

**Der Klimawandel hat zweifellos einen Einfluss auf die Mikrobiologie während der Weinbereitung. Für Botrytis cinerea fehlte bislang ein schnelles, praxistaugliches Nachweisverfahren. An der Universität Mainz wurde ein solches entwickelt.**

# Botrytis-Nachweis per DNA-Fingerprintanalyse



Text und Abbildungen:  
Dr. Jürgen Fröhlich (rechts), Erbslöh Geisenheim AG, Dr. Steffen Hirschhäuser (links) und Dr. Jens Pfannebecker (Universität Mainz)

Der Klimawandel ist in aller Munde und die Daten des IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) belegen, dass das Klima eine globale Erwärmung um durchschnittlich ein Grad Celsius innerhalb der letzten 30-40 Jahre aufweist.

Für die kommenden Jahre werden ebenfalls Niederschlagszunahmen für unsere Breiten prognostiziert. Der Zuwachs der Wetterwechsel und Fluktuationen zwischen den Extremen erscheinen Besorgnis erregend. Als direkte Folge der Erwärmung verlagern sich die Reifep Perioden der Reben um mehrere Wochen. Die Zunahme der Temperatur und der Feuchtigkeit hat bei frühreifen Trauben nachhaltigen Einfluss auf die mikrobiologische Flora, die Gesundheit der Weintrauben und die nachfolgende Populationsdynamik während der Weinbereitung. Die Phytopathologie und Weinmikrobiologie werden zukünftig noch mehr in den Fokus der Landwirtschaft geraten. Die klimatisch bedingten verbesserten Wachstumsbedingungen forcieren eine generelle Zunahme der Mikroorganismen. Altbekannte Mikroben werden deutlich an Anzahl zunehmen, neue Spezies kommen hinzu oder adaptierte Arten aus anderen Ländern werden eingeschleppt. Makroskopisch ist dieser Prozess bei verschiedenen Insekten (Marienkäfer, Gallwespen, Zecken) gut zu beobachten sowie bei anderen Tieren, die mitunter ihre

eigene mikrobielle Flora munter in die Welt hinaus streuen. Zum Beispiel nimmt die Schwarzholzkrankheit des Rebstocks zu, da begünstigte Überpopulationen von Zikaden nicht mehr standorttreu bleiben. Oder die Rebstöcke werden wegen Austrocknung der Wirtspflanzen mit zellwandlosen Bakterien, Phytoplasmen, während des Saugens infiziert.

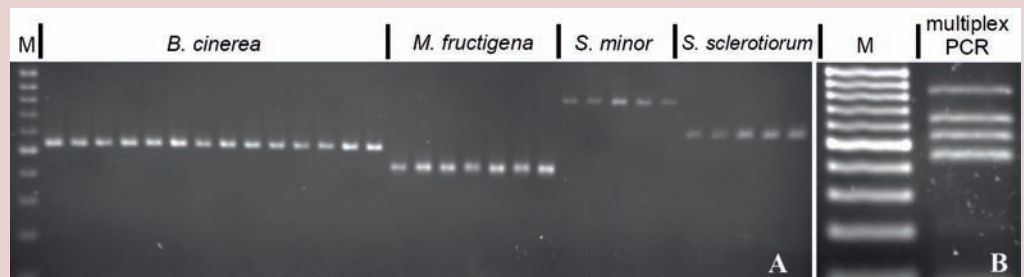
## Gut oder böse?

Nicht immer ist eine Zuordnung der Mikroorganismen in gut und böse möglich. Botrytis kann nach kurzer Feuchtigkeit mit anschließender Trockenperiode zur Konzentrierung des Zuckergehalts günstig auf die Weinqualität wirken. Bei zu hoher Feuchtigkeit neigt Botrytis leicht zur Sauerfäule und ist Wegbereiter für andere Verderbniserreger.

Sind die Reifegrade der Trauben und die Witterungsbedingungen günstig, kann das Wachstum einzelner Pilze beängstigende Ausmaße annehmen und nach Hagel und Regen innerhalb eines Tages schon zu massiven Ernteverlusten führen. Bei günstiger Witterung zeigt gerade Botrytis durch sein aggressives Verhalten, dass nicht nur Weintrauben Ziele seiner Fresslust sind. Als echter Generalist präsentiert sich Botrytis mit einem Wirtsspektrum von mehreren hundert Pflanzen inklusive vieler Obst- und Gemüsesorten.

## Multiplex-PCR mit *lcc2*-spezifischen Primern

Multiplex-PCR einer DNA-Mischung von *Botrytis cinerea* ATCC90769 (links), *M. fructigena* DSM2677, *S. minor* DSM63016 und *S. sclerotiorum* DSM1946. Die Stämme und Isolate der Umweltproben können eindeutig den jeweiligen Arten zugeordnet werden.



Etablierte Methoden bei Bonitätsprüfungen quantifizieren die Belastung der Trauben anhand chemischer Parameter. Die Einflüsse von Botrytis sind dabei mannigfaltig und führen zu massiven Veränderungen der Inhaltsstoffe (Abbau von Weinsäure und die Bildung von Gluconsäure, Glycerin, Alkohol und flüchtiger Säure), vgl. auch [Tabelle](#).

