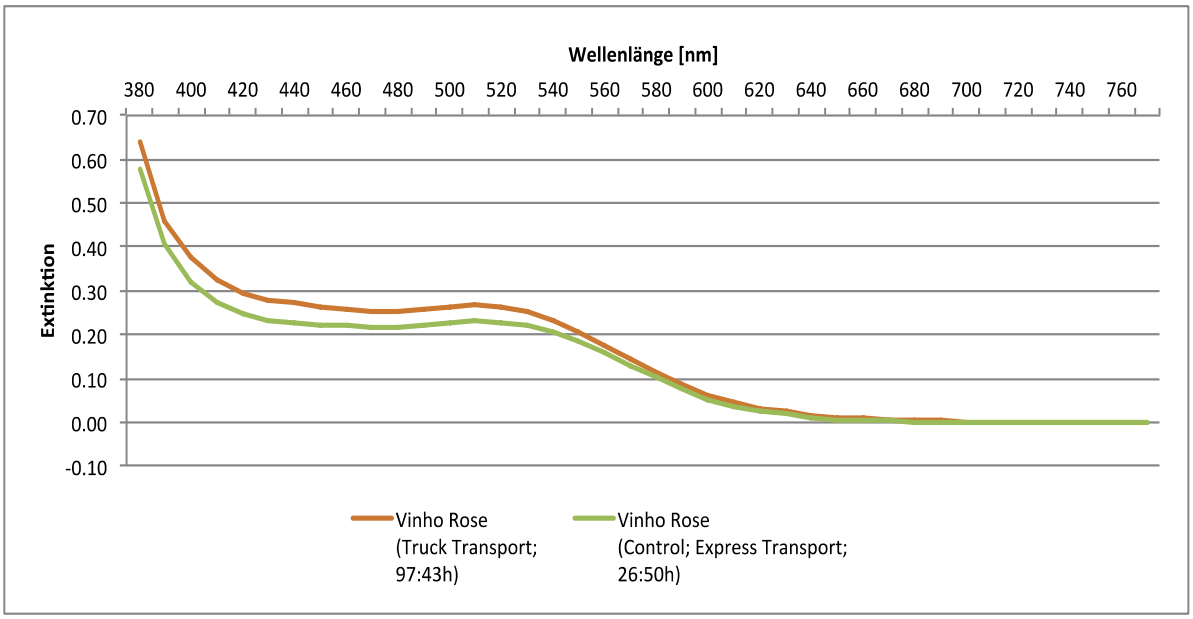


Abb. 1: Farbspektrum Roséwein 2012 nach Lkw-Transport bzw. Express-Transport von Portugal nach Deutschland

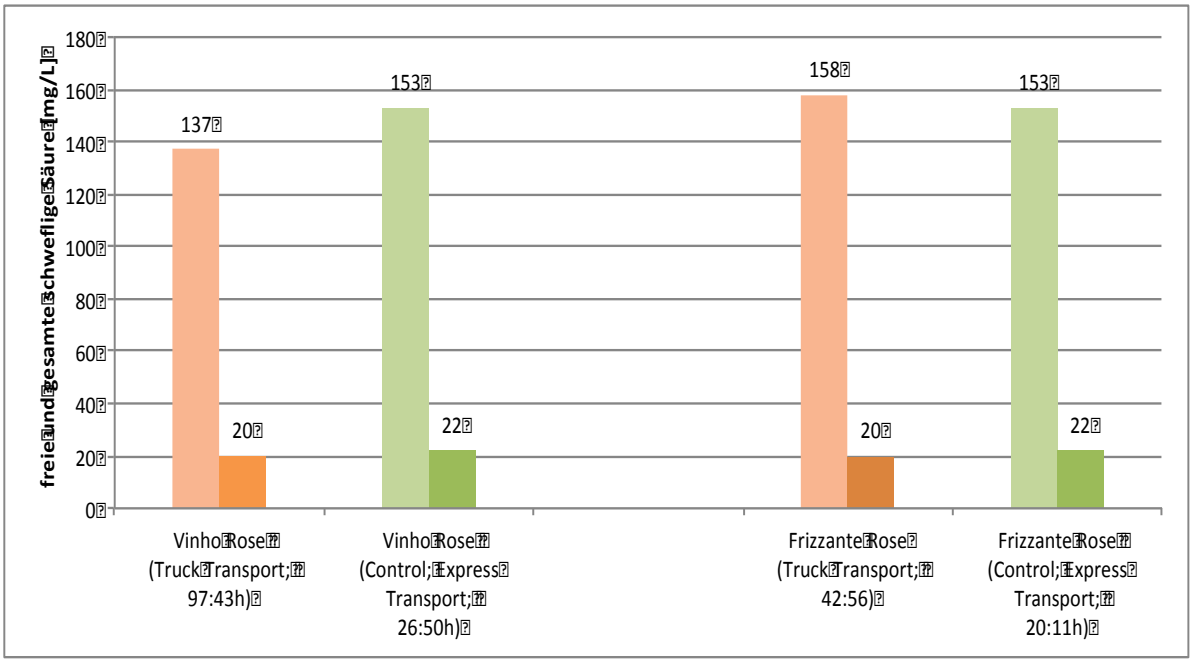


Abb.2: Freie und gesamte SO_2 in 2012 Roséwein (P) und 2012 Frizzante Rosé (I) nach Lkw-Transport bzw. Express-Transport von Portugal bzw. Italien nach Deutschland

