

**Technikfolgen des Einsatzes
gentechnisch veränderter
krankheitsresistenter
Nutzpflanzen**

Teil Weinrebe

**Bernhard Koller
Cesare Gessler**

Institut für Pflanzenwissenschaften, Bereich Phytomedizin, Gruppe Pathologie, Uni-
versitätstr. 2, 8092 Zürich

Zürich, 25. Oktober 1995

Inhaltsverzeichnis

Auftrag an die Autoren der Studie	1
Einleitung	2
1. Bisher durchgeführte erfolgreiche Transformationen von Weinreben	3
a) Zusammenfassungen der publizierten Arbeiten	3
b) Gegenwärtige, noch nicht publizierte Arbeiten	7
2. Analyse des Inventars	8
3. Situationsanalyse bezüglich Pflanzenschutz im Weinbau in der Schweiz	10
Biologischer Weinbau	11
Resistente Sorten	11
4. Einsatz von Krankheits-Resistenzen in der traditionellen Züchtung	12
5. Typisierung von durch Transformation entstehenden Weinreben-Genomen	16
a) DNA aus <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sativa</i>	16
b) DNA aus anderen <i>Vitis</i> -Arten	17
c) Nicht- <i>Vitis</i> -DNA	18
i) “defense-response genes”	18
ii) R-Gene	18
iii) Gene aus Pathogenen	18
18	
6. Beurteilung des toxischen Risikos von Rebentransformationen	19
a) Transformationen mit <i>Vitis</i> -DNA	19
b) Transformationen mit Nicht- <i>Vitis</i> -DNA	20
7. Beurteilung der ökologischen Auswirkungen von Rebentransformationen	21
8. Ökonomische Auswirkungen von Rebentransformationen	22
9. Szenario	23
Zusammenfassung	24
Literatur	25
Adressliste	27

Auftrag an die Autoren der Studie

Aufgrund der vom BATS zusammengestellten Leitlinien und Untersuchungsbereiche wurde ein Themenkatalog für diese Studie zusammengestellt. Diese Studie widmet sich der landwirtschaftlichen Kultur Weinrebe. Der Themenkatalog enthält die folgenden neun Punkte:

1. Inventarisierung. Anhand von Literatur, Forschungsdatenbanken und mündlichen Mitteilungen von Kollegen werden i) die aktuellen erfolgreichen Transformationen von Weinreben mit gentechnischen Methoden erfasst, ii) welche Methoden dabei angewandt wurden (inkl. Markergene) und iii) Ursprung des eingebauten Genmaterials. Die Thematik wird nicht auf Krankheitsresistenz limitiert.
2. Analyse des Inventars. Zusammenfassen und Anführen einer limitierten Anzahl von Musterbeispielen, wobei präferenziell die Krankheits- und Schädlingsresistenz berücksichtigt werden sollten.
3. Situationsanalyse bezüglich Pflanzenschutz im Weinbau in der Schweiz. Angaben der durchschnittlichen Pestizideinsätze und Strategien. Hier ist nur ein grobes Raster erforderlich. Als Informationsquellen dienen Pflanzenschutzberatungsliteratur der offiziellen Bundesstellen der Kantone und der privaten Beratung sowie gezielte Nachfrage bei geeigneten Stellen.
4. Einsatz von Resistenz, die durch "traditionelle" Züchtung eingeführt wird: Forschung und Entwicklung und tatsächlicher Einsatz in der heutigen Praxis. Hier wird nicht nur eine Auflistung erwartet, sondern auch kurze Begründung über den Ist-Zustand. Informationen durch Interviews.
5. Vergleichende Beurteilung der Genome, die durch "konventionelle" Züchtung und durch Einbau von Genen durch gentechnische Methoden entstanden.
6. Analyse des toxischen Risikos für den Konsumenten (soweit möglich auch Produzenten) ausgehend von transformierten Genomen. (Literatur mit gezielter Nachfrage).
7. Positive/negative ökologische Auswirkungen mit möglichen langfristigen Konsequenzen.
8. Ökonomische Auswirkungen, unter spezieller Berücksichtigung der Produzenten.
9. Szenarien: Verarbeitung der aus den obigen Punkten hervorgegangenen Information zu Fallszenarien. Dabei werden bestimmte Umfelder postuliert (zum Beispiel: Konsumenten haben, im Gegensatz zu biologischen Produzenten, keine generellen oder partiellen Vorbehalte gegen transgene Pflanzen).

Einleitung

Die Weinrebe ist diejenige Kulturpflanze mit der grössten Verbreitung in der Welt. Die geschätzte weltweite Anbaufläche beläuft sich auf ca. 10 Millionen Hektaren.

Die Früchte der Weinrebe können auf viele verschiedene Arten verwendet werden, so zum Beispiel als frische Früchte, getrocknet als Weinbeeren, Traubensaft, Wein, Essig oder Weinbrandt.

Die Systematik unterscheidet etwa 50, zum Teil sehr nahe miteinander verwandte und schwer zu identifizierende Arten der Gattung *Vitis*. Die meisten Arten sind in Nordamerika heimisch. Die Art *Vitis vinifera* wird in die Unterarten ssp. *silvestris* und ssp. *sativa* unterteilt. Erstere kommt nach Hess (1984) bei uns als Wildpflanze in der ober-rheinischen Tiefebene, dem Rhonetal (vom Genfersee aufwärts) und im südlichen Tessin vor. Die Unterart *sativa* kommt in der Schweiz nur als Kulturpflanze vor. In der Schweiz kommen für den Anbau von *V. vinifera* ssp. *sativa*, den kultivierten Rebsorten, warme und trockene Standorte bis etwa 500 m.ü.M. in Frage, in den Zentralalpen ausnahmsweise bis 1250 m.ü.M.

Hegi (1908) erwähnt, dass einige, in Europa nicht heimische Arten als Zierpflanzen in Gärten und Anlagen vorkommen: *V. rotundifolia*, *V. Californica*, *V. Labrusca*, *V. candidans*, *V. Coignetiae*, *V. aestivalis*, *V. Thunbergii*, *V. cinerea*, *V. rupestris*, *V. vulpina*, *V. rubra*, *V. Amurensis* und *V. cordifolia*.

Das Compendium of Grape Diseases (1988) zählt 10 *Vitis*-Arten zu den 'echten' Weinreben: *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. aestivalis*, *V. candidans*, *V. cordifolia* und *V. cinerea*. Einige dieser Arten sind resistent gegen Krankheiten und Schädlinge, weshalb sie auch in Züchtungen Eingang gefunden haben.

Die Kultivierung von Weinreben hat eine lange Tradition, so spricht Hegi (1908) von einer über 5000-jährigen Kultur. Verbesserungen in der Qualität der angebauten Sorten ergaben sich vor allem durch die vergleichende Auslese "besserer" Sorten aus der grossen Formenvielfalt verschiedener Regionen. Demgegenüber wurden bis Mitte des vorigen Jahrhunderts keine Artkreuzungen oder geplante generative Vermehrungen durchgeführt (Husfeld 1938).

Die Vermehrung von Weinreben geschieht auf vegetativem Weg. Bis um ca. 1870 wurden Stecklinge einer Sorte als wurzelechte Reben gepflanzt. Dies änderte sich durch das Einschleppen der Reblaus aus Amerika nach Europa, was den Rebbau innert wenigen Jahrzehnten praktisch zum Erliegen brachte. Daraufhin wurden europäische Reben mit amerikanischen Sorten gekreuzt, da letztere dank natürlicher Selektion resistent oder zumindest befallstolerant sind. Diese Kreuzungsnachkommen eigneten sich nicht zum eigentlichen Anbau als Rebsorte, da die amerikanischen Sorten auch unerwünschte Eigenschaften und Ansprüche in die Kreuzung miteinbrachten. Da man aber die bisherigen bewährten europäischen Sorten weiter anbauen wollte, wurden diese auf Wurzelstöcke (Unterlagen) aus solchen interspezifischen Kreuzungen mit amerikanischen Reben gepfropft.

1. Bisher durchgeführte erfolgreiche Transformationen von Weinreben

a) Zusammenfassungen der publizierten Arbeiten

Ayub R.A., Rombaldi C., Petiprez M., Latché A., Pech J.C. and Lelièvre J.M.

Biochemical and immunocytological characterization of ACC oxidase in transgenic grape cells.

In: Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene (Pech *et al.*, eds.). p. 98-99. 1993.

Zellen der Rebensorte 'Gamay' wurden mit *A. tumefaciens* (kein Stamm angegeben) durch Cokultivation transformiert. *A. tumefaciens* enthielt den binären Vektor pGA643 und das Insert pTOM13 (unter Kontrolle des CaMV35S Promotors). Die pTOM13-cDNA stammt aus Tomaten und kodiert für die ACC-Oxidase, welche an der Biosynthese von Ethylen beteiligt ist. Die Publikation gibt nicht an, welcher Typ von Zellen transformiert wurde. Transformierte Rebenzellen zeigten, verglichen mit untransformierten Zellen, eine ungefähr verdoppelte Ethylen-Produktion.

Eine praktische Anwendung der erhöhten Ethylen-Synthese ist nicht ersichtlich. Diese Arbeit wird deshalb als Grundlagenforschung über Ethylen-Biosynthese erachtet und in dieser Studie nicht weiter diskutiert.

Baribault T.J., Skene K.G.M. and Steele Scott N.

Genetic transformation of grapevine cells.

Plant Cell Reports 8:137-140, 1989

Aus einer Perikarp Kallus-Kultur von *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' wurde eine Suspensionskultur hergestellt. Diese Zellen wurden mit *A. tumefaciens*-Kulturen inokuliert. Als binäre Vektoren wurden pGA474-68 und Bin19 verwendet. Es wurden auch *A. tumefaciens*-Stämme mit dem cointegrierten Vektor pGV3850::1103neo verwendet, der die Gene für Neomycin-Phosphotransferase und Nopalinsynthase enthält. Die Cokultivation von Reben-Suspensions-Kulturen mit *A. tumefaciens*-Stämmen führte zuerst zum totalen Verlust lebender Zellen. Es konnte jedoch eine Zelllinie gefunden werden, welche die Cokultivation mit dem Stamm LBA4404 überlebte. Die Selektion geschah auf Medien mit nur 10 µg/ml Kanamycin, im Gegensatz zu den für z.B. Tabak üblichen 100 µg/ml Kanamycin, da solch hohe Kanamycin-Konzentrationen das Wachstum von Rebenzellen vollständig hemmten. Die transformierten Calli wuchsen aber noch bis zu Kanamycin-Konzentrationen von 50 µg/ml. Alle transformierten Zelllinien zeigten gute NPTII-Aktivität.

Baribault T.J., Skene K.G.M., Cain P.A., Steele Scott N.

Transgenic grapevines: Regeneration of shoots expressing β -glucuronidase.

Journal of Experimental Botany 41(229):1045-1049, 1990

In dieser Arbeit wurden Sprossspitzen-('shoot apex')Kulturen der Sorten 'Cabernet Sauvignon' und 'Sultana' mit *A. tumefaciens* co-cultiviert und daraus transgene Sprosse erhalten. Es wurden eine Reihe verschiedener *A. tumefaciens*-Stämme (GV3101, LBA4404, 5805, Ag162) mit verschiedenen Vektoren eingesetzt, die im wesentlichen die Gene für NPTII und GUS enthielten. Aktivitätstests von GUS ergaben Unterschiede in der Färbung sowohl zwischen verschiedenen Sprossen und auch innerhalb einzelner Sprosse. Aus GUS-positivem Gewebe wurde DNA extrahiert und ein NPTII-Fragment mittels PCR amplifiziert. Diese Tests zeigten, dass nur ein Teil dieser auf Kanamycin-haltigem Medium gezogenen Sprosse das NPTII-Gen enthielten.

Berres R., Otten L., Tinland B., Malgarini-Clog E. and Walter B.

Transformation of vitis tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene.

