

**Weinblattmetabolite als  
Resistenzmarker für eine  
*Plasmopara viticola* Widerstandsfähigkeit**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)**

Fakultät Agrarwissenschaften  
Universität Hohenheim  
Institut für Phytomedizin

vorgelegt von  
**Maike Grünwald**  
aus Kassel

2023





UNIVERSITÄT  
HOHENHEIM

Die vorliegende Arbeit wurde am 07.07.2023 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Datum der mündlichen Prüfung:	07.09.2023
Dekan:	Prof. Dr. Ralf Vögele
Leiter der Prüfung:	Prof. Dr. Stefan Böttinger
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ralf Vögele
2. Gutachterin:	Prof. Dr. Astrid Forneck
3. Gutachter:	Prof. Dr. Christian Zörb

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte am Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, im Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz in Quedlinburg und Berlin. Die Untersuchungen wurden durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) zum Thema „Erforschung und Entwicklung von Verfahren zur Reduzierung oder zum Ersatz kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Landbau“ im Bereich des Bundesprogramms Ökologischer Landbau mit dem Vorhaben „Nutzung von Resistenzmechanismen verschiedener Rebrarten als Alternative zum Einsatz von Kupfer im Ökoweinbau“ gefördert (BÖL 2809OE53).



Danksagung:

Die Fertigstellung dieser Arbeit verdanke ich dem Beistand vieler Menschen. Und ich möchte einigen hier besonders dafür danken.

Dr. Detlef Ulrich für die Betreuung der analytischen Arbeit am JKI in Quedlinburg, seine Hilfe und Korrekturen der Monografie sogar in seinem wohlverdienten Ruhestand.

Jörg Sellmann vom JKI Kleinmachnow, Dr. Doreen Gabriel vom JKI Braunschweig und Dr. David Riewe vom JKI Berlin für ihre Unterstützung bei SAS und Statistik Fragen und Problemen.

Dr. Florian Schwander aus dem JKI, Institut für Rebenzüchtung, Siebeldingen für die kurzfristige Korrekturarbeit dieser Monografie.

Dr. Andrea Krähmer, Dr. Hartwig Schulz und Dr. Bernd Hommel für die Gewährung des Gastwissenschaftleraufenthalts im JKI nach Ablauf des bewilligten Projektzeitraums.

Dr. Günther Buchholz, alPlanta (Neustadt a.d. Weinstraße) für die Bereitstellung von gefrorenen *Plasmopara viticola* Sporen und Tipps zu Blattscheibenversuchen.

Prof. Michael Fischer und Dagmar d'Aguiar u.a. für die Betreuung der Arbeit, der praktischen und erläuternden Hilfe bei den Beprobungsterminen im Freiland, den Infektions- und Blattscheibenversuchen am JKI Siebeldingen.

Prof. Ralf Vögele für die kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit an der Universität Hohenheim.

Und natürlich möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinem Mann René, der mir in unserem trubeligen Familienalltag immer wieder Freiräume geschaffen hat, um diese Arbeit beenden zu können.

Von ganzem Herzen danke ich Ihnen und Euch für Eure Unterstützung.

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Anhangverzeichnis.....	XIII
Abkürzungen.....	XIV
Zusammenfassung.....	XVI
Summary.....	XVIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Falscher Mehltau der Weinrebe.....	2
1.1.1 Infektionszyklus von <i>Plasmopara viticola</i> .....	2
1.1.2 Symptome und Pflanzenschutz im ökologischen Weinbau.....	4
1.1.3 Herausforderungen im Ökologischen Weinbau – Pflanzenschutz und Resistenzzüchtung.....	5
1.2 Abwehrreaktionen von Pflanzen.....	7
1.3 Hintergründe zu den statistischen Verfahren.....	9
1.3.1 Spearman Rangkorrelation (SR).....	9
1.3.2 Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS).....	10
1.3.3 Post-hoc-Test „Simulate“.....	10
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Probenmaterial.....	12
2.2 Chemikalien.....	15
2.3 Instrumente.....	18
2.4 Software.....	18
2.5 Verwendetes Pflanzenmaterial.....	19
2.5.1 Probenahme Freilandversuche.....	19
2.5.2 Infektionsversuch im Gewächshaus.....	21
2.5.3 Lagerung und Transport.....	23
2.6 Blattscheibentest zur Ermittlung der Resistenzklassen.....	24
2.7 Probenaufbereitung zur Analyse flüchtiger Metabolite.....	26
2.7.1 Homogenisation.....	26
2.7.2 HS-SPME-GC-EI-MS.....	28

2.7.3	Identifizierung der VOCs .....	29
2.7.4	Referenzsubstanzen .....	31
2.8	Datenverarbeitung.....	32
2.8.1	Vorbereitungen zur statistischen Auswertung – Datenalignement, Standardisierung etc.....	32
2.8.2	Statistik .....	33
3	Resultate .....	36
3.1	Einteilung der Resistenzklassen durch den Blattscheibentest .....	36
3.2	Kalibrierung zur Ermittlung der Retentionsindices .....	37
3.3	Konstitutive Marker (Freilandproben) .....	40
3.3.1	Blattposition .....	42
3.3.2	Metabolitprofile im Versuchsjahr 2011.....	50
3.3.3	Metabolitprofile im Versuchsjahr 2012.....	51
3.3.4	BBCH6 Zwei Jahre.....	53
3.3.5	BBCH8 Zwei Jahre.....	65
3.3.6	BBCH9 Zwei Jahre.....	76
3.3.7	Zweijähriger Vergleich aller Resistenzmarker.....	89
3.3.8	Vergleich der Marker für Resistenz und Blattposition .....	104
3.4	Induzierte Marker (Gewächshaus-Pflanzen).....	107
4	Diskussion .....	116
4.1	Freiland oder Gewächshaus – verschiedene Entwicklungsstadien vs. mögliche unbemerkte Infektion .....	116
4.2	Resistenzklassen Einteilung durch Blattscheibentest .....	118
4.3	Problematik bei induzierten Markern .....	119
4.4	Bioaktivität der Resistenzmarker .....	120
5	Fazit .....	132
6	Literaturverzeichnis.....	136
	Anhang.....	149

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Probenherkunft und Probenanzahl Freilandversuche.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 2: Probenanzahl (n) des Infektionsversuchs. Ganze einjährige Versuchspflanzen im 15 - 20 Blattstadium. Jeweils drei Kontrollen und drei infizierte Varianten.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 3: Abstammung .....</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 4: Einteilung der Blattpositionen .....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 5: Genotypen, deren Resistenz gegen P. viticola durch Blattscheibentests ermittelt wurden.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 6: Einteilung der Resistenzklassen durch Anzahl der Sporangienträger pro Blattscheibe .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 7: Einteilung der Genotypen in Resistenzklassen anhand der Mittelwerte der Blattscheibentests.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 8: Verdünnungsfaktor der 1. - 3. Wiederholung bei apikale Blättern. Wenn kein Wert angegeben ist, dann konnte eine Standardverdünnung (Faktor 3) vorgenommen werden. /) keine biologische Wiederholung verfügbar.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 9: Resistenzklassen der verwendeten Genotypen. BS1 - BS8: Anzahl der getesteten Blattscheiben 1 - 4, MW: arithmetischer Mittelwert, Klasse: Resistenzklasse, /: keine auswertbare Blattscheibe.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 10: Retentionszeiten der Alkanstandards für die Messjahre 2011 und 2012. Vergleich der Retentionszeiten aus SPME und Flüssiginjektion (LI) und Differenz <math>\Delta</math> der jeweils beiden Injektionen. Angabe in Minuten [min]. .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 11: Retentionszeiten der Alkanstandards für das Messjahr 2013. Vergleich der Retentionszeiten aus SPME und LI Injektion und Differenz <math>\Delta</math> der jeweils beiden Injektionen. Angabe in Minuten [min].....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 12: Eigenwerte der Korrelationsmatrix bei der PCA des ontogenetischen Effekts in BBCH8 1.VJ. Angezeigt sind die Eigenwerte der Hauptkomponenten bis der kumulative Anteil der Varianzerklärung die 95 % Hürde erreicht. Berechnung über proc princomp.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 13: Blattpositionsmarker in anfälligen V. vinifera Kultivaren und resistente(re)n Hybrid- und Wildreben. Angegeben sind die p-Werte, CAS-Nr. und der Identifikationsgrad. /) nicht getestet, a) vollständige Identifikation über NIST Datenbank und Referenzsubstanz, b) Identifikation über NIST Datenbank c) Identifikation über NIST Datenbank und Literatur mit Angabe der Trennsäule, d) nicht identifiziert .....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 14: Eigenwerte der Korrelationsmatrix bei der PCA der Genotypen in BBCH8 1. VJ. Angezeigt sind die Eigenwerte der Hauptkomponenten bis der kumulative Anteil der Varianzerklärung die 95 % Hürde erreicht. Berechnung über proc princomp.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 15: Eigenwerte der Korrelationsmatrix der Hauptkomponentenanalyse des ersten Versuchsjahres (2011). Für BBCH8 wurden die Datensätze der „Gesamtprobe“ verwendet. Die Datensätze der Proben BBCH6 und BBCH9 stammten aus Mischproben.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 16: Eigenwerte der Korrelationsmatrix der Hauptkomponentenanalyse des zweiten Versuchsjahres (2012) .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 17: 25 Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH6 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012</i>	<i>60</i>

Tabelle 18: 18 Metabolite in BBCH6 2011, die in den non-targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens einem Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. Signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ) sind <b>FETT gedruckt</b> .....	61
Tabelle 19: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH6 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	62
Tabelle 20: 41 Metabolite in BBCH6 2012, die in den non-targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens einem Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	63
Tabelle 21: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH6 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	65
Tabelle 22: Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH8 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012 ....	71
Tabelle 23: 20 Metabolite in BBCH8 2011, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	72
Tabelle 24: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH8 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	73
Tabelle 25: 35 Metabolite in BBCH8 2012, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	74
Tabelle 26: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH8 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	76
Tabelle 27: Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH9 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012 ....	85
Tabelle 28: 14 Metabolite in BBCH9 2011, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	86
Tabelle 29: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker BBCH9 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	86
Tabelle 30: 32 Metabolite in BBCH9 2012, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc Simulate-Test. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	87
Tabelle 31: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker BBCH9 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math></b> .....	88
Tabelle 32: „Positive“ Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7 nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, nd) nicht oberhalb des Basislinienrauschens	



detektiert, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium B) zweijährig, unterschiedliche Entwicklungsstadien, C) einjährig, mehrmals, D) nur 1x.....	101
Tabelle 33: Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren mit wechselnder Korrelation. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7, nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, X+) „positiver“ Resistenzmarker, X-) „negativer“ Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium, C) einjährig, mehrmals. ....	
	102
Tabelle 34: „Negative“ Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7, nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, nd) nicht oberhalb des Basislinienrauschens detektiert, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium B) zweijährig, unterschiedliche Entwicklungsstadien, C) einjährig, mehrmals, D) nur 1x.....	
	103
Tabelle 35: Vergleich der Marker für konstitutive Resistenz und Blattposition. Angabe mit CAS Nummer, J) Blattpositionsmarker, X+) „positiver“ Resistenzmarker, X-) „negativer“ Resistenzmarker.....	
	105
Tabelle 36: Infektionsmarker. Substanzen, die in den vier Genotypen <i>V. vinifera</i> cv. Müller-Thurgau und Regent, Blaue Isabella (Hybridrebe) und <i>V. riparia</i> signifikant verschiedene Amplitudenwerte zwischen den infizierten Blättern und den Kontrollblättern aufwiesen. <b>FETT gedruckt = <math>p &lt; 0,05</math> #</b> konstitutiver Resistenzmarker.....	
	115

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zoospore mit Infektionsschlauch, der in ein Stoma wächst. Quelle: JKI Archiv, RZ, Siebeldingen.....	2
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>P. viticola</i> . I) Sexueller Zyklus (Winter): Ia) Befruchtung Ib) Oospore Ic) Freisetzung nach Blätterfall im Herbst Id) Keimung der Oosporen Ie) Schlüpfen der Zoosporen. II) Asexueller Zyklus (Sommer): IIa) Sporangium differenziert und undifferenziert IIb) Schlüpfende Zoosporen und Kontakt zu wasserbenetzten Stomata IIc) Zoosporen mit Keimschlauch IId) Myzel im Blattinneren IIe) Sporangioophoren wachsen aus den Stomata. Bildquelle: <a href="https://www.vitifutur.net/modelle.htm">https://www.vitifutur.net/modelle.htm</a> (30.01.2022).....	
	3
Abb. 3: Symptome des Falschen Mehltaus. A) Ölflecken auf der Blattoberfläche und beginnende Nekrosebildung. B) weißer Pilzrasen (Sporangiophoren) an der Unterseite der Ölflecken. C) Sporangioophoren an kleinen befallenen Beeren. D) Lederbeeren innerhalb einer Traube.....	
	4
Abb. 4: Apikale Blätter, Definition des 1. - 3. entfalteteten Blatts .....	21
Abb. 5: Topfpflanzen 1 Tag nach der Inokulation. ....	22
Abb. 6: Schema einer Neubauer improved Zählkammer. Quelle: <a href="http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html">http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html</a> (Stand 07.10.2015).....	
	23
Abb. 7: deutliche Sporangienträgerbildung auf der Blattunterseite von Regent (8 dpi).....	23
Abb. 8: Prinzipielle Funktionsweise der HS-SPME (Indelicato, 2014) .....	29

Abb. 9: Retentionszeiten der Alkanstandards im Zeitraum Juni 2011 – Oktober 2013. Retentionszeiten der verschiedenen Injektionssysteme LI: Flüssiginjektion, SPME: Injektion mittels Headspace-solid phase microextraction.....	39
Abb. 10: Retentionszeit der Alkanstandards im linearen Bereich. Alle Werte aus Tabelle 10 und Tabelle 11 ab einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen.....	39
Abb. 11: Theaspiran Stereoisomere. Durch die zwei Chiralitätszentren an C2 und C5 ergeben sich vier Isomere nach Schmidt (1992).....	41
Abb. 12: Hauptkomponenten Analyse (PCA) bzgl. des ontogenetischen Effekts auf das Metabolitmuster von Rebenblättern. Ellipsen geben den Bereich der Blattgruppen mit Konfidenzlevel $\alpha = 0,15$ an. I: alle biologischen Wiederholungen sind dargestellt; II: Nur Genotypen der anfälligen Resistenzklassen 1 und 3. (Teildarstellung des PCA Scatterplots); III: Nur Genotypen der resistenten Resistenzklassen 7 und 9. (Teildarstellung des PCA Scatterplots); E = anfällige Genotypen ( <i>Vitis vinifera</i> ); A = resistente Genotypen <i>V. labrusca</i> , <i>V. riparia</i> und Hybride; PC1 = Hauptkomponente 1; PC2 Hauptkomponente 2.....	43
Abb. 13: Linalool und Megastigmatrienon in den Blattpositionen von <i>V. vinifera</i> . I) Linalool, II) Megastigmatrienon. Die Amplitudenhöhen beider Metabolite in apikalen Blättern sind signifikant verschieden zur Amplitudenhöhe in medialen oder basalen Blättern.....	45
Abb. 14: Hexanal und Methylsalicylsäure in den Blattpositionen von <i>V. vinifera</i> und der Gruppe der Hybrid- und Wildreben ( <i>Vitis spp.</i> ). I) Hexanal, II) Methylsalicylsäure. Die Amplitudenhöhen beider Metabolite in apikalen Blättern sind signifikant verschieden zur Amplitudenhöhe in medialen oder basalen Blättern. Der Signifikanzunterschied in beiden Grafiken wird durch die Buchstaben a,b bzw. A,B angegeben. Wobei an dieser Stelle die Vergleiche innerhalb der Testgruppen <i>V. vinifera</i> und <i>Vitis spp.</i> vorgenommen wurden. Die Vergleiche zwischen den verschiedenen Resistenzklassen werden in den nachfolgenden Kapiteln besprochen.....	46
Abb. 15: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der „Gesamtproben“ in BBCH8 des ersten Versuchsjahres. Ellipsenberechnung mit Konfidenzlevel $\alpha=0,15$ ; PC1 = Hauptkomponente 1; PC2 Hauptkomponente 2. Oberer Pfeil zeigt auf <i>Vitis riparia</i> Akzession 76-50-1, unterer Pfeil zeigt auf Delaware. ....	49
Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse des ersten Versuchsjahres PC1) Hauptkomponente 1, PC2) Hauptkomponente 2. Für BBCH8 wurden die Datensätze der „Gesamtprobe“ verwendet. Die Datensätze der Proben BBCH6 und BBCH9 stammten aus Mischproben.....	51
Abb. 17: Hauptkomponentenanalyse des zweiten Versuchsjahres PC1) Hauptkomponente 1, PC2) Hauptkomponente 2 PC4) Hauptkomponente 4. Die Datensätze der Proben stammten aus Mischproben.....	52
Abb. 18: (E,Z)-2,4-Heptadienal und Theaspiran B in BBCH6 2011 nach Resistenzklassen. I) (E,Z)-2,4-Heptadienal II) Theaspiran B III) Theaspiran B getrennt nach Genotypen. In III) Anzeige ohne Whisker, da jede Box aus 3 Wiederholungen bestand. Whisker werden durch SAS erst ab vier Wiederholungen dargestellt. -) Median, $\diamond$ ) arithmetisches Mittel °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. rie) Riesling, mlt) Müller-Thurgau, reg) Regent, ris) Blaue Isabella, del) Delaware, con) Concord, vr1) <i>V. riparia</i> Akzession 76-50-1, vr2) <i>V. riparia</i> Akzession 76-49-22, vla) <i>V. labrusca</i> , vlals) <i>V. labrusca</i> Standort Langenscheider Hof.....	54

Abb. 19: positive Resistenzmarker BBCH6 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) die unbekannte Substanz u29,64 und II) Nonanol. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils. ....	55
Abb. 20: negative Resistenzmarker BBCH6 2011. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) (E)- $\beta$ -Ocimen. II) $\beta$ -Myrcen. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils. ....	56
Abb. 21: positive Resistenzmarker BBCH6 2012. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) die unbekannte Substanz u32,51 und II) Methylsalicylsäure. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils. ....	58
Abb. 22: negative Resistenzmarker BBCH6 2012. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) Megastigmatrienon III) (E)- $\beta$ -Ocimen. IV) $\beta$ -Myrcen. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils. ....	59
Abb. 23: „positive“ Resistenzmarker BBCH8 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) (E)- $\beta$ -Damascenon und II) Theaspiran A. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	66
Abb. 24: Amplitudenwerte von I) der unbekannt Substanz u33,95 und II) (E)- $\beta$ -Ionon. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert. ....	67
Abb. 25: „positive“ Resistenzmarker BBCH8 2012. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) (E)- $\beta$ -Damascenon und II) Methylsalicylsäure. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils. ....	69
Abb. 26: negative Resistenzmarker BBCH8 2012. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) u44,49 II) (E)- $\beta$ -Ocimen -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	69
Abb. 27: Amplitudenwerte von I) Alloocimen und II) der unbekannt Substanz u29,33. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert. ....	71
Abb. 28: „positive“ Resistenzmarker BBCH9 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) p-Cymenen und II) (Z)-3-Hexenol. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	77
Abb. 29: Amplitudenwerte von I) der unbekannt Substanz u43,43 und II) $\beta$ -Myrcen in BBCH9 2011. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert. ....	78
Abb. 30: Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Resistenzklassen 3 und 9. I) u44,74 und II) Megastigmatrienon -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	80
Abb. 31: Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen Resistenzklassen ohne Einstufung als Resistenzmarker in BBCH9 2012. I) Nerol und II) Hexanal. -) Median, $\phi$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	81

Abb. 32: „negative“ Resistenzmarker BBCH9 2012. Höhere Metabolitgehalte in der anfälligen Resistenzklassen 1. I) (E)- $\beta$ -Ocimen II) $\alpha$ -Calacoren III) u15,19 (-) Median, $\diamond$ ) arithmetisches Mittel, $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	82
Abb. 33: „positive“ Resistenzmarker BBCH9 2012. I) Methylsalicylsäure II) u43,43 (-) Median, $\diamond$ ) arithmetisches Mittel $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. ....	83
Abb. 34: Amplitudenwerte von I) der unbekanntem Substanz u40,61 und II) Linalool in BBCH9 2012. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert. Signifikante p-Wert Unterschiede werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet. ....	84
Abb. 35: Markeranzahl in den jeweiligen Resistenzklassen aufgegliedert nach Stoffklassen. Jeder Metabolit wird pro Resistenzklasse einmal gewertet. D.h. Methylsalicylsäure (MeSA) und Benzylbenzoat (BB) haben beide den Wert 1 in den entsprechenden Resistenzklassen, obwohl MeSA in jedem Entwicklungsstadium ein Resistenzmarker ist und BB nur 1x als Resistenzmarker identifiziert wurde. In der Legende ist die jeweilige Markeranzahl pro Stoffklasse in Klammern notiert. Daten ohne Berücksichtigung des Norisoprenoids Megastigmatrienon auf Grund seiner gesonderten Einordnung (siehe Ausführung im Text zu Norisoprenoiden). GLV: green leaf volatile .....	91
Abb. 36: (Z)-3-Hexenal als Beispiel wechselnder Korrelation. I) negative Korrelation in BBCH6 2011 II) positive Korrelation in BBCH9 2011. Verschiedene Buchstaben zeigen den signifikanten Unterschied zwischen den Resistenzklassen an. ....	93
Abb. 37: Markerhäufigkeit in den jeweiligen Resistenzklassen aufgegliedert nach Stoffklassen. Gemeint ist die Häufigkeit, mit der ein Metabolit in der entsprechenden Resistenzklasse in den sechs getesteten Entwicklungsstadien auftrat. Beispiel: Methylsalicylsäure ist in beiden Jahren in allen drei Entwicklungsstadien ein Resistenzmarker und erhält in den Resistenzklassen 7 und 9 den Wert 6; wohingegen Benzylbenzoat nur in BBCH8 2012 Resistenzmarker ist und den Wert 1 erhält. Daten ohne Berücksichtigung des Norisoprenoids Megastigmatrienon auf Grund seiner gesonderten Einordnung (siehe Ausführung im Text). ....	97
Abb. 38: Megastigmatrienon Amplitudenwerte in den Genotypen. I) In BBCH8 2012 und II) in BBCH9 2012. Signifikante Unterschiede liegen zwischen den Genotypen innerhalb der beiden Rechtecke (I u. II) bzw. der beiden Ovale (II) vor. mlt) Müller-Thurgau, rie) Riesling, del) Delaware, pho) Phoenix, reg) Regent, ris) Blau Isabella, vr2) Vitis riparia Akzession 76-49-22, vr1) Vitis riparia Akzession 76-50-1, con) Concord, vla) V. labrusca. ....	99
Abb. 39: Hauptkomponentenanalyse der Metabolitprofile von infizierten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Keine Unterschiede sichtbar zwischen Behandlung und Kontrolle, jedoch angedeutete Trennung nach konstitutiven Resistenzeigenschaften. res.) resistente Genotypen Blaue Isabella und V riparia, anf.) anfällige Genotypen V. vinifera cv Müller-Thurgau und Regent, Kontr.) Kontrollbehandlung mit Wasser, Beh.) Behandlung mit P. viticola Sporensuspension. ....	108
Abb. 40: Metabolite in V. riparia mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion. I) Geraniol, II) Sulcaton, III) Methylsalicylsäure IV) u39,41, *) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle). ....	110

Abb. 41: Metabolite in Blaue Isabella mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion. I) (R)-(+)-Citronellol, II) Megastigmatrienon, *) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle). .....	111
Abb. 42: p-Cymenen und die unbekannte Substanz u46,93 mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion in Regent. I) p-Cymenen, II) u46,93, *) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle). .....	113
Abb. 43: Geranylaceton und (Z)-3-Hexenylacetat mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion in Müller-Thurgau und Regent. I) Geranylaceton, II) (Z)-3-Hexenylacetat, *) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle). .....	114
Abb. 44: Redox-Reaktion zwischen p-Cymol zu p-Cymenen .....	128

## Anhangverzeichnis

A1: Liste der detektierten Substanzen. Angabe mit Substanzname, CAS Nummer, Retentionsindex (RI) (Kovats Index), Literaturnachweis, wenn darüber die vorläufige Identifizierung bestätigt wurde Identifikationsstatus. a) vollständig identifiziert durch Referenzsubstanz, b) vorläufige Identifizierung über NIST Datenbankabgleich, c) vorläufige Identifizierung durch NIST und Literaturabgleich, d) nicht identifiziert. ....	150
A2: Referenzsubstanzen mit Lösungsmittel, CAS-Nr., Retentionsindex (Kovats Index). C5: Pentan. isoC8: Isooctan .....	176
A3: MetAlign Einstellung zur Zusammenführung der GC-MS Datensätze. In der MetAlign Oberfläche sind die veränderbaren Feldfunktionen mit Zahlen gekennzeichnet. Diese Zahlen finden sich in der ersten Spalte der Tabelle wieder. Die Feldeinstellungen für Nr. 6-9 entsprechen den RIKILT Empfehlungen für Agilent GC-MS Instrumente. ....	178
A4: Partial least squares Prozedur in SAS. Am Beispiel des Entwicklungsstadiums BBCH6 2011. Entwicklung der Prozedur von Jörg Sellmann, JKI. Zugehöriges Makro siehe A5. ....	179
A5: PLS Makro von Jörg Sellmann, JKI. ....	184
A6: Beispiel für die SAS Befehle zur Erstellung von Boxplot Diagrammen und zum Simulate-Test. ....	211
A7: Unbekannte Substanzen. Retentionsindex und Massenspektrum zur eindeutigen Identifizierung. ....	212

## Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> – Varianzanalyse
BB	Benzylbenzoat
biolog. Wdh	biologische <u>Wiederholung</u>
BPM	<u>B</u> latt <u>p</u> ositions <u>m</u> arker
BPS	<u>B</u> oiling <u>p</u> oint calibration <u>s</u> ample
BS	<u>B</u> latt <u>s</u> cheibe
BSN	Benzothiazol
CCD	<i>carotenoid cleavage dioxygenase</i>
con	<u>C</u> oncord
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
del	<u>D</u> elaware
dpi	<i>days past inoculation</i> - Tage nach der Inokulierung
<i>E. necator</i>	<i>Erysiphe necator</i>
EI	<i>electron impact ionization</i> – Elektronenstoß-Ionisierung
EtOH	Ethanol
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i> – Effektor ausgelöste Anfälligkeit
GC	<u>G</u> as <u>c</u> hromatographie
GLV	<i>green leaf volatiles</i> – Flüchtige Inhaltsstoffe in grünen Blättern
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	<i>hypersensitive response</i> – Hypersensitive Reaktion
HS	<i>headspace</i> - Gasraum über der Flüssigkeit im Analysenvial
ISR	<i>induced systemic resistance</i> – induzierte systemische Resistenz
JKI	Bundesinstitut für Kulturpflanzen Julius Kühn-Institut
LI	<i>liquid injection</i> - Flüssiginjektion
MAMP	<i>microbial-associated molecular patterns</i>
MANOVA	<i>multivariate analysis of variance</i> – Multivariate Varianzanalyse
MeSA	<u>M</u> ethyl <u>s</u> alicylsäure
mlt	<u>M</u> üller- <u>T</u> hurgau
MS	<u>M</u> assens <u>s</u> pektrometrie
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
NI	<u>N</u> or <u>i</u> soprenoide

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<i>P. viticola</i>	<i>Plasmopara viticola</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCA	<i>principal component analysis</i> - Hauptkomponentenanalyse
PDMS	<u>P</u> oly <u>d</u> imethylsiloxan
pho	<u>Ph</u> oenix
PIWI	<u>P</u> ilz <u>w</u> iderstandsfähige Rebsorte
PLS	<i>Partial least squares regression analysis</i> – Regressionsanalyse der partiellen kleinsten Quadrate
PR-Protein	<i>pathogen-related protein</i> – Pathogenese Protein
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i> - Mustererkennungsrezeptoren
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> – PAMP ausgelöste Immunität
reg	<u>R</u> egent
RI	<u>R</u> etentionsindex
rie	<u>R</u> iesling
ris	Blaue Isabella
RM	<u>R</u> esistenzmarker
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – Reaktive Sauerstoff Spezies
SAR	<i>systemic acquired resistance</i> – systemisch erworbene Resistenz
SPME	<i>solid phase micro extraction</i> - Festphasenmikroextraktion
SR	<u>S</u> pearman <u>R</u> angkorrelation
STI	<i>sum of total ions</i> – Summe aller Ionen eines Peaks
techn. Wiederholung	<u>t</u> echnische <u>W</u> iederholung
TIC	<i>total ion chromatogram</i> – Gesamtionenchromatogramm
<i>V. labrusca</i>	<i>Vitis labrusca</i>
<i>V. riparia</i>	<i>Vitis riparia</i>
<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>
VIP	<i>variable importance for the projection</i> – Wichtigkeit der Variablen zur Projektion in PLS
VJ	<u>V</u> ersuchsjahr
vla	<i>Vitis labrusca</i>
vlals	<i>Vitis labrusca</i> Akzession Langenscheider Hof
VOC	<i>volatile organic compounds</i> – flüchtige organische Verbindungen
vr1	<i>V. riparia</i> Akzession 76-50-1
vr2	<i>V. riparia</i> Akzession 76-49-22
Δ	Differenz
ρ	Korrelationskoeffizient

## Zusammenfassung

Der Falsche Mehltau der Weinrebe ist eine der bedeutendsten Erkrankungen der europäischen Weinrebe *Vitis vinifera* LINNÉ *subsp. vinifera*. Er wird durch den obligat biotrophen Oomyceten *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888) hervorgerufen, welcher Ende des 19. Jahrhunderts ungewollt nach Europa eingeführt wurde. Amerikanische Weinreben sind weitestgehend resistent gegen den Falschen Mehltau und könnten auf die eine oder andere Art zum Schutz der anfälligen Reben auch gegen *P. viticola* beitragen.

Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit dem „*Metabolite profiling*“ von Resistenzmarkern (RM) aus dem Spektrum der flüchtigen Sekundärmetabolite von anfälligen und resistenten Reben. Es wurden in Freiland- und Gewächshausversuchen zehn Genotypen mit unterschiedlicher Resistenz gegen *P. viticola* analysiert. Darunter befanden sich drei verschiedene *Vitis* Arten (*V. vinifera*, *V. riparia*, *V. labrusca*) und einige Hybridreben. In einem zweijährigen Versuch wurden die konstitutiven Marker von jeweils drei Entwicklungsstadien (BBCH6, BBCH8 und BBCH9) ermittelt. Außerdem wurden induzierte Marker analysiert. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der Blattposition und dem Auftreten von RM untersucht. Hierbei wurden mit den verwendeten Metabolomics-Methoden auch Marker für die Blattposition identifiziert. Für das „*Metabolite profiling*“ wurden die Weinblätter mittels HS-SPME-GC-EI-MS analysiert und anschließend mit *non-targeted* und *targeted* Analysenmethoden ausgewertet.

Der Vergleich der Metabolitprofile zeigte, dass das Entwicklungsstadium den stärksten Einfluss auf das Metabolitprofil hat und der Einfluss der Blattposition so gering ist, dass er vernachlässigt werden kann.

Es konnten 41 konstitutive RM ermittelt werden. Die identifizierten Metabolite stammten aus den Stoffklassen der *green leaf volatiles* (GLV), Norisoprenoide, Benzoat-Derivate, Monoterpenoide, einem Furan und einem Sesquiterpen. Hierbei zeigte sich, dass GLV, Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und 2-Ethylfuran fast ausschließlich in den resistenten Genotypen in höherer Konzentration vorlagen als in den Anfälligen. Monoterpenoide und das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren lagen hauptsächlich in anfälligen Genotypen von *V. vinifera* in höherer Konzentration vor als in resistenten Genotypen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Monoterpenoide verstärkt im Entwicklungsstadium BBCH6 in signifikant höheren Konzentrationen in *V. vinifera* ermittelt wurden. Wohingegen das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren niemals im BBCH6, sondern erst in den späteren Entwicklungsstadien in signifikant erhöhter Konzentration in *V. vinifera* ermittelt wurde. GLVs traten als RM in den resistenten Genotypen wie *V. labrusca* auf und dann erst in späteren Entwicklungsstadien, hauptsächlich im Entwicklungsstadium BBCH9. Für die konstitutiven RM aus den Gruppen der Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und Furan wurde keine Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums beobachtet. Allerdings wurden drei wei-



tere Metabolite als RM ermittelt, die eine starke Korrelation zum Entwicklungsstadium aufwiesen. Sie traten zunächst in BBCH6 in signifikant höheren Konzentrationen in *V. vinifera* und in BBCH9 in signifikant höheren Konzentrationen in *V. labrusca* auf. Diese RM mit wechselnder Korrelation waren die beiden Monoterpenoide Geranylaceton und  $\alpha$ -Terpineol, sowie das GLV (Z)-3-Hexenal. Nach bestem Wissen und Gewissen ist der Zusammenhang zwischen Auftreten der konstitutiven RM und Entwicklungsstadium bisher noch nicht beschrieben worden. Es ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit, dass Monoterpenoide als RM in Reben hauptsächlich in BBCH6 auftreten und GLV sowie Sesquiterpene hauptsächlich in BBCH9 als RM ermittelt wurden; wohingegen Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und Furan zu allen getesteten Entwicklungsstadien als RM auftraten. Des Weiteren traten Monoterpenoide und das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren artspezifisch häufiger in *V. vinifera* als konstitutive RM auf, wohingegen das Furan 2-Ethylfuran niemals in *V. vinifera* als RM in Erscheinung trat. Benzoat-Derivate und GLVs wurden am häufigsten in *V. labrusca* stämmigen Genotypen als RM detektiert. Norisoprenoide traten am häufigsten, aber nicht ausschließlich in *V. riparia* als RM in Erscheinung. Nach besten Wissen und Gewissen ist der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Norisoprenoiden als RM und der Artspezifität zu *V. riparia* eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Dennoch soll hier kurz erwähnt werden, dass diese Artspezifität sich ausschließlich auf die Eingruppierung als konstitutive RM bezieht. Monoterpene sind auch Bestandteil des Metabolitprofils von *V. labrusca* und Norisoprenoide sind wichtige Geschmacksträger in Qualitätsweinen.

Es konnten 24 induzierte RM ermittelt werden. Dabei stellte sich entgegen der ursprünglichen Erwartung heraus, dass die meisten induzierten RM (19 von 24) in der pilzwiderstandsfähigen Züchtung Regent auftraten und nur sechs in der resistenten *V. labrusca*-stämmigen Hybride Blaue Isabella und in *V. riparia*.

Für alle ermittelten RM wurde nach Publikationen zur Bioaktivität recherchiert. Für die RM 2-Ethylfuran, einem Isomeren-Mix aus (Z)- und (E)-Ocimen sowie  $\beta$ -Cyclocitral wurde bereits eine inhibierende Wirkung auf *P. viticola* publiziert. Dagegen wurden 20 Verbindungen hier zum ersten Mal mit einer Resistenzantwort auf eine *P. viticola* Infektion in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich um die sieben Norisoprenoide Theaspiran, (E)- $\beta$ -Damascon, (E)- $\beta$ -Damascenon, Dihydroedulan I, Megastigmatrienon, Sulcaton und Carvomenthenal A, die 2 GLVs Nonanol und (Z)-3-Hexenylacetat, sowie die zehn Terpenoide p-Cymen, p-Cymol, D-Limonen, Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen,  $\beta$ -Citronellol, Hotrienol, (Z)-Rosenoxid, Geraniumoxid und  $\alpha$ -Calacoren.