Im Rahmen der sensorischen Prüfungen wurden die unterschiedlich gelagerten bzw. transportieren Proben Differenzierungstests in Form von Rangordnungsprüfungen und Triangel-Tests unterzogen. Im Rahmen der Rangordnungsprüfungen hatte das geschulte Prüferpanel die Aufgabe, die Weine hinsichtlich unterschiedlicher Indikatoren für „Frische“ zu ordnen.

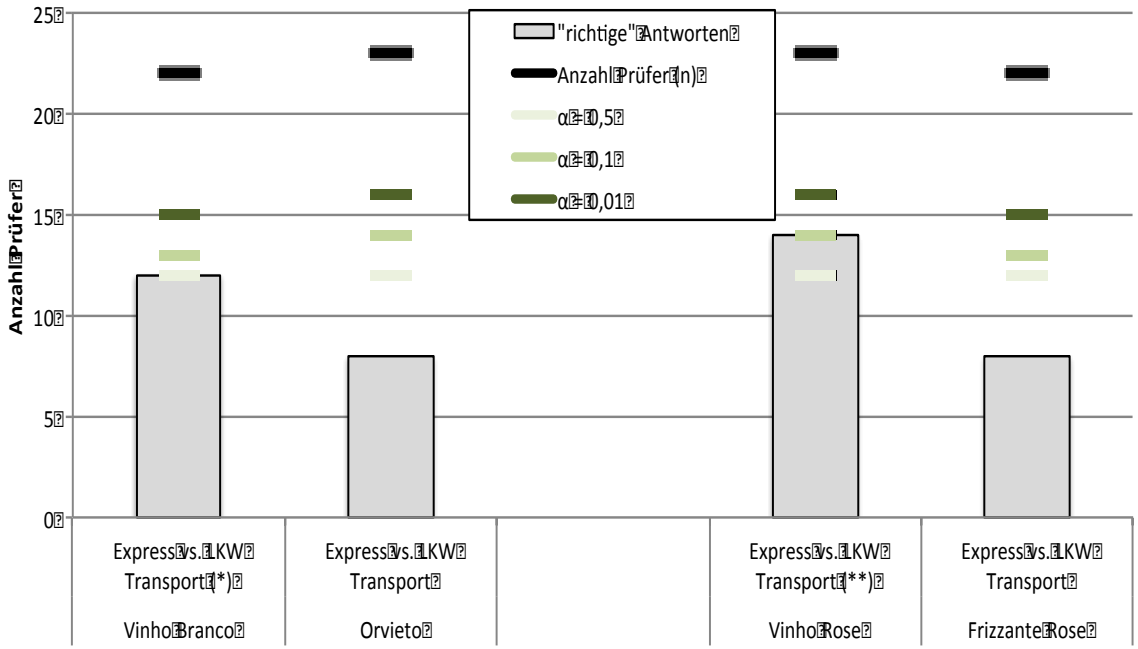


Abb. 3: Ergebnisse sensorischer Unterschiedsprüfungen im Dreieckstest mit Weinen, die per Lkw bzw. Express von Portugal und Italien nach Deutschland transportiert wurden (n = 22 / 23 Prüfer)

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Einfluss des Transports auf die Veränderung bzw. die potentielle Alterung des Weines matrixabhängig bei einzelnen Weinen gegeben war. Insbesondere bei filigranen, jüngeren, kohlensäurebetonten Weinen konnten sensorische Veränderungen der Weine durch das Prüferpanel festgestellt werden. Teilweise unterschieden sich die Proben verschiedener Transportbedingungen bereits farblich, aber auch in Frischeparametern wie „Kohlensäure“ und „Fruchtigkeit“. Bei bereits gereiften Weinen oder Rotweinen, die zum Teil auch eine deutliche Restsüße aufwiesen, waren diese Veränderungen analytisch und sensorisch nicht zu konstatieren.
Die weiteren Untersuchungen werden sich mit längeren Transporten auf dem Seeweg beschäftigen. Ebenso sollen die exakten Temperaturveränderungen ausgehend von der Außentemperatur, über den Container, den Karton in die Flasche näher untersucht werden. Hierbei sollen die Versuche auf ein größeres Spektrum unterschiedlich strukturierter Weine ausgeweitet werden.