Plant Cell Reports 11:192-195, 1992

Blattrondellen und Stamm-Stücke von verschiedenen *Vitis*-Sorten wurden mit einer Reihe von *A. tumefaciens* Stämmen co-cultiviert. Die Stämme enthielten Vektoren mit GUS-Gen, OCS-Gen, UidA (=GUS) und T-6b-Gen sowie gewissen Kombinationen davon. Transformationen von Stamm-Stücken erzielten eine relativ hohe Effizienz. Zwischen 24 und 100 % der entstandenen Calli waren GUS-positiv, wobei aber im GUS-Test nur 1-80 % der Zellen blau gefärbt wurden. Transformationen von Blatt-Explantaten waren weniger effektiv. In beiden Fällen erwies sich der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 am effizientesten. Durch den Einsatz des T-6b Genes (ein T-DNA Gen-Derivat von pTiTm4) konnte die Rate transformierte/untransformierte Zellen wesentlich gesteigert werden.

Aus den Explantaten konnten Knospen regeneriert werden. Diese erschienen im GUS-Test nicht einheitlich blau gefärbt. Pflanzen, die aus diesem Ausgangsmaterial regeneriert würden, wären also Chimären.

Colby S.M., Juncosa A.M. and Meredith C.P.

Cellular differences in Agrobacterium susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines.

J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(2):356-361, 1991

Colby *et al.* versuchten, Blätter von *V. vinifera* (cvs. 'French Colombard', 'Thompson Seedless') mittels dem supervirulenten *A. tumefaciens* (Stamm EHA101) zu transformieren, welcher einen binären Vektor mit den Genen für Aminoglycosid-Phosphotransferase II (ASPHII, vermittelt Kanamycin-Resistenz) und GUS enthielt. Als Promotor dienten der CaMV35S-Promotor (für ASPHII) sowie der Mannopin-Synthase-Promotor.

Ausgehend von den co-cultivierten Explantaten konnten zwar viele Sprosse gezogen werden. Doch die GUS-Analyse der Blattspitzen solcher Sprosse konnte in keinem Fall eine Transformation bestätigen (6310 Explantate, 266 Sprosse).

Gray D.J., Songstad D.D. and Compton M.E.

Expression of GUS in bombarded grape somatic embryos and cells.

In vitro cellular & development biology: Journal of the Tissue Culture Association 29:65A, 1993.

Somatische Embryos und embryogene Zellen von *V. vinifera* 'Thompson Seedless' sowie zygotische Embryos von *V. rotundifolia* 'Carlos' und 'Pamlico' wurden mit Wolfram-Partikeln beschossen. Diese waren beschichtet mit Plasmiden, auf welchen die Gene für GUS und entweder NPTII oder HPT (Hygromyzin-Resistenz) lagen. Etwa 80 % der somatischen Embryos von 'Thompson Seedless' zeigten nach 48 oder 72 Stunden GUS-Aktivität, während die *V. rotundifolia*-Embryos nur zu 30 bis 50 % Aktivität zeigten. Embryogene Zellen aller verwendeten Sorten zeigten GUS-Aktivität in Teilen des Gewebes. Die Kulturen wurden zur Zeit der Publikation auf Kanamycin- und Hygromycin-Resistenz selektiert (keine Resultate angegeben).

Guellec V., David D., Branchard M. and Tempé J.

Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of grapevine (Vitis vinifera L.).

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20:211-215, 1990

Verschiedene Pflanzenteile der Rebensorte 'Grenache' wurden mit Agrobakterien inokuliert: Stamm-Internodien, Blätter und bewurzelte Blattstücke. Im Widerspruch zum Titel, der von *A. rhizogenes* spricht, wird bei der Beschreibung der Inokulations-Methoden aber nur noch von einem *A. tumefaciens*-Stamm gesprochen. Dieser trug die Vektoren pGV3850::1103 und pRi15834 und entstand durch eine Kreuzung mit *A. rhizogenes* 15834. Drei bis vier Wochen nach Inokulation entstanden Calli, und nach weiteren drei bis vier Wochen wurden an den Calli Wurzeln gebildet. Normale Wurzeln konnten nicht dauerhaft (>1 Monat) kultiviert werden. Von den vermutlich transformierten Wurzeln ('hairy roots') konnten Kulturen etabliert werden. Sie verhalten sich allerdings anders als bei anderen Pflanzen beschrieben, d.h. schnelles Wachstum, starkes seitliches Verzweigen. An diesen Kulturen wurde der Opine-Gehalt gemessen und die Anwesenheit der T-DNA durch Hybridisation mit pBIN19 überprüft. Nopaline-positive Linien wurden auf NPTII-Aktivität untersucht. Allerdings zeigten auch NPTII-positive Kulturen keine erhöhte Resistenz gegen Kanamycin.

Die Arbeit verwendete den Wurzelhaarigkeits-Phänotyp als Selektionsmarker und nicht etwa Kanamycin-Selektion.

Hébert D., Kikkert J.R., Smith F.D. and Reisch B.I.

Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions.

Plant Cell Reports 12:585-589, 1993.

Embryogene Zellsuspensionen der Sorte 'Chancellor' wurde mit Wolfram-Partikeln beschossen. Diese waren beschichtet mit dem Plasmid pBI426, welches die Gene für NPTII und GUS enthält. Zwei Tage nach dem Beschiessen wurden die Kulturen auf Kanamycin-haltiges Medium gebracht und die Callusbildung induziert. Ziel der Versuche war die Optimierung der Parameter des Beschiessens. Als optimal erwiesen sich eine Partikelgrösse von 1.07µm. Unterschiede im Helium-Druck für den Beschuss zeigte keinen Einfluss auf die Regeneration von transgenen Calli nach 34 Tagen. Jedoch fand man einen Zusammenhang in der Transformationsrate zwischen Partikelgrösse und Druck. Niedriger Druck (800 psi) / kleine Partikel (0.771 µm) sowie hoher Druck (1200 psi) / grosse Partikel ergaben mehr GUS-exprimierende Zellen.

Keinen Einfluss auf die Rate der GUS-exprimierenden Kolonien hatte der Abstand zwischen "Kanone" (particle launch site) und den Zellen. 23 Tage nach dem Beschiessen erhielt man bis zu 850 transformierte Callus-Kolonien pro Platte.

Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnet N., Otten L., Pinck L. and Walter B.

Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus.

Plant Cell Reports 14:550-554, 1995.

Aus Staubfäden und Hypokotyl-Fragmenten von *V. rupestris* und '110 Richter' (*V. rupestris* x *V. Berlandieri*) wurden embryogene Calli gezogen. Diese wurden mit *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 infiziert und cocultiviert. Der Stamm LBA4404 enthielt das Plasmid p1660, auf welchem die Gene für NPTII und GUS sowie für das Coat Protein des Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) lag. Letzteres war unter Kontrolle des '35S' (nicht genauer angegeben)-Promotors und dem NOS-Terminator. Die Überprüfung der erfolgten Transformation geschah durch Bestimmung der NPTII- und GUS-Aktivität. Die Expression des GFLV-Coat Proteins erfolgte durch ELISA-Tests. Die Integration der Transgene wurde durch PCR und Southern-Hybridisation überprüft. Die Primer für die PCR-Analyse entsprachen Teilen der GFLV-RNA2-Sequenz. Die Southern-Analyse ergab für die meisten analysierten Transformanten mehrere integrierte Kopien des CP-Gens. Die Autoren führen das auf die starke Kanamycin-Selektion zurück. Es konnten Pflänzchen regeneriert werden, die in allen drei Tests (NPTII, GUS, ELISA) positiv waren. Genaue Zahlen dazu sind aber nicht angegeben. Vegetative Vermehrungen solcher Pflänzchen liessen eine chimäre Transformation vermuten, da z.B. nur 1 von 7 Abkömmlingen eines Pflänzchen alle drei Eigenschaften aufwies. Resistenztests gegen GFLV werden zur Zeit unter natürlichen Infektionsbedingungen durchgeführt.

Le Gall O., Torregrosa L., Danglot Y., Candresse T. and Bouquet A.

Agrobacterium-mediated transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV).

Plant Science 102:161-170, 1994.

Die somatischen Embryos wurden aus vegetativem Gewebe von Staubfäden des Reben-Wurzelstocks '110 Richter' gezogen. Die Embryos wurden mit *A. tumefaciens* inokuliert und co-cultiviert. Dazu wurde Stamm LBA4404 verwendet, der den binären Vektor pKVHG2+ enthielt. Auf dem Plasmid liegen die Gene für NPTII, Hygromycin und GUS sowie für das GCMV Coat Protein. Zur Selektion wurden Medien mit verschiedenen Hygromycin-Konzentrationen verwendet. Der Einbau des Vektors in das Reben-genom wurde mit Southern-Analyse überprüft, die Expression von GUS und dem Coat Protein wurde mit histochemischen Methoden beziehungsweise ELISA-Tests und Western-Analyse nachgeprüft. In einem ersten Ansatz konnten schliesslich insgesamt 15 Pflanzen regeneriert werden, von denen aber keine GUS-Aktivität in jungen Blättern zeigte. Drei Monate nach der Co-Cultivierung bildeten sich neben nekrotisierten Gewebeteilen embryogene Gewebe. 39 dieser Zell-Cluster wurden weitergezogen und 24 davon zu Calli regeneriert. 9 dieser Calli erwiesen sich als Hygromyzin-resistent. Schliesslich konnten daraus 5 Pflanzen regeneriert werden, die GUS-Aktivität und die Expression des Coat-Protein-Gens zeigten. Die Southern-Analyse wies die Transgenität dieser Pflanzen aber nur in 3 dieser Pflanzen nach. Die Pflanzen zeigten keine morphologischen Veränderungen. Tests bezüglich Resistenz gegen GCMV-Infektion wurden zum Zeitpunkt der Publikation gerade ausgeführt, Resultate dazu sind noch nicht angegeben.

Martinelli L. and Mandolino G.

Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.).

Theor. Appl. Genet. 88:621-628, 1994.

Aus embryogenen Calli wurden somatische Embryos gezogen, welche mit *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 infiziert und cocultiviert wurden, welcher das Plasmid pBI121 trug. Auf diesem lagen das NPTII-Gen unter Kontrolle des NOS-Promotor und -Terminators sowie das GUS-Gen unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors. In zwei Versuchen wurden 196 und 496 somatische Embryos cocultiviert. 3,1 bzw. 3,4 % dieser Embryos wurden aufgrund der Bildung von Zellklumpen auf Kanamycin-haltigem Medium als vermutlich transgen weitergezogen. 58 bzw. 33 % dieser Selektionen bildeten schliesslich wieder Gruppen von somatische Embryos, bei welchen durch Southern-Analyse die Integration der GUS-DNA nachgewiesen wurde. Die GUS-Expression wurde histochemisch nachgewiesen. Schliesslich wurden 11 bzw. 36 verschiedene Klone erhalten, die zu ganzen Pflanzen regeneriert werden konnten. Auch in den so entstandenen Pflänzchen (in Blättern und Wurzeln) wurde die GUS-Aktivität histochemisch nachgewiesen. Interessant ist die hohe Kanamycin-Konzentration während der Induktion der Emb-

ryonen (100 µg/ml im festen Medium). Während der insgesamt 20 Monate dauernden Selektionsphase wurde die Konzentration schliesslich auf 25 µg/ml reduziert.

Mullins M.G., Tang F.C.A. and Facciotti D.

Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevines: Transgenic plants of Vitis rupestris Scheele and Buds of Vitis vinifera L.