## Summary

Downy mildew of grapevine is one of the most important diseases of the European grapevine *Vitis vinifera* LINNÉ *subsp. vinifera*. It is caused by the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni (1888), which was unintentionally introduced into Europe at the end of the 19th century. American grapevines are largely resistant to downy mildew and may contribute in one way or another to the protection of susceptible vines also against *P. viticola*.

Therefore, this work deals with the metabolite profiling of resistance markers (RM) from volatile secondary metabolites of susceptible and resistant grapevines. Ten genotypes with different resistance to *P. viticola* were analysed in field and greenhouse trials. Among them were three different *Vitis* species (*V. vinifera*, *V. riparia*, *V. labrusca*) and some hybrid vines. In a two-year trial, the constitutive markers of three developmental stages (BBCH6, BBCH8, BBCH9) were determined. In addition, induced markers were analysed in a third year. Furthermore, the relationship between leaf position and the occurrence of RM was investigated. The used metabolomic methods were also applied to identify markers for leaf position. For metabolite profiling the grape leaves were analysed using HS-SPME-GC-EI-MS and then were evaluated using non-targeted and targeted analytical methods.

The comparison of the metabolite profiles showed that the developmental stage has the strongest influence on the metabolite profile and the influence of the leaf position is so small that it can be neglected.

A total of 41 constitutive RMs were identified. The metabolites identified came from the substance classes of green leaf volatiles (GLV), norisoprenoids, benzoate derivatives, monoterpenoids, a furan and a sesquiterpene. It was elaborated, that GLV, norisoprenoids, benzoate derivatives and 2-ethylfuran were almost exclusively present in higher concentrations in resistant genotypes. Monoterpenoids and the sesquiterpene  $\alpha$ -calacorene were mainly detected in higher concentrations in the susceptible genotypes of *V. vinifera*. Furthermore, it could be shown, that monoterpenoids were detected in significantly increased concentrations at the developmental stage BBCH6 in the susceptible *V. vinifera*. In contrast, the sesquiterpene  $\alpha$ -calacorene was never detected in BBCH6. It was only found in significantly increased concentrations in the later developmental stages of *V. vinifera*. GLVs are RM in the resistant genotypes such as *V. labrusca* and occur here exclusively at the later developmental stages, mainly at BBCH9.

For the constitutive RMs from the classes of norisoprenoids, benzoate derivatives and furan, no dependence of the developmental stages and their occurrence was observed. However, three other metabolites were identified as RMs that showed a strong correlation with the developmental stage. They appeared initially in BBCH6 in significantly increased concentrations

in susceptible *V. vinifera*, but in BBCH9 they showed significantly increased concentrations in the resistant *V. labrusca* genotypes. These RMs with changing correlation were the two monoterpenoids geranyl acetone and  $\alpha$ -terpineol, as well as the GLV (*Z*)-3-hexenal. To the best of my knowledge, the correlation between occurrence of the constitutive RMs and the developmental stages has not been described before. It is a new finding of this work that monoterpenoids occur as RMs in grapevines mainly at BBCH6 and GLV as well as sesquiterpenes were found as RMs mainly at BBCH9. Norisoprenoids, benzoate derivatives and furan occurred as RMs at all developmental stages tested. Furthermore, monoterpenoids and the sesquiterpene  $\alpha$ -calacorene occurred species-specifically more frequently in *V. vinifera* as constitutive RMs, whereas the furan 2-ethylfuran never appeared as a RM in *V. vinifera*. Benzoate derivatives and GLVs were most frequently detected as RMs in *V. labrusca* genotypes. Norisoprenoids appeared most frequently, but not exclusively, as RMs in *V. riparia*. To the best of my knowledge, the correlation between the occurrence of norisoprenoids as RMs and species specificity to *V. riparia* is a new finding of this work. Nevertheless, it should be briefly mentioned, that this species specificity refers exclusively to the classification as a constitutive RM. Monoterpenes are also part of the metabolite profile of *V. labrusca* as well as norisoprenoids are important flavour compounds in quality wines.

24 induced RMs were determined. Contrary to the original expectation, most of the induced RMs (19 out of 24) occurred in the fungus-resistant cultivar Regent and only six induced RMs in the resistant *V. labrusca* hybrid Blue Isabella and in *V. riparia*.

For all RMs identified, it was searched for reports on bioactivity in publications. For the RMs 2-ethylfuran, an isomer mix of (*Z*)- and (*E*)-ocimene as well as  $\beta$ -cyclocitral, an inhibitory effect on *P. viticola* has already been published. Still, 20 compounds have been associated here for the first time with a resistance response to *P. viticola* infection. These are the seven norisoprenoids theaspirane, (*E*)- $\beta$ -damascone, (*E*)- $\beta$ -damascenone, dihydroedulan I, megastigmatrienone, sulcatone, and carvomenthenal A, the two GLVs nonanol and (*Z*)-3-hexenyl acetate, and the ten terpenoids p-cymenene, p-cymene, D-limonene, alloocimene,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -citronellol, hotrienol, (*Z*)-rose oxide, geranium oxide and  $\alpha$ -calacorene.



## 1 Einleitung

*Plasmopara viticola* [(Berk. & Curt.) Berl. & de Toni] ist der Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe. Er ist einer der wirtschaftlich bedeutendsten Pathogene im Weinbau. Er wurde im späten 19. Jahrhundert mit Rebstöcken aus Amerika nach Europa eingeschleppt. Zunächst gelangte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts der Erreger des Echten Mehltaus *Erysiphe necator* von Amerika nach Europa. Die europäische Weinrebe *Vitis vinifera* LINNÉ war bzw. ist stark anfällig auf *E. necator*. Dadurch traten in den darauffolgenden Jahren Ernteausfällen von bis zu 80 % auf. Daraufhin wurden in den 1860er Jahren resistente Rebstöcke aus Amerika importiert, die unglücklicherweise Weise auch die Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae* FITCH) nach Europa brachte. Die Ausbreitung der Reblaus verursachte weitere enorme Ernteausfälle und führte durch den Wurzelbefall zum Absterben ganzer Weinberge. Um die Reblauspopulation einzudämmen, wurden erneut amerikanische Wildreben importiert, die eine Resistenz gegen die Reblaus vorwiesen und als Unterlagen für die europäischen anfälligen Reben verwendet wurden (Schwander, 2011). Der Import der amerikanischen Unterlagen geschah, obwohl in Fachkreisen bereits diskutiert wurde, dass hierdurch mit hoher Wahrscheinlichkeit *P. viticola* in Europa eingeführt werden würden. So kam es, dass 1878 / 1879 *P. viticola* in Frankreich und 1880 in Deutschland nachgewiesen wurde. Nur ein weiteres Jahr später wurde er in fast ganz Europa detektiert (Gessler, 2011; Kiefer, 2002). Da die europäische Rebe *V. vinifera* sehr empfänglich für eine *P. viticola* Infektion ist, wird im Weinbau eine hohe Menge an Pflanzenschutzmitteln benötigt, um den Ertrag zu sichern. Insbesondere dem ökologischen Weinbau stehen derzeit nur sehr wenige zugelassene, fungizid wirksame Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus zur Verfügung. Es wird hauptsächlich auf Kupferpräparate zum Pflanzenschutz zurückgegriffen. Kupfer steht jedoch seit Jahren in der Diskussion einer Zulassungsverlängerung bzw. eines Zulassungsverbotes in der EU, da es sich um ein ökotoxisches Schwermetall handelt, das sich im Boden anreichern kann. Derzeit laufen u.a. Langzeitstudien zur Bioverfügbarkeit des angereicherten Kupfers im Boden und dessen Auswirkung auf Bodenorganismen z.B. am Julius Kühn-Institut (JKI) in der Arbeitsgruppe von Dr. Nadine Herwig.

Amerikanische Wildarten wie *V. labrusca* oder *V. riparia* konnten durch ihre Koevolution mit dem Pathogen Resistenzeigenschaften gegenüber dem Befall durch *P. viticola* entwickeln. Durch Einkreuzen (Introgression) von resistenten Wildarten in das Zuchtprogramm und mehrfache (pseudo-)Rückkreuzungen können die Widerstandsfähigkeit gegen die Mehltaupilze und die gewohnt guten Qualitätseigenschaften von *V. vinifera* kombiniert werden. Mögliche Wirkungsweisen von Resistenzen und Resistenzgenen in der Rebe sind vielseitig und häufig noch nicht oder unvollständig verstanden. Diese können u.a. auf basale Resistenz (Zellwand, Topographie der Spaltöffnungen), pathogen spezifische Abwehrmechanismen oder aber auch

auf vorliegenden Primär- und Sekundärmetaboliten beruhen oder positiv beeinflusst werden. Pilzwiderstandsfähige Züchtungen (PIWI Züchtungen) wie z.B. Regent, Calardis Blanc oder Solaris, benötigen wesentlich weniger Pflanzenschutzmittel als ihre anfälligen Artgenossen wie z.B. Müller-Thurgau, Riesling oder Pinot Noir (Spätburgunder).

Diese Arbeit zielt darauf ab, das Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen auf Metabolomics-Ebene zu vertiefen. Hierbei sind primär diejenigen Sekundärmetabolite interessant, die in den resistenten Arten in höherer Konzentration konstitutiv oder Erreger-induziert detektiert werden konnten. Sollten die Resistenzmarker (RM) eigene Bioaktivität gegenüber *P. viticola* besitzen, kann ein Einsatz im Pflanzenschutzbereich evaluiert werden. Zusätzlich werden auch RM, die in anfälligen Genotypen in erhöhter Konzentration vorliegen, betrachtet. Gemeinsam mit den RM, die in erhöhter Konzentration vorliegen, bieten sie einen tiefergehenden Einblick in die Zusammenhänge der sehr komplexen Abwehrantworten und helfen so die Zusammenhänge der Reben-Immunität bzw. Immunantwort weiter aufzuklären. Die Metabolomics-Ebene bildet also eine Brücke zwischen den rein genetischen Untersuchungen, die Aussagen über die Anwesenheit bzw. die Aktivität bestimmter Resistenzgene treffen, und den Beobachtungen phänotypischer Merkmale (Billet, 2020).

### 1.1 Falscher Mehltau der Weinrebe

#### 1.1.1 Infektionszyklus von *Plasmopara viticola*

*Plasmopara viticola* [(Berk. & Curt.) Berl. & de Toni] ist der Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe. Er ist ein obligat biotroph lebender Oomyzet. Der Infektionszyklus beginnt im Frühjahr, wenn die Durchschnittstemperaturen über 8°C liegen und wenigstens 10 mm Regen in 24 - 48 Stunden fällt (Gessler, 2011; Schröder, 2010). Die winterharten Oosporen gelangen z.B. durch Spritzwasser an die Blattunterseite.

Wobei die Oosporen sowohl im Boden als auch im Holz des zurückgeschnittenen Rebstockes oder den Knospen überwintern können (Fröbel, 2019). Aus den Oosporen bildet sich ein Keimschlauch, der sich zu einem Primärsporangium ausbildet. Dort entstehen Zoosporangien, die heranreifen und mehr als 60 begeißelte Zoosporen freisetzen können (Abb. 2; I d + e). Die Zoosporen schwimmen innerhalb des Oberflächenwasserfilms zu den Stomata. Dort enzystieren die Zoosporen und stoßen die Geißeln ab. Zu diesem Zeitpunkt bilden sie einen Keimschlauch aus, welcher durch die Spaltöffnung in den Interzellularraum der Blätter eindringt

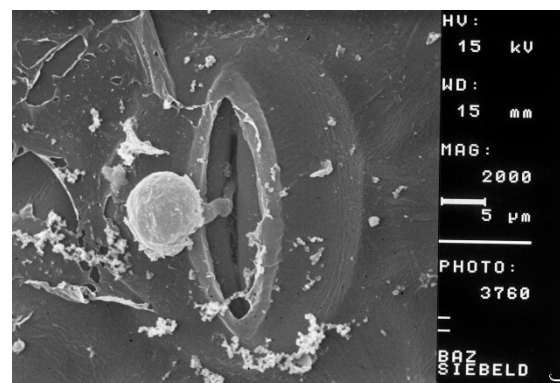


Abb. 1: Zoospore mit Infektionsschlauch, der in ein Stoma wächst. Quelle: JKI Archiv, RZ, Siebeldingen

(Abb. 2; II b + c) und bei starkem Befall verhindert, dass sich die Schließzellen schließen können. Je länger die Infektion her ist, umso stärker ist die Stomataöffnung geweitet. Ist die dahinterliegende Atmungshöhle stark mit *P. viticola* bewachsen, ist die Stomataöffnung sogar größer als bei normaler Öffnung (Allègre, 2007).

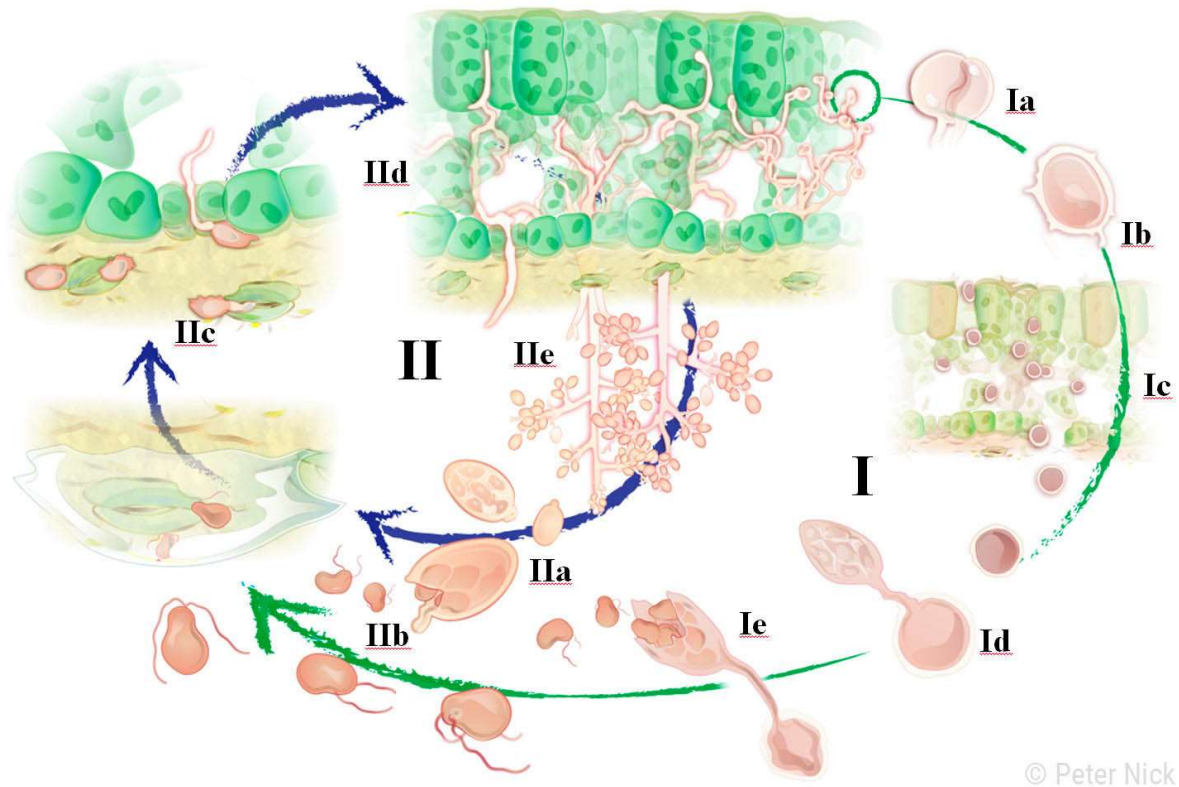


Abb. 2: Lebenszyklus von *P. viticola*. I) Sexueller Zyklus (Winter): Ia) Befruchtung Ib) Oospore Ic) Freisetzung nach Blattzerfall im Herbst Id) Keimung der Oosporen Ie) Schlüpfen der Zoosporen. II) Asexueller Zyklus (Sommer): IIa) Sporangium differenziert und undifferenziert IIb) Schlüpfende Zoosporen und Kontakt zu wasserbenetzten Stomata IIc) Zoosporen mit Keimschlauch IId) Myzel im Blattinneren IIe) Sporangiophoren wachsen aus den Stomata. Bildquelle: <https://www.vitifutur.net/modelle.htm> (30.01.2022)

In der Atmungshöhle verdickt sich der Keimschlauch und es bilden sich Infektionsvesikel, aus denen Infektionsschläuche (Primärhyphen) wachsen. Die Primärhyphen bilden bei Kontakt zu den Rebenzellen Haustorien aus (Fröbel, 2019; Rienth, 2019; Seibicke, 2002). Im Mesophyll breitet sich interzellulär das diploide, nicht-segmentierte Myzel aus (Abb. 2; II d). Bei hoher Luftfeuchtigkeit wachsen in Abhängigkeit von der Temperatur nach 4 - 18 Tagen Hyphen im substomatichen Bereich und es treten Sporangiophoren aus den geöffneten Stomata aus (Abb. 2; II e und Abb. 1), welche Sporangiophoren und Zoosporangien entwickeln, bevor für die Sekundärinfektion neue Zoosporen freigesetzt werden (Abb. 2; II a + b). Der asexuelle Infektionszyklus wird über die Vegetationsphase vielfach wiederholt. Im Herbst wird der sexuelle Teil des Infektionszyklus initiiert. Oogonien und Antheridien entstehen und es kommt innerhalb des Mesophylls durch heterothallische Vermehrung zur Ausbildung der winterharten, dickwandigen Oosporen (Abb. 2; I a - c) (Wong, 2001).

### 1.1.2 Symptome und Pflanzenschutz im ökologischen Weinbau

Als erste makroskopische Anzeichen eines Befalls von Falschem Mehltau sind an der Blattoberseite gelbe Verfärbungen sogenannte „Ölflecken“ sichtbar (Abb. 3 A). Diese Flecken sind auf einen Nährstoffmangel und eine dadurch bedingte Verringerung des Chlorophyllgehalts im infizierten Blattbereich zurückzuführen. Bald darauf treten bei hoher Luftfeuchtigkeit nachts an der Unterseite der Ölflecken die Sporangioophoren aus den Stomata und ein weißer Pilzrasen wird mit bloßem Auge sichtbar (Abb. 3 B). Die Ölflecken trocknen in den folgenden Tagen zum Zentrum hin aus, wobei ein gelblicher Rand bestehen bleibt, aus dem immer neue Sporangioophoren wachsen können. Bei jungen Blättern können die Ölflecken ineinander übergehen. Bei älteren Blättern können sich die Ölflecken nicht jenseits der Blattadern ausweiten. Es entstehen sogenannte „Mosaikflecken“ (Mohr, 2012).

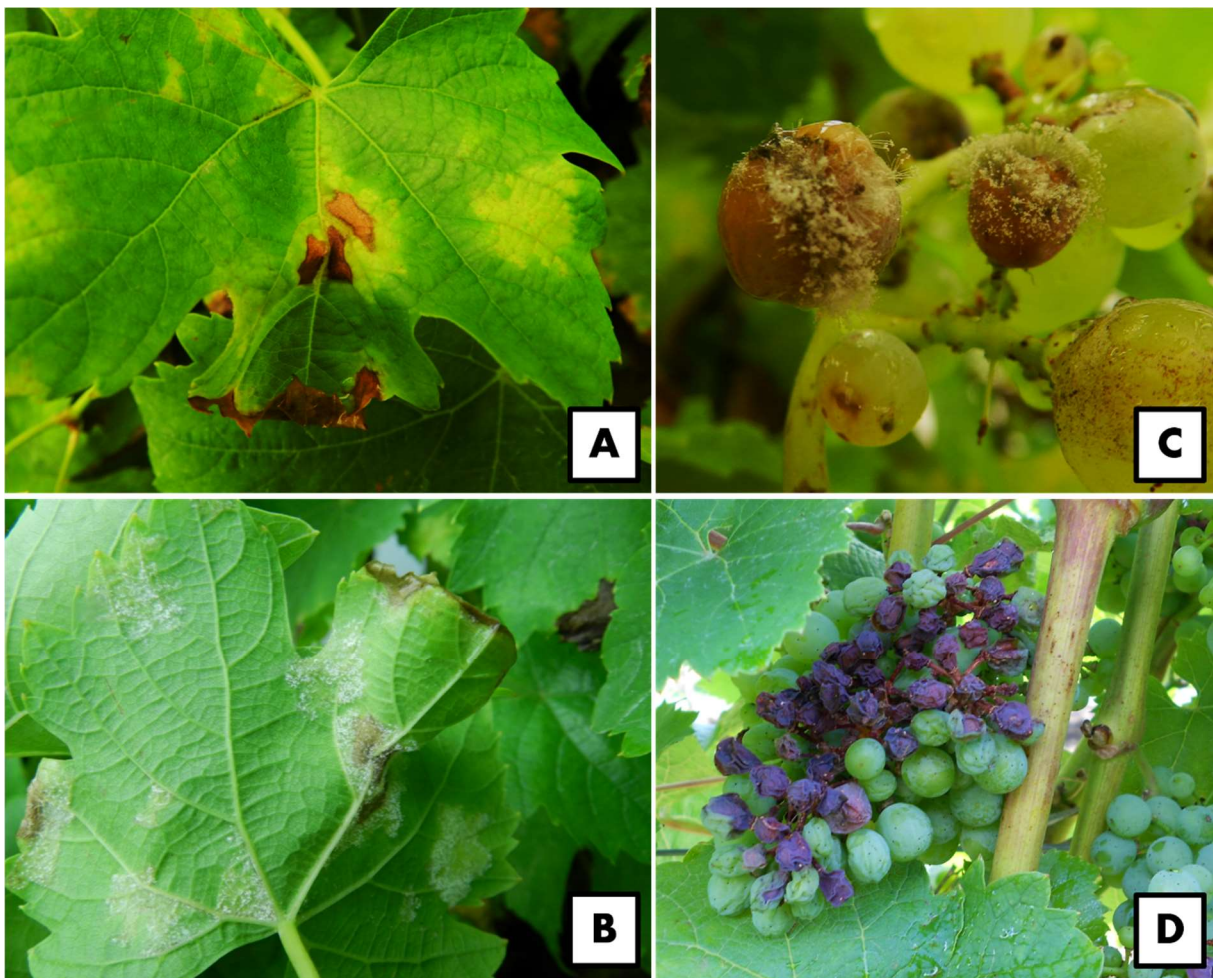


Abb. 3: Symptome des Falschen Mehltaus. A) Ölflecken auf der Blattoberfläche und beginnende Nekrosebildung. B) weißer Pilzrasen (Sporangiophoren) an der Unterseite der Ölflecken. C) Sporangioophoren an kleinen befallenen Beeren. D) Lederbeeren innerhalb einer Traube.

Das Pathogen entzieht den Zellen kontinuierlich Nährstoffe, so dass die Blätter austrocknen und im Endstadium vollständig abfallen. Kommt es zu einer Infektion der Gescheine oder jungen Beeren, so können sich die Beeren nicht vollständig entwickeln. Zunächst ist ein Pilzrasen auf den kleinen Beeren (5 – 6 mm Durchmesser, Erbsengröße in BBCH75) sichtbar (Abb. 3



C). Findet ein Befall der Beeren zu einem späteren Entwicklungsstadium statt, dann werden keine weißen Sporangiothoren auf den Beeren sichtbar, da sich die Stomata bereits zu Lentizellen entwickelt haben. Im Verlauf der Infektion trocknen die Beeren ein und bilden sogenannte „Lederbeeren“ (Abb. 3 D), die neben den Ölflecken ein charakteristisches Merkmal für den Befall mit Falschem Mehltau darstellen (Gessler, 2011; Mohr, 2012; Seibicke, 2002).

### **1.1.3 Herausforderungen im Ökologischen Weinbau – Pflanzenschutz und Resistenzzüchtung**

Wie bereits erwähnt besitzen viele amerikanische Reben wie *V. labrusca* und *V. riparia* durch ihre Koevolution mit dem Pathogen eine hohe Resistenz gegen *P. viticola*. Die Kultursorten der europäischen Rebe *V. vinifera* besitzen jedoch keinen ausreichenden Schutz. Zur Herstellung von Qualitätsweinen sind die Beeren vieler resistenter Arten jedoch ungeeignet. Dies betrifft besonders *V. amurensis* und ihre Abkömmlinge die einen starken Eigengeschmack, den sogenannten „Fox-Tone“ aufweisen. Dadurch wurden über hundert Jahre an Rebenzüchtung notwendig um die modernen PIWI Sorten zu entwickeln (Töpfer, 2011). Der Ökologische Weinbau steht vor der besonderen Herausforderungen, nicht auf synthetische Pflanzenschutzmittel zurückgreifen zu können und gleichzeitig fehlt auf der breiten Basis noch die Akzeptanz der PIWI-Sorten. Dies liegt zum einen an der fehlenden Sortenbekanntheit und des dadurch erhöhten Vermarktungsaufwandes, als auch am noch fehlenden Wissen zur sortenspezifischen Bewirtschaftung und der Oenologie. Aber auch beim Anbau von PIWIs wird ein Basisaufwand an Pflanzenschutz benötigt und empfohlen, um den Erhalt der Resistenzeigenschaften langfristig zu sichern, das Entstehen von Resistenzbrechenden Isolat zu verhindern und vor weiteren pilzlichen Pathogenen (z.B. Schwarzfäule, Roter Brenner) zu schützen. Daher ist neben umfassenden Züchtungsprogrammen auch die Suche nach natürlichen Schutzmechanismen in Reben gegen Pathogene notwendig. Hierfür ist die fortschreitende Aufklärung der möglichen Resistenzantworten verschiedener Reben auf eine *P. viticola* Infektion wichtig.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten drei Zeitpunkte auf, zu denen die weitere Infektion inhibiert wird

- a) Inhibierung des Pathogens kurz nach dem ersten Kontakt der Zoosporen
- b) nach erfolgreicher Kolonisierung des Mesophylls und
- c) untypische (abbarrente) Entwicklung, da das Pathogen nicht in die Schließzellen einwächst.

*V. vinifera* zeigt seine Resistenzantwort nach Modus b) wobei bei vielen amerikanischen Wildtypen bereits nach dem ersten Kontakt der Zoosporen (Modus a) die Resistenzantwort gestartet wird. Einige asiatische Arten zeigten in den mikroskopischen Untersuchungen, dass die Schließzellen nicht überwunden wurde (Modus c). (Jürges, 2009, Gessler 2011). Der unzureichende Schutz der europäischen Reben gegen *P. viticola* beruht also in vielen Fällen zu

einem großen Teil auf einer im Vergleich zu den amerikanischen, resistenten Arten wesentlich später beginnenden Immunantwort. Daher wird seit langem versucht, durch geschicktes Einkreuzen die Resistenzeigenschaft zu erhöhen und gleichzeitig die gewünschten Geschmackseigenschaften der *V. vinifera* Reben zu erhalten. In Deutschland ist die Sorte „Regent“ die bislang bekannteste Sorte einer pilzwiderstandsfähigen Züchtung. Regent wurde 1967 in Siebeldingen am Geilweilerhof (heute Julius Kühn-Institut) gezüchtet, in dem die *V. vinifera* Sorte „Diana“ mit dem zu den französischen Hybriden zählenden „Chambourcin“ gekreuzt wurde. Die Sortenzulassung von Regent erfolgte 1994. Für Regent sind zwei Resistenzloci gegen *E. necator* (*Ren3* und *Ren9* auf Chromosom 15) und einer gegen *P. viticola* (*Rpv3.1* auf Chromosom 18) beschrieben. Dennoch mehren sich die Berichte, dass diese erhöhte Pilzwiderstandsfähigkeit durchbrochen wird (Bellin, 2009; Di Gaspero, 2012; Gessler, 2011; Röckel, 2021; Welter, 2007; Zender, 2017).

Die im ökologischen Weinbau zuverlässigste und am häufigsten verwendete Pflanzenschutzmaßnahme gegen *P. viticola* ist die Anwendung von Kupferbasierten Präparaten. Bereits 1885 wurde eine Kupferbasierte Mischung zum Schutz der Reben eingesetzt. Die sogenannte Bordeaux-Brühe wurden von Professor Alexis Millardet entwickelt und basierte auf einer Formulierung aus  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  und  $\text{CuSO}_4$ . Die Bordeaux-Brühe wirkt als verlässliches Kontaktgift direkt auf die Zoosporen von *P. viticola*, wobei generell die  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen als Enzymgifte wirken und dadurch die Keimung der Sporen verhindern (Schröder, 2010). Im ökologischen Weinbau wird auch heute noch hauptsächlich auf die Wirkung von  $\text{Cu}^{2+}$  zurückgegriffen. Wie bereits erwähnt, stehen Kupferpräparate schon seit längerem in der Diskussion wegen hoher Kupfer-Anreicherung im Boden und seiner Wirkung auf Bodenorganismen. Daher wird nach Alternativen gesucht, um den Gebrauch von Kupferpräparaten möglichst klein zu halten. Ein bisher verfolgter Ansatz ist die Anwendung von Pflanzenölen aus Oregano (Rienth, 2019) oder Nelken und Teebaum-Öl (La Torre, 2014) oder Extrakte aus Anthrachinon-reichen Pflanzen bzw. Pflanzenteilen zu verwenden, wie z.B. Wurzelextrakte des Handlappigen Rhabarbers (*Rheum palmatum*) oder Extrakte aus der Rinde des Gemeinen Faulbaums (*Frangula alnus*) (Godard, 2009). Ein Problem bei der Verwendung von Pflanzenölen und -extrakten ist jedoch die schlechte Aufnahme in bzw. Haftung an den Blättern. Eine schlechte Haftung bedeutet, dass die Präparate bei Regen leicht abgewaschen werden. Die Wirkkomponenten in den Pflanzenölen sind häufig flüchtige organische Verbindung (*volatile organic compounds* VOC). Jedoch sind auch direkte Anwendungen von VOCs schwer einsetzbar. Es benötigt eine sehr gute Formulierung, damit die flüchtigen Verbindungen auch wirklich in definierter Konzentration auf die Pflanzen appliziert werden können. Daher sind die Formulierungen der VOCs von hoher Bedeutung für eine leichtere und effizient wirkende Anwendung im Pflanzenschutz. Als Beispiel sei hier die Arbeit zur Formulierung von D-Limonen genannt. Eine mit D-Limonen beladene Nanoemulsion kann das Wachstum verschiedener pilzlicher Pathogene wie *Pyricularia oryzae*,

6

*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* oder *Phomopsis amygdale* inhibieren (Feng, 2020).

## 1.2 Abwehrreaktionen von Pflanzen

Auch wenn *V. vinifera* sich nur ungenügend gegen eine Infektion von *P. viticola* schützen kann, besitzt sie wie alle Pflanzen ein hochentwickeltes Immunsystem. Dabei besteht in jeder Pflanze ein Gleichgewicht aus konstitutioneller und induzierter Immunität. Hierbei spielt der Kosten-Nutzen-Faktor für die Pflanze eine wichtige Rolle. Die Energie, die zur Synthese von Abwehrmolekülen aufgewendet werden muss, steht der Pflanze nicht mehr zum Wachstum zur Verfügung. Dennoch besitzen Pflanzen konstitutionelle Resistenz, um sich mit allgemeinen Methoden gegen Schädlinge zu schützen. Beispielsweise sind Dornen ein Schutz gegen Herbivoren. Wachse, Trichome oder verdickte Schließzellen können eine Hürde für den Pathogenbefall darstellen. Wurde die Pflanze dennoch infiziert, startet die Immunantwort (Pieterse, 2009).

Bei einem Pathogenbefall werden zunächst häufig auftretende unspezifische Muster (*molecular expression patterns*) von der Pflanze erkannt. Dies können z.B. Molekülcluster der Pathogene, Mikroben oder Molekülcluster die durch Verletzung entstanden sind, sein (*PAMPs pathogen-associated molecular patterns*, *MAMPs microbial- bzw. DAMPs damage-associated molecular patterns*).

PAMPs sind z.B. Flagellin, Chitin, Glycoproteine oder Lipopolysaccharide. Diese PAMPs aktivieren spezielle Rezeptoren (*pattern-recognition receptors PRRs*), welche wiederum untergeordnete Signalwege in Gang setzen. Das zusammengesetzte Gefüge aus Resistenzantworten auf PAMPs mündet in eine basale Resistenz, die *PAMP-triggered immunity* (PTI).

Im Laufe der Evolution konnten verschiedene Pathogene die unspezifische PTI überwinden, indem sich Effektormoleküle entwickelten, die in den Wirtszellen die PTI unterdrückten. Diese hervorgerufene Anfälligkeit der Pflanze ist die *effector-triggered susceptibility* (ETS). In Pflanzen entwickelten sich daraufhin Resistenzproteine, die bestimmte Effektormoleküle erkennen und eine sekundäre Immunreaktion, die sogenannte *effektor-triggered immunity* (ETI) hervorrufen.

PTI und ETI rufen verschieden Immunantworten hervor.

PTI setzt eine Kaskade von Signalereignissen frei, wie Veränderung von Ionenflüssen, Beginn der Protein-Phosphorylation-Kaskade, Akkumulation von ROS (reaktiven Sauerstoff Spezies), Exprimierung von Resistenzgenen, Zellwandverstärkung durch Callose oder Lignin Einlagerung, die Synthese von Phytoalexinen (antimikrobisch wirkenden Sekundärmetabolite) oder die Akkumulation von *pathogenesis-related* (PR) Proteinen wie Chitinasen oder Glucynasen, die die pilzliche oder oomycetische Zellwand abbauen können. ETI führt zu starken lokalen Resistenzantworten und ruft verstärkt die Produktion von ROS hervor, welche letztendlich zu

einem programmierten Zelltod als Teil der Hypersensitiven Antwort (HR: *hypersensitive response*) führen, um die weitere Invasion besonders biotropher Pathogene zu verhindern (Pieterse, 2009; Rienth, 2019). Sowohl PTI als auch ETI aktivieren u.a. auch die Salicylsäure Biosynthese. Salicylsäure Signalwege treten in Bezug auf Resistenzen gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene auf und sind daher in dieser Arbeit über Resistenz gegenüber dem obligatorisch biotrophen Pathogen *P. viticola* wichtig. Signalwege unter Beteiligung von Jasmonsäure oder Ethylen werden bei einer Resistenzstrategie gegen nekrotrophe Pathogene oder Herbivoren angeregt (Pieterse, 2009; Rienth, 2019; Schulze, 2006).