Die Bildung eines verzweigten Glukans führt zu Filtrationsproblemen und die darin enthaltene Laccase-Aktivität zu Farbverlust ([Foto rechts](#)). Die nachfolgende Gärung durch *Saccharomyces cerevisiae* ist erschwert durch Bildung von Botryzine, die Abnahme von Ammonium, Thiamin (Vitamin B1) und Pyridoxal (Vitamin B6) sowie durch vorhandene Spritzmittelrückstände. Ebenfalls ist die Zunahme von Äpfel- und Citronensäure problematisch, da bei nachfolgendem BSA laktische und buttrige Noten sowie flüchtige Säure aus dem Citratstoffwechsel der Milchsäurebakterien im Übermaß auftreten können.

Eine Infektion durch die klimatisch bedingte Zunahme der mikrobiellen Belastung mit Botrytis sollte früh erkannt werden, denn das Adaptationsvermögen des Pilzes an die klassische Behandlung mit Spritzmitteln ist hoch, so dass mitunter mehrmals im Jahr das Mittel gewechselt werden muss. Die Konidien überwintern geschützt im Knospenbereich und sind einer einfachen Identifizierung nicht zugänglich.

### Neues Nachweisverfahren: nSAPD-PCR

Ein am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Uni Mainz verfolgter Ansatz der Identifizierung beruht auf genetische Techniken. Die Techniken haben den Vorteil, in einem frühen Stadium durch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) schon geringe mikrobielle Belastungen an pflanzlichem Material ohne Kultivierung und morphologische Diagnostik durchzuführen. Die gängigen Gene und Genabschnitte wie die ribosomale DNA oder ITS-Bereiche sind für die Pilzfamilie Sclerotiniaceae nicht auflösend genug. Verwandte Gattungen wie *Monilinia* und *Sclerotinia* sind nicht ausreichend von Botrytis zu unterscheiden. Mit einem neu entwickelten Verfahren der DNA-Fingerprintanalyse, nSAPD-PCR, konnten die genetischen Profile der PCR-Muster zur eindeutigen Identifizierung herangezogen werden. Die Fingerprintanalysen haben dabei einen Zeitaufwand von 20 Stunden.

Für eine schnellere Technik wurde ein weiteres einfaches PCR-Protokoll etabliert. Die entsprechenden Genabschnitte dafür wurden bei der Untersuchung der Laccase-Gene gefunden. Botrytis wurde wie die verwandten Gattungen eindeutig durch die individuelle unterschiedliche Anordnung der im Gen vorhandenen Introns identifiziert. Mit dem entwickelten PCR-Protokoll gelingt nun ein Nachweis innerhalb weniger Stunden. Eine simultane Identifizierung der verwandten Sclerotiniaceae ist durch



das Nachweis-Kit (Multiplex-PCR, [Abbildung](#)) möglich. Das Kit wurde erfolgreich bei der Untersuchung infizierter Obst- und Gemüsesorten im Praxistest eingesetzt. ▶

### Hinweis von Erbslöh:

Zur Behebung der Gärrisiken stehen dem Winzer Schönungs- und Gärhilfsmittel zur Verfügung: Granucol (Fehltöne, Phenole), NaCalit (Proteine), Vitamon Plus (Hefeernährung), VitaDrive (Rehydratisierung), Vitaferm (Gärhilfsmittel), Hefacell (Gärstockung), Littothiamol Plus (Hefeernährung), Trenolin Filtro DF (Glukanbeseitigung).

Auch der Einsatz gärstarker Hefen wie Oenoferm Freddo oder die Anwendung Citrat-negativer Oenokokken (Littomaliq Blanc) für das Diacetylmanagement schaffen Abhilfe.

*Phasenkontrastaufnahme von Botrytis cinerea. Zur Sichtbarmachung des Glukans wurde das Präparat mit Tusche gefärbt. Als helle Matrix zeichnet sich das Laccasehaltige Glukan ab*

### Noch Fragen?

Fragen zu diesem Beitrag beantwortet unser Autor.  
Tel: 06722 / 708 0  
E-Mail: [info@erbsloeh.com](mailto:info@erbsloeh.com)

Literaturangaben bei den Autoren

## Veränderung der Aromakomponenten durch eine Botrytis-Infektion

Veränderung des Sortenbuketts durch die Zunahme von (Auswahl)	Veränderung des Sortenbuketts durch die Abnahme von (Auswahl)
Octanol-3	Isoamylalkohol
1-Octen-3-ol	3-Methylpentanol
Benzaldehyd	Trans-3-hexenol
Furfural	α-Terpineol
γ-Nonolacton	β-Phenylalkohol
Phtalid	2-Methyl-3-thiolanan
Ethyllevulinat	1,1-di(2-phenylethoxy)-ethan
Ethylphenylacetat	4-Vinylguajacol
Diethylglutarat	Ethylhexanoat
Diethylacetat	Ethyl-octanoat
	Ethyl-decanoat
	Hexylacetat
	Ethyl-2-hydroxy-3-methylbutanoat
	Ethyl-2-hydroxy-3-methylpentanoat
	Ethyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat
	Ethyl-2-hydroxy-3-phenylpropanoat
	Phenylethylacetat
	Ethylphenylethylsuccinat