Bio/Technology 8:1041-1045, 1990

In dieser Arbeit wurden zweierlei Gewebe transformiert. Einerseits Explantate von Blattstielen von *Vitis rupestris* (Sorte 'Rupestris St. George'), andererseits Knospen aus somatischen Embryos von *Vitis vinifera* (Sorten 'Cabernet Sauvignon' und 'Chardonnay'). Zur Transformation wurde *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 mit dem Plasmid pCGN7320 verwendet, welches die GUS- und NPTII-Gene trägt. Bei der Selektion auf Kanamycin-haltigen Medien erwies sich eine Kanamycin-Konzentration von 10-15 µg/ml als am effizientesten. Calli, die auf Medien dieser Konzentrationen entstanden waren, zeigten in histologischen GUS-Aktivitätstests eine intensive Blaufärbung. Bei tieferen Kanamycin-Konzentrationen (5-10 µg/ml) waren die Calli entweder GUS-negativ oder nur teilweise aktiv. Calli aus nicht selektiven Medien zeigten keine GUS-Aktivität. Explantate von *V. rupestris* produzierten auf 10 µg/ml-Kanamycin-Medium Sprosse. Sechs dieser Sprosse bildeten Wurzeln. Die kräftigste dieser Pflanzen wurde auf Kanamycin-haltigem Medium vegetativ vermehrt und zu Pflanzen regeneriert. Die morphologischen Merkmale dieser Pflanzen waren denjenigen der nicht transformierten Pflanzen ähnlich. Verschiedene Teile dieser Pflanzen zeigten starke und gleichmässige GUS-Aktivität. Die Transformation wurde durch den Nachweis der NPTII-Aktivität und durch Southern Analyse bestätigt. Letztere Untersuchung wies auf mehrere Integrationsorte im Genom hin.

Die einzigen GUS-positiven transgenen Reben, die zu Pflanzen regeneriert werden konnten, waren *V. rupestris* St. George. Von 40 Explantaten dieser Sorte konnten Calli produziert werden, welche 10 Knospen bildeten. Aus diesen Knospen konnten schliesslich 6 Pflanzen regeneriert werden, die alle GUS-positiv waren.

Nakano M., Hoshino Y. and Mii M.

Regeneration of transgenic plants of grapevine (Vitis vinifera L.) via Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of embryogenic calli.

Journal of Experimental Botany 45(274):649-656, 1994

Blattstücke der *V. vinifera*-Sorte 'Koshusanjaku' wurden mit Wildtyp-*A. rhizogenes* co-cultiviert und daraus Calli und Wurzelbildung induziert. Es konnten jedoch keine ganzen Pflanzen regeneriert werden. Dies gelang aber durch co-cultivieren von embryogenen Calli mit *A. rhizogenes*. Dabei wurde der Stamm A13/pBI121 verwendet. Dieser enthält das Wildtyp-Ri-Plasmid sowie den binären Vektor pBI121 mit den Genen für NPTII (nos-Promotor) und GUS (CaMV35S-Promotor). Um chimäre transgene Pflanzen auszuschliessen, wurden die Calli auf selektiven Medien weitergezogen, auf welchen sie sich nicht zu somatischen Embryos entwickeln konnten. Danach wurden die Calli auf entsprechende Medien verbracht, um die Bildung somatischer Embryos anzuregen. Insgesamt wurden 45 somatische Embryos gewonnen, von welchen jeweils 3 bis 10 in Subkultur gezogen wurden. Auf Kanamycin-haltigen Medien wurden diese weitervermehrt. Man erhielt 16 Subklone, die als nicht-chimäre Transformanten angesehen wurden. Aus 12 dieser Subklone konnten Pflanzen regeneriert werden. Die Transformation wurde durch Opine-, Southern- und GUS-Analyse bestätigt. Vier der regenerierten Pflanzen enthielten zwar das Ri-Plasmid und zeigten den dafür typischen Phänotyp (starke Wurzelbildung). Der Phänotyp der anderen acht Pflanzen hingegen war unverändert (normal), wobei aber sechs dieser Pflanzen das Ri-Plasmid enthielten.

Scorza R., Cordts J.M., Ramming D.W. and Emershad R.L.

Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants.

Plant Cell Reports 14:589-592, 1995

Um die Effizienz von Weinreben-Transformation zu steigern, verwendeten die Autoren eine Kombination von Partikel-Beschiessung und *Agrobacterium tumefaciens*-Inokulation. Als Pflanzenmaterial dienen somatische Embryos, welche aus zygotischen Embryos von kernlosen Weinsorten gezogen wurden. Wie diese zygotischen Embryos erhalten wurden, ist nicht angegeben. Das Beschiessen erfolgte mit Gold-Partikeln (mittlerer Durchmesser 1 µm). Dadurch wurde das embryonale Gewebe verwundet. Nachfolgend wurden die Embryos mit *A. tumefaciens* Stamm C58/Z707 infiziert und cocultiviert. Dieser enthielt die Plasmide pGA482GG oder pCGN7314. Auf beiden Plasmiden lagen die Gene für GUS und NPTII. Insgesamt konnten 14 transgene Pflanzen erhalten werden. Alle waren GUS-positiv (histologisch). Mittels PCR wurde einerseits die Präsenz der GUS- und NPTII-Gene sowie die Abwesenheit von *A. tumefaciens* in den Kulturen nachgeprüft. Die Transformationsrate betrug 1,7 %.

b) Gegenwärtige, noch nicht publizierte Arbeiten

B.I. Reisch arbeitet an der New York Agriculture Experimental Station der Cornell-University an der Transformation von Pflanzen, unter anderem auch Weinreben, mit Chitinase-Genen. Der dabei verwendete Vektor enthält Chitinase-Gene aus *Trichoderma harzianum*, doppelten CaMV35S Promotor und das *nptII*-Gen. Gemäss Reisch konnten aber noch keine ganzen, transgenen Pflanzen regeneriert werden. Diese Arbeit wird vom USDA finanziert und läuft unter der Accession Number 9167259. Insbesondere sollen auch wichtige 'Israeli'-Sorten und klassische Weinsorten regeneriert werden. Die Transformation soll mittels *A. tumefaciens* oder Partikelbeschiessung erfolgen. Resistenztests sollen mit Echtem Mehltau durchgeführt werden.

Dennis J. Gray (Univ. of Florida) teilte mit, dass sein Labor an Reben-Transformationen mit dem Coat Protein des Tomato Ringspot Virus und dem 'Shiva-1'-Protein arbeitet. Letzteres Protein wurde auch schon für Transformationen des Apfels verwendet. 'Shiva-1' ist ein lytisches, antibakteriell wirkendes Peptid. In der Rebe soll es die Resistenz gegen "Pierce's Disease" erhöhen, eine bakterielle Krankheit der Weinrebe, die durch *Xylella fastidiosa* verursacht wird. Die Krankheit hat in den USA in Kalifornien sowie in den Ebenen der Golfküste schon merkliche Verluste verursacht. Berichte über ein Vorkommen dieser Krankheit ausserhalb des amerikanischen Kontinents sind nicht bekannt.

A. Spielmann (Univ. Neuchâtel) arbeitet an verschiedenen Transformationen von Weinreben. Ein erstes Teilgebiet umfasst den Schutz gegen die Nepoviren GFLV (grapevine fanleaf virus) und ArMV (arabis mosaic virus). Dazu werden einerseits virale Coat-Proteine sowie virale Replikasen ins Reben genom transferiert. Andererseits wird versucht, durch Einbau von antiviral wirkender Oligoadenylat-Synthase und/oder RNase L aus Säugetieren Reben vor Viren zu schützen. Das zweite Teilgebiet zielt auf Schutz gegen pilzliche Krankheiten ab. Dies soll durch Überproduktion von Resveratrol (ein Phytoalexin) oder durch die Co-Expression von Chitinase und Glucanase erreicht werden. Es konnten bereits transgene Pflanzen (Unterlagen-Sorten) regeneriert werden, welche die viralen resistenz-auslösenden Gene enthalten. Die Pflanzen sollen in Kürze auf ihre Resistenz gegen Nepoviren getestet werden. Die Regeneration von transgenen Pflanzen (Sorten 'Gamay', 'Chasselas') mit den antifungischen Faktoren sind im Gange.

2. Analyse des Inventars

Die Weinrebe gilt als schwer zu transformierende Pflanze (Marinelli and Mandolino 1994). Obwohl es nach Mullins *et al.* (1990) einfach ist, transgene Zellen und Gewebe aus Transformationen mit *Agrobacterium* zu erhalten, ist bei den oben zitierten Arbeiten die Transformations-Frequenz relativ klein und variabel. Es zeigte sich, dass *Vitis*-Gewebe äusserst sensibel auf Kanamycin ist (Baribault *et al.* 1989). Die für die Selektion von vermutlichen Transformanten notwendigen Kanamycin-Konzentrationen hemmen offenbar die Bildung von Sprossen. Ein zum Teil damit verbundenes Problem ist die Erzeugung von homogen transformierten Geweben. Baribault *et al.* (1990) sowie Berres *et al.* (1992) erhielten Chimären, welche sowohl transgene wie auch normale Zellen enthielten, und sie zeigten, dass diese Gewebe (Sprosse) aus mehreren Ursprungszellen entstanden. Letztere Probleme konnten gemäss Nakano *et al.* (1994) überwunden werden, indem somatische Embryos aus embryogenen Calli zur Transformation verwendet wurden. Dieses Zielgewebe erwies sich schon in anderen mehrjährigen Pflanzen als für Transformationen geeignet (McGranahan *et al.* 1988, Fitch *et al.* 1993). Es gilt im übrigen allgemein als schwierig, die transformierten Gewebe zu ganzen Pflanzen zu regenerieren (Colby *et al.* 1991).

Nur in zwei der bisher veröffentlichten Arbeiten (Le Gall *et al.* 1994, Krastanova *et al.* 1995) wurden Reben mit anderen Genen als Selektions- und Markergenen transformiert. In beiden Fällen wurden Wurzelstöcke transformiert. Le Gall *et al.* (1994) führten das Gen für das Coat Protein des Grapevine Chrome Mosaic Virus (GCMV) ins Rebengenom ein, während Krastanova *et al.* (1995) das Gen für das Coat Protein des Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) verwendeten. Das Fanleaf Virus ist ein sogenannter Nepovirus und wird durch bodenbürtige Nematoden (*Xiphinema index* und *X. italiae*) übertragen. Das Krankheitsbild zeigt sich als Degeneration der Pflanze mit niedrigem Ertrag, schlechter Fruchtqualität, kürzerer produktiver Phase des Rebstocks, schlechter Bewurzelung und anderem mehr (Anonymous 1988). Die Ertragsverluste können im Extremfall bis 80 Prozent betragen. Die Krankheit ist in Europa seit mindestens 200 Jahren bekannt, und Herbarbelege von Reben lassen auf einen in Europa existierenden Virusbefall schon vor der Einführung der amerikanischen Arten schliessen. Der Befall durch den GFLV ist nur lokal von Bedeutung. An diesen Stellen, aber nur vor Neupflanzungen, kann der Nematoden- und damit Virusbefall bekämpft bzw. verzögert werden, indem die Überträger durch Pestizide abgetötet werden. Die dazu beispielsweise verwendete Chemikalie Dichlorpropen ist aber äusserst giftig und ausserdem kanzerogen. Ausserdem wirkt die chemische Bekämpfung in tieferen Böden nicht sehr gut. Die Transformation vor allem von Wurzelstöcken mit dem GFLV-CP könnte hier einen Lösungsweg aufzeigen. Es war noch nicht in Erfahrung zu bringen, ob die Coat-Protein-Transformanten nun besser gegen Viren geschützt sind. Die Tests dazu sind gemäss der Publikationen im Gange. Es wurden aber bereits andere Pflanzenarten mit dem GFLV-CP transformiert, so zeigten Bardonnet *et al.* (1994), dass GFLV-CP-transgene Tabakpflanzen gegen das Virus geschützt waren.

Es muss schliesslich angefügt werden, dass die traditionelle Züchtung bereits GFLV-tolerante Wurzelstöcke erzeugt hat, welche sich seit einigen Jahren in Kalifornischen Weinbergen bewährten (Walker *et al.* 1991).