Sobald eine pflanzliche Abwehrreaktion aktiviert wurde, wird auch in weiter entfernten Pflanzenteilen eine Immunantwort angeregt. Diese systemisch erworbene Immunantwort (*systemic acquired resistance* SAR) hält vergleichsweise lange an und dient zur Abwehr eines weiten Spektrums an Pathogenen. SAR kann durch PTI und ETI getriggert werden und wird mit erhöhten Salicylsäurewerten in Verbindung gebracht. Nützliche Bodenmikroorganismen wie Mycorrhiza oder Rhizobakterien können ebenfalls eine Immunantwort induzieren (*induced systemic resistance* ISR), Diese Immunantwort steht im Zusammenhang mit erhöhten Konzentrationen von Jasmonsäure und Ethylen (Pieterse, 2009). SAR kann u.a. durch flüchtige Metabolite in weiter entfernten Pflanzenteilen hervorgerufen werden, z.B. durch Methylsalicylsäure (MeSA) oder Methyljasmonsäure. Ebenso kann durch flüchtige Metabolite auch in benachbarten Pflanzen eine Resistenz induziert werden (Lazazzara, 2021; Schulze, 2006)

Im Zuge der Resistenzantwort produzieren Pflanzen Metabolite, die indirekt einen Einfluss auf die Infektion haben oder direkte Abwehrstoffe gegen die Schädlinge sind. Solche Moleküle, die in Verbindung mit Pflanzenresistenz auftreten, werden Resistenzmarker (RM) genannt. Auch hierbei spielen die flüchtigen Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle. Zunächst wurde die direkte Bioaktivität flüchtiger Inhaltsstoffe, insbesondere von Terpenen (C<sub>10</sub> Kohlenhydratgerüsten) und C<sub>6</sub>- bzw. C<sub>9</sub>-Kohlenhydratgerüsten (*green leaf volatiles* GLV) nur in Richtung der Abwehr von Fressfeinden (Herbivoren) betrachtet. Flüchtige Metabolite treten jedoch auch in erhöhter Konzentration nach verschiedenen Stressfaktoren (UV-B, Trockenstress, Infektion oder Verletzungen) auf und fungieren häufig als indirekte Resistenzvermittler, indem sie z.B. Fressfeinde (Prädatoren) der an ihnen fressenden Insekten anlocken. Sie können jedoch auch direkte Wirkung auf Pathogene haben (Algarra Alarcon, 2015; Lazazzara, 2021; Rienth, 2019; Scala, 2013; Schwab, 2015). Flüchtige Metabolite (VOCs) können also indirekt durch Aktivierung von PTI bzw. ETI oder auch durch direkte Inhibition der Pathogene die Pflanzen schützen. Daher ist zu untersuchen, in welcher Weise sie als Alternative oder Ergänzung zu herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln dienen können.

### 1.3 Hintergründe zu den statistischen Verfahren

#### 1.3.1 Spearman Rangkorrelation (SR)

Der Spearman Rangkorrelationstest vergleicht die Beziehung zwischen zwei Variablen. Dabei gibt der Korrelationskoeffizient  $\rho$  an, ob die Beziehung negativ oder positiv ist und wie stark die Korrelation ist. Der Korrelationskoeffizient liegt stets im Bereich  $-1 < \rho < +1$ . Je größer der Betrag, umso stärker ist die Beziehung. Für eine starke Korrelation wird häufig ein Grenzwert bei  $\rho = |0,7|$  gesetzt. Ein Korrelationskoeffizient  $\rho = 0$  gibt an, dass keine Korrelation zwischen den Variablen besteht. Der Spearman Rangkorrelationstest kann für eine wesentlich breitere Datenmenge verwendet werden als der bekanntere Pearson Korrelationstest. Wobei die Spearman Rangkorrelation die robustere Variante von beiden ist. Zudem müssen für den Pearson Test beide Variablen kontinuierlich verlaufen, wohingegen der Spearman Rangtest sowohl mit ordinal, interval oder kontinuierlich verteilten Variablen funktioniert, da hier in der Berechnung Ränge gebildet werden. Als weitere Bedingung gilt, dass die Daten monoton verteilt sein müssen, d.h. beide Variablen müssen gleichzeitig fallen und / oder steigen (Weaver, 2017). Für den Spearman Rangkorrelationstest ist eine Normalverteilung der Daten nicht notwendig, im Gegensatz zum Pearson Korrelationstest (<https://www.scribbr.de/statistik/rangkorrelationskoeffizient/> (28.10.2020)).

Die Spearman Rangkorrelation verteilt die Variablen einzig nach ihrer Reihenfolge, konvertiert die Reihenfolge in Ränge und vergleicht die Ränge der beiden Varianten miteinander. Daraus ergibt sich dann der Korrelationskoeffizient in Formel 1, wie er im hier verwendeten SAS Statistikprogramm verwendet wird:

Formel 1: Spearman Korrelationskoeffizient

$$\rho = \frac{\sum_i ((R_i - \bar{R})(S_i - \bar{S}))}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \sum_i (S_i - \bar{S})^2}}$$

$\rho$ : Spearman Rangkoeffizient

$R_i$  Rang der Variable  $x_i$

$S_i$  Rang der Variable  $y_i$

$\bar{R}$  Mittelwert aller  $R_i$

$\bar{S}$ : Mittelwert aller  $S_i$

([https://documentation.sas.com/?cdclid=pgmsascdc&cdcVersion=9.4\\_3.5&docsetId=proctat&docsetTarget=procstat\\_corr\\_details03.htm&locale=en](https://documentation.sas.com/?cdclid=pgmsascdc&cdcVersion=9.4_3.5&docsetId=proctat&docsetTarget=procstat_corr_details03.htm&locale=en) (14.12.2020))

### **1.3.2 Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS)**

Die Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS - *partial least squares regression analysis*) wurde in den 1960er Jahren von Herman Wold entwickelt und fand schnell Verwendung in den Bereichen des Chemieingenieurwesens bzw. der Chemometrie (Tobias, 2003). PLS wird benutzt, um eine Gruppenzugehörigkeit mit Hilfe einer linearen Regression darzustellen. Ziel der Methode ist es Modelle zu entwickeln, bei denen korrelierte Variablen in einen Satz unkorrelierter Variablen umgeformt werden. Die Methode ist besonders geeignet, wenn es mehr Variablen als Observablen gibt und wenn die Variablen zusätzlich voneinander abhängig sind, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist (Carrascal, 2009; Pirouz, 2006; Tobias, 2003). Ähnlich wie bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA - *principal component analysis*) werden aus einer Vielzahl von Variablen diejenigen herausgefiltert, die einen Großteil der fundamentalen Beziehungen beschreibt. Dabei wird die ursprüngliche Multidimensionalität in einem iterativen Verfahren auf eine kleinere Anzahl von orthogonalen Faktoren verkleinert. In den Modellierungen werden bei PLS die Kovarianzen zur Berechnung verwendet. Dabei werden die optimalen kleinsten Quadrate an die Kovarianzmatrix angepasst. PLS projiziert die Faktoren der Prädiktor-Variablen und die Beobachtungen in einen neuen Raum und findet so eine Lineare Regression. Dadurch, dass nicht die Prädiktor-Variablen, sondern die Faktoren verwendet werden, entfallen auch Interkorrelationsbedingungen der Variablen (Judas, 2008).

Da die Verteilung der partiellen kleinsten Quadrate unbekannt ist, gibt es keinen konventionellen Signifikanztest als Folge der PLS. In der Literatur finden sich daher unterschiedliche Grenzwerte. In SAS wird für jede Prädiktor-Variable ein VIP Wert (*variable importance for the projection*) berechnet. Prinzipiell gilt, je höher der Wert eines VIP ist, umso wichtiger ist die Variable für die Deutung. Jun (2009) leitet aus der Beziehung, dass der Mittelwert aller quadrierten VIP Werte 1 ergibt, ab, dass Variablen, deren  $VIP > 1$  ist, als wichtig angesehen werden sollten. Wohingegen Judas (2008) alle Variablen ab einem  $VIP > 0,8$  für relevant halten.

Dennoch bleibt der wesentliche Vorteil der PLS Analyse bestehen, der darin liegt, dass große unbalanzierte Datensätze untersucht werden können, bei denen zwischen den Variablen viele Interkorrelationen vorliegen können, aber nicht müssen. Zudem können die Variablen sowohl nominal, ordinal oder kontinuierlich skaliert sein (Pirouz, 2006).

### **1.3.3 Post-hoc-Test „Simulate“**

Als post-hoc-Test wird in dieser Arbeit die *proc mixed prozedur* in SAS mit Mittelwert- und angepassten p-Wert Berechnungen verwendet, genau gesagt die *proc mixed lsmeans* Option *Simulate*. *Proc mixed* berechnet ein gemischtes lineares Model (*mixed linear model*). Es ist eine Verallgemeinerung der allgemeinen linearen Modelle, bei der sowohl korrelierte Datensätze als auch solche mit nicht konstanter Variabilität analysiert werden können. Die *lsmeans*

Anweisung generiert die Mittelwerte der kleinsten Quadrate bzw. schätzt die marginalen Mittelwerte. Im Gegensatz zum allgemeinen linearen Model in SAS (*proc glm*) werden die Standardfehler auf die Kovarianzparameter des Modells angepasst. *Proc mixed* erstellt einen approximierten *t*-Test für ungleiche Varianzen. Die *Simulate* Anpassung erstellt angepasste *p*-Werte und Konfidenzlevel aus der simulierten Verteilung des Maximums oder des Absolutwertmaximums eines zufälligen *t* Vektors. Alle Kovarianzparameter sind während der Simulation auf ihre angenäherten Werte festgelegt. Eine Ausnahme hierzu ist die Varianz der Residuen (SAS, 2015). Laut Schuhmacher (2006) liefert der *Simulate*-Test das trennschärfste Ergebnis bei paarweise durchgeführten Vergleichen, (All-Paarvergleiche [MCA]). Zudem ist der Test auf unbalanzierte Datensätze anwendbar. Der *Simulate*-Test hat demnach mehr Power als der bekannte Tukey-Kramer Test (Schuhmacher, 2006). Er beruht auf einer Arbeit von Edwards (1987).

#### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede der flüchtigen Blattmetabolite von Weinreben in Abhängigkeit ihrer Resistenzeigenschaften gegenüber *P. viticola* darzustellen. Dazu sollte zunächst die konstitutiv vorhandenen Unterschiede von Freilandreben unterschiedlicher Resistenzklassen untersucht werden. Im Rahmen der Kupferminimierungsstrategie des Bundes sollten Grundlagen geschaffen werden, die langfristig zu einer verminderten Anwendung von Kupfer im Bioweinbau führen könnten. Hierzu sollte überprüft werden, zu welchem Entwicklungszeitpunkt der adulten Freilandreben die meisten konstitutiven Resistenzmarker vorlagen. Eine frühe Hypothese des Verbundprojektes, in dem diese Arbeit eingebettet war, verfolgte den Ansatz, Extrakte aus resistenten Rebblättern im Pflanzenschutz einzusetzen, um die Menge an Kupferapplikation im Ökoweinbau zu minimieren. Für den Zweck einer möglichen Extraktherstellung war es wichtig zu wissen, welchen Einfluss die Blattposition auf den Gehalt möglicher bioaktiver Inhaltsstoffe hatte. Daher sollte das Metabolitprofil in Abhängigkeit der Blattposition überprüft werden. Zusätzlich sollten mit künstlicher Infektion unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus induzierte Resistenzmarker ermittelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

Tabelle 1: Probenherkunft und Probenanzahl Freilandversuche.

Jahr	Entwicklungsstadium BBCH Code	Genotyp	Probenanzahl (je 20 Blätter / Probe)
2011	6	<i>Vitis vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> Müller-Thurgau <sup>*,+</sup> , Riesling <sup>+</sup> , Regent	je 3 Mischproben über mehrere Stöcke
2011	6	<i>Vitis labrusca</i> LINNÉ 3 Stöcke „76-48-11“ <sup>+</sup> und 2 Stöcke „LS-6-19-31“ <sup>o,+</sup>	2 Proben von „76-48-11“ und 1 Probe von „LS 6-19-31“ an Einzelstöcken
2011	6	<i>Vitis riparia</i> MICHAUX je 2 Stöcke „76-49-22“ <sup>+</sup> und „76-50-1“ <sup>+</sup>	1 Probe von „76-49-22“; 2 Proben von „76-50-1“ an Einzelstöcken
2011	6	Hybride Blaue Isabella, Delaware, Concord	Je 3 Proben an Einzelstöcken
2011	8	<i>Vitis vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> Müller-Thurgau <sup>*</sup> , Riesling, Regent, Phoenix	Je 20 Blätter / Probe nach apikalen, medialen und basalen Blattpositionen getrennt. Mischprobe über mehrere Stöcke. Je 3 Proben / Blattposition
2011	8	Hybrid Delaware	10 Blätter apikale Blattposition, 10 Blätter basale Blattposition und 20 Blätter mediale Blattposition, 1 Mischprobe über 3 Stöcke
2011	8	Hybrid Concord	10 Blätter apikale Blattposition, 20 Blätter mediale Blattposition, 10 Blätter basale Blattposition, 1 Mischproben über 3 Stöcke
2011	8	Hybrid Blaue Isabella	10 Blätter / Blattposition, 1 Proben / Blattposition, Mischprobe über 3 Stöcke



<b>Jahr</b>	<b>Entwicklungsstadium BBCH Code</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Probenanzahl (je 20 Blätter / Probe)</b>
2011	8	<i>Vitis riparia</i> MICHAUX „76-49-22“ und „76-50-1“	Je 20 Blätter / Blattposition, nach Akzessionen getrennte Mischproben der Stöcke. je 1 Proben / Blattposition
2011	8	<i>Vitis labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“	20 Blätter apikale Blattposition, 10 Blätter mediale Blattposition, 10 Blätter basale Blattposition, 1 Mischprobe über 3 Stöcke
2011	9	<i>Vitis vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Müller-Thurgau*, Riesling, Regent	je 3 Mischproben über mehrere Stöcke
2011	9	<i>Vitis labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“	3 Proben nach Einzelstöcken
2011	9	<i>Vitis riparia</i> MICHAUX „76-49-22“ und „76-50-1“	Je 2 Proben / Akzession. Getrennt nach Einzelstöcken
2011	9	Hybride Concord, Delaware, Blaue Isabella,	Je 3 Proben an Einzelstöcken
2012	6	<i>Vitis vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Müller-Thurgau*, Riesling, Regent, Phoenix	Je 4 Mischproben über mehrere Stöcke, bzw. 3 Mischproben über mehrere Stöcke für Phoenix
2012	6	Hybride Concord, Delaware, Blaue Isabella,	Je 3 Proben an Einzelstöcken, bzw. 4 Proben an Einzelstöcken für Blaue Isabella
2012	6	<i>Vitis labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“	2 Proben an Einzelstöcken
2012	6	<i>Vitis riparia</i> MICHAUX „76-49-22“ und „76-50-1“	4 Proben an Einzelstöcken für „76-49-22“ und 2 Proben an Einzelstöcken für „76-50-1“
2012	8	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Müller-Thurgau*, Riesling, Regent, Phoenix	Je 4 Mischproben über mehrere Stöcke.

<b>Jahr</b>	<b>Entwicklungsstadium BBCH Code</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Probenanzahl (je 20 Blätter / Probe)</b>
2012	8	Hybride Delaware, Blaue Isabella, Concord	Je 4 Proben an Einzelstöcken
2012	8	<i>V. labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“	2 Proben an 3 Einzelstöcken
		<i>V. riparia</i> MICHAUX „76-50-1“	1 Proben für „76-49-22“ und 2 Proben für „76-20-1“ an Einzelstöcken
2012	9	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Müller-Thurgau*, Riesling, Regent, Phoenix	Je 4 Mischproben über mehrere Stöcke.
2012	9	Hybride Delaware, Blaue Isabella, Concord	Je 4 Proben an Einzelstöcken, bzw. 3 Proben an Einzelstöcken für Delaware
2012	9	<i>V. labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“	3 Proben an Einzelstöcken
2012	9	<i>V. riparia</i> MICHAUX „76-50-1“	3 Proben an Einzelstöcken

\* Müller-Thurgau von Privatwinzer Wilhelm Gläßgen vom Standort Birkweiler, ° *V. labrusca* Linné „LS-6-19-31“ vom JKI Standort Langenscheiderhof; +Einfriermethode ohne N<sub>2</sub> Kühlung sonst mit N<sub>2</sub> Kühlung vor der Lagerung

Tabelle 2: Probenanzahl (n) des Infektionsversuchs. Ganze einjährige Versuchspflanzen im 15 - 20 Blattstadium. Jeweils drei Kontrollen und drei infizierte Varianten.

<b>Genotyp</b>	<b>n / Behandlung (20 Blätter / Probe)</b>
<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv Müller-Thurgau	3
<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv Regent	3
<i>V. labrusca</i> LINNÉ x <i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> Blaue Isabella	3
<i>V. riparia</i> MICHAUX „76-50-1“	3

Tabelle 3: Abstammung

<b>Probe</b>	<b>Abstammung</b>	<b>Klassifizierung</b>
Müller-Thurgau	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>Vinifera</i>	Europäerrebe, „Weinherstellung“
Riesling	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>Vinifera</i>	Europäerrebe, „Weinherstellung“

Probe	Abstammung	Klassifizierung
Regent	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>Vinifera</i>	Europäerrebe, PIWI „Weinherstellung“
Phoenix	<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i>	Europäerrebe, PIWI Keltertraube, Tafeltraube
Delaware	( <i>V. labrusca</i> x <i>V. aestivalis</i> ) x <i>V. vinifera</i> subsp. <i>vinifera</i> LINNÉ	Direktrebe, Hybridrebe, Amerikanerrebe
Concord	( <i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i> LINNÉ) x <i>V. labrusca</i> LINNÉ	Direktrebe, Hybridrebe, Amerikanerrebe
Blaue Isabella „23-12-25“	<i>V. labrusca</i> LINNÉ x <i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i>	Direktrebe, Hybridrebe, Amerikanerrebe
„76-49-22“ und „76-50-1“	<i>V. riparia</i> MICHAUX	Direktrebe, Amerikanerrebe, Wildart
„76-48-11“, „LS-6-19-30“ und „LS-6-19-31“	<i>V. labrusca</i> LINNÉ	Direktrebe, Amerikanerreiben, Wildart

Abstammung laut *Vitis* International variety catalogue VIVC, [www.vivc.de](http://www.vivc.de)

## 2.2 Chemikalien

- (-)-Terpinen-4-ol, 95 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (+)-3-Caren, 90 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (+/-)-Theaspiran, > 90 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E)-β-Damascon, Eramex aromatics GmbH, Meerbusch, Deutschland
- (E)-2-Heptenal, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E)-2-Hexenal, 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E)-2-Hexenol, 95 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- (E)-2-Pentenal, 80 – 85 %, Acros Organics, Geel, Belgien
- (E)-3-Hexenol, 97 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E)-Geranyl aceton, analytical standard, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E)-β-Ocimen, TRC Inc, North York, Kanada
- (E,E)-2,4-Hexadienal, > 95 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (E,Z)-2,4-Heptadienal, 90 %, eptes sàrl, Vevey, Schweiz

## 2 Material und Methoden

---

- (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol, 95 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (S)-(+)-2-Octanol, 99 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
- (Z)-3-Hexenal, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (Z)-3-Hexenol, 98 % Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (Z)-3-Hexenyl acetat, 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (Z)-Linalool oxide (Furanoid), Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- (Z)-Rose oxide, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- (Z)- $\beta$ -Ocimen, 95 %, BOC Sciences, Shirley, NY, United States
- 1-Dodecanol, 98 % (GC), Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 1-Heptanal, > 95 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- 1-Heptanol, 99 % Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
- 1-Hexanol, 99 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- 1-Octanal, 99 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 1-Octanol, 99,5 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- 1-Octen-3-ol, 98 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- 1-Tetradecanol, 97% Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2,4-Dimethyl-5-acetylthiazol, >97%, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2,4-Dimethylbenzaldehyd, > 95 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2,5-Dimethylpyrazin, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2-Aminoacetophenon, >98 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2-Heptanol, 98 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazin, > 98 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2-Nonanol, 99 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
- 2-Phenylethylalkohol, 99 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Benzothiazol, >96%, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Benzylalkohol, 99,8 % Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Boiling point calibration sample no. 1, Hewlett Packard Company, Avondale, USA
- Bornylacetat, ca. 80 %, TCI, Eschborn, Deutschland
- Bromdecan, 98 % Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

- 
- Buttersäure, 99 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - D-Limonen, 99 %, Fluka Analytical, Buchs, Schweiz

---

  - Ethylacetat, Dragoco, Holzminden, Deutschland

---

  - Ethylheptanoate, 98 % Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Ethylhexanoat, 99 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

---

  - Ethyloctanoate, > 98 % Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Farnesen, mixture of Isomeres, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Farnesol, 95 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Frambione, > 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Geranial, 95 %, BOC Sciences, Shirley, NY, United States

---

  - Geraniol, GC standard, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

---

  - Hexan, 99,0% (GC), destilliert, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

---

  - Hexanal, 96 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Isoeugenol, 98 %, cis und trans, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland

---

  - Linalool, 97 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Methylantranilate, > 98 % (GC), Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

---

  - Methylsalicylsäure, 99 %, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

---

  - Natriumchlorid, Emsure®, ACS, IISO, Reag. Ph. Eur, für Analysen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

  - Nerol, analytical standard, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

  - Nonanal, 97 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

---

  - Nonanol, 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - n-Pentadecane, >99 %, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - p-Cymol, Fluka Analytical, Buchs, Schweiz

---

  - Pelargonsäure, > 97 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

---

  - Pentan, Rotipuran®, >99% p.a., Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

---

  - Pyrazin, 99%, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Pyridin, 99%, Acros Organics, Geel, Belgien

---

  - Sulcatol, 99 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Sulcaton, 99 %, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - Wasseragar, BD, Heidelberg

---

  - $\alpha$ -Ionon, 90 % SAFC (Sigma-Aldrich), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

  - $\alpha$ -Terpinen, 95 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

- $\alpha$ -Terpineol, analytical standard, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- $\alpha$ -Terpinolen, Dr. Ehrenstorfer, Wessel, Deutschland
- $\beta$ -Cyclocitral, 90 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
- $\beta$ -Damascenon, 98 %, Eramex aromatics GmbH, Meerbusch, Deutschland
- $\beta$ -Ionon, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- $\beta$ -Myrcen, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- $\beta$ -Pinen, GC Standard, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- $\gamma$ -Terpinen, 97 %, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 2.3 Instrumente

- GC-MS Agilent 5973N GC/MSD System<sup>1</sup>, Mass Selective Detector, 6890N Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- MPS2 Autosampler mit Agitator, Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim a.d. Ruhr, Germany
- HP INNOWax Säule, Agilent 19091N-233 30m x 250  $\mu$ m x 0,5  $\mu$ m, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- SPME Faser 100 $\mu$ m PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Standmixer (Blendor), Waring Commercial, Torrington, CT, USA
- Zentrifuge Rotixa 120 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Stereomikroskop MZ16 mit Kamera DFC420C, Leica, Wetzlar
- Neubauer improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)

### 2.4 Software

- NIST 2002 Rev D04.00 Massenspektrenbibliothek (G1033A und G1041A) 2002, Vertrieb durch Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA, Alle Rechte liegen bei National Institute of Standards and Technologies, Gaithersburg, MD, USA
- Chemstation™ D.01.02.16 , 2004, Agilent, Palo Alto, CA, USA
- SAS 9.3, 9.4 und University Edition (2016), SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- AMDIS 2.73 (Build 149.31), Steve Stein, <http://www.amdis.net/index.html>
- OpenChrom® 1.4.0, Lablicate GmbH, Hamburg, Deutschland
- metAlign™ Version 041012, RIKILT, University Wageningen, Niederlande
- Flavornet.org, <https://www.flavornet.org/flavornet.html>
- NIST Webbook, <https://webbook.nist.gov/chemistry/>

---

<sup>1</sup> Genaue Beschreibung unter <http://www.aimanalytical.com/5973Ndiff.html> (27.09.2019)

## 2.5 Verwendetes Pflanzenmaterial

Zur Ermittlung der flüchtigen Inhaltsstoffe von Weinreben wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht. Zum einen sollten an Freilandpflanzen die konstitutiven flüchtigen Metabolite detektiert und identifiziert werden. Zum anderen sollten gezielt Pflanzen mit *Plasmopara viticola* infiziert werden, so dass nach erfolgter Infektion die Unterschiede im Blattmetabolom zwischen unbehandelten Kontrollpflanzen und infizierten Blättern ermittelt werden konnten. Die Infektionsversuche wurden an einjährigen Pflanzen im Gewächshaus durchgeführt. Alle Pflanzen stammen vom JKI in Siebeldingen mit Ausnahme der Müller-Thurgau Blätter des Freilandversuchs. Diese stammen freundlicherweise aus einem privaten Weinberg des JKI Mitarbeiters Wilhelm Gläßgen.

### 2.5.1 Probenahme Freilandversuche

#### Konstitutive Marker

Im Jahr 2011 und 2012 wurden an je drei Terminen Rebenblätter von zehn Genotypen gesammelt. Die zehn Genotypen besaßen unterschiedlich ausgeprägte Resistenzeigenschaften gegen *P. viticola*. Über die sechs Probetermine gab es kleinere Veränderungen der Genotypen (Tabelle 1). Bei der ersten Probenahme 2011 wurden zunächst 11 Genotypen beprobt, da verschiedene *V. labrusca* Akzessionen integriert wurden. Da sich die Metabolitprofile der zwei Akzessionen statistisch nicht voneinander unterschieden und es drei Stöcke am Standort Geilweilerhof gab, wurde davon abgesehen, an einem weiteren Standort (Langenscheiderhof) Blattproben zu untersuchen, um zusätzliche Einflüsse des Standorts auszuschließen, z.B. Bodenbeschaffenheit, Nährstoffverfügbarkeit, lokaler Pathogendruck oder örtliche Wettereinflüsse wie Temperaturunterschiede, Wind- oder Regenstärke. Bei der dritten Probe im Jahr 2011 konnten nur von neun Genotypen Blätter verwendet werden, weil es bei Phoenix zu diesem Zeitpunkt keine intakten Blätter mehr gab. Ebenso wurden bei der dritten Beprobung im Jahr 2012 nur neun Genotypen verwendet, da für *V. riparia* nur die Akzession 76-50-1 für die GC-MS Analysen zur Verfügung stand.

Die zehn Genotypen (Tabelle 3) besaßen unterschiedlich ausgeprägte Resistenzeigenschaften gegen *P. viticola*. Es waren Genotypen aus verschiedenen *Vitis* Arten, vier Genotypen entstammen der europäischen Art *Vitis vinifera* LINNÉ subsp. *vinifera* und waren stark anfällige (Müller-Thurgau und Riesling) bzw. pilzwiderstandsfähige Züchtungen (PIWI). Es wurden die beiden PIWI Genotypen Regent und Phoenix verwendet. Außerdem wurden zwei resistente Wildarten in die Untersuchungen integriert (*V. labrusca* LINNÉ und *V. riparia* MICHAUX). Wobei von *V. labrusca*, wie erwähnt, nur bei der ersten Probenahme zwei Akzessionen verwendet wurden. Von *V. riparia* wurden zwei Akzessionen beprobt, um die benötigte Blattmasse zu

erhalten. Außerdem wurden drei Hybridreben (Delaware, Blaue Isabella und Concord) verwendet, die unterschiedliche interspezifische Kreuzungen aus *Vitis* spp. sind und deren Abstammungen in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Von den vier *V. vinifera* Genotypen wurden jeweils Blattproben über mehrere Stöcke gesammelt. Die Hybriden und Wildarten wuchsen in Siebeldingen am JKI mit jeweils drei Einzelstöcken, die Teil der Deutschen Genbank für Reben (<https://www.deutsche-genbank-reben.julius-kuehn.de/>) sind. Eine Ausnahme hierzu bilden die beiden Akzessionen 76-49-22 und 76-50-1 von *V. riparia*. Hier sind jeweils nur zwei Stöcke angebaut worden.

Es wurde immer das ganze Blatt inklusive Stiel verwendet. Von den Hybriden und Wildarten wurden die Blattproben von den getrennten Einzelstöcken gesammelt. Bei den *V. vinifera* Genotypen wurden Mischproben über mehrere Stöcke erstellt. Wenn möglich wurden jeweils 20 Blätter / Probe gesammelt (s. Tabelle 1). Im ersten Versuchsjahr 2011 wurden - wenn möglich - drei biologische Wiederholungen pro Genotyp erstellt. Im zweiten Versuchsjahr wurden - wenn möglich - vier biologische Wiederholungen gesammelt. Die genaue Probenzahl für jeden Genotyp bei jedem Probetermin findet sich ebenfalls in Tabelle 1.

### Ontogenetischer Effekt an Freilandblättern

Für die zweite Probenahme im ersten Versuchsjahr wurde die Auswirkung des ontogenetischen Effekts untersucht. Als ontogenetischer Effekt wurde die Blattposition bzw. das jeweilige Alter der Einzelblätter einer Pflanze zu einem bestimmten Entwicklungsstadium definiert. Es wurden von jedem Genotypen Blätter verschiedenen Alters beprobt und die Metabolitprofile miteinander verglichen.

Hierzu wurden die Rebstöcke in drei Blattpositionen eingeteilt (Tabelle 4), wobei beginnend vom ersten entfalteten Blatt der Triebspitze gezählt wurde (Abb. 4). Da bei diesem Versuch sehr viel Blattmaterial benötigt wurde, konnte für die Reben aus der Genbank (Wildarten und Hybridreben) jeweils nur eine Blattprobe als Mischprobe über die Einzelstöcke akquiriert werden mit teilweise nur zehn statt 20 Blättern. Die genaue Anzahl ist in Tabelle 1 angegeben. Für die Kulturreben wurden wie üblich Mischproben über mehrere Stöcke erstellt. Da die Kulturreben in größerer Anzahl angebaut wurden, konnten für jede Blattposition jedes Genotyps jeweils drei biologische Wiederholungen analysiert werden.

Tabelle 4: Einteilung der Blattpositionen

Apikale Blattposition	1. - 3. Blatt
Mediale Blattposition	8. - 10. Blatt
Basale Blattposition	< 13. Blatt



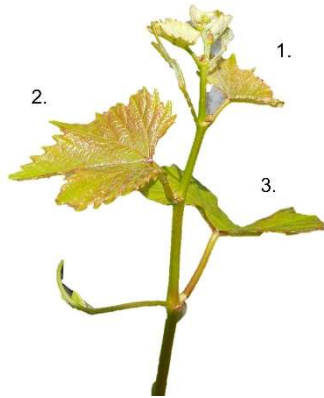


Abb. 4: Apikale Blätter, Definition des 1. - 3. entfalteteten Blatts

### 2.5.2 Infektionsversuch im Gewächshaus

#### Verwendete Genotypen

Es wurden fünf Genotypen ausgewählt, die alle verwendeten Resistenzklassen und die in den Freilandversuchen analysierten *Vitis spp.* abdecken sollten. Dazu wurden im Herbst 2012 je 20 Stecklinge von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau, *V. vinifera* cv. Regent, *Vitis riparia* „76-49-22“, dem *Vitis labrusca* Abkömmling Blaue Isabella und dem Wildtyp *Vitis labrusca* geschnitten. Die Stecklinge stammten von zweijährigen Pflanzen. Von Blauer Isabella standen nicht genügend zweijährige Ausgangspflanzen zur Verfügung, so dass auch Ruten von einjährigen Pflanzen verwendet wurden. Die Ruten wurden über den Winter im Kühlraum bei + 5 °C gelagert. Im darauffolgenden Frühjahr 2013 wurden die Stecklinge im Gewächshaus in Siebeldingen angezogen. Jeweils zehn Pflanzen wurden infiziert und zehn Pflanzen als unbehandelte Kontrolle verwendet.

Leider wurden in diesem Test keine Genotypen aus der sehr stark resistenten Klasse 9 verwendet<sup>2</sup>. Von den *Vitis labrusca* Stecklingen aus Resistenzklasse 9 sind nur vier angewachsen, so dass der Infektionstest nicht durchgeführt werden konnte. Die Blaue Isabella entpuppte sich in einem gleichzeitig durchgeführten Test zur Einteilung der Resistenzklasse als leicht anfälliger und gehört demzufolge, ebenso wie *Vitis riparia*, zur Resistenzklasse 7 und nicht zur Klasse 9. SSR Marker Analysen (nicht Teil dieser Arbeit) ergaben, dass die Blaue Isabella kein Kultivar von *Vitis labrusca* ist, sondern aus einer interspezifische Kreuzung aus *Vitis labrusca* LINNÉ x *Vitis vinifera* LINNÉ subsp. *vinifera* stammt (Maul, 2020). Daher erfolgte dieser Test an Genotypen der Resistenzklassen 1, 3 und 7 (Zur Einteilung der Resistenzklassen vgl. Abschnitte 2.6 und 3.1).

<sup>2</sup> Erläuterung zur Einteilung der Genotypen in Resistenzklassen siehe Abschnitt 2.6 Seite 22

### Behandlung und Probenahme

Die jeweils 20 Topfpflanzen der vier Genotypen Müller-Thurgau, Regent, Blaue Isabella und *V. riparia* wurden im Gewächshaus in Siebeldingen unter einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert (Abb. 5). Zur Vorbeugung von Echtem Mehltau (*Erysiphe necator*) Befall wurde wöchentlich eine Behandlung mit 2 %igem Netzschwefel durchgeführt. Als alle Pflanzen das 15 - 20 Blattstadium erreicht hatten, wurde mit der *P. viticola* Infektion begonnen.



Abb. 5: Topfpflanzen 1 Tag nach der Inokulation.

### Herstellung der Sporensuspension und Infektion

Am Vormittag des 17.07.2013 wurden vom Freiland Blätter mit frischen *P. viticola* Sporen gesammelt. Die Sporen wurden von den Blättern abgepinselt und in einem eisgekühlten, mit sterilen Leitungswasser gefüllten Becherglas aufgefangen.

In einer Neubauer improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden 2 x 10  $\mu\text{l}$  Sporensuspension pipettiert und die Anzahl der Sporen / ml ermittelt. Nun wurden die Sporen in den vier großen Quadranten in den Ecken gezählt (Abb. 6). Aus den Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Der zehnfache Mittelwert gab die Sporenkonzentration pro  $\mu\text{l}$  an. Der Faktor 10 erklärt sich daraus, dass jedes Eckquadrat eine Grundfläche von 1  $\text{mm}^2$  und eine Höhe von 0,1 mm besitzt, d.h. jedes der Eckquadrate hat ein Volumen von 0,1  $\text{mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ . Die Auszählung der Sporen erfolgte über ein Stereomikroskop (Leica, Wetzlar) mit 20facher Vergrößerung.