Behebung von Gärproblemen durch teilweise Alkoholreduzierung von Wein

Matthias Schmitt

Hochschule Geisenheim University, Institut für Oenologie

Studien aus verschiedenen Ländern zeigen über die letzten Jahre steigende Alkoholgehalte beim Wein. Verschiedene Autoren berichten, dass die unterschiedlichen physikalischen Verfahren geeignet sind, den Alkoholgehalt beim Wein zu reduzieren.
So kann eine Alkoholreduzierung durch osmotische Destillation um 2% vol. nicht signifikant von der Kontrolle unterschieden werden. (Diban et al. 2007; Lisanti et al. 2010; Schmitt et al. 2013)
Überhöhte Alkoholgehalte äußern sich beim Wein aber nicht nur sensorisch. Der toxische Einfluss des Alkohols verursacht auch Probleme bei der Gärung und beim biologischen Säureabbau.
Daher bietet die teilweise Alkoholreduzierung von Wein großes Potential Gärproblemen zu beheben. Besonders beim Sekt sind Gärstockungen durch überhöhte Alkoholgehalte ein großes Problem.
In ersten Versuchen zur Sekterzeugung wurde jeweils eine frühe Lese mit einer späten Lese verglichen. Die späte Lese wurde durch osmotische Destillation auf den gleichen Ausgangsalkoholgehalt gebracht, wie durch die frühe Lese. Dabei zeigte sich, dass die Aromenverluste durch den technischen Eingriff weit geringer waren als durch die frühe Lese. Abgeleitet hieraus ergibt sich einiges an Potential die Schaumweinqualität in Zukunft zu sichern bzw. zu verbessern.
In einem weiteren Versuch wurde ein Grundwein mit 13,3% vol. auf verschiedene Alkoholgehalte eingestellt. (12,3.11,3 und 10,3%vol.). Die Flaschengärung wurde mit Alkoholgehalten von 13,3% vol. bis 10,3% vol. begonnen. Wie zu erwarten zeigte sich ein klarer Einfluss des Ausgangsalkoholgehaltes auf die Gärung (Abb.1).
Nach Beendigung des neunmonatigen Hefelagers werden die Flaschen degorgiert und weiter beprobt.

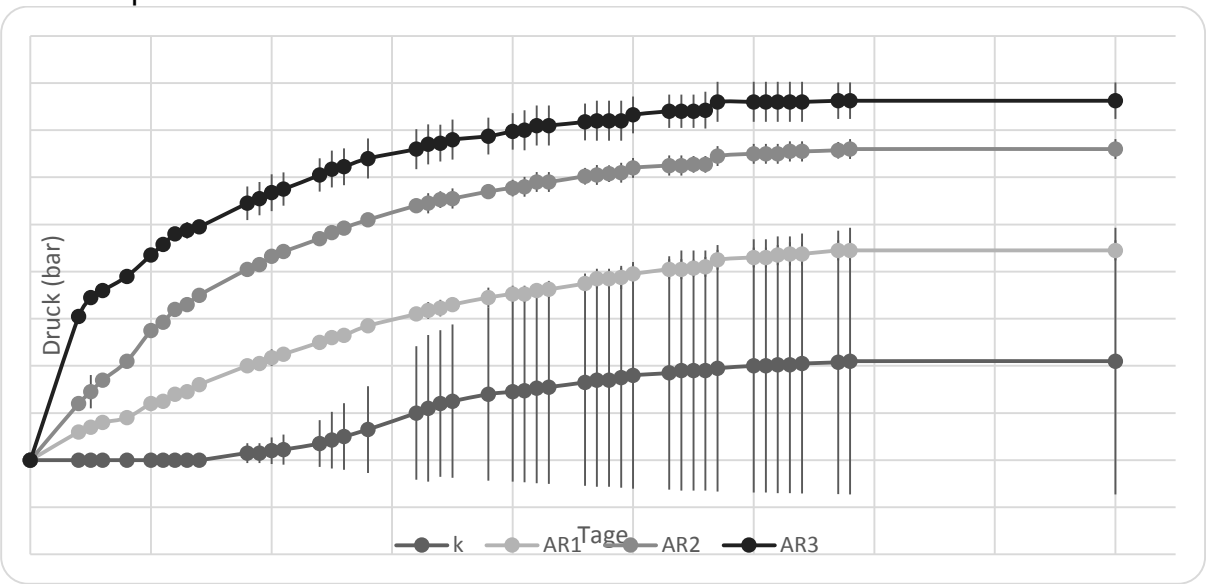


Abb. 1 Druckanstieg der verschiedenen Alkoholgehalte

Eine Alkoholreduzierung zur Behebung von Gärstockungen beim Wein wurde bisher noch nicht durchgeführt. Sobald geeignetes Material vorliegt, wird eine Teilmenge entsprechend dem Antrag behandelt werden.
Als Vergleich dazu werden andere Strategien mit einem neuen Hefeansatz verglichen.s