Gegenwärtige Projekte befassen sich mit der Transformation von Reben mit Chitinase-Genen. Die Transformation von Pflanzen mit Genen für zellwandabbauende Enzyme ist ein Ansatz, mit dem versucht wird, krankheitsresistente Pflanzen zu erzeugen. Dieser Ansatz wird aber nicht nur für den Einsatz bei Weinreben erwogen. Die Chitinase

soll Resistenz gegen pilzliche Krankheitserreger vermitteln. Dieser allgemeine Abwehrmechanismus kann jedoch nur gegen Pathogene wirken, welche Chitin als wesentlichen Zellwandbestandteil enthalten, wie zum Beispiel der Erreger des Echten Mehltaus (*Uncinula necator*) oder *Botrytis cinerea*. Einer der wichtigsten Krankheitserreger der Rebe (*Plasmopara viticola*) gehört aber zu den Oomyceten, deren Zellwände hauptsächlich aus Cellulose bestehen und kein Chitin enthalten (Müller und Löffler 1982). Chitinase wird also gegen *P. viticola* unwirksam sein. Darüberhinaus vermittelt Chitinase alleine vermutlich keine absolute Resistenz gegen einen Erreger (Kahl und Winter 1995, Neuhaus *et al.* 1991). Deshalb schlagen zum Beispiel Kahl und Winter (1995) eine kombinierte Transformation von Pflanzen mit Chitinasen und anderen, zellwandabbauenden Enzymen wie β -1-3-Glucanasen vor, um den synergistischen Effekt der verschiedenen Enzyme zu erhalten und damit die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen zu erhöhen. Im Fall einer Pyramidisierung solcher Faktoren in einer Pflanze spielt die Regulation der Gene eine wichtige Rolle. Eine konstitutive, starke Expression verschiedener zusätzlicher Gene hätte vermutlich einen Einfluss auf die Energiebilanz der Pflanze. Da Chitinasen und Glucanasen natürlicherweise schon in Pflanzen produziert werden, muss auch auf eine Bedeutung dieser Enzyme in der Physiologie der Pflanze geschlossen werden. Unerwünschte Nebeneffekte einer Überexpression sind deshalb durchaus denkbar. Trauben werden in der Regel zur Weinherstellung produziert. Die für die Vinifizierung nötigen Hefen enthalten in ihrer Zellwand Chitin. Denkbar ist nun, dass die überexprimierten, zellwandabbauenden Enzyme auch in der Maische und während der Gärung aktiv bleiben bzw. erst induziert werden und deshalb negativ auf die Vergärung wirken könnten.

Unbekannt ist, ob Pilze ihrerseits gegen ein zellwandabbauendes Enzym Resistenzen entwickeln können.

Als ein weiterer Ansatzpunkt für Transformationen von Reben wird das Phytoalexin Resveratrol (ein Stilben) genannt. Dieser Stoff wird von Reben natürlicherweise gebildet, und spielt vermutlich eine Rolle für die Resistenz gegen *Botrytis cinerea* und *Plasmopara viticola*. Der Begriff Phytoalexin beschreibt keine diskrete Stoffklasse, sondern meint ursprünglich Wirkstoffe, welche Pflanzen als Reaktion auf eine Pilzinfektion bilden. Hain *et al.* (1993) transformierten Tabakpflanzen mit dem Gen für die Stilbensynthase. Die Produktion von Resveratrol in den transgenen Pflanzen konnte mit einer erhöhten Resistenz gegen *Botrytis* korreliert werden. Die Idee war daher, Resveratrol in der Rebe zu überexprimieren, um einen Schutz gegen diesen Pilz zu erreichen. Dazu ist anzumerken, dass die Nützlichkeit von Phytoalexinen generell limitiert ist (Mansfield and Bailey 1982). So sind Phytoalexine weniger fungitoxisch als synthetische Fungizide und werden in der Pflanze nicht transportiert. Vielmehr werden sie lokal als Reaktion auf einen Elicitor gebildet. Eine Akkumulation von Phytoalexinen könnte aber aufgrund der oft auch phytotoxischen Wirkung dieser Stoffe die Pflanze selbst schädigen. Grössere Mengen an Phytoalexin in den Beeren könnten auch zu Problemen bei der Gärung oder *per se* zu geschmacklichen Veränderungen führen.

3. Situationsanalyse bezüglich Pflanzenschutz im Weinbau in der Schweiz

Die Rebbauzählung 1991 (Anonymous 1993) ergab eine Anbaufläche von 14966 ha, die von 33003 Bewirtschaftern bebaut wurden. 76,3 Prozent dieser Fläche lagen in der Westschweiz, während 16 % in der Deutschschweiz und 7,7 % in der Südschweiz lagen. Bereits rund ein Drittel der Anbaufläche (5010 ha) werden gemäss den Richtlinien der Integrierten Produktion bewirtschaftet, wobei praktisch alle IP-Produzenten Mitglieder der Weinbauvereins "Vinatura" sind. Biologisch bewirtschaftet werden in der gesamten Schweiz zur Zeit ca. 150 ha Reben (persönl. Mitteilung Häseli, FiBL). Wie im konventionellen Anbau liegt auch hier der überwiegende Anteil in der Westschweiz, nämlich 109 ha (15 Betriebe).

Die in der Schweiz angebauten Sorten sind hauptsächlich Chasselas (37,5 %), Pinot noir (28 %), Gamay (15,2 %), Merlot (6 %) und Riesling x Sylvaner (1,9 %). Alle anderen Sorten machen zusammen nur 5,5 % der Rebfläche in der Schweiz aus. Im biologischen Weinbau unterscheidet sich das Sortenspektrum nicht wesentlich. Hier spielen aber neuere, interspezifische Sorten in zunehmendem Masse eine grössere Rolle und machen 1995 etwa 5 % der Rebfläche in der Deutschschweiz aus (persönl. Mitteilung Häseli, FiBL). Mit 'interspezifisch' werden Kreuzungen aus europäischen *V. vinifera*-Sorten mit amerikanischen *Vitis*-Arten bezeichnet (siehe Einleitung). Diese amerikanischen *Vitis*-Arten sind gegen gewisse Insekten und pilzliche Krankheitserreger tolerant bis resistent und werden deshalb in Züchtungsprogrammen verwendet. Demgegenüber gelten die traditionell verwendeten Rebsorten als krankheitsanfällig und würden ohne Pflanzenschutz-Massnahmen kaum Ertrag bringen (Basler und Wiederkehr 1993), dies insbesondere nach der Einschleppung von verschiedenen Krankheiten der Rebe aus Amerika.

Gemäss der Schweizerischen Gesellschaft für Chemische Industrie (1995) wurden 1994 für den Weinbau Pflanzenschutzmittel im Wert von 22,1 Millionen Franken verkauft. In der Schweiz werden im Weinbau nach dem Getreidebau mengenmässig am meisten Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Diese Statistik der SGCI gibt allerdings keine Angaben über die Zusammensetzung nach Produktklassen, das heisst eine Aufschlüsselung nach Einsatzgebiet wie Fungizide, Herbizide und Insektizide. Nach Boller *et al.* (1986) dominiert der präventive Einsatz von Fungiziden den Pflanzenschutzmitteleinsatz. Im Wallis werden etwa 6-11 Fungizidapplikationen pro Saison ausgeführt. Dabei wird 4-5 Mal gegen *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator*, 0-3 Mal gegen *Botrytis cinerea* und 2-3 Mal gegen Rotbrenner behandelt. In der Ostschweiz wird 11-13 Mal gegen Pilzkrankheiten behandelt (6-8 Mal gegen *Plasmopara*, 3-4 Mal gegen *Botrytis*, 2 Mal gegen Rotbrenner). In gewissen Anbaugebieten hat *Botrytis cinerea* gegen Botrytizide Resistenzen entwickelt.

Fried *et al.* (1993) stellten bereits eine Liste der am häufigsten verwendeten chemischen Stoffe zusammen und schilderten auch ihre eventuellen Nachteile wie schnelle Resistenzbildung oder toxikologische Nachteile. Die wahrscheinlich langfristigen Konsequenzen hat der starke Einsatz von Kupferpräparaten im Rebbau. Das Schwermetall Kupfer reichert sich im Boden an und wirkt sich negativ auf Bodenmikroorganismen und somit die Bodenfruchtbarkeit aus (Anderson 1978).

Aber auch Schwefel und organische Fungizide, die gegen den Echten Mehltau eingesetzt werden, haben Nachteile. Schwefelbehandlungen wirken nicht nur gegen Pilzkrankheiten, sondern töten auch Milben ab. Es muss daher befürchtet werden, dass durch Schwefel-Applikationen auch Nützlinge wie Raubmilben abgetötet werden, was einen vermehrten Schädlingsbefall zur Folge haben kann.

Im konventionellen Weinbau werden Pflanzenschutzmittel nach einem festen Zeitplan appliziert. Unter anderem dadurch lässt sich der intensive Pflanzenschutz dieser Kultur begründen. Ein fixes Applikationsschema ist zur Bekämpfung beziehungsweise Vorbeugung von einigen Krankheiten zur Zeit unumgänglich. Der Erreger des Falschen Mehltaus beispielsweise kann sich bei günstigen Bedingungen innert kürzester Zeit explosionsartig vermehren. Die dazu notwendigen Infektionsbedingungen sind zwar bekannt, aber nicht sicher vorhersehbar. Um diesem Unsicherheitsfaktor entgegenzuwirken, werden die Weinreben vor allem vor der Blüte mit Fungiziden behandelt. Ein Voraussage- und Modell-Systeme könnten hier eine Reduktion des Pflanzenschutzmittel-Einsatzes ermöglichen. Arbeiten dazu sind auch in der Schweiz im Gange (Blaise and Gessler 1990).

Biologischer Weinbau

Zur Bekämpfung von pilzlichen Krankheitserregern dürfen nach VSBLO-Richtlinien (1992) Kupferpräparate (3 kg Reinkupfer pro Hektar und Jahr) und Schwefel ausgebracht werden. Neuerdings sind auch Tonerdepräparate wie "Mycosan" oder "Ulmasud" zugelassen. Diese wirken im speziellen gut gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) und den Rotbrenner (*Pseudopeziza tracheiphila*).

Der Falsche Mehltau ist auch hier der bedeutendste Krankheitserreger, vor allem aufgrund des unregelmässigen, dann aber massiven Auftretens. Der Echte Mehltau ist durch den Einsatz von Schwefel gut kontrollierbar. Die Bedeutung von Rotbrenner und *Botrytis* ist gleich wie im konventionellen oder IP-Weinbau. Bei *Botrytis* spielt insbesondere die Pflanzenernährung beziehungsweise der Stickstoffgehalt im Boden eine Rolle, das heisst, dass zu hoher N-Gehalt im Boden den Befall durch *Botrytis* fördert. Das wirtschaftliche Risiko ist im biologischen Weinbau allgemein etwas grösser als im konventionellen Weinbau.

Die Erfahrungen mit den interspezifischen, krankheits-toleranten oder -resistenten Rebsorten sind im biologischen Weinbau gut. Gemäss Häseli (FiBL) können in einem (wetterbedingt) ungünstigen Jahr wie 1995 auch solche Sorten starken *Plasmopara*-Befall aufweisen. Es ist noch nicht klar, ob ein solcher Befall durch spezialisierte Pathotypen hervorgerufen wurde, die auf diesen Sorten unerwünschterweise selektioniert wurden. Dies ist aufgrund der vermutlich polygenen Vererbung wohl möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich.

Insekten-Befall wird im biologischen Weinbau in der Regel durch natürliche Regulierung bekämpft. Einzig gegen Traubenwickler kommen *Bacillus-thuringiensis*-Präparate zum Einsatz. Überschlagsmässig kann ein Anteil von 40 % der Betriebe angenommen werden, welche gegen Insekten keinerlei Spritzungen vornehmen (pers. Mitteilung Häseli).

Resistente Sorten

Mit dem Ausdruck "resistente Sorten" bezeichnet man in der Regel die Resistenz gegen Pilzkrankheiten. Die Resistenzen aus amerikanischen Arten werden zur Züchtung verwendet, was jedoch aufgrund der polygenen Vererbung schwierig ist (siehe Punkt 4).

4. Einsatz von Krankheits-Resistenzen in der traditionellen Züchtung

Krankheiten und Schädlinge können im Rebbau beträchtliche Ertrags- und somit Einkommens-Verluste verursachen. Die Verluste entstehen primär durch geringeren Ertrag und nicht durch Qualitätseinbussen wie etwa beim Apfel durch Schorfbefall. In der Schweiz dient der Rebbau praktisch ausschliesslich der Erzeugung von Wein, die Trauben werden also nicht frisch konsumiert, weshalb ein geringer Befall, der den Ertrag noch nicht mindert, keinen Einfluss auf den Erlös hat.