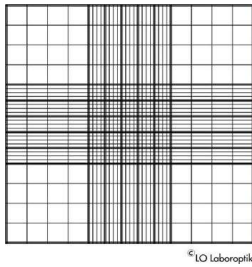


Abb. 6: Schema einer Neubauer improved Zählkammer. Quelle: <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html> (Stand 07.10.2015)

Die Sporensuspension wurde auf 40 000 Sporangien / ml eingestellt. Am 07.10.2013 wurde eine neue Sporensuspension hergestellt mit 50 000 Sporangien / ml. Von beiden Infektionslösungen wurden je fünf Liter angesetzt und diese vollständig auf die Blattunterseite der zu behandelten Pflanzen aufgesprüht. Die Kontrollpflanzen wurden mit der gleichen Menge an sterilisiertem Leitungswasser besprüht. Die Pflanzen wurden nachts immer mit Plastik umhüllt, um ein feuchtes Klima zu erzeugen. Nach acht Tagen sollte nach eingetretener Infektion mindestens an den anfälligen Blättern von Müller-Thurgau ein weißer Pilzrasen an der Blattunterfläche sichtbar sein. Eine erste Inokulation am 17.07.2013 hat nicht zu einer sichtbaren Infektion geführt. Der darauffolgende langanhaltende Hochsommer im August / September sorgte für sehr trockene, heiße Luft im Gewächshaus. Unter diesen Konditionen treten kaum Infektionen mit *P. viticola* auf. Daher wurde erst am 07.10.2013 eine zweite Infektion angesetzt. Nach acht Tagen war ein Pilzrasen auf den Blättern der anfälligen Topfpflanzen zu erkennen (Abb. 7). Die Infektionsmethode beruht auf einer Kombination aus JKI internen Erfahrungen und den Vorschriften nach Gindro (2003) und Pezet (2003).



Abb. 7: deutliche Sporangienträgerbildung auf der Blattunterseite von Regent (8 dpi).

### 2.5.3 Lagerung und Transport

Die Blattproben wurden direkt nach der Probenahme in herkömmlichen Gefrierbeuteln verpackt. Die Freilandproben wurden im Weinberg bis zur Rückkehr ins Institutsgebäude in Kühlboxen transportiert. Im Institut wurden alle Proben mit flüssigem N<sub>2</sub> übergossen und im schock-

gefrorenen Zustand bei - 70 °C bis zum Transport von Siebeldingen nach Quedlinburg gelagert. Bei der ersten Probenahme 2011 wurden abgesehen von den Hybridreben alle Proben ohne N<sub>2</sub> Behandlung eingefroren.

Für den Transport wurden die Proben erneut in Kühlboxen verpackt und direkt nach der Ankunft im Quedlinburger Institut bei - 60 °C bis zur Analyse gelagert.

### **2.6 Blattscheibentest zur Ermittlung der Resistenzklassen**

Die Resistenzklassen der verwendeten Genotypen wurde über Blattscheibentests ermittelt. Die Tests erfolgten durch das technische Personal (Frau d'Aguiar) am JKI Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Siebeldingen. Die Auswertung ist Teil der eigenständigen Arbeit dieser Monographie. Für die Tests wurden Blätter der in Tabelle 5 aufgeführten Genotypen benutzt.

Für alle Blattscheibentests wurde das 3. - 5. Blatt unterhalb der Triebspitze verwendet. Die Blätter stammten aus Freilandkulturen und waren augenscheinlich symptomfrei. Sie wurden mit Wasser gewaschen und trocken getupft. Anschließend wurden Blattscheiben mit einem Korkbohrer mit Durchmesser von 18 mm aus den Blättern gestanzt und diese mit der Blattoberseite auf Wasseragar gelegt.

#### Herstellung der *P. viticola* Sporensuspension

Die Herstellung der Sporensuspension für den Blattscheibentest unterschied sich leicht von der Herstellung der Sporensuspension für den Infektionstest an ganzen Pflanzen. Die Sporen für die Infektion der Blattscheiben stammten nicht direkt aus dem Freiland, sondern von befallenen Gewächshauspflanzen (Müller-Thurgau und Kerner Setzlinge).

Tabelle 5: Genotypen, deren Resistenz gegen *P. viticola* durch Blattscheibentests ermittelt wurden.

#### **Genotyp**

<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Müller-Thurgau
<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Riesling
<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Regent
<i>V. vinifera</i> LINNÉ subsp. <i>vinifera</i> cv. Phoenix
Hybrid Delaware
Hybrid Blaue Isabella
Hybrid Concord
<i>V. riparia</i> MICHAUX „76-50-1“
<i>V. labrusca</i> LINNÉ „76-48-11“

Die Setzlinge wurden in der Klimakammer unter einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchte von > 95 % kultiviert. Wobei die Pflanzschalen nachts zusätzlich mit Wasser bespritzt und mit einer Plastiktüte eingehüllt wurden. Für die Gewinnung der Sporen wurden von den Setzlingen jeweils maximal drei Blätter verwendet, an deren Unterseite ein starker Pilzrasen sichtbar war. Die weitere Vorgehensweise ist im Absatz 2.5.2 beschrieben. Es wurde eine Sporenkonzentration von 20 000 Sporen / ml eingestellt. Die Suspensionen wurden unmittelbar auf die Blattscheiben aufgetragen (je 40 µl / Blattscheibe).

### Durchführung des Blattscheibentests

8 g Agar-Agar pro Liter entionisierten Wassers wurden zur Herstellung von 0,8 %igem Wasseragar verwendet. Der autoklavierte Wasseragar wurde in rechteckige Kunststoff-Petrischalen (25 x 25 cm) gegossen und nach dem Erkalten mit je vier oder acht Blattscheiben pro Sorte belegt, wobei die Blattunterseite nach oben zeigte. Auf diese Weise konnten pro Petrischale alle Genotypen mit je vier Blattscheiben gleichzeitig getestet werden. Je 40 µl Sporensuspension wurden in die Mitte der Blattscheibe pipettiert. Die Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt und über Nacht im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Wassertropfen mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und anschließend weitere acht Tage in der Klimakammer mit einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, 25 °C und relativer Luftfeuchte > 95 % inkubiert. Die Auswertung des Befalls erfolgte unter einem Binokular mit zehnfacher Vergrößerung nach den Vorgaben des OIV ((OIV), 2009) wie es auch durch Schwander (2012) beschrieben wird. Der Befall wurde ordinalskaliert protokolliert, wobei nach der Einteilung in Tabelle 6 bonitiert wurde.

Die Anzahl der Sporangienträger ist ein Indikator dafür, wie erfolgreich der Oomyzete das Blatt infizieren, neue Sporangien gebildet und somit der asexuelle Reproduktionszyklus komplett stattfinden konnte. Auf Pflanzen, die den Reproduktionszyklus durchbrechen oder zumindest einschränken können, entwickeln sich weniger oder sogar keine Sporangienträger. Daher lässt sich die Anzahl der gebildeten Sporangienträger für die Einteilung der Resistenzklassen aller analysierten Genotypen verwenden.

Aus den Resistenzklassen der einzelnen Blattscheiben wurden Mittelwerte gebildet. Um die protokollierte Ordinalskalierung nicht zu verfälschen, wurden die Genotypen abweichend von der Vorgehensweise in Schwander (2012) ausschließlich in die Klassen eingeteilt, die in Tabelle 7 angegeben sind.

Tabelle 6: Einteilung der Resistenzklassen durch Anzahl der Sporangienträger pro Blattscheibe

Resistenzklasse	Anzahl der Sporangienträger pro Blattscheibe
1	dichter Sporangienträgerteppich
3	< 20
5	6 - 20
7	1 - 5
9	0

Tabelle 7: Einteilung der Genotypen in Resistenzklassen anhand der Mittelwerte der Blattscheibentests

Bereich des Mittelwerts	Resistenzklasse
1 - 2,0	1
> 2,0 – 3,0	3
> 3,0 - 5,0	5
> 5,0 - 7,0	7
> 7,0	9

### 2.7 Probenaufbereitung zur Analyse flüchtiger Metabolite

Die Aufbereitung der gefrorenen Blätter zur Extraktion der flüchtigen Sekundärmetabolite erfolgte in Anlehnung an die durch Olbricht (2008) beschriebene Methode.

#### 2.7.1 Homogenisation

Je 20 gefrorene Blätter einer Probe wurden grob zerkleinert, mit wässriger 3,4 M NaCl-Lösung 1:3 (m/v) versetzt und mit einem Waring Blender homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenisate 30 Minuten bei 3000 rpm (100 x g) und 4 °C in einer Standzentrifuge Rotixa 120RS zentrifugiert. Die Proben wurden über einen mit Nylongaze (90 µm) bestückten Büchnertrichter filtriert und das Filtrat bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei jeder biologischen Wiederholung wurde jeweils eine Kontrollprobe ohne Rebenblätter erstellt (sog. *blank run*), um Matrixsubstanzen ermitteln zu können. Hierdurch soll verhindert werden, dass Substanzen, die aus dem Verarbeitungsprozess in die Proben gelangt sind, bei der nachfolgenden Analytik fälschlicherweise für Pflanzenmetabolite gehalten werden.

Die hohe Natriumchlorid-Konzentration während der Homogenisation der Blätter denaturierte zum einen Enzyme, so dass möglichst kein enzymatischer Abbau der Sekundärmetabolite stattfinden sollte. Die Inhibierung beruht darauf, dass der Überschuss an Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> Ionen an die funktionellen Gruppen der Enzyme anlagern. (Ionische Wechselwirkung und Dipol-Ion-

Wechselwirkung). Zum anderen sorgte die hohe Salzkonzentration dafür, dass die pflanzlichen Inhaltsstoffe in ihrer ionischen Form als Natriumsalze vorlagen und so leichter in die wässrige Phase ausgetrieben wurden. Dadurch konnten auch ursprünglich lipophile Metabolite ohne organische Lösemittel extrahiert werden.

In BBCH8 des 1. Versuchsjahres (VJ) wurden keine Mischproben über die Blattstände genommen, sondern von jedem Genotyp apikale, mediale und basale Blätter beprobt, um den Einfluss des Blattalters zu untersuchen. Bei den apikalen Blättern ergab dies nicht immer genug Blattmasse, um in den vorhandenen Blendern die Probe mit der NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3 zu homogenisieren. Es mussten teilweise höhere Verdünnungen genommen werden (Mindestvolumen im Blender betrug 45 ml). Die Verdünnungsfaktoren wurden nachträglich in der SAS Datenanalyse wieder eingerechnet, so dass die Intensität der verdünnten Proben, der Intensität der anderen Proben entsprach. Alle apikalen Blätter der Wild- und Hybridreben ausgenommen *V. labrusca* mussten zusätzlich verdünnt werden. Bei den anfälligen *V. vinifera* Sorten musste mindestens eine Wiederholung verdünnt werden. In Tabelle 8 sind die genauen Verdünnungsfaktoren für jede apikale Probe angegeben, wenn aus technischen Gründen eine zusätzliche Verdünnung erfolgen musste.

Tabelle 8: Verdünnungsfaktor der 1. - 3. Wiederholung bei apikale Blättern. Wenn kein Wert angegeben ist, dann konnte eine Standardverdünnung (Faktor 3) vorgenommen werden. /) keine biologische Wiederholung verfügbar.

<b>Probe</b>	<b>1. Wdh</b>	<b>2. Wdh</b>	<b>3. Wdh</b>
Müller-Thurgau		4,6	5,2
Riesling	6,9	5,1	5,2
Regent		4,6	
Phoenix	8,1	6,5	7,0
Delaware	9,1	/	/
<i>V. riparia</i> 76-49-22	6,8	/	/
<i>V. riparia</i> 76-50-1	4,9	/	/
Blaue Isabella	6,6	/	/
Concord	3,8	/	/

Für die Untersuchung der Blätter aus dem Infektionstest ergab sich ein ähnliches Problem wie bei der Analyse der apikalen Blätter aus BBCH8 2011. Die Blattmasse der einzelnen Topfpflanzen reichte nicht aus, um mit derselben Homogenisationsmethode verarbeitet zu werden, wie die anderen Proben. Daher wurden die Blätter zweier Topfpflanzen bei der Einwaage vereinigt. Vier Pflanzen jeder Testgruppe wurden für die Analyse von nicht-flüchtigen Metaboliten zur Verfügung gestellt, die nicht Teil dieser Arbeit ist. Daher ergaben sich jeweils drei biologische Wiederholungen pro Testgruppe innerhalb des Infektionsversuches.

### 2.7.2 HS-SPME-GC-EI-MS

#### Probenvorbereitung

Die eingefrorenen Probenfiltrate (nachfolgend „Homogenisate“ genannt) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, um sie anschließend mittels GC-MS zu analysieren. Dafür wurde das Verfahren der Gasraum-Festphasen-Mikroextraktion mit nachfolgender Gaschromatografie-Massenspektrometrie (*Headspace-solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry* [HS-SPME-GC-MS]) verwendet. Es wurden je 10 ml Homogenisat auf 4 g getrocknetem NaCl in 20 ml Rundbodenvials mit Schraubverschluss und Septum pipettiert. Als interner Standard wurden zunächst zu jeder Analysenprobe je 10 µl Bromdecan (1:10 000 (v/v) in EtOH) hinzugefügt. Brom bildet ein sehr leicht erkennbares Massenfragementierungsmuster aufgrund seiner natürlich vorkommenden Isotope. Allerdings wurde ein Teil des Broms ins System verschleppt und führte zu unerwünschten Bromdecan Detektionen in fremden Proben. Daher wurde nach einem geeigneten Ersatz gesucht, der zugleich eine leicht zu identifizierende Substanz sein und keine Sekundärmetabolite überlagern sollte. Für alle Analysen der Probetermine ab 2012 wurde als Interner Standard je 1 µl Benzothiazol (BSN) in der Verdünnung 1:1000 (v/v) in Hexan verwendet.

Von jeder Probe wurden drei technische Wiederholungen erstellt. Die biologischen Wiederholungen wurden in getrennten Blöcken analysiert. Jede technische und biologische Wiederholung bildete jeweils einen eigenständigen Block. Die Blöcke wurden vollständig randomisiert analysiert. Dadurch sollten die Umgebungseinflüsse während der Analysezeit für den gesamten Block equilibriert werden. Die Randomisierung erfolgte in Excel mit der Funktion „Zufallszahl“. Den Analyseproben in jedem Block wurden Zahlen im Bereich von 0 - 1 zugewiesen. Anschließend wurden die Analysenproben nach der Zufallszahl sortiert und in der entsprechenden Reihenfolge analysiert. Zu Beginn jedes Blocks wurde als erstes ein Leerwert gemessen, in dem lediglich die NaCl-Lösung mit BSN enthalten war.

#### SPME Bedingungen

Die flüchtigen Metabolite der Blatthomogenisate wurden an eine PDMS beschichtete Faser (Schichtdicke 100 µm, Supelco, USA) adsorbiert. Dazu wurde jedes Homogenisat für 10 Minuten bei 35°C in einem beheizbaren Schüttler (Agitator) mit einer Schüttelrate von 300 U/min inkubiert (Abb. 8, T<sub>1</sub>). Anschließend wurde die SPME Nadel durch das Septum gestochen und in den Gasraum eingebracht. Die Faser verblieb 15 Minuten im 35 °C warmen Gasraum des Vials (*Headspace*), um die Metabolite zu absorbieren (Abb. 8, T<sub>2</sub>). Die Desorption erfolgte, indem die PDMS Faser in den Injektor des GC eingeführt und für 5 Minuten auf 250 °C erhitzt wurde (Abb. 8, T<sub>3</sub>). Es wurde im *splitless-Modus* gemessen. Der Purge flow to Split vent betrug 10 ml / min mit 2 min Purge Zeit. Als Trägergas wurde Helium verwendet.



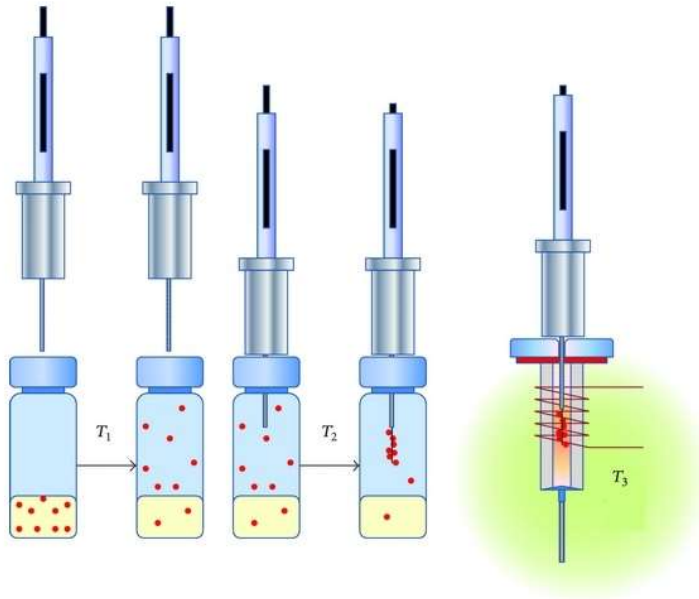


Abb. 8: Prinzipielle Funktionsweise der HS-SPME (Indelicato, 2014)

### GC BEDINGUNGEN

Die Trennung der Metabolite erfolgte auf einer polaren Säule HP INNOWAX (Agilent, Waldbronn), 30 m Länge x 250 µm ID x 0,5 µm Filmdicke, Helium wurde als Trägergas verwendet mit einer Flussrate von 1,1 ml/min im *constant flow* Modus. Die Temperaturrampe startete bei 45 °C für 5 Minuten, anschließend erfolgte ein stetiger Temperaturanstieg von 3°C / min bis 200 °C. In der Schlussphase wurde die Temperatur auf 200 °C für 25 Minuten gehalten. Anschließend an die eigentliche chromatografische Trennung erfolgt eine 8minütige Abkühlphase, in der die Säulentemperatur erneut auf 45 °C equilibriert wurde. Insgesamt dauerte jede Analyse 90 Minuten (82 Minuten Analysenzeit und 8 Minuten Säulenequilibration).

### EI-MS BEDINGUNGEN

Um die Metabolite zu ionisieren wurde das Elektronenstoß-Ionisierungsverfahren (*electron impact ionization* [EI]) verwendet mit der Standard-Ionisierungsenergie von 70 eV. Die kleinste detektierte Masse war 35 m/z, die maximale Masse der zu detektierenden Fragmente betrug 350 m/z. Die Ionenfragmente wurden im scan Modus detektiert.

#### **2.7.3 Identifizierung der VOCs**

Die vorläufige Identifizierung der Metabolite erfolgte über die Vergleiche der Massenfragmentierungsmuster mit der NIST Rev D04.00 Datenbank und der Retentionsindices (RIs) mit Datenbanken und Literaturdaten. Für eine vollständige Identifizierung wurden anschließend die entsprechenden Referenzsubstanzen auf demselben System gemessen und die erhaltenen Massenfragmentierungsmuster und Retentionsindices der Referenz mit der Probe verglichen.

Eine Abweichung des RIs am Peakmaximum darf höchstens 10 % betragen, um als Übereinstimmung zu gelten.

### Identifizierung über NIST Massenspektrendatenbank

In der Auswertesoftware ChemStation (Agilent, Waldbronn) war der Zugriff auf die NIST Datenbank hinterlegt. Für jede Substanz konnte ein Datenabgleich mit NIST durchgeführt werden. Dabei gab die Software eine prozentuale qualitative Übereinstimmung des aufgenommenen Massenspektrums zu den Referenzspektren an. Eine qualitative Übereinstimmung der Massenspektren bedeutete, dass angegeben wurde, wie viele der Fragmentationen der unbekannt Substanz mit den Fragmentationen eines Referenzspektrums übereinstimmten. Die Software orientierte sich dabei jedoch nicht an dem Verhältnis der Fragmentationen zueinander, so dass eine manuelle Kontrolle stets nötig war. Zudem muss für eine vorläufige Identifizierung auch die Retentionszeit bzw. der Retentionsindex mit Literaturwerten übereinstimmen. Die Recherche der Substanz über den Massenspektrenvergleich lieferte nur einen ersten Anhaltspunkt zur tatsächlichen Bestimmung der Substanz.

### Bestimmung des Retentionsindex

Bevor die Proben eines Teilversuchs bestimmt wurden, wurde jeweils eine Analyse einer sogenannten „*Boiling point calibration sample*“ (BPS) durchgeführt. In dieser Probe waren 14 Alkane verschiedener Kettenlänge enthalten (C5, C8, C9, C10, C11, C12, C14, C15, C16, C17, C18, C20, C24, C28). 5 µl BPS (1:1000 (v/v) in Pentan) wurden auf ein Filterpapier am Boden eines Rundbodenvials getropft, verschraubt und anschließend mit der oben beschriebenen HS-SPME-GC-MS Methode analysiert. Zusätzlich wurde 1 µl BPS direkt mit einer Hamiltonspritze injiziert. Hierbei wurde ein 1:1 Split mit zweiminütigen Delay und einem Splitfluss von 1,1 ml/min verwendet. GC und MS Bedingungen blieben unverändert.

Die Retentionsindices der Analyten für die verwendete Säule wurden anhand der Retentionszeiten der Substanzen im Vergleich zu den Retentionszeiten der Alkanstandards über Formel 2 berechnet.

Formel 2: Berechnung des Retentionsindex für Alkane in temperaturprogrammierten gaschromatografischen Analysen

$$RI = 100 \left[ n + (n_{+1} - n) * \frac{t_a - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right]$$

RI: Retentionsindex

$n$ : Anzahl der C-Atome im Alkanstandard mit der nächst kleineren Retentionszeit

$n_{+1}$ : Anzahl der C-Atome im Alkanstandard mit der nächst größeren Retentionszeit

$t_a$ : Retentionszeit des Analyten

$t_n$ : Retentionszeit des Alkanstandards mit der nächst kleineren Retentionszeit

$t_{n+1}$ : Retentionszeit des Alkanstandards mit der nächst größeren Retentionszeit

Der Retentionsindex eines unverzweigten Alkans mit  $n$  C-Atomen ist wiedergegeben in Formel 3.

Formel 3: Retentionsindex für Alkanstandards in temperaturprogrammierten gaschromatografischen Analysen

$$RI_{Alkanstandard} = 100n$$

RI: Retentionsindex

$n$ : Anzahl der C-Atome im Alkanstandard (unverzweigtes Alkan)

Nach den Retentionsindices der Substanzen wurde anschließend in den Datenbanken Flavor-net.org (<https://www.flavornet.org/flavornet.html>), NIST Webbook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>) und in weiterführender Fachliteratur gesucht.

### 2.7.4 Referenzsubstanzen

Für 69 Metabolite wurden Referenzproben analysiert, um die Identifizierung über die MS Fragmente zu bestätigen. Eine Liste der Referenzsubstanzen findet sich im Anhang A2. Die Referenzen wurden jeweils 1:1000 (v/v) in Pentan bzw. Isooctan gelöst. Anschließend wurden jeweils 5 µl der Substanz auf ein Filterpapier in einem Rundbodenvial gegeben und mit der beschriebenen HS-SPME-GC-MS Methode (siehe Absatz 2.7.2) analysiert. Die Retentionsindices wurden anhand der BPS Kalibrierung berechnet (Formel 2) und mit dem RI des zu überprüfenden Analyten verglichen. Ebenso wurden die Massenfragmentierungen auf Übereinstimmung überprüft.

### **2.8 Datenverarbeitung**

Das Gesamtionenchromatogramm (*total ion chromatogram - TIC*) jedes Datensatzes wurde mit dem Programm ChemStation (Agilent, Waldbronn) bearbeitet. Zunächst wurden eine automatische Basislinienkorrektur und eine Glättung der Peaks vorgenommen. Mit einem Schwellenwert (*Threshold*) wurde eine automatische Integration der Peaks durchgeführt. Der Threshold wurde so gewählt, dass Substanzen knapp oberhalb des Rauschens integriert wurden, jedoch möglichst keine Peaks aus dem Rauschen. Dafür wurde der im ChemStation System hinterlegte Threshold 15 verwendet, der einen guten Kompromiss zwischen Anzahl der integrierten Peaks und sinnvollen Integrationen niedrig konzentrierter Substanzen bot. Die automatische Integration musste jedoch trotzdem in jedem Fall sehr zeitaufwändig händisch überprüft und teilweise korrigiert werden, da die Software teilweise einzelne Peaks in mehrere Zeitscheiben unterteilte, obwohl es sich um ein und dieselbe Substanz handelte.

In der verwendeten Version konnte ChemStation jeweils nur den geöffneten Datensatz korrigieren und integrieren. Daher wurde dieser Vorgang nicht für alle 773 Analysen durchgeführt, sondern an ausgewählten Stichproben. Im ersten Versuchsjahr und für den Infektionsversuch wurde von jedem Genotyp in jeder biologischen Wiederholung eine Analyse betrachtet. Im zweiten Versuchsjahr wurden die Chromatogramme nur dann einzeln betrachtet, wenn die Resistenzmarkeranalysen durch Massenspektren, Retentionsindices und Referenzsubstanzen verifiziert werden mussten.

Für jede betrachtete Analyse wurde eine Peakliste gespeichert, in der für jeden Peak u.a. die Anfangs- und Endzeit, Retentionszeit am Maximum und die integrierte Peakfläche angegeben wurde. Die Identifizierung der Peaks erfolgte ebenfalls über manuelle Überprüfung der Fragmentierungsmuster mit der hinterlegten Datenbank (NIST 2002).

#### **2.8.1 Vorbereitungen zur statistischen Auswertung – Datenalignment, Standardisierung etc.**

Für die Überprüfung der statistischen Unterschiede zwischen den Metabolitprofilen wurden im ersten Schritt alle Datensätze der Proben eines Beprobungstermins in einer Datei zusammengefasst. Dabei wurden für jeden gemessenen Zeitpunkt alle Massenfragmente aller Analyten übereinandergelegt (*aligned*). Hierfür wurde das Programm metAlign<sup>TM</sup> (RIKILT, Wageningen University & Research, Wageningen, Niederlande) verwendet. MetAlign<sup>TM</sup> benutzte die Originaldatensätze von Agilent, sorgte für eine zeitliche Sortierung („Alignment“) und exportierte den Datensatz im csv-Format (Lommen, 2009; Lommen, 2012). Diese sortierten Tabellen wurden zur weiteren Datenuntersuchung in SAS importiert. Die genauen metAlign<sup>TM</sup> Einstellungen, die für die Zusammenführung der Datensätze verwendet wurden, finden sich im Anhang

A3. Nach dem Import in SAS wurde die Datenmenge um diejenigen Massenfragmente reduziert, die aus der Basislinie oder den Blindwerten stammten. Zur Basislinienkorrektur wurden von allen Analysen die Blindanalysen subtrahiert. Da in den Blindanalysen auch der interne Standard enthalten war, wurde im Retentionsbereich von Benzothiazol (BSN) keine Basislinienkorrektur vorgenommen. Die Proben wurden jeweils in Blöcken (biolog. Wdh.) und Unterblöcken (techn. Wdh.) randomisiert gemessen. In jedem Unterblock wurde eine Blindprobe analysiert. Die Basislinienkorrektur erfolgte ebenfalls getrennt nach Unterblöcken, so dass die Basislinienkorrektur eines Unterblocks auf der zugehörigen Blindprobe basierte. Durch die Basislinienkorrektur wurden einige Werte leicht negativ (z.B. Basislinie der Blindprobe mit Amplitude 125, Basislinie der Probe mit Amplitude 75). Alle Werte  $< 0$  wurden auf 0 gesetzt. Falls eine Probe bei der Homogenisation aus technischen Gründen stärker verdünnt werden musste, wurden die Verdünnungsfaktoren vor der Basislinienkorrektur einberechnet.

Im Anschluss an die Basislinienkorrektur wurden die technischen Wiederholungen als arithmetisches Mittel zusammengefasst. Um die sehr große Menge an Beobachtungen weiter zu minimieren, wurde für alle Analysen ein Threshold eingerichtet. Hierdurch wurden Beobachtungen gelöscht, bei denen die Massenfragmentamplituden aller Variablen den gewählten Threshold nicht überschritten. Für die Daten des Infektionsversuches und des ersten Beprobungsjahres 2011 wurde der Threshold so eingerichtet, dass alle Beobachtungen gelöscht wurden, bei denen nicht mindestens eine Fragmentamplitude  $> 1000$  war. Im zweiten Beprobungsjahr wurden bei allen Analysen wesentlich geringere Amplitudenwerte detektiert. Daher wurden alle Beobachtungen bewertet bei denen mindestens ein Fragment mit einer Amplitude  $> 130$  detektiert wurde.

Die Standardisierung der Daten auf den internen Standard BSN wurde als weiterer Schritt in die Datenvorbereitung eingefügt. Sie wurde für jedes Entwicklungsstadium getrennt vorgenommen. Zunächst wurde der Mittelwert der BSN Amplituden über alle Daten eines Entwicklungsstadiums gebildet. Danach wurde für jede Analyse der Faktor berechnet, mit dem die einzelnen BSN Werte vom Mittelwert abwichen. Anschließend wurden die Massenfragmentamplituden des gesamten Datensatzes mit dem entsprechenden Faktor multipliziert.

### **2.8.2 Statistik**

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle folgenden statistischen Untersuchungen mit SAS durchgeführt.

#### PCA

Zur Berechnung der Hauptkomponentenanalyse (*principal components analysis - PCA*) wurden alle Massenfragmente eines Entwicklungsstadiums bzw. eines Versuchsjahrs miteinander verglichen. Über die jeweiligen Datensätze wurde durch den Befehl *proc princomp* eine PCA

berechnet. Zusätzlich erzeugte die *proc princomp* Prozedur einen Screeplot aller Eigenwerte der Hauptkomponenten. Inwiefern eine Hauptkomponente die Varianz der Proben beschrieb, wurde tabellarisch als Einzeldifferenz und kumulativ dargestellt. SAS erstellte als Ergebnis der *princomp* Prozedur eine Korrelationsmatrix inklusive der Eigenwerte der Hauptkomponenten. Die Verteilung der Eigenwerte der wichtigsten Hauptkomponenten wurden über *proc sgplot scatter* als Scatterplot erstellt. Für die Darstellung ausgewählter Gruppen im Plot wurden für die jeweiligen Gruppen Wahrscheinlichkeitsverteilung berechnet, in dem über die Datenwolke mit *proc sgplot ellipse* eine Ellipse gelegt wurde. Das Zentrum der Ellipsen bildeten die Mittelwerte der Variablen, es wurde sozusagen ein MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) Test grafisch dargestellt.

SAS berechnete die Ellipse basierend auf den Eigendekompositionen einer Kovarianzmatrix in Anlehnung an die Berechnungen einer Hauptkomponentenanalyse. Standardmäßig verwendet SAS zur Ellipsenberechnung  $\alpha = 0,05$ . Es gilt für das Konfidenzniveau  $1 - \alpha$  (Wicklin, 2014a, 2014b).

### Spearman Rangkorrelation

Für die Ermittlung der Korrelation zwischen der Konzentration flüchtiger Blattmetabolite und der Resistenz des Genotyps gegen Falschen Mehltau wurden zwei verschiedene Tests durchgeführt, der Spearman Rangkorrelationstest und der Regressionstest der partiell kleinsten Quadrate (s.u.). Da die Resistenzklassen als Ränge ermittelt wurden, wurde zunächst eine Spearman Rangkorrelation vorgenommen. Dazu wurden die Amplituden der Massenfragmente eines jeden Entwicklungsstadiums gegen die Resistenzklasse korreliert. Es wurde der Befehl *proc corr <spearman>; var bonitur; with massnumber 1 – massnumber n* verwendet, wobei „bonitur“ die Resistenzklasse angab und „massnumber 1 – massnumber n“ die Gesamtheit der einbezogenen Massenfragmente umfasste. Alle Massenfragmente, deren Korrelationskoeffizient  $\rho > 0,7$  betrug, wurden zur weiteren Betrachtung als Resistenzmarker in resistenten Genotypen verwendet. Ebenso wurden alle Massenfragmente, deren Korrelationskoeffizienten  $\rho < -0,7$  betrug, zur weiteren Verifizierung für Marker in anfälligen Genotypen untersucht. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die hochkorrelierenden Massenfragmente Teil des Substanzfragmentierungsmusters am entsprechenden Retentionszeitpunkt waren, oder ob sie dem Rauschen entstammten. Dafür wurde im Spektrum eines anfälligen Genotyps (Müller-Thurgau) und eines resistenten Genotyps (*V. labrusca* oder Concord) im Programm AMDIS 2.73 (<http://www.amdis.net>) das Massenspektrum zum passenden Retentionszeitpunkt aufgerufen und überprüft, ob die Massenzahl im Spektrum vorlag. In AMDIS wurde auch die Start- und Endzeit des Peaks nachgeschaut. Aus allen Massenfragmenten im Bereich der Retentionszeit wurde das Fragment mit der höchsten Amplitude herausgefiltert. An diesem Peak wurden die nachfolgenden Überprüfungen durchgeführt. Im Retentionsbereich wurden

alle Massenfragmente markiert, deren Korrelationskoeffizient  $\rho > 0,7$  bzw.  $\rho < -0,7$  betrug. Anschließend wurden alle Massenfragmente der Größe nach sortiert. Allgemein gilt, dass Massenfragmente, deren Anteile  $< 15\%$  des höchsten Hauptfragments betragen, nicht zur Identifizierung einer Substanz beitragen. Daher sollte zusätzlich die folgende Bedingung erfüllt werden. Von den Fragmenten, die mindestens  $15\%$  der Amplitudenhöhe des größten Massenfragments entsprachen, sollten wiederum mindestens  $60\%$  hochkorrelierende Massenfragmente sein. Nur wenn diese Bedingung erfüllt wurde, wurde ein Metabolit vorläufig als „Resistenzmarker“ eingestuft. Nachfolgend wurde ein post-hoc-Test durchgeführt, der im Anschluss an den Partial least squares Regressionstest besprochen wird.

### Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS)

Als zweites Verfahren zur Ermittlung von Korrelationen zwischen flüchtigen Metaboliten und Resistenzeigenschaften der Genotypen wurde die Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS – *partial least squares regression*) verwendet. Die SAS Prozedur verwendete *proc pls method = pls; model bonitur = massnr(1) – massnr(n)* mit einem Makro, welches von Jörg Sellmann, JKI bereitgestellt wurde. Die ausführliche Prozedur ist in den Anhängen A4 und A5 hinterlegt. Die erarbeitete Prozedur führte zwei aufeinander folgende PLS durch. Im ersten Schritt wurden die wichtigsten Massenfragmente für eine Vorhersage der Regression ermittelt. Da nach der ersten PLS noch sehr viele Massenfragmente eine hohe Gewichtung hatten, wurde anschließend mit diesen wichtigsten Massenfragmenten eine zweite PLS durchgeführt. Dadurch wurde die Datenmenge weiter auf die wichtigsten Faktoren (*variable importance for the projection = VIP* in SAS) konzentriert. Im ersten Schritt wurden alle Massenfragmente mit  $VIP_1 > 1,6$  weiter untersucht. Nach dem zweiten Schritt wurden alle Massenfragmente mit  $VIP_2 > 1,2$  betrachtet. Für die Ermittlung von Markern zur Blattposition wurden  $VIP_1 > 2,0$  und  $VIP_2 > 1,3$  verwendet. Auf diese Weise wurden je nach Analyse 27 - 936 Massenfragmente ermittelt, die in einem linearen Zusammenhang zu den Resistenzklassen standen. Für diese Massenfragmente wurden anschließend die zugehörigen Metabolite bestimmt. Es ergaben sich je nach Analyse 11 - 38 Metabolite. Im post-hoc Verfahren „*Simulate*“ wurden die ermittelten Metabolite auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen hin überprüft.

### Post-hoc-Test „*Simulate*“

Im Nachgang von Spearman Rangkorrelation und PLS Regression wurde für die ermittelten Metaboliten überprüft, ob und wo ein signifikanter Unterschied zwischen den Resistenzklassen bestand.

Zunächst wurde im Programm AMDIS für jeden Teilversuch je ein Chromatogramm eines anfälligen und eines resistenten Genotyps betrachtet. Für die Versuche zur induzierten Resistenz wurde für jeden Genotyp je ein Chromatogramm pro Behandlung verglichen. Aus beiden Chromatogrammen wurde die Start- bzw. Endzeit der Metabolitpeaks herausgesucht. In SAS wurde

anschließend in Anlehnung an die integrierte Peakfläche die Summe aller Massenfragment-Amplituden erstellt (*sum of total ions* = STI). Die STI eines Metaboliten wurden dann auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin untersucht (*proc mixed; LSMEANS <variable = „bonitur“ or „cultivar“ or „method“> /  $\alpha = 0.05$  cl adjustment = Simulate; run;*). Die ermittelten p-Werte der Gruppenvergleiche wurden generiert. Zur graphischen Verdeutlichung wurde von jedem Metabolitvergleich ein Boxplotdiagramm erstellt (*proc sgplot; vbox / extreme category = bonitur group = cultivar; run;*). In den Boxplots wurden nachträglich die Buchstabenkennung zur Unterscheidung der Signifikanz eingefügt. In Anhang A6 ist ein vollständiges Beispiel für die angewendeten Prozeduren *proc mixed* und *proc sgplot* angegeben.

### 3 Resultate

#### 3.1 Einteilung der Resistenzklassen durch den Blattscheibentest

Für die Ermittlung von Resistenzmetaboliten ist es unerlässlich, dass die verwendeten Genotypen durch einen reproduzierbaren Test nach der Stärke ihrer Resistenzeigenschaften gegen den Falschen Mehltau eingeteilt werden. Hierfür eignet sich ein Blattscheibentest mit festgelegter Infektionsstärke. Je mehr Sporangienträger am Ende der Prüfzeit (9 dpi) gebildet wurden, um so anfälliger ist ein Genotyp gegenüber *P. viticola*.

Tabelle 9: Resistenzklassen der verwendeten Genotypen. BS1 - BS8: Anzahl der getesteten Blattscheiben 1 - 4, MW: arithmetischer Mittelwert, Klasse: Resistenzklasse, /: keine auswertbare Blattscheibe.

Genotyp	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	MW	Klasse
Müller-Thurgau	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Riesling	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Regent	3	3	3	1	3	1	3	1	2,25	3
Phoenix	1	3	3	3	/	/	/	/	2,5	3
Delaware	3	3	3	3	/	/	/	/	3	3
<i>V. riparia</i>	7	7	5	7	/	/	/	/	6,5	7
Blaue Isabella	5	5	5	7	7	9	9	9	7	7
<i>V. labrusca</i>	9	9	9	9	/	/	/	/	9	9
Concord	9	9	9	9	/	/	/	/	9	9

Wie erwartet stellten die *V. vinifera* Sorten Müller-Thurgau und Riesling die anfälligste Klasse dar (Klasse 1). Die beiden pilzwiderstandsfähigen Züchtungen mit *V. vinifera* Status Regent und Phoenix fanden sich - ebenfalls wie erwartet - in Klasse 3 wieder. *V. labrusca* und die



Hybridsorte Concord sind die beiden resistentesten Genotypen in der Untersuchung, bei denen bei der Auswertung keine Sporenträger vorlagen. Abweichend von den Erwartungen und den vorherigen empirischen Einteilungen wurden die beiden Hybriden Delaware und Blaue Isabella nicht in Resistenzklasse 5 eingeordnet. Delaware wurde durch diesen Test in die Resistenzklasse 3 zu den pilzwiderstandsfähigen Züchtungen Regent und Phoenix klassiert. Wohingegen Blaue Isabella stärkere Resistenzeigenschaften zeigte und zusammen mit *V. riparia* zur Resistenzklasse 7 gehörte (s. Tabelle 9).

#### **3.2 Kalibrierung zur Ermittlung der Retentionsindices**

Für die Ermittlung der Retentionsindices aller detektierten Analyten wurden regelmäßige Kalibrierungen vorgenommen. Hierzu wurden unverzweigte gesättigte Alkanstandards gemessen. Die Alkanstandards wurden sowohl mittels SPME als auch durch direkte Flüssiginjektion analysiert. Durch die Flüssiginjektion wurde die Detektion der Alkane C20 - C28 (Eicocosan, Tetracosan und Octacosan) verbessert, da diese Alkane nur schlecht an der PDMS Faser adsorbiert wurden. Die kurzen Ketten C5 + C8 (Pentan und Octan) wurden bei der Flüssiginjektion häufig vom Lösemittelpeak überlagert, daher erfolgte hier die zuverlässigere Detektion über SPME (Tabelle 10 und Tabelle 11).

Die Auftragung der Retentionszeiten zeigte, dass das Analysensystem über die drei Messjahre hinweg äußerst stabil war (Abb. 9).

Die Regression aller Retentionszeiten der Alkane ab einer Kettenlänge von C10 (Decan) zeigte eine lineare Abhängigkeit der Retentionszeit ( $R = 0,99$ ) sowohl für die SPME als auch die Flüssiginjektion (Abb. 10). Aufgrund der sehr guten Übereinstimmung der Messungen mittels SPME und Flüssiginjektion wurden für die RI Berechnung aller Analyten mit einer Retentionszeit im Bereich der C20 - C28 Alkanstandards die Retentionszeiten aus der Flüssiginjektion verwendet und für alle anderen Analyten wurden die Werte aus den SPME Messungen verwendet. Zur Berechnung der Retentionsindices der Blattmetabolite wurde die oben beschriebene Formel (Formel 2, S. 31) angewendet.

### 3 Resultate

Tabelle 10: Retentionszeiten der Alkanstandards für die Messjahre 2011 und 2012. Vergleich der Retentionszeiten aus SPME und Flüssiginjektion (LI) und Differenz  $\Delta$  der jeweils beiden Injektionen. Angabe in Minuten [min].

Alkankette	SPME 06/11	LI 06/11	$\Delta$ 06/11	SPME 04/12	LI 04/12	$\Delta$ 04/12
5	1,572	/	/	/	/	/
8	2,518	2,407	0,111	/	/	/
9	3,806	3,653	0,153	3,800	3,660	0,140
10	6,384	6,269	0,115	6,360	6,270	0,090
11	10,235	10,180	0,055	10,200	10,190	0,010
12	14,785	14,786	-0,001	14,750	14,790	-0,040
14	23,823	23,887	-0,064	23,760	23,890	-0,130
15	28,085	28,161	-0,076	28,000	28,160	-0,160
16	32,168	32,281	-0,113	32,100	32,280	-0,180
17	36,053	36,136	-0,083	35,980	36,140	-0,160
18	39,739	39,807	-0,068	39,680	39,810	-0,130
20	/	46,704	/	46,710	46,430	/
24	/	58,859	/	58,860	58,370	/
28	/	75,744	/	/	/	/

Tabelle 11: Retentionszeiten der Alkanstandards für das Messjahr 2013. Vergleich der Retentionszeiten aus SPME und LI Injektion und Differenz  $\Delta$  der jeweils beiden Injektionen. Angabe in Minuten [min].

Alkankette	SPME 06/13	LI 06/13	$\Delta$ 06/13	SPME 10/13	LI 10/13	$\Delta$ 10/13
5	1,590	/	/	1,538	/	/
8	/	2,351	/	2,500	2,351	0,149
9	3,760	3,585	0,175	3,712	3,582	0,130
10	6,300	6,166	0,134	6,257	6,157	0,100
11	10,120	10,064	0,056	10,089	10,041	0,048
12	14,770	14,626	0,144	14,647	14,622	0,025
14	23,720	23,737	-0,017	23,651	23,734	-0,083
15	27,940	28,021	-0,081	27,902	28,011	-0,109
16	32,010	32,126	-0,116	31,981	32,139	-0,158
17	35,880	35,998	-0,118	35,862	35,990	-0,128
18	39,580	39,685	-0,105	/	39,669	/
20	/	46,589	/	/	46,569	/
24	/	58,753	/	/	58,739	/
28	/	75,411	/	/	75,381	/

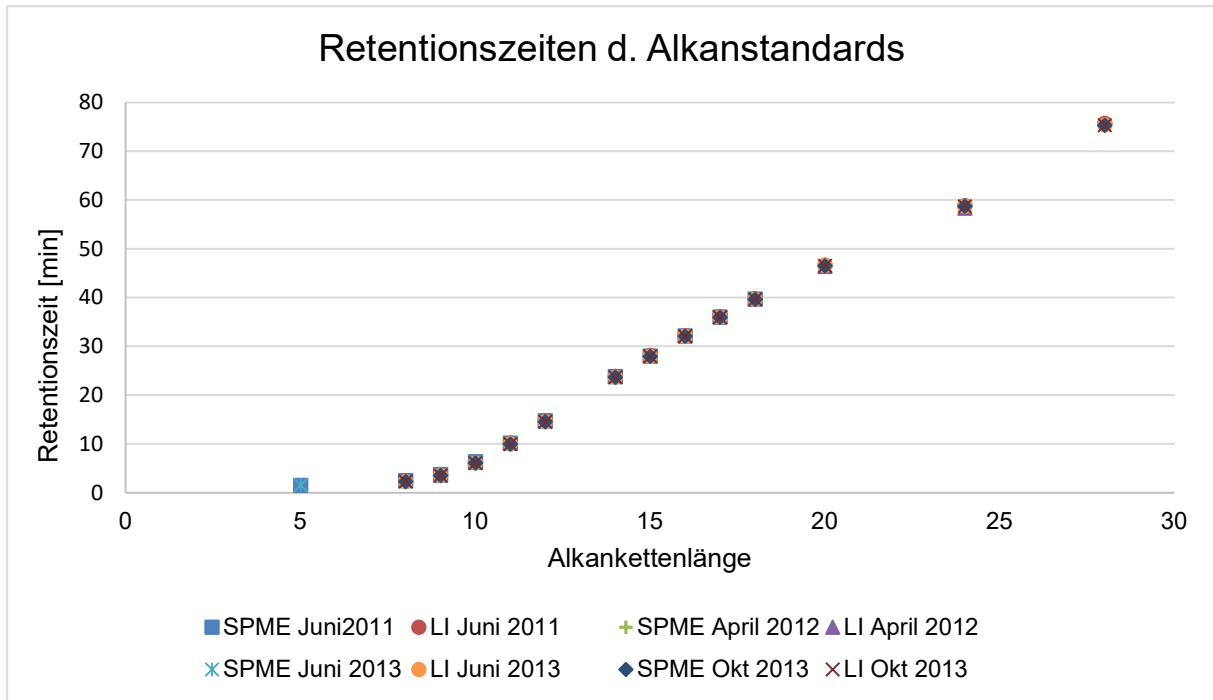


Abb. 9: Retentionszeiten der Alkanstandards im Zeitraum Juni 2011 – Oktober 2013. Retentionszeiten der verschiedenen Injektionssysteme LI: Flüssiginjektion, SPME: Injektion mittels *Headspace-solid phase microextraction*

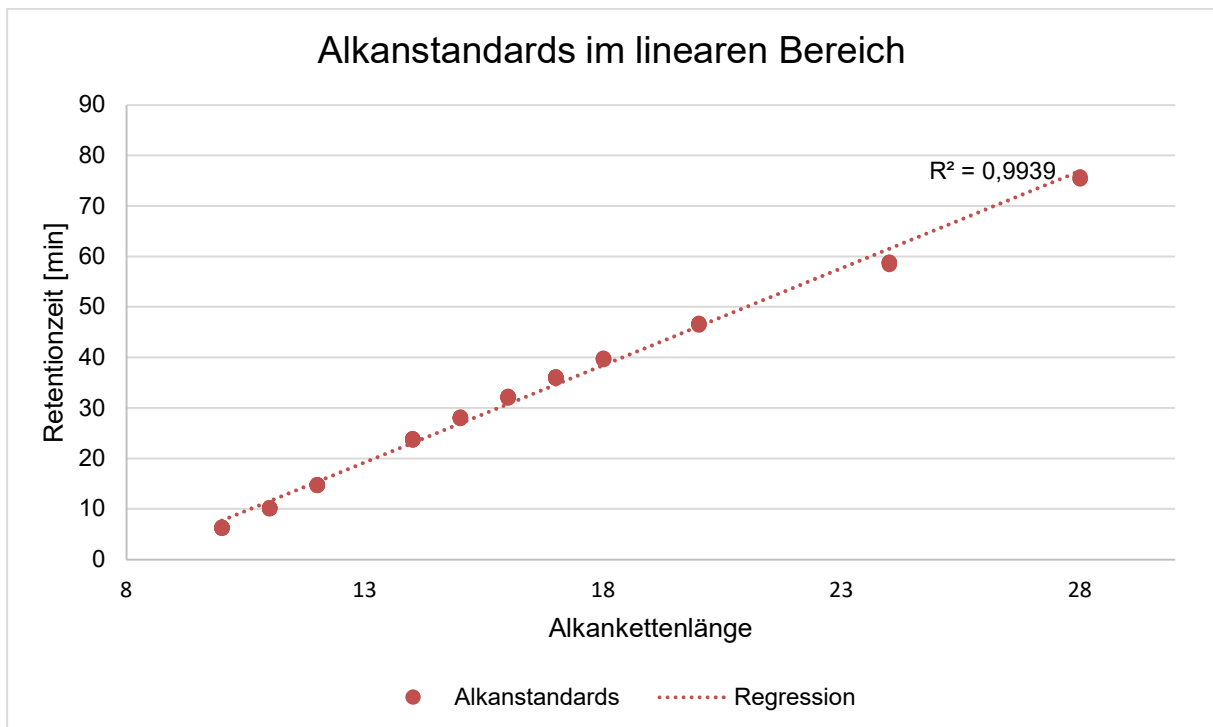


Abb. 10: Retentionszeit der Alkanstandards im linearen Bereich. Alle Werte aus Tabelle 10 und Tabelle 11 ab einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen.

### 3.3 Konstitutive Marker (Freilandproben)

Die konstitutiven Marker zur Resistenz oder Blattposition wurden aus Rebenblättern von Freilandpflanzen ermittelt. In zwei aufeinanderfolgenden Jahren (2011 und 2012) wurden die Genotypen unterschiedlicher Resistenzklassen zu jeweils drei Terminen gesammelt. Dabei wurde jeweils ein Probetermin um die Blüte, während der Traubenreife und um die Erntezeit gewählt. Dabei ergaben sich für das Jahr 2011 insgesamt 363 GC-MS Analysen. Im zweiten Versuchsjahr wurden vier statt drei biologische Wiederholungen durchgeführt, daher belief sich die Gesamtanalysezahl auf 469 GC-MS Analysen. Die GC-MS Analysen aller biologischen und technischen Wiederholungen eines Erntetermins oder Jahrgangs wurden mit dem Programm MetAlign zusammengefügt. Es ergaben sich in den MetAlign-Datensätzen für die im Freiland erhobenen einzelnen Probetermine 95 786 – 277 345 Massenfragmente (Beobachtungen). Diese große Anzahl an Beobachtungen wurde zur statistischen Ermittlung der Resistenzmarker verwendet. D.h. eine sehr große Anzahl an korrelierenden Beobachtungen musste gegen eine sehr viel kleinere Anzahl an Variablen (vier Resistenzklassen bzw. zehn Genotypen) verrechnet werden. Daher wurde auf sehr robuste Verfahren, wie die Spearman Rangkorrelation oder die Regression der partiell kleinsten Quadrate zurückgegriffen.

Pro Probetermin traten zwischen 23 - 145 Substanzen in einer Analyse auf. Insgesamt wurden 609 Substanzen detektiert. Davon wurden 137 Substanzen über die Datenbankvergleiche (NIST) und weitere 45 Substanzen zusätzlich über Literaturabgleiche vorläufig identifiziert (siehe auch Liste aller Substanzen im Anhang A1).

Eine vollständige Identifizierung von 65 Substanzen wurde über die Vergleiche der Retentionsindices und Massenspektren von koeluierten Referenzsubstanzen erzielt. Für vier Substanzen konnte die vorläufige Identifizierung nicht bestätigt werden, da die Retentionsindices deutlich von denen der Referenzsubstanzen abwichen (siehe Liste der Referenzsubstanzen im Anhang A2).

Im weiteren Verlauf der Auswertung wurden zwei Isomere von Theaspiran wichtig. Zur Identifizierung stand als Referenz ein Isomerengemisch aus (+/-) - Theaspiran zur Verfügung. Die beiden Isomere stimmten mit Retentionsindex und Massenfragmentierung exakt mit den Metaboliten der Blätter überein. Aus dem Isomerengemisch kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, welches Isomer + oder – Chiralität besitzt. Auch gibt es sowohl am C2 als auch am C5 ein Chiralitätszentrum, so dass insgesamt vier Theaspiran-Isomere möglich sind (Abb. 11). Wenn in der Literatur (Binder, 1990; Joichi, 2005; Schmidt, 1992; Winterhalter, 1988) oder auf Suchportalen (NIST, PubMed, Pherobase, ChemSub online oder Chem SRC) überhaupt Angaben zur Stereoisomerie von Theaspiran A und B gemacht werden, dann sind diese unvollständig oder teilweise widersprüchlich. ChemSub online (<http://chemsub.online.fr/> Stand 01.02.2021) definiert (±)-Theaspiran A als das (2S,5S)-Isomer und (±)-Theaspiran B wird als

das (2R, 5S)-Isomer betitelt. Es kann nur vermutet werden, dass diese Zuordnung ohne die Angabe der optischen Aktivität stimmen mag. Eine eindeutige Identifizierung der auftretenden Isomere war daher nicht möglich. Dennoch wurde zur besseren Verständlichkeit im Text eine genaue Bezeichnung für die Isomere verwendet, die sich auf die Isomeren Benennung nach Joichi (2005) bezog und auch durch NIST so angegeben wurde. Joichi et al. (2005) analysierten ebenfalls auf einer HP INNOWax Säule, wobei zuerst Theaspiran A und dann Theaspiran B eluiert wurde. Beide Isomerendaten aus der Literatur haben eine sehr gute RI Übereinstimmung zu den hier detektierten Theaspiran-Isomeren. Allerdings verwendeten die Autoren keine Referenzsubstanzen zur eindeutigen Bestimmung der Isomere, so dass nicht bestimmt werden könnte, um welches der vier Isomere es sich genau handelt.

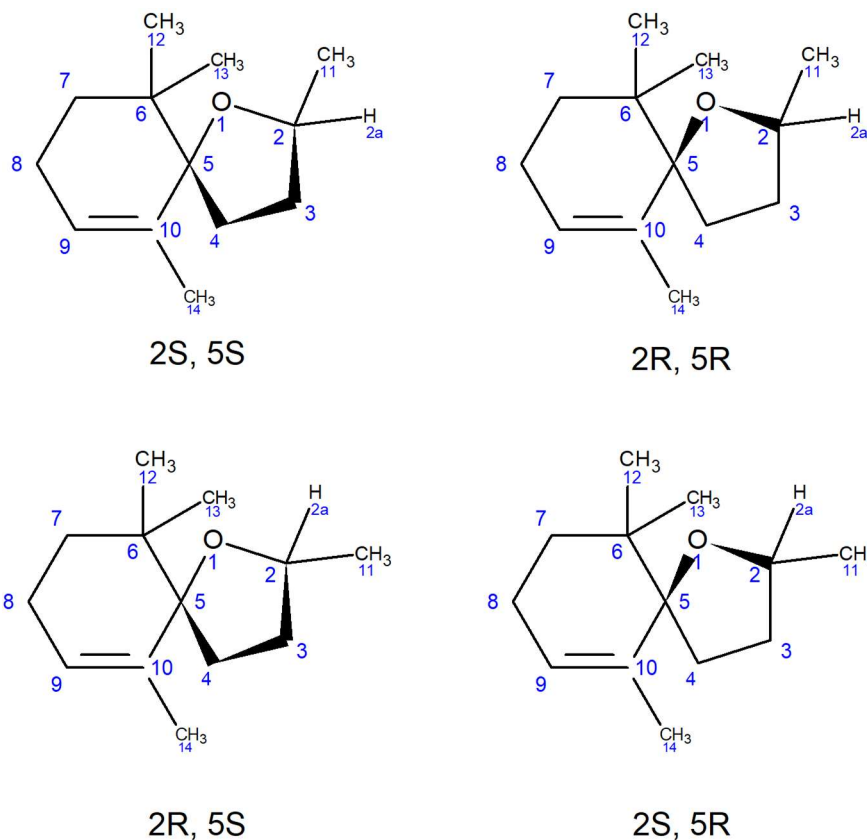


Abb. 11: Theaspiran Stereoisomere. Durch die zwei Chiralitätszentren an C2 und C5 ergeben sich vier Isomere nach Schmidt (1992).

In den nachfolgenden Kapiteln wird nun zunächst der Einfluss der Blattposition auf das Metabolitprofil besprochen und anschließend werden die Resistenzmarker, die bei den verschiedenen Entwicklungsstadien auftraten, miteinander verglichen.

### 3.3.1 Blattposition

Das Ziel des Projekts, in dem diese Arbeit angegliedert war, bestand darin, aus Rebenblättern resistenter Sorten oder Arten Extrakte mit phytoprotektiver Wirkung herzustellen. In diesem Zusammenhang wurde das Metabolitmuster der Blätter während des ersten Versuchsjahres im Entwicklungsstadium BBCH8 in Abhängigkeit von der Blattposition untersucht. Es sollte überprüft werden, ob der ontogenetische Effekt für eine spätere Extraktherstellung berücksichtigt werden sollte.

*Die Unterscheidung der apikalen und basalen Blattprofile beruht vor allem auf den Blattprofilen von anfälligen Reben.*

Zunächst wurde über den Scatterplot einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) veranschaulicht, ob sich die Metabolitmuster von Blättern aufgrund ihres Alters bzw. ihrer Blattposition unterschieden. Die Eigenwerte der ersten beiden Hauptkomponenten erklärten 76,24 % der Varianz aller Proben (Tabelle 12). In Abb. 12 ist die PCA zum ontogenetischen Effekt dargestellt. Das Konfidenzlevel für die Ellipsenberechnung betrug  $\alpha = 0,15$ . Das Metabolitprofil von apikalen und basalen Blättern unterschied sich deutlich voneinander (Abb. 12 I). Die Gruppe der medialen Blätter war nicht von der Gruppe der basalen Blattprofile zu unterscheiden und die Konfidenzellipse ragte auch in den Bereich der apikalen Blätter hinein. Dieser Effekt war zu erwarten, da im medialen Blattbereich der Übergang zwischen den älteren basalen und den jüngeren apikalen Blättern lagen und sich das Metabolitprofil generell in einem fließenden Verlauf ändert. Ein genauerer Blick auf die Gruppe der apikalen Blattprofile zeigte, dass sich die Profile der anfälligen Genotypen stärker von den restlichen Profilen unterschieden. Daher sind in Abb. 12 II und III jeweils nur die anfälligen bzw. resistenten Genotypen aufgetragen. Die schmalen Ellipsen für die apikalen und medialen Gruppen der anfälligen Reben (E) zeigten, dass die Korrelation von PC1 und PC2 zueinander groß war (Abb. 12 II). Die Konfidenzintervalle der apikalen, medialen und basalen Blattprofile von resistenten Genotypen überlagerten sich jedoch vollständig. Zudem waren die Ellipsen um die Gruppen der resistenten Genotypen wesentlich runder, was normalerweise auf eine höhere Varianz zwischen den Proben hindeutet. In diesem Fall könnte jedoch auch die sehr kleine Probenmenge ausschlaggebend für die große Ellipse sein, insbesondere für die Konfidenzellipse der resistenten apikalen Blattprofile. Dies ist durch die Berechnungsannahmen von Konfidenzellipsen bei sehr kleinen Probenmengen häufig der Fall. Die Unterscheidung der apikalen und basalen Blattprofile wie sie in Abb. 12 I sichtbar ist, beruht demnach vor allem auf den Blattprofilen von anfälligen Reben.

Daher wurden im Folgenden über PLS Analysen mit anschließenden *Simulate*-Tests die Biomarker für den ontogenetischen Effekt identifiziert. Zur Frage, ob Resistenzmarker in den Blattpositionen unterschiedlich konzentriert waren, siehe Absatz 3.3.8 S. 104.

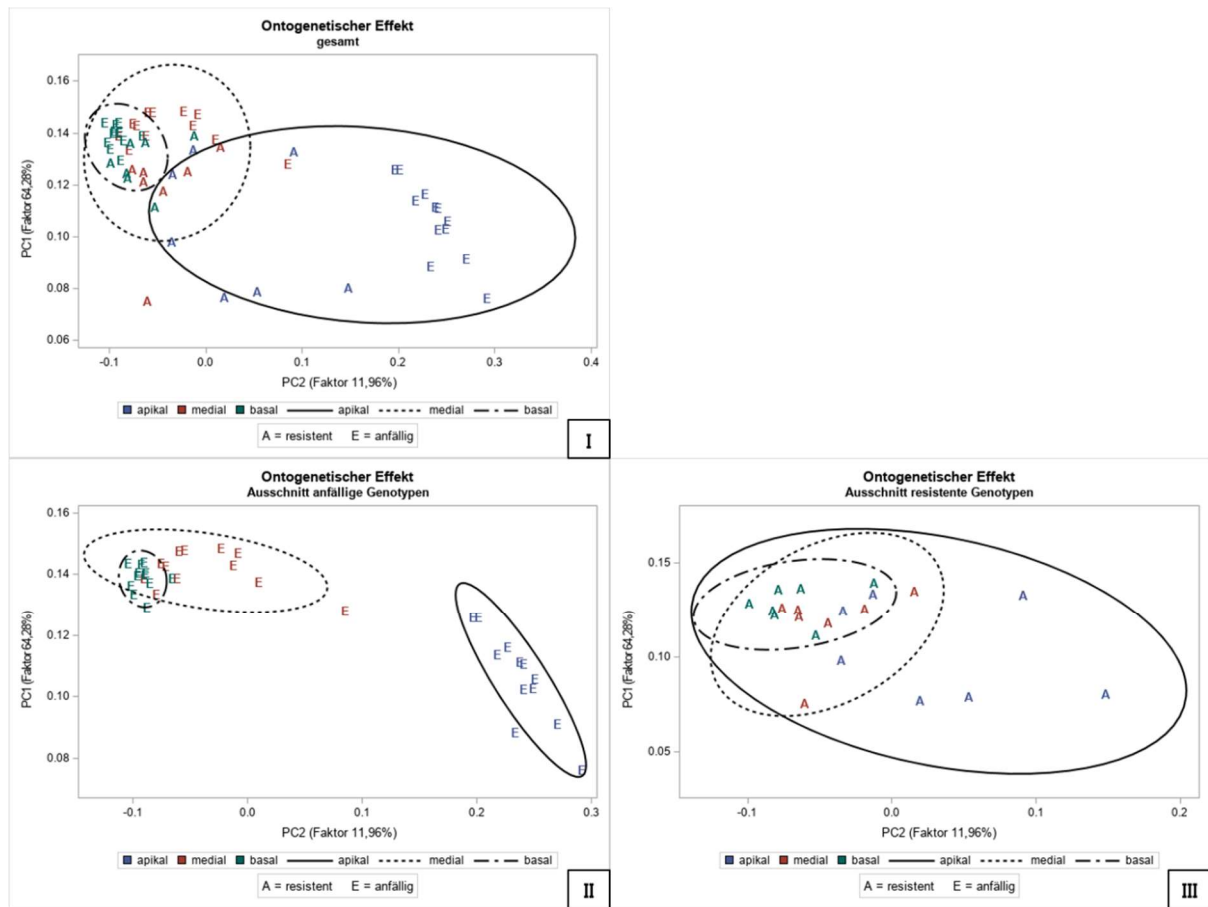


Abb. 12: Hauptkomponenten Analyse (PCA) bzgl. des ontogenetischen Effekts auf das Metabolitmuster von Rebenblättern. Ellipsen geben den Bereich der Blattgruppen mit Konfidenzlevel  $\alpha = 0,15$  an. I: alle biologischen Wiederholungen sind dargestellt; II: Nur Genotypen der anfälligen Resistenzklassen 1 und 3. (Teildarstellung des PCA Scatterplots); III: Nur Genotypen der resistenten Resistenzklassen 7 und 9. (Teildarstellung des PCA Scatterplots); E = anfällige Genotypen (*Vitis vinifera*); A = resistente Genotypen *V. labrusca*, *V. riparia* und Hybride; PC1 = Hauptkomponente 1; PC2 Hauptkomponente 2.

Tabelle 12: Eigenwerte der Korrelationsmatrix bei der PCA des ontogenetischen Effekts in BBCH8 1.VJ. Angezeigt sind die Eigenwerte der Hauptkomponenten bis der kumulative Anteil der Varianzerklärung die 95 % Hürde erreicht. Berechnung über *proc princomp*.

Hauptkomponente	Eigenwert	Proportion	Kumulativ
1	40,4990497	0,6428	0,6428
2	7,5340633	0,1196	0,7624
3	5,4245343	0,0861	0,8485
4	1,7130747	0,0272	0,8757
5	1,4071276	0,0223	0,8981
6	1,2175776	0,0193	0,9174
7	0,8763911	0,0139	0,9313
8	0,7263203	0,0115	0,9428
9	0,6657733	0,0106	0,9534

#### Blattpositionsmarker in *V. vinifera*

Zunächst wurden die Unterschiede der Blattpositionen in den anfälligen *V. vinifera* Kultivaren Müller-Thurgau, Riesling, Phoenix und Regent untersucht, da sich die Metabolitmuster ihrer apikalen Blätter am deutlichsten von allen andern Proben unterschieden. Anschließend wurden alle anderen Genotypen auf Unterschiede zwischen den Blattpositionen hin untersucht.

Über PLS wurde ermittelt, welche Metabolite hauptsächlich für den Unterschied zwischen basalen und apikalen Blättern verantwortlich waren. In dem verwendeten statistischen Verfahren wurden zwei PLS hintereinander durchgeführt. Nach der ersten Prozedur wurden alle VIP > 1,6 für eine zweite PLS verwendet. Bei der darauffolgenden PLS wurden alle VIP > 1,25 näher betrachtet. So wurden bei den Analysen der anfälligen Genotypen 65 VIPs bzw. 65 Massenfragmente erhalten, die diesen Kriterien entsprachen.

Für alle 65 Massenfragmente wurden die zugehörigen Blattmetabolite ermittelt, indem in den Datensätzen von Riesling apikal und Riesling basal das vollständige Massenspektrum am entsprechenden Retentionszeitpunkt bestimmt wurde. Die beiden Riesling Datensätze wurden zufällig ausgewählt. In einigen wenigen Fällen wurde bei der Retentionszeit eines Massenfragments kein Metabolit in den beiden Riesling-Analysen detektiert, dann wurde das Massenspektrum einer Analyse von Phoenix apikal betrachtet.

Die durch PLS ermittelten 65 Massenfragmente führten zu 19 Metaboliten, für die jeweils die STI (*sum of total ions*) bestimmt wurde. Der anschließend durchgeführte *Simulate*-Test über die STI der Metabolite bestätigte für 17 Metabolite (2-Ethylfuran, Hexanal, Geraniumoxid, d-Limonen, Sulcaton, Theaspiran B, Linalool, Octanol,  $\alpha$ -Terpineol,  $\alpha$ -Santalol, Methylsalicyl-

---

*In den anfälligen *V. vinifera* wurden 19 Metabolite als Blattpositionsmarker identifiziert. Bis auf Megastigmatrienon lagen alle Metabolite in den apikalen Blättern in höherer Konzentration vor als in basalen Blättern*

---

säure, Nerol, Geraniol, Megastigmatrienon und den drei unbekannt Substanzen u19,02, u29,78, und u30,19<sup>3</sup>) signifikante Unterschiede zwischen apikaler und basaler Blattposition in den vier anfälligen *V. vinifera* Genotypen (Tabelle 13). Zwei Metabolite zeigten zwar in einzelnen Genotypen signifikante Unterschiede zwischen den Blattpositionen, jedoch lagen die p-Werte für die

kombinierte Betrachtung der vier *V. vinifera* Kultivare oberhalb der Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ . Daher wurden sie nicht weiter als Marker für die Blattposition von *V. vinifera* in Betracht gezogen.

---

<sup>3</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7



Megastigmatrienon ist unter den 17 Metaboliten die einzige Substanz, die in basalen Blättern mit höherer STI vorliegt als in apikalen Blattproben. Für alle anderen 16 Substanzen gilt dies in umgekehrter Weise, sie wurden in apikalen Blättern in höherer Konzentration als in basaler Blattposition detektiert. In Abb. 13 S. 45 sind hierzu die Boxplots der Amplitudenhöhen von Megastigmatrienon im Vergleich zu Linalool gezeigt. Am Beispiel von Linalool soll das Verhalten der 16 Metabolite demonstriert werden, die in apikalen Blättern in höherer Konzentration vorlagen. Wie bereits durch die PCA festgestellt wurde, unterschieden sich die Amplitudenhöhen von apikalen Blättern signifikant von anderen Blattpositionen. Die detektierten Amplitudenhöhen in medialen und basalen Blattpositionen unterschieden sich nicht.

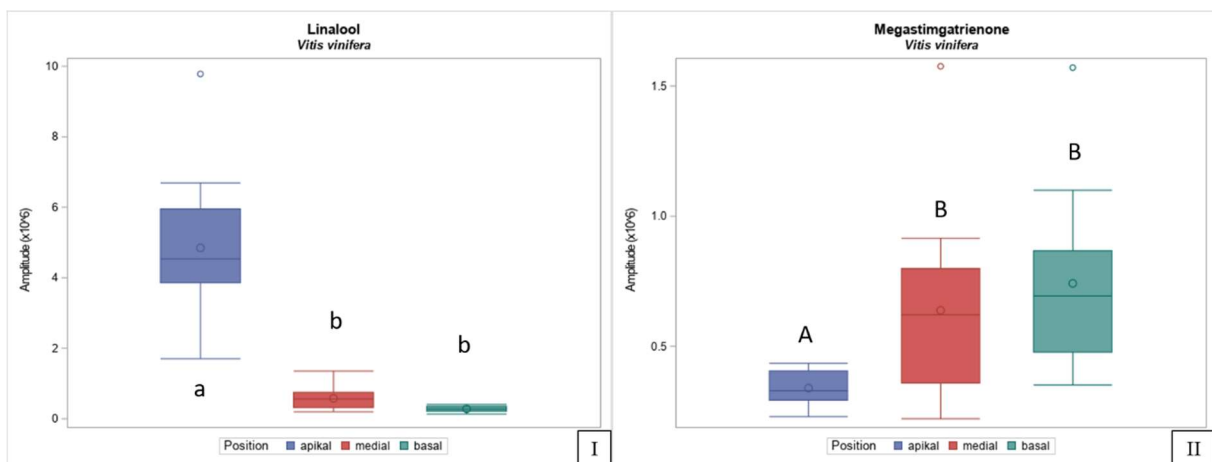


Abb. 13: Linalool und Megastigmatrienon in den Blattpositionen von *V. vinifera*. I) Linalool, II) Megastigmatrienon. Die Amplitudenhöhen beider Metabolite in apikalen Blättern sind signifikant verschieden zur Amplitudenhöhe in medialen oder basalen Blättern.