Das Spektrum von Krankheitserregern und Schädlingen ist bei der Rebe relativ vielfältig. Die Bedeutung der einzelnen Krankheiten variiert regional und ist von Jahr zu Jahr unterschiedlich. Boller *et al.* (1986) und Fried *et al.* (1993) nennen als bedeutendste Krankheitserreger der Rebe den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*, oft auch als Peronospora-Krankheit bezeichnet), den Echten Mehltau (*Uncinula necator*) sowie die Graufäule (*Botrytis cinerea*). Im weiteren schreiben sie dem Rotbrenner (*Pseudopeziza tracheiphila*) eine lokale Bedeutung in der Schweiz zu. Bei den Schädlingen nennen Fried *et al.* die Traubenwicklerarten *Eupoecilia aubiguella* (Einbindiger Traubenwickler) und *Lobesia botrana* (Bekreuzter Traubenwickler), die Rote Spinne (*Panonychus ulmi*) sowie Vögel. Die Reblaus (*Phylloxera*), welche Ende des letzten Jahrhunderts aus Amerika eingeschleppt wurde und in den europäischen Rebenkulturen verheerende Schäden anrichtete, hat durch die Verwendung von resistenten Unterlagen keine Bedeutung mehr.

Die Weinreben-Züchtung befasst sich hauptsächlich mit Resistenzen gegen die pilzlichen Erreger des Falschen und Echten Mehltaus. Dazu werden amerikanische *Vitis*-Arten mit europäischen *V. vinifera*-Sorten gekreuzt, man spricht deshalb auch von interspezifischen Kreuzungen. Die dafür verwendeten Arten sind in Tabelle 1. aufgelistet.

Tab. 1. Amerikanische Rebenarten, die in der Züchtung verwendet werden.

Art	Widerstandsfähigkeit gegen
<i>V. riparia</i>	Reblaus und Pilzkrankheiten, vor allem <i>P. viticola</i>
<i>V. rupestris</i>	Reblaus, teilweise Pilzkrankheiten
<i>V. berlandieri</i>	Pilzkrankheiten, Reblaus
<i>V. cordifolia</i>	Pilzkrankheiten, Reblaus
<i>V. cinerea</i>	Pilzkrankheiten, absolute Resistenz gegen Reblaus

Die Tatsache, dass vor allem amerikanische *Vitis*-Arten eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Krankheitserreger und Schädlinge aufweisen, erklärt sich daraus, dass diese Erreger in Amerika heimisch waren und erst im letzten Jahrhundert nach Europa eingeschleppt wurden (Echter Mehltau: 1845, Falscher Mehltau: 1878). Die in Europa heimischen *Vitis*-Arten waren bis dahin nicht mit diesen in Kontakt gekommen und weisen deshalb nur sehr geringe Resistenz gegen diese Erreger auf.

So ist es zu erklären, dass zusammen mit dem Bestreben nach Reblaus-resistenten Rebsorten auch Resistenzen gegen Krankheiten in die Züchtung Eingang gefunden haben.

Die Bekämpfung der Reblaus erfolgte Ende letzten Jahrhunderts mittels zwei Konzepten. Das erste, sich später als erfolgreich erweisende Konzept beinhaltete die Kombination von wurzeltoleranten Amerikaner-Unterlagen mit blatttoleranten Europäersorten. Das zweite Konzept beschrieb die Züchtung von Direktträgern (Hybriden), die sowohl

Reblaus- wie *Plasmopara*-resistent sind. Die nachteiligen Eigenschaften, welche die zu dieser Züchtung verwendeten Amerikaner-Arten miteinbrachten, führten zu einer ablehnenden Haltung gegenüber den frühen Hybriden. Der vielleicht bekannteste Nachteil wird als Fuchs-artiger Geschmack beschrieben. Durch weitere Rückkreuzungen scheint dieses Problem inzwischen gelöst zu sein.

Die Resistenzmechanismen der Weinrebe gegen Pilzbefall sind vielgestaltig. Boubals (1959), zitiert von Basler und Wiederkehr (1993), beschreibt für *P. viticola* das Abstoppen des Wachstums und der Entwicklung des Pilzmyzels. Dies geschieht einerseits durch Nekrotisierung befallener Zellen. Dadurch wird der obligat biotrophe Krankheitserreger am Weiterwachsen gehindert. Andererseits vermutet Boubals als Hauptursache der Resistenz Myzelwachstums-limitierende Ernährungsfaktoren, die vom Wirt produziert werden. Ein Mangel an solchen Faktoren stoppt die weitere Entwicklung des Pilzes.

Zur Resistenzbildung trägt in der Rebe die Produktion von Phytoalexinen (antimikrobielle Substanzen) durch die Pflanze bei: Vitaceen produzieren Resveratrol, ein Stilben, und deren Polymere, sogenannte Viniferine. Phytoalexine sind teil der Abwehrkaskade, welche Pflanzen gegen Krankheitserreger auslösen können, und können deshalb als 'defense-response genes' bezeichnet werden (siehe Kasten). Eine ausführliche Untersuchung der Rolle von Resveratrol bei der Resistenzbildung und Literaturverwei-

Memorandum:

Resistenzen werden allgemein **in zwei** Typen eingeteilt: a) Sie sind wirksam gegen alle Isolate eines Pathogens und werden als **generelle** (horizontale) Resistenzen bezeichnet. b) Man kennt einzelne Isolate (Pathotypen), die eine bestimmte Resistenz durchbrechen können. Dies wird als **differenzielle** (vertikale) Resistenz bezeichnet. Sind solche differenziellen Resistenzen von verschiedenen Isolaten durchbrochen, gelten sie untereinander als funktionell verschieden. Die Genotypen des Pilzes werden als Rassen mit entsprechender Virulenz bezeichnet. Dieses System versucht man mit der sogenannten 'Gen-für-Gen-Hypothese' zu erklären. Dabei wird angenommen, dass zu **jedem Resistenzgen** in der Pflanze ein **entsprechendes Avirulenzgen** im Krankheitserreger existiert. Treffen Wirt und Krankheitserreger zu sammen, welche beide die entsprechenden Gene besitzen, interagieren die Produkte von Resistenzgen und Avirulenzgen so, dass die Interaktion inkompatibel wird, und der Erreger kann die Pflanze nicht befallen. Fehlt aber einer der beiden Faktoren, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion. Die **Rolle der Resistenzgene** ist also die **Erkennung** des Pathogens, man spricht deshalb auch von '**recognition genes**' oder R-Genen. Die Produkte dieser R-Gene lösen dann die Aktivierung einer Kaskade von Abwehrmechanismen aus (Produkte sogenannter '**defense-response genes**'). Dazu gehören beispielsweise Phytoalexine, hydrolytische Enzyme und sogenannte PR-Proteine ('pathogenesis-related proteins'). Generell kann davon ausgegangen werden, dass alle Sorten einer Wirtsart die Gene dieser Abwehrkaskaden besitzen. Hingegen wird angenommen, dass die Verteilung und die Präsenz der R-Gene in den verschiedenen Sorten unterschiedlich ist, und auch anfällige Sorten gewisse R-Gene besitzen. Diese wurden von entsprechenden Erreger-Rassen unwirksam gemacht. Das Modell erklärt diesen Effekt durch den Verlust der entsprechenden Avirulenzgene.

Von der echten generellen Resistenz (nicht die noch nicht erkannte differenzielle Resistenz) wird angenommen, dass sie von vielen additiven Genen abhängig ist, wobei einige Fälle bekannt sind, die nicht diesem Schema entsprechen. Bis heute wird vermutet, dass diese Resistenz nicht auf einem Pathotyp-Erkennungssystem basiert.

se dazu finden sich bei Denzer (1991). Er fand kontroverse Korrelationen wie zum

Beispiel interspezifische, wenig resistente Sorten mit hohem Resveratrolgehalt oder Sorten mit sehr guter Resistenz aber nur geringem Resveratrolgehalt. Die ursächliche Rolle dieses Phytoalexins in der Resistenz von Weinreben ist also ungeklärt. Darüberhinaus fanden zum Beispiel Pezet *et al.* (1991), dass der Erreger des Grauschimmels (*Botrytis cinerea*) Resveratrol abzubauen vermag.

Über die genetischen Grundlagen der Resistenzen gegen Falschen und Echten Mehltau ist wenig bekannt. Bei der Weinrebe kennt man bislang keine Beispiele eindeutiger Gen-für-Gen-Beziehungen beziehungsweise vertikale Resistenzen (siehe Kasten S. 13). Deshalb ist es bisher unklar, ob in *Vitis*-Arten Erkennungs-Gene (*R*-Gene) existieren oder ob die Resistenz auf präformierte strukturelle und/oder biochemische Unterschiede zurückzuführen ist, die zwischen den resistenten amerikanischen Arten und den *vinifera*-Arten bestehen. Im Fall des Falschen und Echten Mehltaus gilt als gesichert, dass die entsprechenden Resistenzen polygen vererbt werden (Husfeld 1939, Boubals 1959, Li 1985, Diehl 1988). Gegen den Echten Mehltau existieren auch monogene Resistenzen in der den *Vitis*-Arten verwandten *Muscadinia rotundifolia*.

Die Dauerhaftigkeit der oben erwähnten polygenen Resistenzen kann als gut beschrieben werden. Die Beobachtungen von Li (1985) zeigten, dass in pilzresistenten Rebanlagen keine Erregerstämme von *P. viticola* auftauchten, die eine erhöhte Virulenz aufwiesen, währenddem er aber Pilz-Stämme mit erhöhter Fitness fand. Eine Interaktion zwischen Sortenresistenz und Virulenz des Pathogens stellte er aber nicht fest. Denzer (1991) wies nach, dass die Resistenz interspezifischer Rebsorten gegen *P. viticola* in verschiedenen Stadien der Wirtsbesiedlung stattfindet und schliesst deshalb auf eine polyfaktoriell begründete Resistenz.

Eibach *et al.* (1989) führten Untersuchungen zur Vererbung von Resistenzeigenschaften der Rebe gegen den Echten und Falschen Mehltau sowie gegen *Botrytis cinerea* durch. Dabei bewährten sich insbesondere die *in-vitro*-Resistenztests, da sie mit den im Feld beobachteten Resistenzwerten gut korrelierten. Die Autoren ermittelten den Heritabilitätskoeffizienten der Resistenzen in Kreuzungsnachkommen und fanden den vermuteten polyfaktoriellen Charakter aller drei untersuchten Resistenzen bestätigt. Dagegen bestätigten sie für die *Plasmopara*-Resistenz in der asiatischen Art *V. yeshanensis* eine mono- oder oligogen bedingte Resistenz.

Es ist wichtig anzumerken, dass die einzelnen Resistenzen einer polygenen Resistenz nur eine kleine Wirkung haben und deshalb als Einzelfaktoren auch nur einen geringen Selektionsdruck auf die Krankheitserreger ausüben. In den resistenten Rebenarten sind mehrere Teilresistenzen gleichzeitig vorhanden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit eines Resistenzdurchbruchs zusätzlich stark reduziert. Wohl weshalb ist bis heute kein Erregerstamm beschrieben, der die polygenen Resistenzen durchbrechen kann. Umgekehrt kann daraus gefolgert werden, dass die isolierte Verwendung einzelner dieser Resistenzfaktoren dazu führt, dass - wenn auch sehr langsam - virulente Pathotypen selektioniert werden, welche dann auch auf polygen resistenten Sorten eine erhöhte Virulenz hätten.

Wie Fried *et al.* anführen, ist die Verfügbarkeit von geeigneten Selektionsmethoden für die Resistenzzüchtung essentiell, und verweisen auf Referenzen für *in-vitro*-, Gewächshaus- und Freiland-Selektionssysteme.