### Blattpositionsmarker in Wildtyp und Hybridreben

Zur Bestimmung der Unterschiede in den Blattpositionen von Wild- und Hybridreben lagen Analysen der folgenden Genotypen vor: *Vitis labrusca*, *Vitis riparia* Akzession 76-50-1, *Vitis riparia* Akzession 76-49-22, Concord, Blaue Isabella und Delaware. Durch eine zweifache PLS wurden die für die Trennung von apikalen und basalen Blattprofilen wichtigsten Massenfragmente ermittelt. Hierbei wurden die gleichen Grenzwerte wie bei der Anwendung auf *V. vinifera* Genotypen benutzt. Für den zweiten PLS Durchlauf wurden alle Massenfragmente mit  $VIP > 1,6$  verwendet und anschließend alle Fragmentierungen mit  $VIP > 1,25$  zur Ermittlung der wichtigsten Metabolite benutzt. Es ergaben sich 142 Massenfragmente, die zu 23 verschiedenen Metabolitspektren gehörten (Tabelle 13). Für die Ermittlung der Metabolite wurden wieder zufällig zwei GC-MS Datensätze ausgewählt (*V. riparia*

*Fünf Metabolite wurden in den Wild- und Hybridgenotypen als Blattmarker identifiziert. Alle hatten ihr Konzentrationsmaximum in apikalen Blättern.*

Akzession 76-49-22 apikal und basal). Wenn in den beiden Akzessionen zur Retentionszeit eines Massenfragments kein Metabolit detektiert wurde, wurde auf die Datensätze von Blauer Isabella basal oder apikal bzw. *V. riparia* Akzession 76-50-1 apikal oder basal für die Metabolitbestimmung zugegriffen. Die 23 Metabolite wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den apikalen und basalen Blattprofilen mit dem *Simulate*-Test überprüft. Fünf Substanzen (Hexanal, (*E*)-2-Pentenal, (*Z*)-2-(2-Pentenyl)furan, Methylsalicylsäure und die unbekannte Substanz u45,16<sup>4</sup>) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den apikalen und basalen Blattprofilen der Wild- und Hybridreben (Tabelle 13). Davon waren Hexanal und Methylsalicylsäure auch bereits Marker bei der Unterscheidung der Blattposition von *V. vinifera* Genotypen (Abb. 14). Alle fünf Metabolite wurden in den apikalen Blättern in höherer Konzentration detektiert.

*Insgesamt wurden 20 Blattpositionsmarker detektiert. Davon 17 in V. vinifera. MeSA und Hexanal traten in resistenten und anfälligen Genotypen als Blattpositionsmarker auf.*

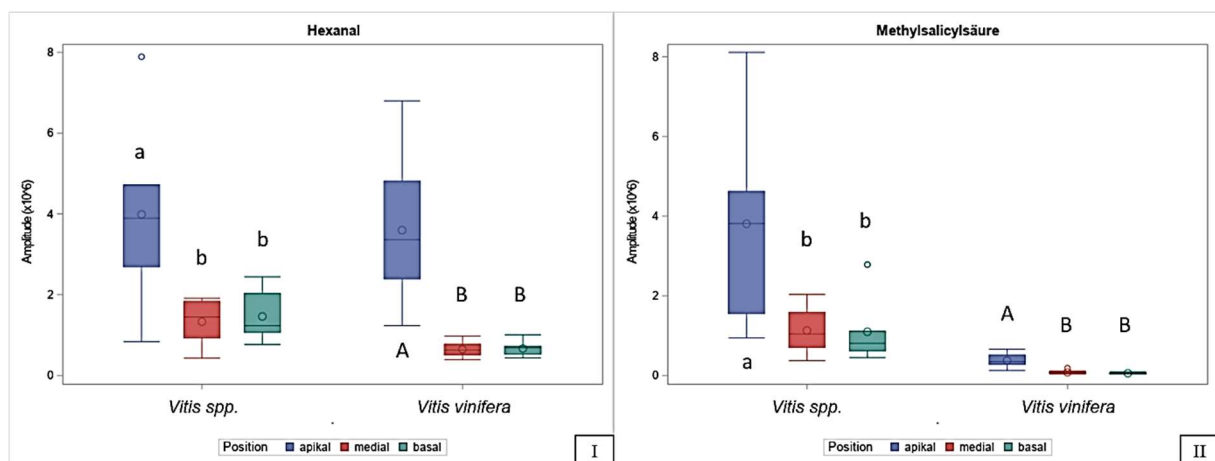


Abb. 14: Hexanal und Methylsalicylsäure in den Blattpositionen von *V. vinifera* und der Gruppe der Hybrid- und Wildreben (*Vitis spp.*). I) Hexanal, II) Methylsalicylsäure. Die Amplitudenhöhen beider Metabolite in apikalen Blättern sind signifikant verschieden zur Amplitudenhöhe in medialen oder basalen Blättern. Der Signifikanzunterschied in beiden Grafiken wird durch die Buchstaben a,b bzw. A,B angegeben. Wobei an dieser Stelle die Vergleiche innerhalb der Testgruppen *V. vinifera* und *Vitis spp.* vorgenommen wurden. Die Vergleiche zwischen den verschiedenen Resistenzklassen werden in den nachfolgenden Kapiteln besprochen.

<sup>4</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

### 3.3 Konstitutive Marker (Freilandproben)

Tabelle 13: Blattpositionsmarker in anfälligen *V. vinifera* Kultivaren und resistente(re)n Hybrid- und Wildreben. Angegeben sind die p-Werte, CAS-Nr. und der Identifikationsgrad. /) nicht getestet, a) vollständige Identifikation über NIST Datenbank und Referenzsubstanz, b) Identifikation über NIST Datenbank c) Identifikation über NIST Datenbank und Literatur mit Angabe der Trennsäule, d) nicht identifiziert

Metabolit	CAS	p-Wert anfällig	p-Wert resistent
Benzaldehyd	100-52-7	/	0,0810
p-Cymenen	1195-32-0	/	0,6434
3,4-Dehydro-ar-ionone (TDN)	1203-08-3	/	0,9743
2-Ethylfuran	3208-16-0	<b>&lt;0,0001</b>	0,9991
Geraniol	106-24-1	<b>&lt;0,0001</b>	/
Geraniumoxid	7392-19-0	<b>0,0004</b>	/
( <i>E,E</i> )-2,4-Hexadienal	142-83-6	/	0,4614
Hexanal	66-25-1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0226</b>
Hexanol	111-27-3	/	0,3885
( <i>E</i> )-2-Hexenal	6728-26-3	/	0,8273
( <i>Z</i> )-3-Hexenal	6789-80-6	/	0,7651
D-Limonen	5989-27-5	<b>&lt;0,0001</b>	0,2290
Linalool	78-70-6	<b>&lt;0,0001</b>	/
Megastigmatrienon	38818-55-2	<b>0,0057</b>	/
Methylsalicylsäure	119-36-8	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0269</b>
β-Myrcen	123-35-3	/	0,0796
Nerol	106-25-2	<b>&lt;0,0001</b>	/
1-Octanol	111-87-5	<b>&lt;0,0001</b>	/
( <i>E</i> )-2-Pentenal	1576-87-0	/	<b>0,0226</b>
( <i>Z</i> )-2-(2-Pentenyl)furan	70424-13-4	/	<b>0,0006</b>
α-Santalol	11031-45-1	<b>&lt;0,0001</b>	0,2406
Sulcaton	110-93-0	<b>&lt;0,0001</b>	0,7966
α-Terpineol	98-55-5	<b>&lt;0,0001</b>	/
Theaspiran B	36431-72-8	<b>0,0105</b>	/
u15,19		/	0,9960
u19,02		<b>&lt;0,0001</b>	/
u20,91		/	0,5402
u25,27		/	0,1468
u29,78		<b>0,0027</b>	/
u30,19		<b>&lt;0,0001</b>	/
u35,90		0,1949	/

Metabolit	CAS	p-Wert anfällig	p-Wert resistent
u39,19		/	0,0627
u44,49		0,3651	/
u45,16		/	<b>0,0245</b>
u46,84		/	0,9973
u48,38		/	0,1375

Da die Analyse der einzelnen Blattpositionen zeigte, dass das Metabolitmuster von anfälligen Reben stark beeinflusst wurde, das Muster der resistenteren Hybrid- und Wildreben jedoch wesentlich geringere Unterschiede zwischen den Blattpositionen zeigte, wurde im nächsten Schritt eine Hauptkomponentenanalyse über die zusammengeführten Blattpositionen eines jeden Kultivars durchgeführt. Dazu wurden jeweils eine apikale, mediale und basale Probe zu einer „Gesamtprobe“ zusammengefasst. Der Scatterplot der PCA über die Gesamtheit der Blätter wurde in Abb. 15 dargestellt, Eigenwerte sind in Tabelle 14 angegeben. Für die Darstellung der Gruppen wurde zur Erstellung der Konfidenzellipsen ein Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,15$  verwendet. Die Eigenwerte der ersten beiden Hauptkomponenten (Tabelle 14) spiegelten 88,08 % der Varianz wider. Es zeigte sich, dass das Metabolitmuster von *V. vinifera* Kultivaren einen engen Cluster bildeten, der sich deutlich von den Metabolitmustern der Hybrid und Wildreben unterschied. Der Einfluss des apikalen Blattmusters von *V. vinifera* bewirkte diese deutliche Abtrennung. Die Datenpunkte der Gruppe *Vitis spp.* liegen weiter auseinander. Die Gruppe ist inhomogener. Die beiden Datenpunkte in der Mitte (gekennzeichnet mit ➡) bilden die Metabolitmuster von Delaware und *Vitis riparia* Akzession 76-50-1 ab. *V. riparia* Akzession 76-49-22 befindet sich zusammen mit den Hybriden Blaue Isabella und Concord sowie der *V. labrusca* Rebe im rechten Teil der roten Ellipse. Um zu verifizieren, ob es sich hier tatsächlich um einen gemeinsamen oder zwei getrennte Cluster handelt, wäre mindestens eine größere Anzahl an biologischen Wiederholungen, wenn nicht sogar die Analyse zusätzlicher Kultivare nötig gewesen. Zu diesem Zeitpunkt der Probenahme konnten jedoch keine weiteren Blattproben gesammelt werden, ohne die Pflanzen der Genbank am JKI vollständig zu entlauben und dadurch ein Absterben der Pflanzen zu riskieren.

---

*Der Einfluss der Genotypen auf das Blattmetabolom ist wichtiger als der ontogenetische Effekt.*

---

Die Auswertung der einzelnen Blattpositionen und der vereinten „Gesamtproben“ zeigten, dass der Einfluss der Genotypen auf das Blattmetabolom bedeutender ist als der ontogenetische Effekt. Zumal die resistenten Genotypen nicht anhand ihrer Blattmetabolite in unterschiedliche Blattpositionen eingeteilt werden

konnten. Für eine angedachte Herstellung phytoprotektiver Extrakte aus resistenten Genotypen spielt die Blattposition demnach eine untergeordnete Rolle.

Für die Ermittlung von Resistenzmarker wurden daher Mischproben über alle Blattpositionen verwendet. Dazu wurde bereits bei der Blattbeprobung eine Mischprobe aus allen Blattpositionen erstellt. Zusätzliche wurde dadurch die zeitaufwändige Probenahme der Blätter deutlich vereinfacht und gleichzeitig führte dies zu einer größeren verfügbaren Blattmenge, die für biologische Wiederholungen verwendet werden konnte.

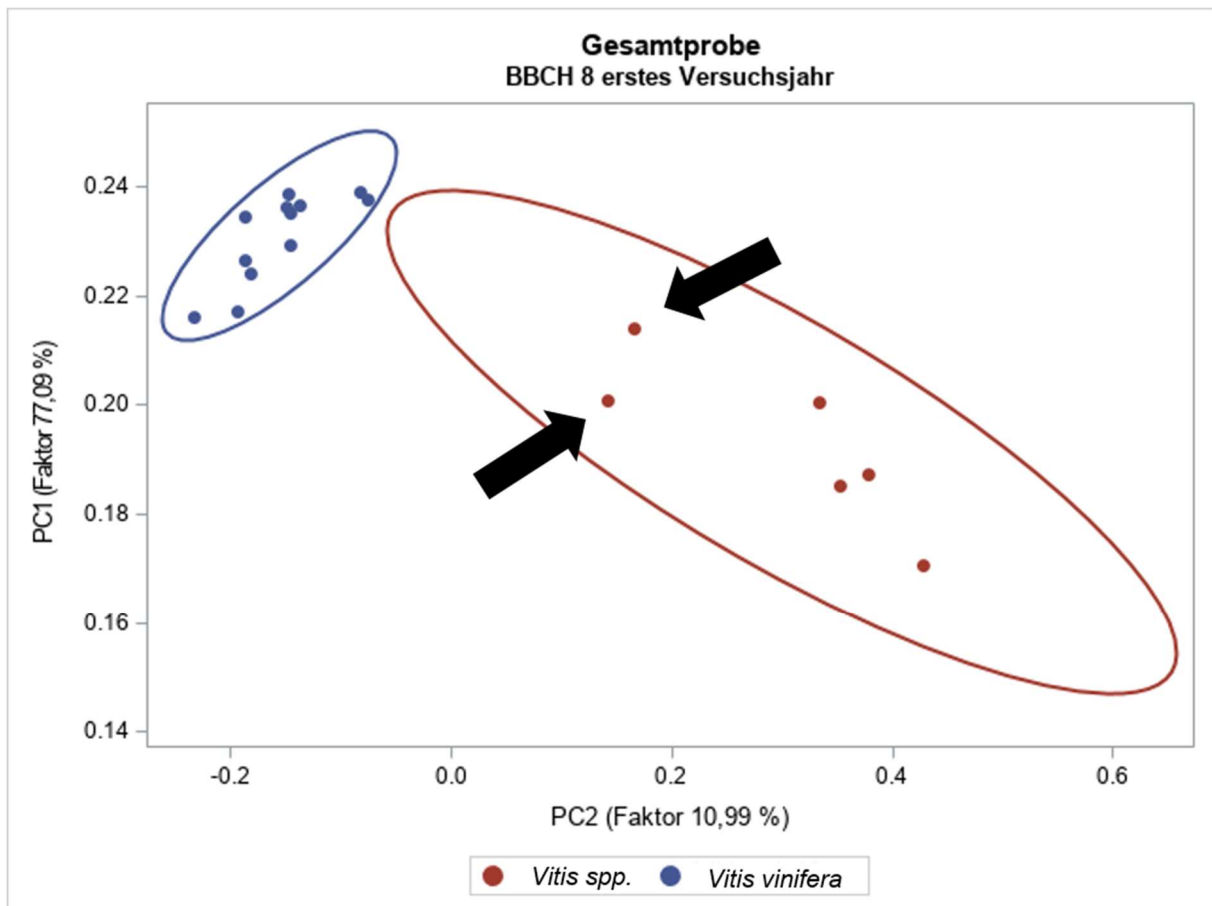


Abb. 15: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der „Gesamtproben“ in BBCH8 des ersten Versuchsjahres. Ellipsenberechnung mit Konfidenzlevel  $\alpha=0,15$ ; PC1 = Hauptkomponente 1; PC2 Hauptkomponente 2. Oberer Pfeil zeigt auf *Vitis riparia* Akzession 76-50-1, unterer Pfeil zeigt auf Delaware.

Tabelle 14: Eigenwerte der Korrelationsmatrix bei der PCA der Genotypen in BBCH8 1. VJ. Angezeigt sind die Eigenwerte der Hauptkomponenten bis der kumulative Anteil der Varianzerklärung die 95 % Hürde erreicht. Berechnung über *proc princomp*.

Hauptkomponente	Eigenwert	Differenz	Proportion	Kumulativ
1	16,1880086	13,8800563	0,7709	0,7709
2	2,3079523	1,7390760	0,1099	0,8808
3	0,5688763	0,0151623	0,0271	0,9078
4	0,5537140	0,2329962	0,0264	0,9342
5	0,3207178	0,0335147	0,0153	0,9495
6	0,2872030	0,1172657	0,0137	0,9632

#### 3.3.2 Metabolitprofile im Versuchsjahr 2011

Um eine schnelle Übersicht über die Datenlage der drei Entwicklungsstadien zu gewinnen, wurde eine gemeinsame Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Plots der Hauptkomponenten 1 und 2 (PC1 und PC2) zeigten, dass sich die Metabolitprofile der Entwicklungsstadien deutlich voneinander unterschieden (Abb. 16).

Für das Entwicklungsstadium BBCH8 wurde die „Gesamtprobe“ verwendet (siehe hierzu Beschreibung unter 3.3.1). Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien. Die Metabolitprofile aus BBCH6 zeigten die stärkste Differenzierung von den anderen beiden Entwicklungsstadien. BBCH8 und BBCH9 sind sich etwas ähnlicher.

Weingart (2012) untersuchten ebenfalls mittels HS-SPME-GC-MS Weinblätter an zwei unterschiedlichen Probeterminen, die acht Wochen auseinander lagen. Die Weinblätter stammten von Freilandreben. Die Metabolitprofile beider Beprobungstermine bildeten ebenfalls deutlich voneinander getrennte Cluster.

Jedes Entwicklungsstadium stellt besondere Herausforderungen an die Pflanzen. Darum ist es nicht verwunderlich, dass sich die in dieser Arbeit untersuchten Metabolitprofile während der Blüte (BBCH6) bzw. der beginnenden Fruchtentwicklung (BBCH7), der Traubenreife (BBCH8) und zum Ende des Reifeprozesses bzw. bei Eintritt in die Vegetationsruhe (BBCH9) voneinander unterschieden.

Aus diesem Grund wurde die weitere Datenauswertung für jedes Entwicklungsstadium gesondert durchgeführt. Im Nachfolgenden werden die entsprechenden Entwicklungsstadien der zwei Jahre zusammenhängend besprochen.

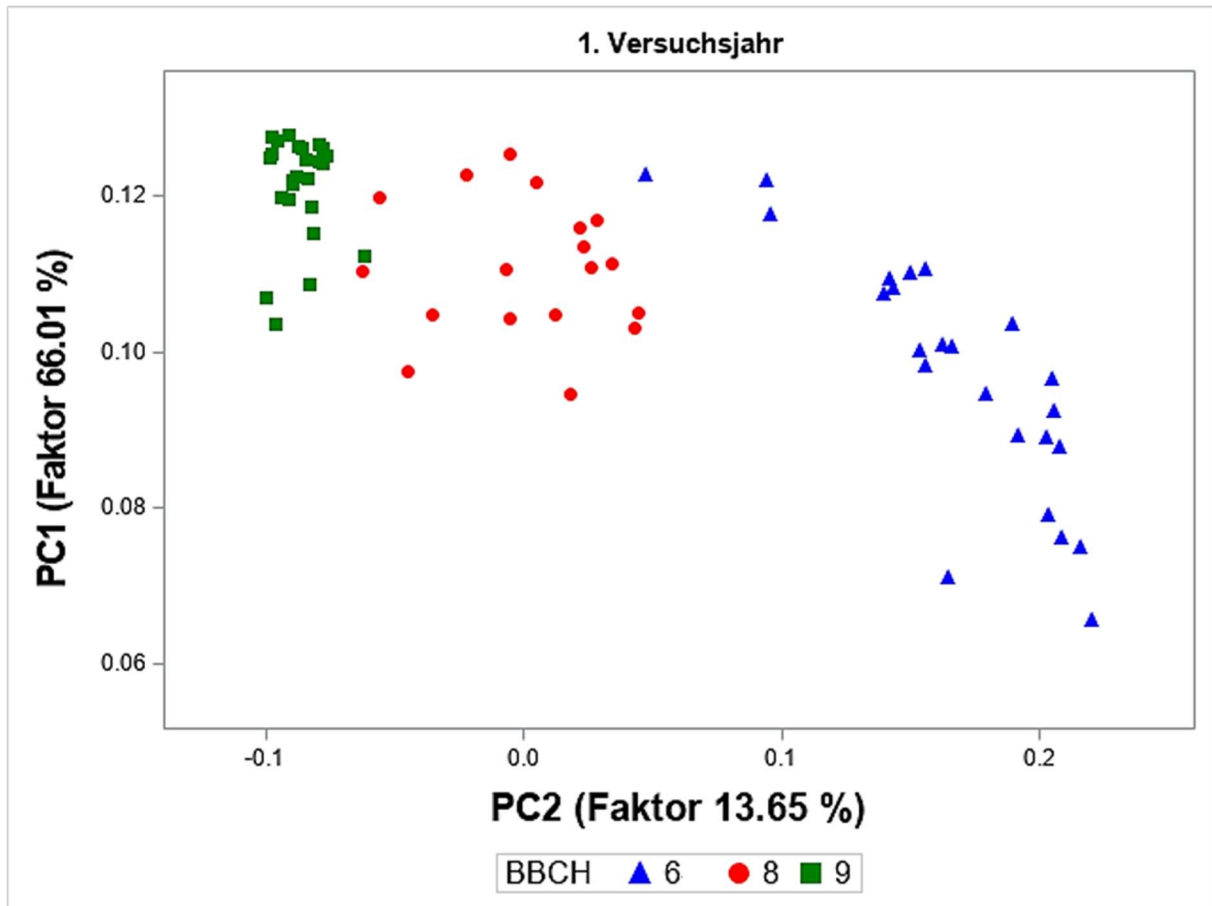


Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse des ersten Versuchsjahres (PC1) Hauptkomponente 1, PC2) Hauptkomponente 2. Für BBCH8 wurden die Datensätze der „Gesamtprobe“ verwendet. Die Datensätze der Proben BBCH6 und BBCH9 stammten aus Mischproben.

Tabelle 15: Eigenwerte der Korrelationsmatrix der Hauptkomponentenanalyse des ersten Versuchsjahres (2011). Für BBCH8 wurden die Datensätze der „Gesamtprobe“ verwendet. Die Datensätze der Proben BBCH6 und BBCH9 stammten aus Mischproben.

Hauptkomponente	Eigenwert	Differenz	Proportion	Kumulativ
1	52,1467464	41,3659932	0,6601	0,6601
2	10,7807533	5,7737324	0,1365	0,7966
3	5,0070209	2,1563134	0,0634	0,8599
4	2,8507075	1,5408207	0,0361	0,896
5	1,3098868	0,0953105	0,0166	0,9126
6	1,2145763	0,1172358	0,0154	0,928

### 3.3.3 Metabolitprofile im Versuchsjahr 2012

Für die Daten des zweiten Versuchsjahres wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um eine erste Übersicht über die Datenlage zu erhalten. Der Plot der Hauptkomponenten

1 und 2 (Abb. 17 I) zeigte, dass die Blattproben sich nach Entwicklungsstadien sortieren. Allerdings war die Differenzierung zwischen den Gruppen nicht so deutlich wie im vorangegangenen Versuchsjahr 2011. Erst der Plot der Hauptkomponenten 2 und 4 verdeutlichte eine Gruppierung nach Entwicklungsstadium (Abb. 17 II). Die beiden ersten Hauptkomponenten beschrieben die Unterschiedlichkeit der Proben zu 84,72 % (79,48 % und 5,24 %) (Tabelle 16). Wohingegen durch die beiden Hauptkomponenten PC2 und PC4 nur 8,04 % (5,24 % und 2,80 %) der Probeneigenschaften erklärt wurden. Durch die Hauptkomponentenanalyse zeigte sich, dass auch im zweiten Versuchsjahr das Metabolitmuster der Blätter vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig war. Dabei war der Einfluss weniger ausgeprägt als im ersten Jahr. Die Datensätze des zweiten Versuchsjahres wurden daher ebenfalls getrennt nach Entwicklungsstadium ausgewertet. In den folgenden Kapiteln wird die Ermittlung von potenziellen konstitutiven Resistenzmarkern besprochen, wobei die jeweiligen Entwicklungsstadien der beiden Versuchsjahre miteinander verglichen werden. Ein zweijähriger Vergleich aller Resistenzmarker wird in Kapitel 3.3.7 durchgeführt.

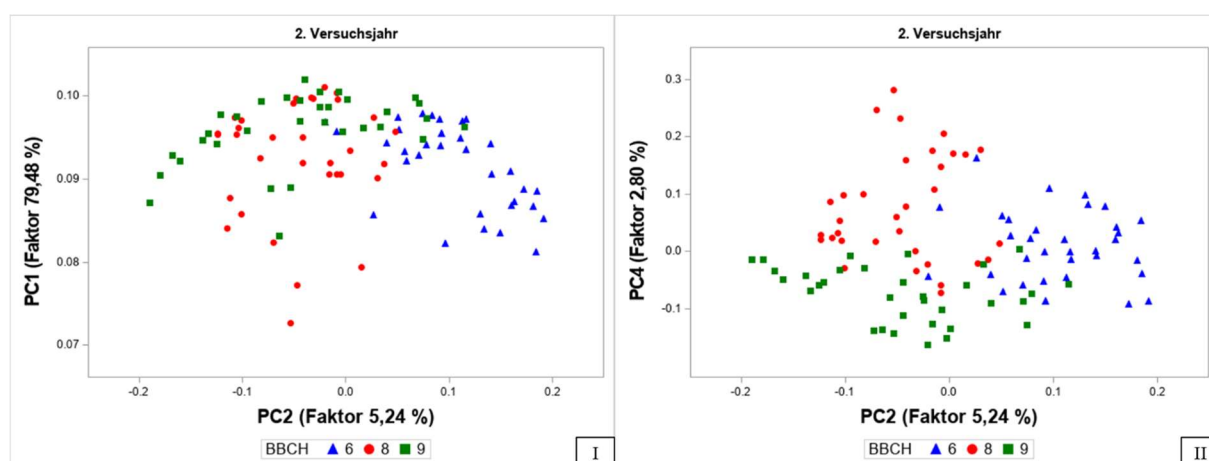


Abb. 17: Hauptkomponentenanalyse des zweiten Versuchsjahres PC1) Hauptkomponente 1, PC2) Hauptkomponente 2 PC4) Hauptkomponente 4. Die Datensätze der Proben stammten aus Mischproben.

Tabelle 16: Eigenwerte der Korrelationsmatrix der Hauptkomponentenanalyse des zweiten Versuchsjahres (2012)

Hauptkomponente	Eigenwert	Differenz	Proportion	Kumulativ
1	90,6034874	84,6278599	0,7948	0,7948
2	5,9756276	2,4098908	0,0524	0,8472
3	3,5657368	0,3750350	0,0313	0,8785
4	3,1907018	1,3426075	0,0280	0,9065
5	1,8480943	0,1207532	0,0162	0,9227
6	1,7273411	0,4368276	0,0152	0,9378



### 3.3.4 BBCH6 Zwei Jahre

#### BBCH6 2011 Ungerichtete Analysen

Mit SR wurden fünf Metabolite und durch PLS wurden 15 Metabolite (137 Massenfragmente) ermittelt. Einige Metabolite wurden durch beide Verfahren als wichtige Substanzen annotiert, so dass von insgesamt 18 Metaboliten die Verteilung der Peakflächen bzw. der STI auf signifikante Unterschiede bezüglich der Resistenzklassen überprüft wurde (Tabelle 18).

Fünf dieser Substanzen [(Z)-3-Hexenylacetat, (Z)-3-Hexenylbutyrat,  $\alpha$ -Terpineol sowie die nicht identifizierte Substanz u47,61<sup>5</sup>] wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen auf.

Vier Metabolite [Carvomenthenal Isomere A und B, Theaspiran Isomer B und (E,Z)-2,4-Heptadienal] zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 3 zu den anderen Resistenzklassen. Wobei die Carvomenthenal-Isomere und Theaspiran B Signifikanz zu jeder der drei anderen Klassen zeigten. Dieser Effekt beruhte darauf, dass in allen Regentblättern diese drei Metabolite in sehr hohen Konzentrationen detektiert wurden. Bei einer Betrachtung der Unterschiede zwischen den Genotypen zeigte Regent signifikante Unterschiede zu jedem anderen Genotyp. Wobei sich gleichzeitig die anderen Genotypen nicht statistisch voneinander unterschieden. Der Effekt basierte demnach auf einer Regent-typischen Metabolitkonzentration und wurde daher nicht in Zusammenhang mit Resistenzeigenschaften gestellt. In Abb. 18 II und III ist die Amplitudenverteilung von Theaspiran B als Boxplot dargestellt. Die Carvomenthenol-Isomere verhielten sich in ähnlicher Weise (Tabelle 18).

(E,Z)-2,4-Heptadienal zeigte signifikante Unterschiede der Resistenzklasse 3 zu den resistenteren Klassen 7 und 9. Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied zu der stark anfälligen Klasse 1 vor. Die Klassen 1, 7 und 9 konnten statistisch nicht unterschieden werden. Zudem lagen die STI Werte der Resistenzklasse 3 unter den Werten der übrigen Klassen (Abb. 18 I). Daher wurden diese vier Substanzen [Carvomenthenal-Isomere A und B, Theaspiran-Isomer B und (E,Z)-2,4-Heptadienal] nicht als Resistenzmarker in Betracht gezogen.

---

<sup>5</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

### 3 Resultate

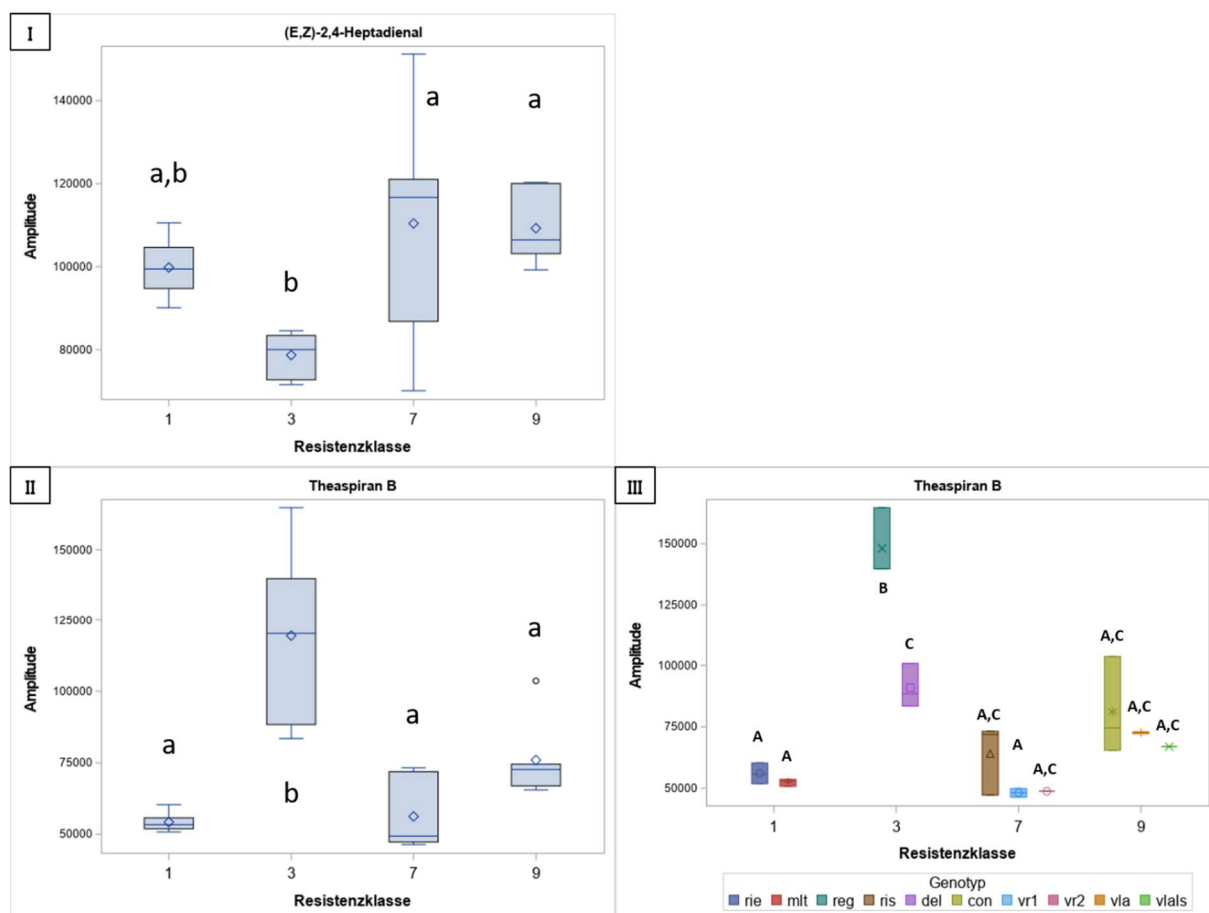


Abb. 18: (E,Z)-2,4-Heptadienal und Theaspiran B in BBCH6 2011 nach Resistenzklassen. I) (E,Z)-2,4-Heptadienal II) Theaspiran B III) Theaspiran B getrennt nach Genotypen. In III) Anzeige ohne Whisker, da jede Box aus 3 Wiederholungen bestand. Whisker werden durch SAS erst ab vier Wiederholungen dargestellt. -) Median, (◊) arithmetisches Mittel (°) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils. rie) Riesling, mlt) Müller-Thurgau, reg) Regent, ris) Blaue Isabella, del) Delaware, con) Concord, vr1) *V. riparia* Akzession 76-50-1, vr2) *V. riparia* Akzession 76-49-22, via) *V. labrusca*, vlals) *V. labrusca* Standort Langenscheider Hof.

Unterschieden beim *Simulate*-Test die p-Werte zwischen den resistenten Klassen 9 (Concord und *V. labrusca*) oder 7 (Blaue Isabella und *V. riparia*) und der anfälligen Resistenzklasse 1 (Müller-Thurgau und Riesling) die Signifikanzgrenze, dann wurden diese Metabolite intensiver betrachtet. Neun Metabolite [Benzaldehyd, Benzylalkohol, (Z)-3-Hexenal, Linalool, Methylsalicylsäure,  $\beta$ -Myrcen, Nonanol, (E)- $\beta$ -Ocimen und die nicht identifizierte Substanz u29,64]<sup>6</sup> entsprachen in BBCH6 2011 diesen Kriterien und wurden als Resistenzmarker notiert (Tabelle 17).

Die Substanzen Nonanol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, Methylsalicylsäure und u29,64 zeigten mit steigender Resistenzklasse eine Konzentrationszunahme. Im Folgenden werden Substanzen als „positive Resistenzmarker“ bezeichnet, die in resistenten Genotypen einen höheren Gehalt haben. Wohingegen Substanzen als „negative Resistenzmarker“ bezeichnet werden,

<sup>6</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

deren Amplitudenwerte in den anfälligen Resistenzklassen 1 und 3 höher waren [(Z)-3-Hexenal, Linalool,  $\beta$ -Myrcen und (*E*)- $\beta$ -Ocimen].

Die positiven Resistenzmarker nahmen im Verlauf der Resistenzklassen stetig zu (Abb. 19). Für Benzaldehyd, Benzylalkohol und u29,64 lagen signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 9 zu den beiden Klassen 1 und 3 vor. Benzylalkohol zeigte auch einen signifikanten Unterschied zwischen den Resistenzklassen 7 und 9 (Tabelle 18). Methylsalicylsäure und Nonanol verzeichneten einen deutlich steileren Anstieg der Amplitudenwerte, so dass signifikante Unterschiede jeweils zwischen den beiden anfälligen Klassen zu beiden resistenten Klassen vorlagen. Nonanol besaß sogar einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden resistenten Klassen 7 und 9.