Aus der Tatsache der polygen vererbten Resistenzen in der Rebe sind die Schwierigkeiten für die traditionelle Züchtung klar ersichtlich. Der hohe Grad an Heterozygotität in der Rebe spielt hier eine besondere Rolle. Eine bessere Kenntnis über die Vererbungsmodi von Resistenzen und eine sichere Identifizierung der Resistenzfaktoren würden eine gezieltere Auswahl der Kreuzungseltern erlauben und die Selektion von Kreuzungsnachkommen schneller und sicherer machen. Züchterisch interessant wäre dazu

die Erzeugung von homozygoten Reben. Diese könnte durch wiederholte Rückkreuzungen beziehungsweise Selbstbefruchtungen erzeugt werden. Zwar ist eine Selbstbefruchtung bei den meisten Kultursorten möglich. Bei wiederholten Rückkreuzungen ist allerdings eine starke Inzuchtdepression in der 3. oder 4. Filialgeneration zu beobachten. Diese äussert sich in einem extremen Kummerwuchs ohne Ausbildung generativer Organe, weshalb die Erzeugung von homozygoten Reben auf diesem Weg nicht möglich ist.

5. Typisierung von durch Transformation entstehenden Weinreben-Genomen

Mit dem Ausdruck "transgen" wird der Zustand einer künstlichen Einführung genomischen Materials in einen Organismus beschrieben, gibt aber nicht über die Herkunft der übertragenen DNA Auskunft. Für Transformations-Arbeiten mit Weinreben drängt sich jedoch eine Unterscheidung anhand des Ursprungs des dabei verwendeten Genmaterials auf, wobei hier im wesentlichen unterschieden wird zwischen Genen der eigenen Gattung (*Vitis*) und Genen aus anderen Gattungen. Bis heute wurden nur Transformationen mit Gattungsfremder DNA durchgeführt, da *R*-Gene bisher noch nicht identifiziert worden sind. Arbeiten mit putativen 'defense-response genes' aus *Vitis* sind im Gange.

a) DNA aus *Vitis vinifera* ssp. *sativa*

Ziel der traditionellen Züchtung ist es unter anderem, erwünschte Eigenschaften von verschiedenen, bestehenden Kultursorten in neuen Sorten zu kombinieren, so zum Beispiel Geschmack oder Wuchsform. Schon relativ lange ist die monofaktorielle Vererbung einiger solcher Merkmale bekannt (Husfeld 1938). Viele wichtige Eigenschaften sind jedoch unter Kontrolle von mehreren Genen. Als Beispiel gelten hier Wüchsigkeit (Stärke des Wachstums), Ertrag und Geschmack. Der polygene Vererbungsmodus erschwert natürlich die Züchtung wesentlich. Dazu kommt im Falle der Weinreben noch der hohe Grad an Heterozygotität der Merkmale. Selbstungsnachkommen der Sorte Riesling zeigten beispielsweise eine ausserordentliche Fülle von Qualitätsunterschieden.

Wie schon erwähnt ist die Einführung der agronomisch wichtigen Eigenschaften auch durch die klassische Züchtung möglich, in der Praxis jedoch erweisen sich Faktoren wie hoher Grad an Heterozygotität und lange Generationszeit als grosse Hindernisse. Im Falle der Weinrebe ist die Einführung polygen vererbter Eigenschaften in der Praxis unmöglich. Die Transformation von Reben mit den erwähnten Erbfaktoren und ihren Regulationsgenen könnte den 'Züchtungsprozess' wesentlich beschleunigen. Es bleibt zur Zeit allerdings dahingestellt, ob eine Transformation mit mehreren für die gewünschten Eigenschaften kodierenden Genen überhaupt realisierbar ist und sich im neuen Organismus wie gewünscht ergänzen.

Erkennungsgene (*R*-Gene) wurden bei *V. vinifera*-Reben bisher nicht identifiziert und stehen nicht für Transformationen zur Verfügung. Denkbar ist aber, dass "defense-response genes" verwendet werden. Diese sind auch in *V. vinifera*-Reben vorhanden, weshalb eine Transformation mit diesen Genen einer Veränderung ihrer Regulation gleichkäme, insbesondere bei einer konstitutiven Expression. Damit verbundene unerwünschte Nebenwirkungen sind zu erwarten, da sonst die Pflanzen die Änderung der Regulation im Laufe der Evolution bereits vorgenommen hätten. Als Beispiel sei hier die Co-Evolution der *V. vinifera*-Sorten mit *Botrytis cinerea* angeführt.

Memorandum

'Defense-response genes' sind in allen Vitis-Arten vorhanden, werden in der Regel aber nur bei Bedarf (Infektion) exprimiert. Eine Transformation von Rebensorten, die auf die Verwendung solcher Gene abzielt, besteht deshalb im Endeffekt aus dem Verändern der natürlichen Regulation, zum Beispiel durch konstitutive Expression. Bei einer solchen Transformation muss mit physiologischen Veränderungen der Pflanze gerechnet werden. Diese haben wahrscheinlich negative Nebeneffekte, da sonst ja die Pflanze evolutiv diese Strategie bereits verfolgt hätte.

'Recognition-genes' (R-Gene) entstanden in der Natur in verschiedenen Vitis-Genotypen. Durch die sexuelle Rekombination werden diese Gene in verschiedenen Kombinationen auftreten. Erst durch die Fixierung einzelner Genotypen durch den Mensch (Klon-Vermehrung) wurden diese Neukombinierungen verunmöglicht.

Durch den antropogenen Einbau von R-Genen in Rebensorten ist demzufolge keine physiologische Veränderung der Sorte zu erwarten ausser der erfolgreichen Erkennung eines Pathogens.

b) DNA aus anderen Vitis-Arten

In der Resistenzzüchtung werden amerikanische und asiatische *Vitis*-Arten als Quellen von Resistenz verwendet. Mit interspezifischem *Vitis*-Genmaterial transformierte Weinreben entsprächen einem Züchtungsprodukt, welches aus einer mehrmals wiederholten Rückkreuzung resultiert. Dieses käme sogenannten 'near isogenic lines' (NILs) gleich, wie sie in anderen landwirtschaftlichen Kulturen erzeugt werden, und hätten den Vorteil, dass sie infolge des wegfallenden Züchtungsschrittes keine unerwünschten Gene enthalten. Auf traditionellem Weg wären wiederholte Rückkreuzungen zwar weitgehend möglich. Die Rebe reagiert jedoch sehr schnell mit einer starken Inzuchtdepression. Vor allem aber entsteht aus jedem Züchtungsschritt eine neue Rebensorte mit veränderten Qualitätseigenschaften, wodurch auch die Qualität des Weines aus diesen Sorten verändert wird. Eine Rekonstruktion der erwünschten Qualitätseigenschaften der Ursprungsorte ist durch traditionelle Züchtung nicht möglich.

Man wird deshalb versuchen, bisherige bewährte Rebsorten mit zusätzlichen gewünschten Erbfaktoren zu transformieren, wobei es entscheidend ist, welcher Typ von Genen in der Transformation eingesetzt wird (siehe Kasten). Falls in anderen *Vitis*-Arten R-Gene identifiziert werden, würden sich die damit transformierten Rebsorten also nur dadurch von konventionell gezüchteten unterscheiden, dass der Einbau der Erbfaktoren nicht durch homologe Rekombination geschah und dass (beim derzeitigen Stand der Technik) auch Selektions- und/oder Reporter-Gene miteingeschleust würden, die nicht von der Weinrebe stammten. Schliesslich muss auch erwähnt werden, dass die Anzahl der Kopien der durch die Transformation eingeführten Gene nicht kontrolliert werden kann. Daraus ergibt sich die Frage eines eventuellen Gen-Dosis-Effektes. Denkbar wäre zum Beispiel, dass der Einbau bzw. die Expression mehrerer Kopien des eingeführten Genmaterials unerwünschte Nebeneffekte haben kann (siehe Kasten). Im Fall der Weinrebe, die vegetativ vermehrt wird, ist eine Integration in ein Programm nicht unbedingt notwendig, da die DNA-Integration in den "background" des neuen Organismus nicht durch weitere Kreuzungen stabilisiert werden muss.

Ein Nachteil der ersten Nachkommen aus traditionellen Kreuzungen von *vinifera*-Sorten mit amerikanischen Rebenarten war der spezielle Weingeschmack. Dieser wird

im allgemeinen als Gras- oder Fuchsgeschmack beschrieben. Noch ist nicht genau bekannt, ob diese Geschmackseigenschaften mit der Resistenz der Pflanzen gekoppelt sind. Neuere Resultate sprechen dagegen, da aus Kreuzungen jüngerer Datums resistente Sorten ohne diesen typischen Geschmack hervorgegangen sind.

Auch hier soll festgehalten werden, dass der Einfluss des nicht-homologen DNA-Einbaus durch eine Transformation unbekannt ist, und unerwünschte Gen-Dosis-Effekte sind auch hier nicht auszuschliessen.

c) Nicht-*Vitis*-DNA

In allen der bisher publizierten Transformationen von Weinreben wurde Gattungsfremde DNA verwendet (siehe einleitenden Abschnitt dieses Kapitels). Mögliche Typen von Gattungsfremder DNA wären:

i) "defense-response genes"

Vielfach erwogen wird der Einbau von 'defence-response genes' aus anderen Pflanzen, so zum Beispiel die Einführung neuer Phytoalexine (Dixon *et al.* 1995) oder der Einsatz von Chitinasen aus *Trichoderma*.

ii) R-Gene

Die Idee der Verwendung von R-Genen aus anderen Pflanzen basiert auf folgender Hypothese: Es wird angenommen, dass R-Gene auch Krankheitserreger erkennt, die mit dem eigentlichen zu erkennenden Erreger nahe verwandt sind. Als Beispiel sei hier der Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel (*Phytophthora infestans*) genannt, der mit *Plasmopara viticola* relativ nahe verwandt ist. Es ist bisher aber reine Spekulation, ob R-Gene gegen andere Krankheitserreger in der Rebe Resistenz gegen die wichtigen Pathogene auslösen würden.

iii) Gene aus Pathogenen

Eine spezielle Situation besteht bei der Transformation von Weinreben mit Genen von viralen Coat-Proteinen. Die sinnvollste Anwendung dieser Technik ist sicherlich die Transformation von Wurzelstöcken, da einige der wichtigsten Viren der Rebe die Wurzeln infizieren. Eine ungeklärte Frage ist die Dauerhaftigkeit der Virusresistenz, welche bei Reben während der langen Standzeit von ca. 20-30 Jahren anhalten muss. Falls die Resistenz nicht absolut ist, wäre über die Jahre eine Akkumulation der Viren in der Pflanze denkbar. Unter Umständen könnte dies dann trotz des Schutzes durch Coat-Proteine Schäden verursachen.

Schliesslich wird sogar erwogen, Pflanzen mit Avirulenzgenen der Krankheitserreger zu transformieren (Dixon *et al.* 1995). Das Produkt des Avirulenzgens soll mit dem Erkennungsgen der Pflanze interagieren und dadurch die in der Pflanze vorhandene Abwehrkaskade auslösen (siehe Kasten Seite 13).

6. Beurteilung des toxischen Risikos von Rebentransformationenen

In den bisher publizierten Arbeiten über Transformationen von Weinreben wurden bis auf zwei Ausnahmen (LeGall *et al.* 1994, Krastanova *et al.* 1995) lediglich Selektions- und Marker-Gene transferiert. Eine allfällige praktische Anwendung solcher transformierten Pflanzen im Weinbau ist nicht anzunehmen, weshalb eine Beurteilung dieser Arbeiten in diesem Kapitel nicht gemacht wird.

Die Gene, welche Krankheitsresistenz in Weinreben vermitteln, sind noch nicht identifiziert, und deshalb sind auch ihre Produkte und deren Eigenschaften unbekannt. Es ist daher unmöglich, mögliche Risiken künftiger transgener Reben konkret zu diskutieren.

a) Transformationen mit *Vitis*-DNA

Über die Genprodukte der unter Punkt 4 erwähnten Krankheitsresistenzgene (=Erkennungsgene oder *R*-Gene) gibt es bisher keine toxikologischen Untersuchungen. Es ist hier deshalb nicht möglich, allfällige toxische Risiken für Konsumenten direkt zu bestimmen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine Verwendung dieser Gene kein toxisches Risiko beinhaltet. Wie unter Punkt 4 erläutert, ist eine absolute, vertikale Resistenz eine Frage der Erkennung der Pathogene seitens der Pflanze. Eine sinnvolle Transformation von Weinreben beinhaltet demnach die Verwendung der entsprechenden Erkennungs-Gene. Es kann angenommen werden, dass solche Gene in amerikanischen Rebenarten vorhanden sind. Bezüglich toxischer Effekte der Früchte dieser Arten gibt es aber keine Berichte, ebenso nicht über die Früchte von Kreuzungsnachkommen dieser Arten mit *vinifera*-Sorten. Toxische Effekte können ableitend von anderen System ausgeschlossen werden.