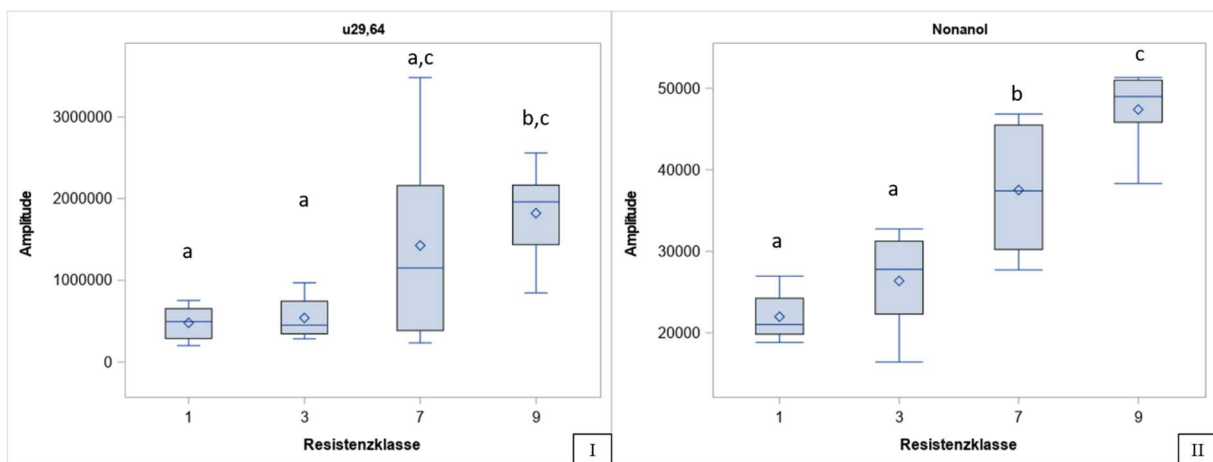


Abb. 19: positive Resistenzmarker BBCH6 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) die unbekannte Substanz u29,64 und II) Nonanol. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel, °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils.

Die Metabolite, die als negative Resistenzmarker bezeichnet wurden, zeigten selten eine stetige Gehaltsabnahme mit steigender Resistenz. In vielen Fällen glichen die Werte einer „herabführenden Treppe“, d.h. die Amplitudenwerte in den anfälligen Resistenzklassen 1 und 3 lagen oberhalb der Klassen 7 und 9. Dies galt für (*E*)- $\beta$ -Ocimen, Linalool oder (*Z*)-3-Hexenal (Abb. 20 I). Teilweise wurde ein „Berg-Tal-Verlauf“ beobachtet. Zunächst erfolgte auf einem höheren Niveau ein Anstieg von Klasse 1 zu 3 mit einem anschließenden Tal. Hierfür wird beispielhaft der Boxplot von  $\beta$ -Myrcen in Abb. 20 II gezeigt. Diese Metabolite könnten an der Resistenzantwort in *V. vinifera* beteiligt sein, da sie mit zunehmender Resistenz innerhalb von *V. vinifera* mit höherer Konzentration detektiert wurden. Sie scheinen jedoch nicht (wesentlich) für die effektivere Resistenzantwort in den resistenten Genotypen notwendig zu sein. Derartige Konzentrationsverläufe mit Ausbildung von Minima und Maxima deuten darüber hinaus auf Faktoren mit gegenläufiger Wirkungsweise hin.

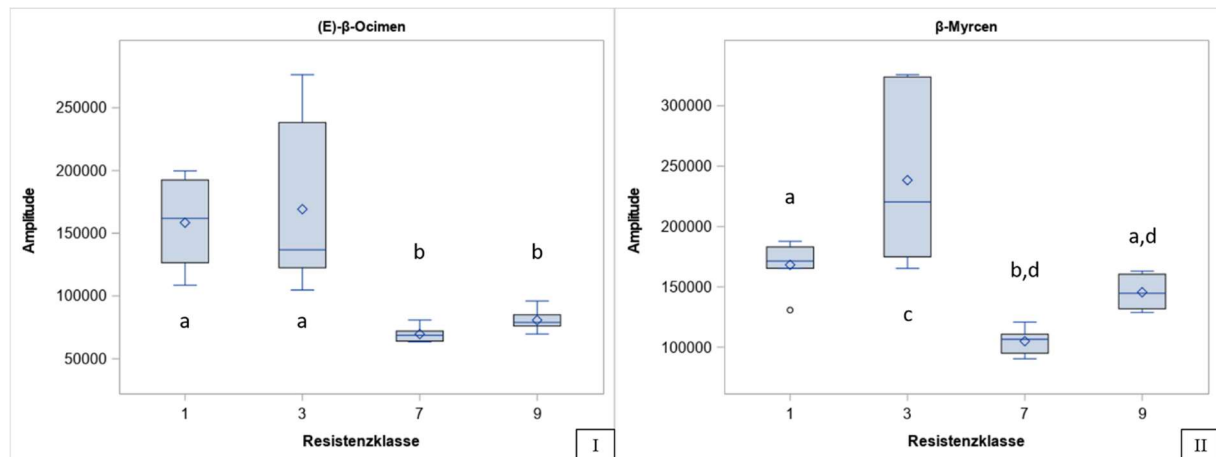


Abb. 20: negative Resistenzmarker BBCH6 2011. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) (*E*)- $\beta$ -Ocimen. II)  $\beta$ -Myrcen. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel,  $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils.

### BBCH6 2011 Zielgerichtete Analysen

31 weitere Metabolite wurden zielgerichtet (*target analysis*) auf Unterschiede zwischen den Resistenzklassen hin analysiert (Tabelle 19). Diese 31 Metabolite wurden in anderen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker eingestuft und wurden daher auch in BBCH6 2011 auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen überprüft. Sieben dieser Substanzen ( $\alpha$ -Calacoren, Dihydroedulan I, und die unbekannt Substanzen u10,43, u29,33, u43,43, u44,49 und u44,70<sup>7</sup>) wurden nicht im Entwicklungsstadium BBCH6 2011 detektiert. 14 weitere Substanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen (Benzylbenzoat, (*E*)- $\beta$ -Damascenon, Geraniumoxid, (*Z*)-3-Hexenol, Hotrienol, Megastigmatrienon, Nonanal, 2-Phenylethanol,  $\alpha$ -Terpinolen, Theaspiran A und die unbekannt Substanzen u32,51, u33,95, u40,61, u40,86<sup>8</sup>). Die drei Metabolite Geraniol, Geranylaceton und Nerol besaßen signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 3 zu den Klassen 7 und 9 bzw. im Fall von Nerol zusätzlich auch zu Klasse 1. Bei genauerer Betrachtung der Daten zeigte sich, dass die Amplitudenwerte nur in *V. vinifera* cv. Regent erhöht vorlagen. Es handelte sich hier demnach um Genotyp-spezifisch erhöhte Werte. Daher wurden diese drei Metabolite nicht als Resistenzmarker eingestuft.

<sup>7</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>8</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

Von den 31 überprüften Metaboliten verblieben damit sieben Metabolite, die zusätzlich als Resistenzmarker detektiert wurden (Alloocimen, p-Cymenen, 2-Ethylfuran, (*E*)- $\beta$ -Ionon, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen und (*Z*)-Rosenoxid sowie die unbekannte Substanz u15,19<sup>9</sup>).

Alloocimen, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, (*Z*)-Rosenoxid und die unbekannte Substanz u15,19 besaßen in den resistenten Genotypen geringere Gehalte als in den anfälligen Reben. Der Verlauf der Amplitudenhöhe über die Resistenzklassen glich für die drei identifizierten Metabolite einer „herabführenden Treppe“ ebenso wie z.B. (*E*)- $\beta$ -Ocimen in Abb. 20 Abschnitt 3.3.4. Für die Substanz u15,19 wurde eine stetige Abnahme der Amplitudenwerte hin zu höheren Resistenzklassen detektiert.

2-Ethylfuran zeigte ähnlich wie Methylsalicylsäure einen verhältnismäßig stetigen Anstieg der Amplitudenhöhe von anfälligen zu resistenten Genotypen und zählt damit zu den „positiven“ Resistenzmarkern. p-Cymenen und (*E*)- $\beta$ -Ionon hatten signifikante Unterschiede zwischen den anfälligen Genotypen aus Resistenzklasse 1 zu Resistenzklasse 7, jedoch nicht zu Resistenzklasse 9. Sowohl in den Akzessionen von *V. riparia* als auch in der Hybridrebe Rote Isabella wurden hohe Gehalte der beiden Metabolite detektiert.

#### BBCH6 2012 Ungerichtete Analysen

Über Spearman Rangkorrelation wurden zwei Metabolite mit  $\rho > 0,70$  (78 Massenfragmente) und 13 Metabolite mit  $\rho < (-0,70)$  (880 Massenfragmente) ermittelt. Die PLS resultierte in 38 Metaboliten (936 Massenfragmenten). Insgesamt ergaben sich 42 verschiedenen Metabolite, die mit dem *Simulate*-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen überprüft wurden (Tabelle 20). 23 Metabolite zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen. Für vier Metabolite [Carvomenthenol Isomere A und B, D-Limonen und  $\alpha$ -Terpen] lagen signifikante Unterschiede nur zwischen der Resistenzklasse 3 zu anderen Klassen vor. Bei diesen vier Metaboliten wurden in den Regentblättern wesentlich höhere Gehalte als in den restlichen Blättern detektiert. Es handelte sich daher - wie unter BBCH6 2011 beschreiben - um Regent-spezifische Metabolitgehalte und nicht um Resistenzmarker.

14 weitere Substanzen zeigten signifikante Unterschiede zwischen mindestens einer der beiden resistenteren Klassen 7 und 9 und der anfälligen Resistenzklasse 1 [Alloocimen, Geraniol, Geranylaceton, Linalool, Megastigmatrienon, Methylsalicylsäure,  $\beta$ -Myrcen, Nerol, (*E*)- und (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, (*Z*)-Rosenoxid,  $\alpha$ -Terpineol,  $\alpha$ -Terpinolen und die nicht identifizierten Substanz u32,51<sup>10</sup>]. Von diesen Metaboliten stiegen bei Methylsalicylsäure und u32,51 die Gehalte mit

---

<sup>9</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>10</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

zunehmender Resistenz an, weshalb sie zu den „positiven“ Resistenzmarker zählten. Bei u32,51 lagen in der Resistenzklasse 9 die Amplitudenwerte signifikant höher als in den Klassen 1, 3 und 7, die sich statistisch nicht voneinander unterschieden (Abb. 21 I). Im Fall von Methylsalicylsäure war der Anstieg der Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenz deutlicher. Die beiden resistenten Klassen unterschieden sich jeweils signifikant von den anfälligen Klassen (Abb. 21 II).

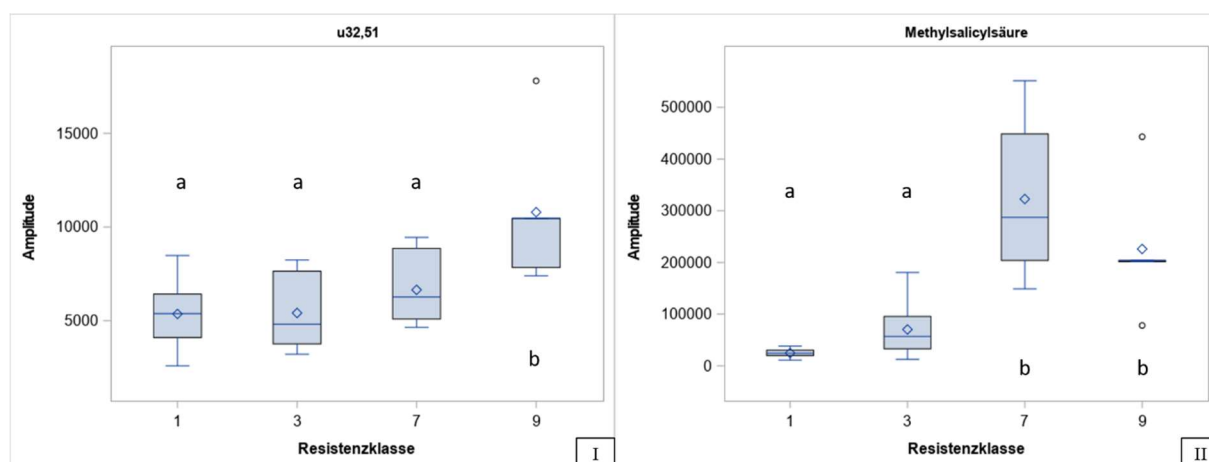


Abb. 21: positive Resistenzmarker BBCH6 2012. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) die unbekannte Substanz u32,51 und II) Methylsalicylsäure. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel,  $\circ$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils.

12 Metabolite wurden als „negative“ Resistenzmarker identifiziert, da die Amplitudenhöhe der Substanzen mit steigender Resistenz abnahm. (Z)-Rosenoxid und Megastigmatrienon zeigten eine relativ stetige Abnahme des detektierten Gehalts an (Abb. 22 I). Die übrigen zehn Metabolite [Alloocimen, Geraniol, Geranylaceton, Linalool,  $\beta$ -Myrcen, Nerol, (E)- und (Z)- $\beta$ -Ocimen,  $\alpha$ -Terpineol und  $\alpha$ -Terpinolen] zeigten eine Abnahme mit „Treppen-Verlauf“, d.h. die Amplituden der anfälligen Resistenzklassen hatten ein höheres Niveau als die resistenten beiden Klassen. Dieser „Treppenverlauf“ mit den zwei Plateaus galt auch für  $\beta$ -Myrcen, welches in BBCH6 2011 einen „Berg-Tal“-Verlauf andeutete (Abb. 22 II und III).

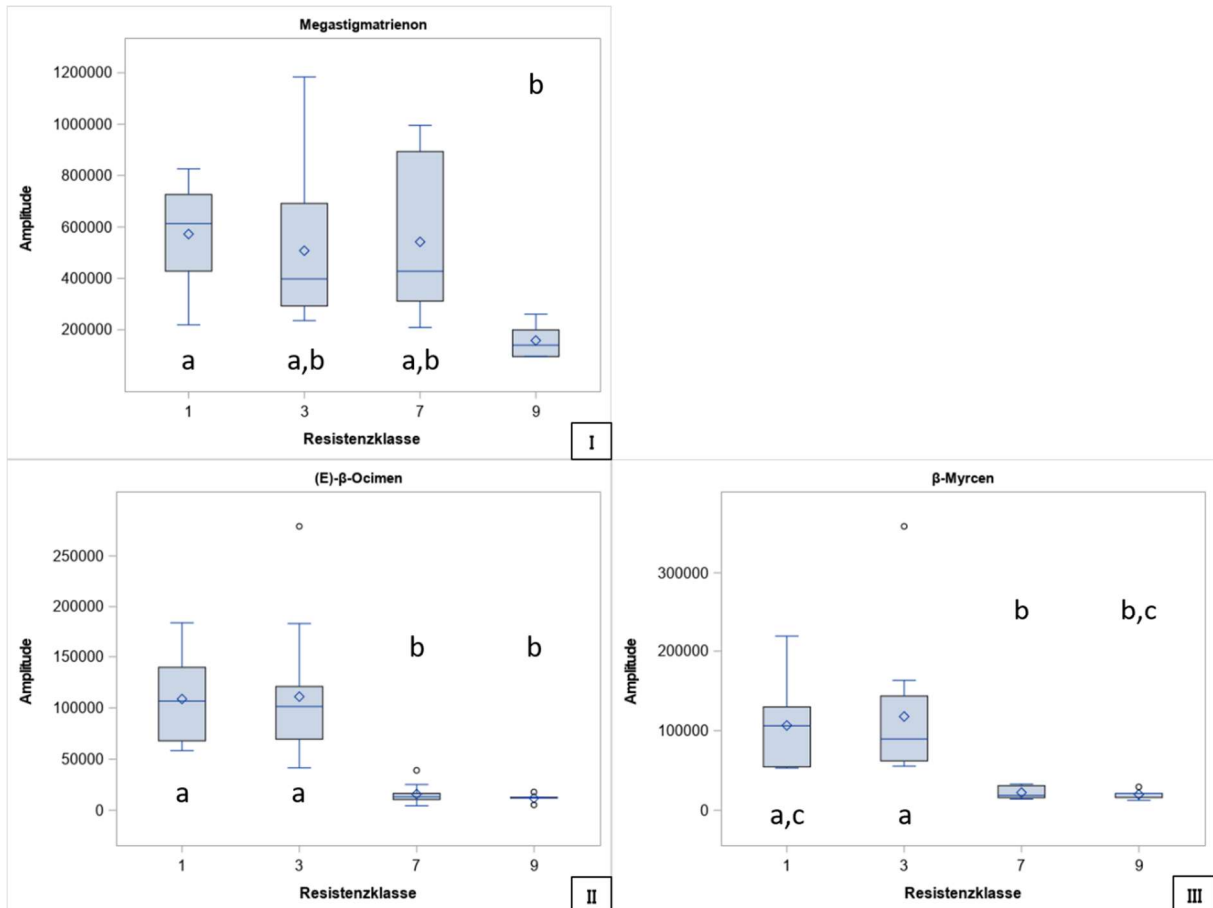


Abb. 22: negative Resistenzmarker BBCH6 2012. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) Megastigmatrienon III) (*E*)-β-Ocimen. IV) β-Myrcen. -) Median, ◇) arithmetisches Mittel, °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils.

### BBCH6 2012 Zielgerichtete Analysen

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Metaboliten wurden 21 weitere Substanzen daraufhin überprüft, ob sie in BBCH6 2012 detektiert wurden und ebenfalls als Resistenzmarker eingestuft werden konnten (Tabelle 21). Die zusätzlichen 21 Substanzen wurden in anderen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker identifiziert. Neun dieser Substanzen wurden nicht in BBCH6 2012 detektiert ( $\alpha$ -Calacoren, (*E*)-β-Ionon, Nonanal und die unbekannt Substanzen u10,43, u29,33, u33,95, u40,86, u43,43, u44,70<sup>11</sup>). Zehn weitere Substanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen resistenten und anfälligen Klassen (Benzaldehyd, Benzylbenzoat, p-Cymenen, Geraniumoxid, (Z)-3-Hexenol, Hotrienol, Nonanol, 2-Phenylethanol, Theaspiran A und die unbekannt Substanz u29,64<sup>12</sup>).

<sup>11</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>12</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

Von den 21 getesteten Substanzen wurden daher nur (*E*)- $\beta$ -Damascenon und Dihydroedulan I zusätzlich als „positive“ Resistenzmarker ermittelt. Dihydroedulan I zeigte ähnlich wie Methylsalicylsäure einen stetigen Gehaltsanstieg von anfälligen zu resistenten Klassen hin. (*E*)- $\beta$ -Damascenon zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 7 zu allen anderen Klassen. Dies war bedingt durch den sehr hohen Gehalt in *V. riparia* Akzession „76-49-22“.

Aus den Probeterminen BBCH6 in zwei aufeinander folgenden Jahren wurden insgesamt 25 Resistenzmarker ermittelt (11 „positive“ Marker und 13 „negative“ Resistenzmarker, sowie Megastigmatrienon<sup>13</sup>). In Tabelle 17 werden diese Resistenzmarker zur Übersicht zusammengefasst. Die meisten Resistenzmarker wurden bereits durch die ungerichteten Analysen in mindestens einem Entwicklungsstadium identifiziert (6 / 11 positive und 11 / 13 negative Resistenzmarker, sowie Megastigmatrienon). Methylsalicylsäure, Alloocimen, Linalool,  $\beta$ -Myrcen, (*E*)- $\beta$ -Ocimen, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen und (*Z*)-Rosenoxid traten in beiden Jahren als Resistenzmarker auf.

---

*Im Entwicklungsstadium BBCH6 wurden in den zwei Testjahren 25 konstitutive Resistenzmarker identifiziert. Davon traten sieben Marker in beiden Jahren auf.*

---

Tabelle 17: 25 Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH6 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012

<b>"Positive" Resistenzmarker</b>	<b>BBCH6 2011</b>	<b>BBCH6 2012</b>
Benzaldehyd	X	
Benzylalkohol	X	
p-Cymenen	X	
( <i>E</i> )- $\beta$ -Damascenon		X
Dihydroedulan I		X
2-Ethylfuran	X	
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ionon	X	
Methylsalicylsäure	X	X
Nonanol	X	
u29,64	X	
u32,51		X

<sup>13</sup> Megastigmatrienon wird als Sonderfall und nicht als „negativer“ Resistenzmarker aufgeführt. Hierzu erfolgt eine genaue Erklärung in Kapitel 3.3.7.



Resistenzmarker Sonderfall	BBCH6 2011	BBCH6 2012
Megastigmatrienon		X
"Negative" Resistenzmarker	BBCH6 2011	BBCH6 2012
Alloocimen	X	X
Geraniol		X
Geranylaceton		X
(Z)-3-Hexenal	X	
Linalool	X	X
$\beta$ -Myrcen	X	X
Nerol		X
(E)- $\beta$ -Ocimen	X	X
(Z)- $\beta$ -Ocimen	X	X
(Z)-Rosenoxid	X	X
$\alpha$ -Terpineol		X
$\alpha$ -Terpinolen		X
u15,19	X	

Tabelle 18: 18 Metabolite in BBCH6 2011, die in den non-targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens einem Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. Signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ) sind **FETT gedruckt**.

Resistenzmarker	CAS	Resistenzklasse					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Benzaldehyd	100-52-7	<b>0,0003</b>	0,0456	<b>0,0012</b>	0,1569	0,9170	0,1369
Benzylalkohol	100-51-6	<b>0,0022</b>	0,9165	<b>0,0339</b>	0,9354	0,6165	<b>0,0095</b>
Carvomenthenal A	29548-14-9	0,1559	0,8242	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0012</b>	0,5472
Carvomenthenal B	29548-14-9	0,0691	0,9957	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0029</b>	0,1073
(E,Z)-2,4-Hep-tadienal	4313-02-4	0,7236	0,6476	<b>0,0142</b>	<b>0,0107</b>	0,1220	0,9992
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	<b>0,0101</b>	0,1086	<b>0,0431</b>	0,3340	0,9064	0,6705
(Z)-3-Hex-enylacetat	3681-71-8	0,9051	0,9901	0,4507	0,6720	0,8378	0,9818
(Z)-3-Hex-enylbutyrat	16491-36-4	0,0773	0,6991	0,1075	0,7954	0,9981	0,4611
Linalool	78-70-6	0,0677	<b>0,0367</b>	<b>0,0127</b>	<b>0,0065</b>	0,8573	0,9904
Methylsalicylsäure	119-36-8	<b>0,0013</b>	<b>0,0030</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0125</b>	0,9215	0,9802

### 3 Resultate

Resistenz- marker	CAS	Resistenzklasse					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
β-Myrcen	123-35-3	0,7379	<b>0,0448</b>	<b>0,0024</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0231</b>	0,2894
Nonanol	143-08-8	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0009</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0166</b>	0,5679	<b>0,0371</b>
(E)-β-Ocimen	3779-61-1	<b>0,0156</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,0019</b>	0,9665	0,9628
α-Terpineol	98-55-5	0,7355	0,6071	0,3099	0,2211	0,8731	0,9963
Theaspiran B	36431-72-8	0,2349	0,9979	<b>0,0042</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,3098
u29,64		<b>0,0207</b>	0,1388	<b>0,0283</b>	0,1793	0,9989	0,7801
u47,61		0,3009	0,5504	0,5760	0,8392	0,9563	0,9658

Tabelle 19: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH6 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH6 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7	<b>0,0080</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0049</b>	<b>0,0014</b>	0,9963	0,9463
Benzylbenzoat	120-51-4	0,3014	0,1353	1,0000	0,9602	0,3053	0,9621
α-Calacoren	21391-99-1	nicht detektiert					
p-Cymenen	1195-32-0	0,3512	<b>0,0011</b>	0,6412	<b>0,0035</b>	0,9560	<b>0,0471</b>
(E)-β-Dama- scenon	23726-93-4	0,9978	0,1497	0,9941	0,1312	0,9999	0,2044
Dihydroedulan I	63335-66-0	nicht detektiert					
2-Ethylfuran	124-18-5	<b>0,0018</b>	<b>0,0160</b>	<b>0,0116</b>	0,0895	0,8402	0,7641
Geraniol	106-24-1	0,1686	0,1204	<b>0,0006</b>	<b>0,0004</b>	0,0702	0,9976
Geraniumoxid	7392-19-0	0,8241	0,1154	0,9993	0,3822	0,8816	0,4506
Geranylaceton	105-87-3	0,1905	0,2745	<b>0,0011</b>	<b>0,0019</b>	0,1035	0,9958
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	0,1544	0,9725	0,1147	0,9326	0,9984	0,3115
Hotrienol	29957-43-5	0,9211	0,9188	0,9622	0,8603	0,9988	0,5933
(E)-β-Ionon	79-77-6	0,4441	<b>0,0096</b>	0,6831	<b>0,0172</b>	0,9680	0,1640
Megastigma- trienon	38818-55-2	0,6974	0,8948	0,8187	0,7927	0,9961	0,3041
Nerol	106-25-2	0,3975	0,1653	<b>0,0006</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0218</b>	0,9412
Nonanal	124-19-6	nicht detektiert					
(Z)-β-Ocimen	3338-55-4	0,1131	<b>0,0227</b>	<b>0,0144</b>	<b>0,0024</b>	0,7503	0,8575
2-Phenylethanol	60-12-8	0,9667	0,2093	0,9869	0,1685	0,9992	0,0915
α-Terpinolen	586-62-9	0,9856	0,6733	0,4091	0,1145	0,6091	0,8579
Theaspiran A	43126-22-3	0,5411	0,6544	0,7751	0,6672	0,1291	0,9976
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	0,1008	<b>0,0139</b>	0,0726	<b>0,0095</b>	0,9982	0,7755

Resistenz- marker	CAS	BBCH6 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
u10,43		nicht detektiert					
u15,19		<b>0,0154</b>	0,1230	0,0665	0,3789	0,8980	0,7424
u29,33		nicht detektiert					
u32,51		0,2021	0,3980	0,9973	0,9941	0,2765	0,9691
u33,95		0,1396	0,0538	0,9859	0,9987	0,0732	0,9592
u40,61		0,5467	1,0000	0,4194	0,9948	0,9960	0,5594
u40,86		0,9961	0,9427	0,3359	0,7796	0,4513	0,8625
u43,43		nicht detektiert					
u44,49		nicht detektiert					
u44,70		nicht detektiert					

Tabelle 20: 41 Metabolite in BBCH6 2012, die in den non-targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens einem Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	Resistenzklasse					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7	0,0646	<b>0,0265</b>	<b>0,0272</b>	<b>0,0064</b>	0,9937	0,9997
Benzylalkohol	100-51-6	0,5559	0,8109	0,7928	0,2580	0,0557	0,9289
Carvomen- thanal B	29548-14-9	0,2512	0,8867	<b>0,0012</b>	<b>0,0052</b>	0,0554	0,5396
Carvomen- thanal A	29548-14-9	0,2243	0,5835	<b>0,0006</b>	<b>0,0012</b>	0,0486	0,7816
p-Cymol	99-87-6	0,4241	0,9568	0,8520	0,4078	0,7790	0,1938
2-Ethylfuran	124-18-5	0,9551	0,9999	0,7427	0,9267	0,9552	0,9608
2-Etyhlvinyl- keton	1629-58-9	0,6977	0,9890	0,6520	0,9881	1,0000	0,5056
Eugenol	97-53-0	0,9999	0,5143	0,5340	0,9930	0,3611	0,6699
Geraniol	106-24-1	<b>0,0183</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0089</b>	<b>0,0011</b>	0,9997	0,9999
Geranylaceton	3796-70-1	<b>0,0429</b>	<b>0,0093</b>	<b>0,0068</b>	<b>0,0007</b>	0,9153	1,0000
Hexanal	66-25-1	0,7405	0,4143	0,9885	0,8763	0,8121	0,9914
(E)-2-Hexenal	6728-26-3	0,2063	0,1787	0,5030	0,5148	0,8375	0,9919
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	0,7803	0,5577	0,7398	0,4673	1,0000	0,9984
D-Limonen	5989-27-5	0,0635	0,0709	<b>0,0021</b>	<b>0,0014</b>	0,5340	0,9608
Linalool	78-70-6	<b>0,0036</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0002</b>	0,9983	0,9897
Megastigma- trienon	38818-55-2	<b>0,0403</b>	0,9942	0,0778	0,9903	0,9513	0,0508

### 3 Resultate

Resistenz- marker	CAS	Resistenzklasse					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
2-Methyl-4-Pentenal	5187-71-3	0,7857	0,3269	0,9223	0,4899	0,9766	0,9568
Methyl-salicylsäure	119-36-8	<b>0,0049</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0260</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,7387	0,2759
β-Myrcen	123-35-3	0,0626	<b>0,0217</b>	<b>0,0190</b>	<b>0,0032</b>	0,9756	0,9999
Myrtenal	564-94-3	0,2602	0,0938	0,3411	0,1290	0,9870	0,9991
Nerol	106-25-2	0,0304	<b>0,0070</b>	<b>0,0003</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,2781	0,9999
Nerolidol	7212-44-4	0,9995	0,5383	0,6256	0,9982	0,4195	0,7167
(E)-β-Ocimen	3779-61-1	<b>0,0032</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0002</b>	0,9995	0,9985
(Z)-β-Ocimen	3338-55-4	<b>0,0323</b>	<b>0,0089</b>	<b>0,0070</b>	<b>0,0010</b>	0,9680	0,9996
(E)-2-Pentenal	1576-87-0	0,1639	0,3704	0,1227	0,2839	1,0000	0,8580
(Z)-Rose oxide	16409-43-1	<b>0,0173</b>	<b>0,0017</b>	0,0583	<b>0,0066</b>	0,8576	0,9981
α-Terpinen	99-86-5	0,1084	0,0780	<b>0,0294</b>	<b>0,0108</b>	0,9458	0,9935
α-Terpineol	98-55-5	<b>0,0316</b>	<b>0,0365</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,0011</b>	0,6507	0,9459
α-Terpinolen	586-62-9	<b>0,0374</b>	<b>0,0333</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0011</b>	0,6710	0,9666
u15,19		0,8157	0,2015	0,9131	0,2606	0,9907	0,8261
u32,51		<b>0,0012</b>	0,6221	<b>0,0013</b>	0,6065	0,9999	<b>0,0147</b>
u39,79		0,0778	0,2017	0,2178	0,5366	0,8586	0,8188
u40,61		0,0620	0,7553	0,2677	0,9999	0,7123	0,2596
u41,97		0,7382	0,4104	0,6581	0,3064	0,9998	0,9905
u44,59		0,9682	0,6876	0,3223	0,0504	0,4810	0,9672
u45,09		0,9693	0,9080	0,9677	0,8868	1,0000	0,7233
u47,61		0,7931	0,9902	0,9984	0,9130	0,7850	0,9039
u48,56		0,9671	0,9650	0,9431	0,9734	0,9998	0,7928
u52,00		0,9986	0,9504	0,9891	0,8666	0,9983	0,9889
u66,66		0,9543	1,0000	0,9681	0,9995	0,9997	0,9498
u68,90		0,8821	0,9998	0,5926	0,9623	0,9473	0,8257

Tabelle 21: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH6 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH6 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Benzaldehyd	100-52-7	1,000	0,9984	0,1530	0,0349	0,0715	0,998
Benzylbenzoat	120-51-4	0,2143	0,4805	0,3799	0,7600	0,9505	0,8444
$\alpha$ -Calacoren	21391-99-1	nicht detektiert					
p-Cymenen	1195-32-0	0,3261	0,2307	0,3379	0,1290	0,9991	<b>0,0076</b>
(E)- $\beta$ -Damasce- nol	23726-93-4	1,0000	<b>0,0145</b>	0,9997	<b>0,0060</b>	0,9999	<b>0,0474</b>
Dihydroedulan I	63335-66-0	<b>0,0253</b>	0,1571	0,9317	0,8212	<b>0,0257</b>	0,5838
Geraniumoxid	7392-19-0	0,3152	0,2005	0,1869	0,0830	0,9934	0,9999
(Z)-3- Hexenol	928-96-1	0,9892	0,8149	0,9936	0,8149	0,9999	0,9746
Hotrienol	29957-43-5	0,0755	0,1098	0,1455	0,2376	0,9475	0,9270
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	nicht detektiert					
Nonanal	124-19-6	nicht detektiert					
Nonanol	143-08-8	0,4785	0,0900	0,9676	0,5611	0,6037	0,9317
2-Phenylethanol	60-12-8	0,5459	0,6435	0,0617	0,9955	0,4977	0,0938
Theaspiran A	43126-22-3	0,4077	0,4275	0,9685	0,7674	0,0825	0,9891
u10,43		nicht detektiert					
u29,33		nicht detektiert					
u29,64		0,8487	0,9941	1,0000	0,8517	0,7476	0,9220
u33,95		nicht detektiert					
u40,86		nicht detektiert					
u43,43		nicht detektiert					
u44,70		nicht detektiert					

### 3.3.5 BBCH8 Zwei Jahre

#### BBCH8 2011 Ungerichtete Analyse

Aus den Datensätzen der „Mischproben“ im Entwicklungsstadium BBCH8 2011 wurden insgesamt 20 Metabolite über SR (sechs Metabolite) und PLS (15 Metabolite) ermittelt, deren Gehalte (STI) auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen überprüft wurden (Tabelle 23). 14 Metabolite konnten ausgeschlossen werden, da sie keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Sechs Metabolite unterschritten das Signifikanzniveau zwischen mindestens einer der Resistenzklasse 7 oder 9 und einer anfälligeren Resistenzklasse 1 oder 3

[Benzylalkohol, (*E*)- $\beta$ -Damascenon, 2-Ethylfuran, Methylsalicylsäure, Theaspiran-Isomer A und die unbekannte Substanz u29,64<sup>14</sup>]. Diese Metabolite wurden in den resistenteren Klassen mit höheren Gehalten detektiert und sind demnach alle „positive“ Resistenzmarker. Es wurden keine Substanzen ermittelt, die in den anfälligen Resistenzklassen signifikant erhöhte Werte aufwiesen.