Eine Veränderung der Expression von einzelnen "defense-response genes" könnte hingegen aufgrund eines Dosis-Effektes unvorhersehbare Auswirkungen haben. Denkbar wäre, dass die konstitutive Expression eines für ein antimikrobielles Toxin kodierendes Gen in allen Zellen des transformierten Organismus zu humantoxischen Konzentrationen führt. Es wird zum Beispiel erwägt, Weinreben gentechnisch so zu verändern, dass sie das Phytoalexin Resveratrol überexprimieren. Resveratrol korreliert zum Teil mit der Resistenz von Weinreben gegen pilzliche Krankheitserreger wie *Botrytis cinerea* oder *Plasmopara viticola* (Coxon 1982). Der Begriff Phytoalexin beschreibt keine diskrete Stoffklasse, sondern meint ursprünglich Wirkstoffe, welche Pflanzen als Reaktion auf eine Pilzinfektion oder auf Stresssituationen bilden. Informationen über die direkte Toxizität von Resveratrol und seinen in Pflanzen vorkommenden Derivaten war nicht zu finden. Zu Phytoalexinen im allgemeinen kann aber folgendes gesagt werden (Smith 1982): Phytoalexine sind Biozide. Die frühere Annahme, Phytoalexine wirkten nur antifungisch, wurde wiederlegt. Bakterien, höhere Pflanzen und Tiere können durch Phytoalexine geschädigt werden. Daher sind auch toxische Effekte für den Menschen möglich (Kuç and Currier 1976). Unterschiedliche Organismen zeigen eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf Phytoalexine. Auch nah verwandte Organismen zeigen unterschiedliche Reaktionen. Zusammenfassend muss demzufolge auf ein toxisches Potential von Pflanzen hingewiesen werden, welche Phytoalexine entweder konstitutiv oder in sehr grosser Menge überproduzieren. Diese Feststellung gilt jedoch nicht nur für transgene Pflanzen, sondern auch für traditionell gezüchtete Pflanzen, die auf hohen Phytoalexin-Gehalt hin selektiert werden.

b) Transformationen mit Nicht-*Vitis*-DNA

Das momentan vielversprechendste Einsatzgebiet der Transformation ist bei der Rebe die Erzeugung Virus-resistenter Pflanzen. Bei den Virose der Rebe spielen die Nepoviren eine grosse Rolle, die durch Nematoden im Boden übertragen werden. Le Gall *et al.* (1994) und Krastanova *et al.* (1995) transformierten Weinreben mit dem Coat-Proteinen des Grapevine Chrome Mosaic Nepovirus beziehungsweise des Grapevine Fanleaf Virus. Die vegetative Art der kommerziellen Vermehrung beziehungsweise das Pfropfen von Ertragssorten auf Wurzelstöcke erlaubt es im Fall von Nepoviren, Weinreben vor ihnen zu schützen, indem resistente Wurzelstöcke eingesetzt werden. Dies hat den grossen Vorteil, dass das Genom der Ertragssorte und damit ihre Qualitätseigenschaften nicht verändert und beeinflusst werden. Bei der Weinerzeugung ist dies ein entscheidender Punkt. Insbesondere sind auch keine toxischen Nebenwirkungen in den Früchten zu erwarten, da ja nur die Unterlage verändert wurde.

Solche Nebenwirkungen sind aber durchaus möglich, wenn Ertragssorten mit Resistenzfaktoren ("defense-response genes") aus anderen Pflanzengattungen oder aus Tieren transformiert werden. Gegenwärtige Transformationen von Reben verwenden beispielsweise Chitinase-Gene aus *Trichoderma*, da Chitinasen eine teilweise antifungische Aktivität besitzen (siehe Punkt 2).

Für die Verwendung von "defense-response genes" gelten dieselben Argumente wie unter Punkt a.

7. Beurteilung der ökologischen Auswirkungen von Rebentransformationen

Die Literatur über die verschiedenen Teilaspekte dieses Abschnittes ist sehr spärlich. Es konnten keine Angaben über Feldversuche mit transgenen Weinreben gefunden werden, aus denen man diesen Abschnitt betreffende Schlüsse ziehen könnte. Allgemeine Überlegungen können dennoch gemacht werden:

Die Kultur- oder Edelrebe ist eine Formengruppe, über die bezüglich Herkunft und Verwandtschaft der einzelnen Sorten und Arten vermutlich nie gänzlich Aufschluss erhalten werden wird (Hegi 1908). Die meisten Rebarten und Kultursorten haben $2n=38$ Chromosomen, so auch die Gattung *V. vinifera*. Neuere molekularbiologische Methoden könnten hier vielleicht Licht ins Dunkel bringen. Die Formenvielfalt und die Züchtungstätigkeit (siehe Punkt 4) machen aber klar, dass *Vitis*-Arten untereinander hybridisieren können.

Die Kulturformen der Rebe werden in der ganzen Schweiz angebaut. Als Kulturflüchtling oder Überreste ehemaliger Weinberge kommt *V. vinifera* ssp. *sativa* überall dort vor, wo früher Wein angebaut wurde. Eine Verwilderung in Form eines Unkrautes ist indes nicht bekannt.

Zusammenfassend muss also davon ausgegangen werden, dass Pollen von transgenen Weinreben auf kompatible *Vitis*-Arten gelangen kann und daraus Früchte mit keimfähigen Samen entstehen können.

Die Bedeutung dieser Tatsache ist aber unklar. Wie erwähnt ist die Kulturrebe bei uns nicht heimisch, wird aber seit mehreren tausend Jahren angebaut. Trotzdem hat sich die Unterart *silvestris* als solche erhalten. Denkbar ist, dass eventuelle *vinifera-silvestris*-Hybriden unter natürlichen Bedingungen nicht lebensfähig sind, da sie viele nachteilige Eigenschaften der Kulturrebe erben. Dazu kommt, dass solche Hybridisationen wahrscheinlich nicht sehr häufig geschehen, da die wilde Rebe andere Standortansprüche hat als die Kulturrebe. *V. vinifera* ssp. *sativa* kommt gemäss Hegi (1908) nur auf eher feuchten Böden (vor allem in Auenwäldern) vor. Die Kulturrebe hingegen benötigt eher trockene und kalkhaltige Böden an sonnigen Lagen. Vor allem die Standortansprüche sind es wohl auch, weshalb sich verwilderte Reben nicht weiter verbreitet haben. Krankheiten könnten dafür zwar auch verantwortlich sein, doch spricht die sehr lange Zeit der Kultivierung dagegen, denn bis zur Einschleppung der Krankheiten und Schädlinge aus Amerika konnten die Reben auch ohne chemische Pflanzenschutzmittel angebaut werden. Die Einführung von Krankheitsresistenzen - sei es durch traditionelle Züchtung oder durch Transformation - wird an dieser Situation also kaum etwas ändern.

Le Gall *et al.* (1994) und Krastanova *et al.* (1995) transformierten Wurzelstöcke mit den Gensequenzen für Coat-Proteine von Nepoviren. Die ökologischen Auswirkungen eines Einsatzes von Coat-Proteinen im allgemeinen werden schon andernorts untersucht und gelten auch für die Weinrebe. Dieses Thema wird deshalb hier nicht weiter diskutiert.

Ähnlich verhält es sich mit anderen heterologen Faktoren, wie zum Beispiel Chitinasen, welche als Resistenzbildner in Transformationsprojekten auch anderer landwirtschaftlicher Kulturen erwogen werden.

8. Ökonomische Auswirkungen von Rebentransformationen

Trauben werden in der Schweiz fast ausschliesslich zur Weinherstellung produziert. Die direkte Konsumation als Tafelobst ist unbedeutend. Im Zusammenhang mit Pflanzenkrankheiten entstehen somit keine Probleme bezüglich der äusseren Qualität der Früchte, wie dies etwa beim Apfel der Fall ist und wo nur makellose Früchte frei von jeglichen Schäden als Klasse I Obst verkauft werden können. Ausserdem werden die Trauben bei uns auch nicht gelagert, weshalb etwaige Auswirkungen von krankheitsresistenten Reben auf die Lagerhaltung nicht zu beachten sind. Eine Bezifferung der durch Krankheiten verursachten Schäden ist schwierig. Ein geringer Befall führt nicht sofort zu Einkommenseinbussen durch Qualitätsverluste, da ein kleiner Prozentsatz befallener Trauben in der Weinproduktion toleriert werden kann. Wenn kein geeigneter Pflanzenschutz ausgeführt wird, kann aber in Jahren mit starkem Infektionsdruck der Befall durch *Plasmopara* einen Totalausfall der Ernte verursachen.

Für den Einsatz im Rebbau wurden 1994 Pflanzenschutzmittel im Wert von 22,1 Mio. Franken verkauft. Dies ergibt einen Durchschnittswert von rund 1470.- Fr pro Hektare und Jahr. Dies ist aber nur ein grober Mittelwert, denn die tatsächlichen Einsatzmengen und -Kosten schwanken regional und über die Jahre sehr stark.

Zu den direkten Kosten für Chemikalien kommt der Arbeitsaufwand für den Pflanzenschutz. Der SRVA (Service romand de vulgarisation agricole) stellt Angaben über die Produktionskosten im Schweizer Weinbau zusammen. Die im Folgenden gemachten zahlenmässigen Überlegungen basieren auf diesen Daten. Der Handarbeitsaufwand für den Pflanzenschutz in den verschiedenen Weinbaugebieten der Schweiz sehr unterschiedlich. So wurden im Kanton Genf oder Neuchatel nur 18 Stunden aufgewendet, während im Südtessin oder in einzelnen Bezirken des Wallis rund 100 Stunden aufgewendet wurden. Ein Mittelwert wäre hier also nicht sehr aussagekräftig. Der Pflanzenschutz ist verglichen mit anderen Arbeiten im Weinbau auch nicht so arbeitsintensiv, Stockpflege (350-800 h) und Weinlese (100-350 h) benötigen einen weitaus grösseren Handarbeitseinsatz. Dementsprechend sind auch die mit der Handarbeit verbundenen Kosten für den Pflanzenschutz geringer. Resistente Rebsorten würden an dieser Situation nur wenig ändern.

Einen gewissen ökonomischen Vorteil könnten hingegen Virus-resistente Wurzelstöcke erzielen. Durch den Grapevine Fanleaf Virus befallene Reben haben weniger Ertrag, eine verminderte Fruchtqualität und eine kürzere produktive Phase. In der Regel sind die Viren aber nur sehr lokal von grösserer Bedeutung, weshalb hier keine Bezifferung der Schäden gemacht wird.

9. Szenario

In den traditionellen Weinanbau-Gebieten machen Rebensorten aus konventionellen Züchtungen bisher nur einen unbedeutenden Anteil aus. Unter den neuen Sorten sticht einzig Riesling x Sylvaner hervor, die sich in Randgebieten stark durchsetzen konnte. Diese Situation könnte sich zwar in den kommenden Jahrzehnten ändern. Zwei Gründe sprechen aber dagegen: Einerseits sind die Qualitätsansprüche sehr hoch. Andererseits ist der Weinanbau ausserordentlich stark der Tradition verpflichtet und nicht sehr innovativ. Ein Erfolg von transgenen krankheitsresistenten Sorten ist deshalb nur dort anzunehmen, wo der Weinanbau durch Krankheitsbefall verunmöglicht wird und Bekämpfungsmassnahmen nicht wirksam oder verfügbar sind. Als Beispiel seien hier Fungizidresistenzen oder der Verbot gewisser Pflanzenschutzmittel erwähnt.

Weinreben haben eine lange Standzeit von ungefähr 30 Jahren. Neupflanzungen sind deshalb relativ selten. Falls künftig transgene Sorten ohne qualitative oder verarbeitungstechnologische Nachteile erzielt werden können, ist deshalb nur eine äusserst langsame Umstellung auf solche Sorten zu erwarten. Dabei sind aber Reben mit Resistenz gegen einen einzelnen Krankheitserreger nicht attraktiv genug, da im Weinbau mehrere Krankheiten grösseren Schaden bewirken können. Deshalb müssten in transgenen Reben Resistenzen gegen die 2-3 Hauptpathogene kombiniert sein, wobei angemerkt werden muss, dass die natürlichen Resistenzen in Reben polygener Natur sind, die einzelnen Gene additiv wirken und einzeln nur eine kleine Wirkung besitzen.

Einen gewissen Erfolg könnten transgene Virus-resistente Unterlagen erzielen, dies aber nur lokal, das heisst auf wenigen Hektaren Rebfläche in der Schweiz, wo Virenbefall ein Problem darstellt.

Die Akzeptanz von Produzenten und Konsumenten sowie die Gesetzgebung zum Zeitpunkt, wo transgene resistente Rebsorten erhältlich sind, ist nicht abschätzbar.

Zusammenfassung

Im Auftrag des BATS (Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprogrammes Biotechnologie) sollten Technikfolgen von transgenen Weinreben untersucht werden. Der Themenkatalog beinhaltete als Erstes die Erfassung der bisher publizierten Literatur auf diesem Gebiet sowie die Analyse ausgewählter Arbeiten. Danach wurde die Situation des Pflanzenschutzes im Schweizer Weinbau zusammengefasst. Als nächstes wurden die in der traditionellen Züchtung verwendeten Krankheitsresistenzen beschrieben und diskutiert. Es folgten Analysen des toxischen Risikos, der ökologischen sowie der ökonomischen Auswirkungen. Schliesslich wurde aufgrund der Informationen aus den vorherigen Punkten zu einem Fallszenario verarbeitet.

Die bisher veröffentlichten Arbeiten über Transformationen von Weinreben beinhalten bis auf zwei Ausnahmen den Gentransfer von Marker- und Selektions-Genen sowie die Regeneration der transformierten Gewebe zu ganzen Pflanzen. Die zwei Ausnahmen befassten sich mit der Transformation von Reben mit viralen Coat-Proteinen.

Der Pflanzenschutz im Schweizer Weinbau wird zur Zeit durch den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln geprägt. Einerseits besteht ein grosses Einsparungspotential, was die Menge an ausgebrachten Chemikalien betrifft. Andererseits muss, um sicher gegen Verluste durch gewisse Krankheiten vorzubeugen, ein fixes Behandlungsschema eingehalten werden, weshalb heute in der Praxis nur wenige Einsparungen möglich sind.

Insbesondere im biologischen Anbausystem haben resistente Sorten ein grosses Anbaupotential. Krankheitsresistente Rebensorten sind als Resultat von (traditionellen) Züchtungen bereits auf dem Markt erhältlich.

Bei der Beurteilung des toxischen Risikos von transgenen Weinreben wurde auf mögliche Gefahren bei der Verwendung von "defense-response genes" wie beispielsweise Phytoalexine hingewiesen. Berichte über toxische Effekte durch traditionell gezüchtete krankheitsresistente Sorten konnten keine gefunden werden.

Die ökologischen Auswirkungen von transgenen Weinreben sind schwierig zu beurteilen. Feldversuche mit solchen Reben wurden noch keine durchgeführt. Verschiedene *Vitis*-Arten können konventionell gekreuzt werden. In der Schweiz kommt die Edelrebe *Vitis vinifera* nur kultiviert vor, die Wildart *V. silvestris* nur an wenigen Standorten. Ein Auskreuzungspotential existiert zwar, hat vermutlich aber keine praktische Bedeutung. Die Gefahr einer Verwilderung von transgenen krankheitsresistenten Weinreben wird als gering eingeschätzt, da Krankheiten nicht limitierend für das Vorkommen in der Schweiz sind.

Transgene krankheitsresistente Rebsorten ergäben für die Produzenten Einsparungen, wie sie auch durch traditionell gezüchtete Sorten möglich wären. Von Bedeutung ist in beiden Fällen die Dauerhaftigkeit der eingeführten Resistenz. Im Rebbau ist der Arbeitsaufwand für den Pflanzenschutz kleiner als für andere Arbeiten wie Stockpflege und Weinlese.

Mit Ausnahme von Virus-resistenten Sorten sind die Erfolgchancen für transgene Reben relativ klein. Um attraktiv genug zu sein, müssten solche Sorten auch kombinierte Resistenzen gegen die zwei bis drei wichtigsten Krankheitserreger besitzen. Aber auch dann lassen die lange Standzeit und die traditionell geprägte Weinkultur nur eine langsame Umstellung auf transgene Sorten erwarten.

Literatur

- Anderson J.R. 1978. Pesticide effects on non-target soil microorganisms. In: Pesticide Microbiology, ed. Hill I.R. and Wright S.J.L., Academic Press. p. 313-533.
- Anonymous. 1988. Compendium of Grape Diseases. R.C. Pearson and A.C. Goheen (eds.). American Phytopathological Society. St.Paul, USA. pp. 94.
- Anonymous. 1993. Der Rebbau in der Schweiz. Bundesamt für Statistik. pp. 45.
- Baribault T.J., Skene K.G.M. and Steele Scott N. 1989. Genetic transformation of grapevine cells. Plant Cell Reports 8:137-140.
- Baribault T.J., Skene K.G.M., Cain P.A. and Steele Scott N. 1990. Transgenic grapevines: Regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. Journal of Experimental Botany 41(229):1045-1049.
- Basler P. and Wiederkehr M. 1993. Krankheitsresistente Rebsorten - Chance für ökologischen Durchbruch. Schweiz. Zeitschrift für Obst- und Weinbau 129:646-658.
- Berres R., Otten L., Tinland B., Malgarini-Clog E. and Walter B. 1992. Transformation of vitis tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene. Plant Cell Reports 11:192-195.
- Blaise Ph. and Gessler C. 1990. Development of a forecast model of grape downy mildew on a micro-computer. Acta Horticulturae 276:63-70.
- Boller E., Siegfried W., Herzog J. and Potter C. 1986. Analyse ausgewählter landwirtschaftlicher Kulturen der Schweiz - Weinbau. Schweizerische landwirtschaftliche Forschung 25(3/4):286-293.
- Boubals D. 1959. Contribution à l'étude des causes de la résistance des *Vitacees* au mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de Toni) et de leur mode de transmissions héréditaire. Ann. de l'Amélior. Plantes 1:1-236.
- Colby S.M., Juncosa A.M. and Meredith C.P. 1991. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(2):356-361.
- Coxon D.T. 1982. Phytoalexins from other families. In: Phytoalexins. Bailey and Mansfield (eds.). Blackie, London. p. 319-323.
- Denzer H. 1991. Resistenz von Rebsorten gegen *Plasmopara viticola*. Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen. pp. 133.
- Diehl H.J. 1988. Untersuchungen zur Erbllichkeit von Resistenzeigenschaften bei Reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea*. Dissertation Uni Stuttgart-Hohenheim.
- Dixon R.A., Paiva N.L. and Bhattacharyya M.K. 1995. Engineering disease resistance in plants: an overview. In: Molecular Methods in Plant Pathology (Singh and Singh, eds.). CRC Press. p. 249-270.
- Eibach R., Diehl H. and Alleweldt G. 1989. Untersuchungen zur Vererbung von Resistenzeigenschaften bei Reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea*. Vitis 28:209-228.
- Fitch M.M.M., Manshardt R.M. Gonsalves D. and Slightom J.L. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Reports 12:245-249.
- Fried P.M., Barben H., Keller S., Müller M.D., Winzeler H., Winzeler M. and Weisskopf P. 1993. Expertise betreffend Möglichkeiten des Einsatzes biotechnologischer Methoden zur Erhöhung der Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge wichtiger Kulturpflanzen der Schweiz. Schweizerischer Nationalfonds. Bern. pp. 86.

- Gray D.J., Songstad D.D. and Compton M.E. 1993. Expression of GUS in Bombarded Grape Somatic Embryos and Cells. In vitro cellular & development biology: Journal of the Tissue Culture Association 29:65A.
- Guellec V., David D., Branchard M. and Tempé J. 1990. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20:211-215.
- Hain R., Reif H.J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stöcker R.H. and Stenzel K. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361:154-156.
- Hébert D., Kikkert J.R., Smith F.D. and Reisch B.I. 1993. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. Plant Cell Reports 12:585-589.
- Hegi G. 1908. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. J.F. Lehmann Verlag, München. IV/2:743.
- Hess H.E., Landolt E. and Hirzel R. 1984. Bestimmungsschlüssel zur Flora der Schweiz. Birkhäuser Verlag.
- Husfeld B. 1939. Handbuch der Pflanzenzüchtung. In: Roemer T. und Rudorf W. (eds.). p. 152-195.
- Kahl G. und Winter P. 1995. Plant genetic engineering for crop improvement. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11:449-460.
- Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnnet N., Otten L., Pinck L. and Walter B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. Plant Cell Reports 14:550-554.
- Kuç J. and Currier W. 1976. Phytoalexins, plants and human health. In: Mycotoxins and other fungal related food problems. Rodricks J.R. (ed.). American Chemical Society. p. 356-368.
- Le Gall O., Torregrosa L., Danglot Y., Candresse T. and Bouquet A. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). Plant Science 102:161-170,
- Li H. 1985. Etude de la relation entre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de Toni) et l'espèce *Vitis vinifera* L.: variabilité de l'agent pathogène et de la sensibilité de l'hôte. These Université de Bordeaux.
- Mansfield J.W. and Bailey A. 1982. Phytoalexins: current problems and future prospects. In: Phytoalexins. Bailey and Mansfield (eds.). Blackie, London. p. 319-323.
- Martinelli L. and Mandolino G. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). Theor. Appl. Genet. 88:621-628.
- McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A. and Dandekar A.M. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Bio/Technology 6:800-804.
- Müller E. and Löffler W. 1982. Mykologie. G. Thieme Verlag Stuttgart. pp. 366.
- Mullins M.G., Tang F.C.A. and Facciotti D. 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: Transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and Buds of *Vitis vinifera* L. Bio/Technology 8:1041-1045.
- Nakano M., Hoshino Y. and Mii M. 1994. Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of embryogenic calli. Journal of Experimental Botany 45(274):649-656.

- Neuhaus J.M., Ahl-Goy P., Hinz U., Flores S. and Meins F. 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 16:141-151.
- Pezet R., Pont V. and Hoang-Van K. 1991. Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39(6):441-450.
- Scorza R., Cordts J.M., Ramming D.W. and Emershad R.L. 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14:589-592.
- SRVA (Service romand de vulgarisation agricole, Lausanne). 1995. Erhebung Trauben und Wein; wirtschaftlich-technische Ergebnisse.
- Vereinigung schweizerischer biologischer Landbau-Organisationen (VSBLO). 1992. Richtlinien für die Erzeugung, Verarbeitung und den Handel von Produkten aus biologischem (ökologischem) Anbau. pp. 45.
- Walker M.A., Lider L.A., Goheen A.C. and Olmo H.P. 1991. VR O39-16. *HortScience* 26:1224-1225.

Adressliste

Die Adressen von Personen, von welchen persönliche Mitteilungen für diese Studie stammten, sind im folgenden aufgelistet.

D.J. Gray. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Leesburg (FL) 34748-8232, USA.

A. Häseli, Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Bernhardsberg, 4104 Oberwil (BL), Schweiz.

B. Reisch. Dept. Horticultural Sciences. Cornell University. Geneva (NY), USA.

A. Spielmann. Institut de Botanique. Université de Neuchâtel. 2007 Neuchâtel, Schweiz.

An dieser Stelle möchten wir P. Basler (FAW Wädenswil) und P. Gugerli (RAC Chagnins) für ihre Diskussionsbeiträge danken.