(*E*)- $\beta$ -Damascenon zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 7 (Blaue Isabella und *V. riparia* Akzessionen) zu den anfälligen Klassen 1 und 3 sowie zwischen den beiden resistenten Klassen 7 und 9. Beispielhaft für diese drei Metabolite wird in Abb. 23 I der Boxplot von (*E*)- $\beta$ -Damascenon abgebildet ( $p$ -Werte aller drei Metabolite s. Tabelle 23). Die detektierten Amplitudenwerte sind sowohl in der Hybridrebe Blaue Isabella als auch in den *V. riparia* Akzessionen stark erhöht. Die übrigen fünf Metabolite zeigten einen verhältnismäßig stetigen Anstieg der Amplitudenwerte von anfälligen zu resistenten Klassen (siehe auch Boxplot von Theaspiran A Abb. 23 II)

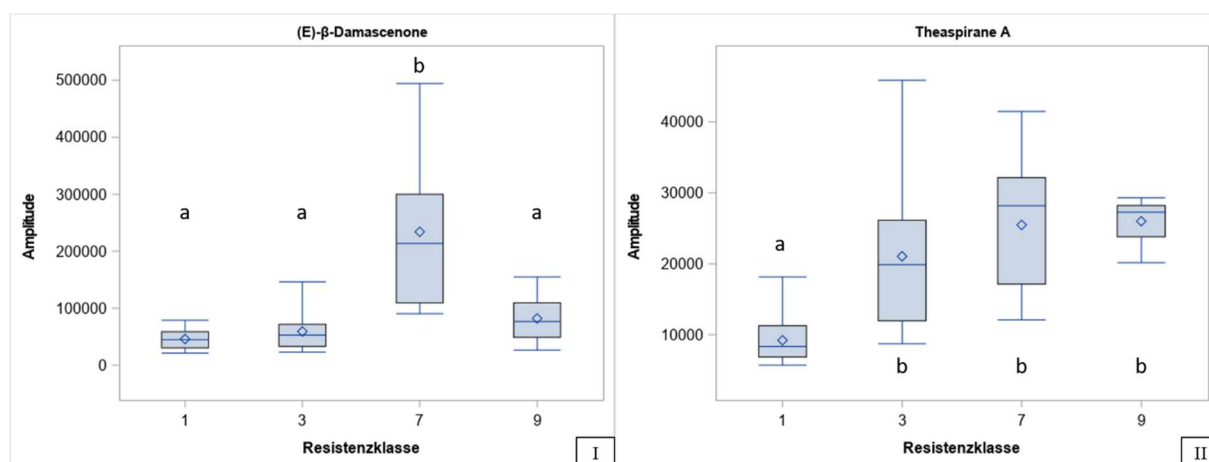


Abb. 23: „positive“ Resistenzmarker BBCH8 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) (*E*)- $\beta$ -Damascenon und II) Theaspiran A. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel, °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

### BBCH8 2011 Zielgerichtete Analysen

Im Entwicklungsstadium BBCH8 2011 wurden 33 Metabolite zusätzlich zu den bereits analysierten Substanzen zielgerichtet auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen untersucht. Diese 33 Metabolite wurden in den anderen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker identifiziert. Für die zielgerichtete Analyse wurde der *Simulate*-Test auf Grundlage der STI verwendet. Fünf Substanzen (Benzylbenzoat,  $\alpha$ -Calacoren und die unbekanntes Substan-

<sup>14</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekanntes Substanzen finden sich in Anhang A7

zen u10,43, u29,33 und u40,86) wurden nicht detektiert (Tabelle 24). Bei weiteren 22 Substanzen traten keine signifikanten Klassenunterschiede auf. Bei Dihydroedulan I lag der signifikante Unterschied zwischen den beiden anfälligen Klassen 1 und 3, so dass dieser Metabolit kein Resistenzmarker in BBCH8 2011 war. Für die unbekannte Substanz u33,95 lagen signifikante Klassenunterschiede zwischen der anfälligen Klasse 3 zu den resistenteren Klassen 7 und 9 vor (Abb. 24). Diese beruhten auf den höheren Amplitudenwerten von u33,95 in Regent und Phoenix. Wobei die Amplitudenwerte der wesentlich anfälligeren Sorte Riesling ähnlich hoch detektiert wurden. In allen anderen Genotypen, sowohl den anfälligen Müller-Thurgau als auch allen resistenteren Genotypen, lagen die detektierten Werte auf einem gleich niedrigen Niveau. Daher wurde auch u33,95 in BBCH8 2011 nicht als Resistenzmarker klassifiziert. Ähnliches galt für die Metabolite p-Cymenen, (*E*)- $\beta$ -Ionon, 2-Phenylethanol und (*Z*)-3-Hexenol. Zwar lagen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Resistenzklassen vor, die Varianz der Gruppen deutete aber auf keine eindeutige Unterscheidbarkeit hin. Keiner der zusätzlich überprüften Metabolite konnte in BBCH8 2011 als Resistenzmarker identifiziert werden.

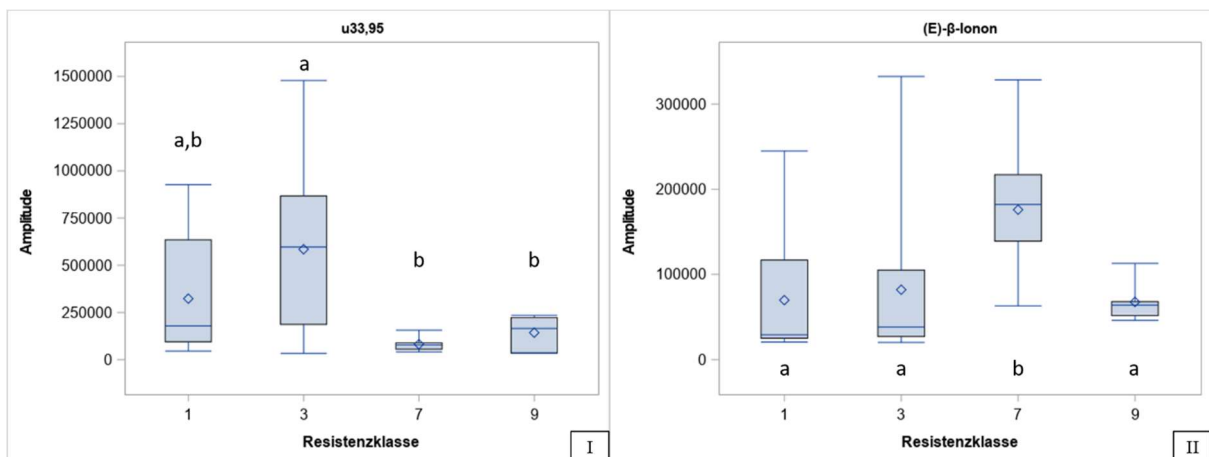


Abb. 24: Amplitudenwerte von I) der unbekannten Substanz u33,95 und II) (*E*)- $\beta$ -ionon. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert.

### BBCH8 2012 Ungerichtete Analysen

Die Spearman Rangkorrelationsanalyse der Blattmetabolite mit BBCH8 im zweiten Versuchsjahr führte zu 178 Massenfragmenten, die mit > 70 % zu den Resistenzklassen korrelierten und 117 Massenfragmente deren Korrelationskoeffizient < - 70 % war. Die Massenfragmente führten zu vier bzw. drei hochkorrelierenden Metaboliten. Die Regression der partiell kleinsten Quadrate führte zu 465 Massenfragmenten, die aus den Massenspektren von 32 Metaboliten

stammten. Insgesamt wurden 35 Metabolite auf signifikante Unterschiede zwischen Resistenzklassen mittels *Simulate*-Test überprüft (Tabelle 25). 16 Substanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassengehalten.

Sechs weitere Metabolite zeigten signifikante Unterschiede, jedoch nur ausgehend von der Resistenzklasse 3 [(*E*)- $\beta$ -Damascon, Geranylaceton, Megastigmatrienon, Eugenol, Nerol und 2-Phenylethanol]. Im Gegensatz zu ähnlichen Beobachtungen in den Entwicklungsstadien BBCH6 trugen in BBCH8 nicht nur die Regentblätter zu den erhöhten Werten in der Resistenzklasse 3 bei, sondern auch die Blättern von Delaware und / oder Phoenix. Es handelte sich daher nicht um Regent-spezifisch erhöhte Metabolitgehalte. Dennoch lagen zwischen den Gruppen 1, 7 und 9 keine signifikanten Unterschiede vor. Daher wurden diese sechs Substanzen für BBCH8 2012 nicht als Resistenzmarker in Betracht gezogen.

13 Metabolite hatten p-Werte die bei einer der Resistenzklassen 7 oder 9 zu der anfälligen Klasse 1 das Signifikanzniveau unterschritten. Davon zählten die sechs Metabolite Benzylalkohol, (*E*)- $\beta$ -Damascon, (*E*)- $\beta$ -Ionon, Methylsalicylsäure, Nonanal und die unbekannte Substanz u10,43<sup>15</sup> zu den „positiven“ Resistenzmarkern, da sie in den anfälligen Resistenzklassen niedrigere Amplitudenwerte als in den resistenteren Klassen aufwiesen. (*E*)- $\beta$ -Damascon, (*E*)- $\beta$ -Ionon und Nonanal hatten die höchsten Gehalte in der Resistenzklasse 7. Nonanal wurde in der Hybridrebe Blaue Isabella mit den höchsten Amplitudenwerten detektiert. Wobei (*E*)- $\beta$ -Damascon und (*E*)- $\beta$ -Ionon die höchsten Werte in den Akzessionen von *V. riparia* aufwiesen. Die Metabolitgehalte der Resistenzklasse 9 unterschied sich in diesen drei Fällen nicht von den Gehalten in den anfälligen Resistenzklassen. In Abb. 25 I ist (*E*)- $\beta$ -Damascon beispielhaft für diese Verteilung angegeben. Die drei Metabolite Benzylalkohol, Methylsalicylsäure und u10,43 zeigten einen relativ stetigen Anstieg der Amplitudenwerte von anfällig zu stark resistent (Abb. 25 II).

---

<sup>15</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7



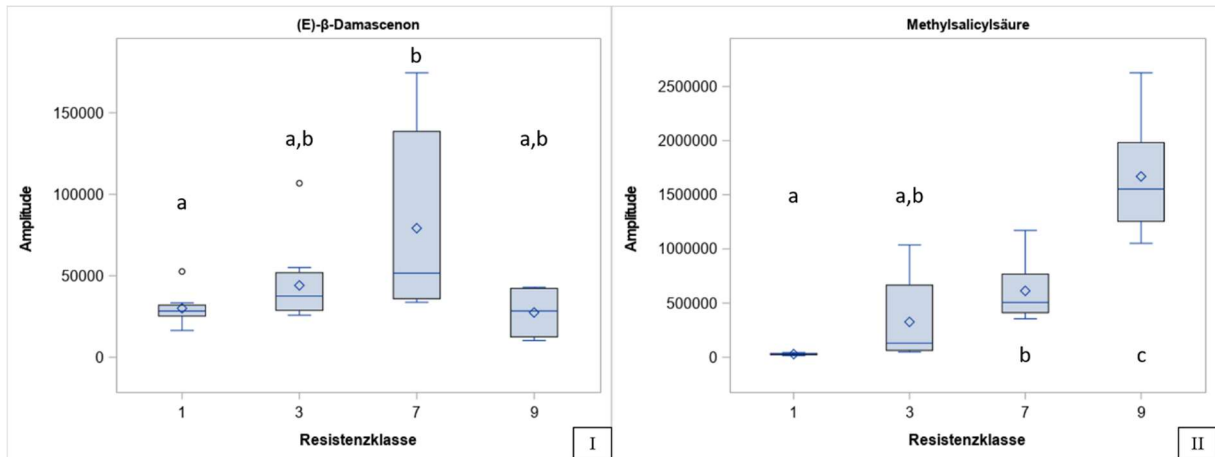


Abb. 25: „positive“ Resistenzmarker BBCH8 2012. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) (E)-β-Damascenon und II) Methylsalicylsäure. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel,  $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen/unteren Quartils.

Sieben Metabolite [Benzylbenzoat, Geraniol, (E)-β-Ocimen, (Z)-β-Ocimen und die unbekannt Substanzen u33,95, u40,61 und u44,49<sup>16</sup>] zeigten eine Abnahme der Amplitudenwerte mit steigender Resistenz. Diese „negativen“ Resistenzmarker zeigten im Fall von Benzylbenzoat, u33,95 und u44,49 eine relativ stetige Abnahme (Abb. 26 I) und für Geraniol, die beiden Ocimen-Isomere und u40,61 einen „Treppenverlauf“, wobei die Gehalte in den beiden Resistenzklassen 1 und 3 sowie 7 und 9 relativ ähnliche Werte besaßen (siehe Abb. 26 II).

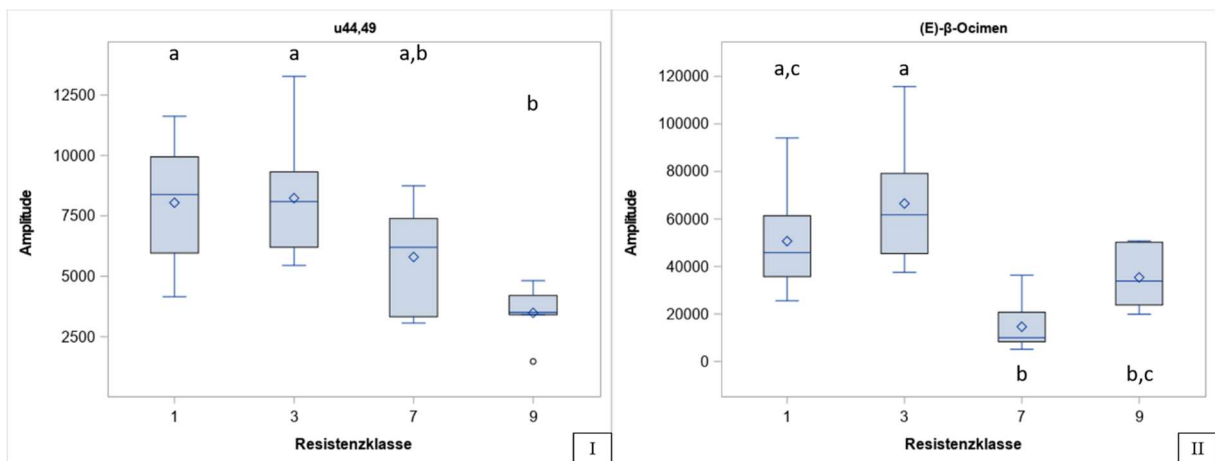


Abb. 26: negative Resistenzmarker BBCH8 2012. Höhere Metabolitgehalte in den anfälligen Resistenzklassen. I) u44,49 II) (E)-β-Ocimen -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel  $^{\circ}$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

<sup>16</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

#### BBCH8 2012 Zielgerichtete Analysen

Für das Entwicklungsstadium BBCH8 2012 wurden zusätzlich 21 Metabolite überprüft, die als Resistenzmarker in den anderen Entwicklungsstadien ermittelt wurden. Fünf Substanzen (Geraniumoxid,  $\beta$ -Myrcen, (Z)-Rosenoxid und die unbekannt Substanzen u40,86 und u43,43<sup>17</sup>) wurden nicht detektiert (Tabelle 26). Für die vier Metabolite Benzaldehyd, (Z)-3-Hexenal, Hotrienol und  $\alpha$ -Terpineol lagen keine signifikanten Klassenunterschiede vor. Alloocimen und Linalool zeigten signifikante Unterschiede zur Resistenzklasse 3. Für beide Substanzen wurden erhöhte Amplitudenwerte in Delaware detektiert. Alle anderen Genotypen besaßen ähnliche Amplitudenwerte. Alloocimen und Linalool wurden daher für BBCH8 2012 nicht als Resistenzmarker eingestuft. Im Fall der unbekannt Substanz u29,33 lag eine ähnliche Datenlage vor. Allein die vergleichsweise sehr hohen Amplitudenwerte der *V. riparia* Akzession „76-50-1“ verursachten eine Signifikanz der Resistenzklasse 7 zu den Klassen 1 und 9. Die Amplitudenwerte aller anderen Genotypen einschließlich *V. riparia* Akzession „76-49-22“ lagen auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 27). Daher wurde auch u29,33 nicht als Resistenzmarker eingestuft.  $\alpha$ -Calacoren wurde durch die Überprüfung als zusätzlicher „negativer“ Resistenzmarker ermittelt mit einer stetigen Abnahme der Amplitudenhöhe bei steigender Resistenz.

Die übrigen acht Metabolite (p-Cymenen, Dihydroedulan I, (Z)-3-Hexenol, Nonanol, Theaspiran A und die unbekannt Substanzen u29,64, u32,51 und u44,70<sup>18</sup>) wurden als zusätzliche „positive“ Resistenzmarker in BBCH8 2012 ermittelt. p-Cymenen und Theaspiran A besaßen die höchsten Amplitudenwerte in den Genotypen der Resistenzklasse 7, wobei keine signifikanten Klassenunterschiede zwischen anfälligen Klassen zur hochresistenten Klasse 9 vorlagen. Sowohl in den *V. riparia* Akzessionen als auch in der Hybridrebe Blaue Isabella wurden erhöhte Gehalte detektiert. Die restlichen sechs Metabolite zeigten einen vergleichsweise stetigen Anstieg der Amplitudenwerte mit steigender Resistenz mit den höchsten Werten in Resistenzklasse 9.

---

<sup>17</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>18</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

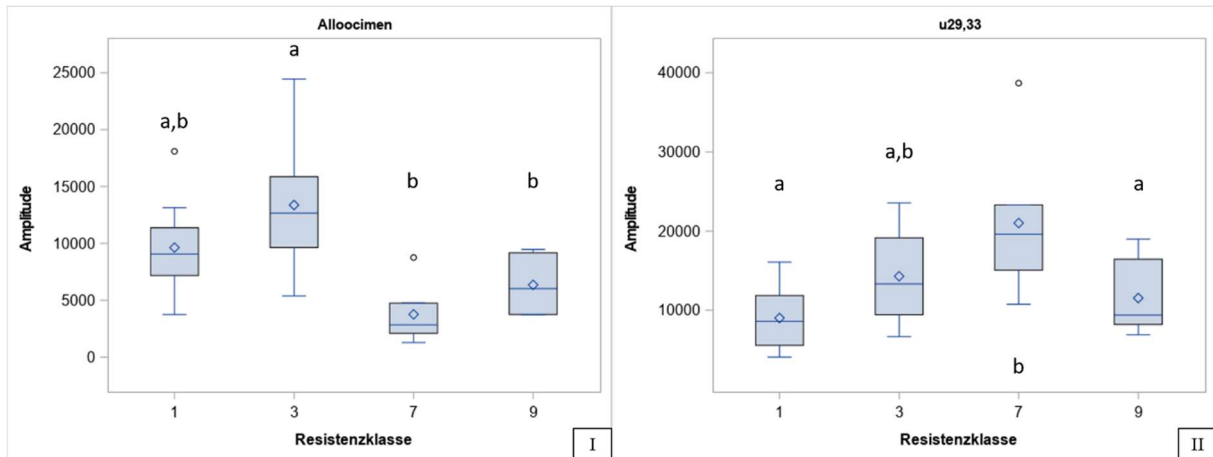


Abb. 27: Amplitudenwerte von I) Alloocimen und II) der unbekanntes Substanz u29,33. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert.

Im Entwicklungsstadium BBCH8 wurden in zwei aufeinander folgenden Jahren insgesamt 23 Resistenzmarker ermittelt (15 „positive“ Marker und acht „negative“ Resistenzmarker). Ebenso wie im Entwicklungsstadium BBCH6 wurden auch in BBCH8 die meisten Resistenzmarker

*Im Entwicklungsstadium BBCH8 wurden 23 konstitutive Resistenzmarker identifiziert, wobei vier Marker in beiden Jahren auftraten. In BBCH8 2011 wurden keine „negativen“ Resistenzmarker ermittelt.*

bereits durch die ungerichtete Analytik in mindestens einem Entwicklungsstadium bestimmt (11 / 15 „positive“ und 7 / 8 „negative“ Resistenzmarker). Benzylalkohol, (*E*)- $\beta$ -Damascenon, Methylsalicylsäure und u29,64 traten in beiden Jahren als „positive“ Resistenzmarker auf. Nur in BBCH8 2012 wurden negative Resistenzmarker ermittelt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH8 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012

"Positive" Resistenzmarker	BBCH8 2011	BBCH8 2012
Benzylalkohol	X	X
p-Cymenen		X
( <i>E</i> )- $\beta$ -Damascenon	X	X
Dihydroedulan I		X
2-Ethylfuran	X	
( <i>Z</i> )-3-Hexenol		X
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ionon		X
Methylsalicylsäure	X	X
Nonanal		X

### 3 Resultate

<b>"Positive" Resistenzmarker</b>	<b>BBCH8 2011</b>	<b>BBCH8 2012</b>
Nonanol		X
Theaspiran A	X	X
u10,43		X
u29,64	X	X
u32,51		X
u44,70		X
<b>"Negative" Resistenzmarker</b>	<b>BBCH8 2011</b>	<b>BBCH8 2012</b>
Benzylbenzoat		X
$\alpha$ -Calacoren		X
Geraniol		X
(E)- $\beta$ -Ocimen		X
(Z)- $\beta$ -Ocimen		X
u33,95		X
u40,61		X
u44,49		X

Tabelle 23: 20 Metabolite in BBCH8 2011, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. **FETT gedruckt = p<0,05**

<b>Resistenz- marker</b>	<b>CAS</b>	<b>BBCH8 2011</b>					
		<b>1/9</b>	<b>1/7</b>	<b>3/9</b>	<b>3/7</b>	<b>1/3</b>	<b>7/9</b>
Benzylalkohol	100-51-6	<b>&lt;0,0001</b>	0,2637	0,1088	0,3988	<b>0,0005</b>	<b>0,0134</b>
Cuparen	16982-00-6	0,9289	0,9908	0,6627	0,9944	0,8800	0,8499
(E)- $\beta$ -Damasconen	23726-93-4	0,6207	<b>&lt;0,0001</b>	0,8610	<b>&lt;0,0001</b>	0,9143	<b>0,0002</b>
2-Ethylfuran	124-18-5	<b>0,0109</b>	0,3851	0,0526	0,8200	0,7585	0,3394
Eugenol	97-53-0	0,9961	0,2394	0,4905	0,9995	0,1021	0,5638
Geraniol	106-24-1	0,4556	0,4199	0,4078	0,3664	0,9994	0,9990
(E,E)-2,4-Hexadienal	142-83-6	0,9943	0,1057	0,9878	0,1055	0,9999	0,1820
Hexanal	66-25-1	0,9575	0,7396	0,9956	0,8946	0,9724	0,9889
(Z)-3-Hexenylacetat	3681-71-8	0,0511	0,0624	0,7877	0,9521	0,0588	0,9759
(Z)-3-Hexenylbutyrat	16491-36-4	0,4580	0,4559	0,9967	1,0000	0,2694	0,9986
(Z)-3-Hexenylpropanoate	33467-74-2	0,6253	0,8680	0,9416	1,0000	0,7844	0,9643

### 3.3 Konstitutive Marker (Freilandproben)

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
(Z)-Linalool oxide	5989-33-3	0,9982	0,9363	1,0000	0,9843	0,9935	0,9934
Megastigma- trienon	38818-55-2	0,5166	0,0137	0,0853	0,1952	0,4329	0,0027
Methyl- salicylsäure	119-36-8	<b>0,0095</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,0331</b>	<b>0,0129</b>	0,8442	1,0000
α-Santalol	11031-45-1	0,9875	0,8094	0,8315	0,9650	0,3276	0,9809
Theaspiran A	43126-22-3	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,5166	0,4865	<b>0,0001</b>	0,9990
u13,66		0,8954	0,8897	0,7136	0,6592	0,9538	0,9996
u29,64		<b>&lt;0,0001</b>	0,0547	<b>0,0025</b>	0,5172	0,3622	0,0975
u40,61		0,9364	0,6867	0,5333	0,9948	0,7198	0,5027
u43,32		0,9956	0,0746	0,8449	0,5301	0,4307	0,3232

Tabelle 24: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH8 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7	0,9287	0,9947	0,4951	0,6463	0,6791	0,9871
Benzaldehyd	100-52-7	0,9708	0,8104	0,9725	0,9994	0,5990	0,9935
Benzylbenzoat	120-51-4	nicht detektiert					
α-Calacoren	21391-99-1	nicht detektiert					
p-Cymenen	1195-32-0	0,9851	<b>0,0215</b>	0,9995	<b>0,0415</b>	0,9741	0,2056
Dihydroedulan I	63335-66-0	0,5606	0,1092	0,6642	0,9604	<b>0,0044</b>	0,9258
Geraniol	106-24-1	0,453	0,3908	0,409	0,3282	0,9994	0,9995
Geraniumoxid	7392-19-0	0,9425	0,7373	0,9873	1,0000	0,5475	0,9939
Geranylaceton	3796-70-1	0,5703	0,9523	0,3950	0,8142	0,9752	0,8796
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	0,1549	0,5614	0,3179	0,8372	0,9221	0,7986
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	<b>0,0001</b>	0,2067	<b>0,0002</b>	0,2960	0,9878	<b>0,0448</b>
Hotrienol	29957-43-5	0,7923	0,8747	0,9897	0,9996	0,8166	0,9956
(E)-β-Ionon	79-77-6	0,9999	<b>0,0052</b>	0,9739	<b>0,0142</b>	0,9570	<b>0,0420</b>
Linalool	78-70-6	0,7700	0,8066	0,3907	0,3749	0,8089	0,9986
β-Myrcen	123-35-3	0,9190	0,9354	0,6636	0,6391	0,8967	0,9993
Nerol	106-25-2	0,9521	0,9818	0,3905	0,3843	0,4222	0,9981
Nonanal	124-19-6	0,6009	0,2974	0,8092	0,5038	0,9505	0,9943
Nonanol	143-08-8	0,8917	0,6709	0,9995	0,9981	0,6241	0,9955

### 3 Resultate

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
(E)- $\beta$ -Ocimen	3779-61-1	0,8509	0,9490	0,4466	0,5341	0,7723	0,9944
(Z)- $\beta$ -Ocimen	3338-55-4	0,8987	0,9385	0,4851	0,4655	0,7245	0,9981
2-Phenylethanol	60-12-8	0,6008	<b>0,0131</b>	0,1073	0,1728	0,4289	<b>0,0044</b>
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	0,9981	0,1563	0,9989	0,1540	0,9999	0,4325
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	0,9981	0,9943	0,6252	0,8047	0,4631	0,9836
$\alpha$ -Terpinolen	586-62-9	0,9994	0,9981	0,6039	0,4635	0,3877	1,0000
u10,43		nicht detektiert					
u15,19		0,5545	0,9650	0,6127	0,9859	0,9983	0,8490
u29,33		nicht detektiert					
u32,51		0,9353	0,0548	0,9984	0,2916	0,6711	0,4331
u33,95		0,6253	0,2656	<b>0,0220</b>	<b>0,0015</b>	0,0680	0,9854
u40,86		nicht detektiert					
u43,43		0,9844	0,9985	0,5530	0,7825	0,5314	0,9707
u44,49		0,8626	0,1784	0,3008	0,7654	0,4895	0,1106
u44,70		0,3795	0,0987	0,2920	0,0592	0,9969	0,9804

Tabelle 25: 35 Metabolite in BBCH8 2012, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Azulol	489-84-9	0,2585	0,8703	0,1082	0,6519	0,9905	0,6751
Benzylalkohol	100-51-6	<b>0,0002</b>	0,9998	0,9220	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>0,0002</b>
Benzylbenzoat	120-51-4	<b>0,0027</b>	<b>0,0011</b>	0,2822	0,2295	0,0555	1,0000
p-Cymol	99-87-6	0,8262	0,0691	0,9909	0,1515	0,9110	0,4055
(E)- $\beta$ -Damascon	23726-93-4	0,9985	<b>0,0157</b>	0,6715	0,0825	0,7288	<b>0,0166</b>
(E)- $\beta$ -Damascon	85949-43-5	0,6546	0,1971	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>0,0007</b>	0,8705
2-Ethylfuran	124-18-5	0,2675	0,9992	0,9844	0,3895	0,2996	0,3327
Ethylvinylketon	1629-58-9	<b>0,0127</b>	0,6379	0,1465	0,9994	0,4743	0,1869
Eugenol	97-53-0	0,9908	0,2381	0,1054	0,8753	<b>0,0260</b>	0,4604
Geraniol	106-24-1	0,7084	<b>0,0282</b>	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>0,0024</b>	0,3381
Geranylaceton	3796-70-1	0,8223	0,7018	0,1524	<b>0,0006</b>	<b>0,0097</b>	0,2722

## 3.3 Konstitutive Marker (Freilandproben)

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Hexanal	66-25-1	0,7767	0,9367	0,9952	0,9980	0,8249	0,9833
(E)-3-Hexenol	928-97-2	0,2586	0,3827	0,6293	0,8029	0,7997	0,9908
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	0,3366	<b>0,0128</b>	1,0000	0,3988	0,1884	0,5100
Isoterpinolen	586-63-0	0,0559	0,9999	0,4344	0,5309	0,4479	0,0782
Megastigma- trienon		0,2060	0,9636	<b>0,0107</b>	0,3059	0,5752	0,4506
2-Methyl-4-Pen- tenal	5187-71-3	1,0000	0,5724	0,9986	0,3911	0,9973	0,6243
Methyl- salicylsäure	119-36-8	<b>&lt;0,000 1</b>	<b>0,0133</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	0,3253	0,2592	<b>&lt;0,000 1</b>
Myrtenal	564-94-3	0,0589	0,7593	0,9217	0,5795	0,0881	0,3555
Nerol	106-25-2	0,9998	0,2507	0,6379	<b>0,0096</b>	0,5017	0,2700
Nonanal	124-19-6	0,7895	<b>0,0254</b>	0,9999	0,1107	0,7370	0,2384
(E)- $\beta$ -Ocimen	3779-61-1	0,5274	<b>0,0105</b>	<b>0,0257</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	0,3526	0,2986
(Z)- $\beta$ -Ocimen	3338-55-4	0,3553	<b>0,0106</b>	<b>0,0128</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	0,3895	0,4539
Octansäure	124-07-2	0,8649	0,9738	1,0000	0,9815	0,8152	0,9858
1-Octen-3-ol	3391-86-4	0,7900	0,0764	0,7655	0,0485	1,0000	0,4610
2-Phenyl- ethanol	60-12-8	0,0880	0,8289	<b>0,0083</b>	0,2970	0,7942	0,3979
$\alpha$ -Terpinolen	586-62-9	0,7470	0,9286	0,9806	0,1435	0,3872	0,4235
u10,43		<b>0,0029</b>	0,9810	0,0671	0,8551	0,5854	<b>0,0250</b>
u13,66		0,9989	0,9261	0,4161	0,1646	0,4350	0,9735
u15,19		0,8679	0,9923	0,9296	0,9499	0,9954	0,7394
u33,95		<b>&lt;0,000 1</b>	<b>&lt;0,000 1</b>	0,6934	0,4737	<b>&lt;0,000 1</b>	0,9952
u39,79		0,2940	0,2673	0,1554	0,1355	0,9958	1,0000
u40,61		<b>0,0197</b>	0,0853	<b>0,0041</b>	<b>0,0193</b>	0,9692	0,8891
u44,49		<b>0,0039</b>	0,2210	<b>0,0009</b>	0,1104	0,9975	0,2580
u49,03		0,1330	0,6516	0,0692	0,4942	0,9984	0,6828

Tabelle 26: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker in BBCH8 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt =  $p < 0,05$** 

Resistenz- marker	CAS	BBCH8 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7	0,5483	0,0838	<b>0,0208</b>	<b>0,0007</b>	0,2982	0,7398
Benzaldehyd	100-52-7	0,8173	0,9733	0,5803	0,2623	0,0892	0,9696
$\alpha$ -Calacoren	21391-99-1	<b>0,0249</b>	0,2815	<b>0,0090</b>	0,1465	0,9966	0,6217
p-Cymenen	1195-32-0	0,4851	<b>&lt;0,0001</b>	0,974	<b>&lt;0,0001</b>	0,6172	<b>0,0008</b>
Dihydroedulan I	63335-66-0	<b>0,0276</b>	0,0991	0,9796	0,9879	<b>0,0212</b>	0,9115
Geraniumoxid	7392-19-0	nicht detektiert					
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	0,9034	0,8783	0,9984	0,4927	0,9254	0,5290
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	<b>0,0291</b>	0,1049	0,4102	0,8089	0,3195	0,9157
Hotrienol	29957-43-5	0,5229	0,6805	0,5482	0,523	0,9984	0,1045
Linalool	78-70-6	0,9949	0,2374	0,2892	<b>0,0041</b>	0,3405	0,4164
$\beta$ -Myrcen	123-35-3	nicht detektiert					
Nonanol	143-08-8	<b>0,0009</b>	0,4128	0,4540	0,4371	<b>0,0105</b>	0,0619
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	nicht detektiert					
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	0,8892	0,9691	0,8003	0,1276	0,2816	0,6637
Theaspiran A	43126-22-3	0,2527	<b>&lt;0,0001</b>	0,9807	<b>0,0096</b>	0,055	<b>0,0122</b>
u29,33		0,8719	<b>0,0033</b>	0,8001	0,1149	0,2580	<b>0,0437</b>
u29,64		<b>0,0064</b>	0,6185	0,1458	0,9776	0,2969	0,1147
u32,51		<b>0,0171</b>	<b>0,0314</b>	<b>0,0256</b>	<b>0,0477</b>	0,9732	0,9907
u40,86		nicht detektiert					
u43,43		nicht detektiert					
u44,70		<b>0,0088</b>	0,1035	<b>0,0172</b>	0,2360	0,9090	0,6543

### 3.3.6 BBCH9 Zwei Jahre

#### BBCH9 2011 Ungerichtete Analysen

Die SR Analysen ergaben 413 Massenfragmente mit einem Korrelationskoeffizienten  $\rho > 70\%$  und fünf Massenfragmente mit  $\rho < -70\%$ . Die Auswertung der Massenfragmente führte zu acht hochkorrelierenden Metaboliten. Die PLS Analysen führten zu 46 VIP bzw. Massenfragmenten, die wiederum aus den Massenspektren von 11 Metaboliten stammten. In BBCH9 2011 wurden insgesamt 14 Metabolite auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen untersucht (Tabelle 28). (*E*)-Edulan und Geraniol wiesen in BBCH9 2011 keine signifi-



signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen auf. In den übrigen 12 Metaboliten waren die Amplitudenwerte in den anfälligen Resistenzgruppen geringer als in den resistenten Gruppen. Alle 12 Metabolite waren „positive“ Resistenzmarker. Vier dieser Substanzen besaßen in der Resistenzklasse 7 ein Maximum (p-Cymenen, Geranylaceton, (*E*)- $\beta$ -Ionon und die nicht identifizierte Substanz u44,70<sup>19</sup>). Bei p-Cymenen war dieses Maximum so stark ausgeprägt, dass auch zwischen den Resistenzgruppen 7 und 9 signifikante Unterschiede auftraten. Gleichzeitig waren die p-Cymenen Gehalte in beiden anfälligen Resistenzgruppen 1 und 3 niedriger als in den zwei resistenten Gruppen (Abb. 28 I). Für diese Substanzen waren die Gehalte sowohl in den Akzessionen von *V. riparia* als auch in der Hybridrebe Blaue Isabella erhöht. Bei (*E*)- $\beta$ -Ionon waren die Amplitudenwerte nur in den *V. riparia* Akzessionen und nicht in der Hybridrebe erhöht.

Die verbleibenden acht Metabolite (Benzaldehyd, Dihydroedulan I, (*Z*)-3-Hexenol, Methylsalicylsäure, Theaspiran A, Hotrienol und die unbekannt Substanzen u29,64 und u29,33<sup>20</sup>) zeigten einen relativ stetigen Anstieg der Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenz in den Gruppen. In Abb. 28 II ist beispielhaft die Verteilung von (*Z*)-3-Hexenol in den Resistenzklassen gezeigt.

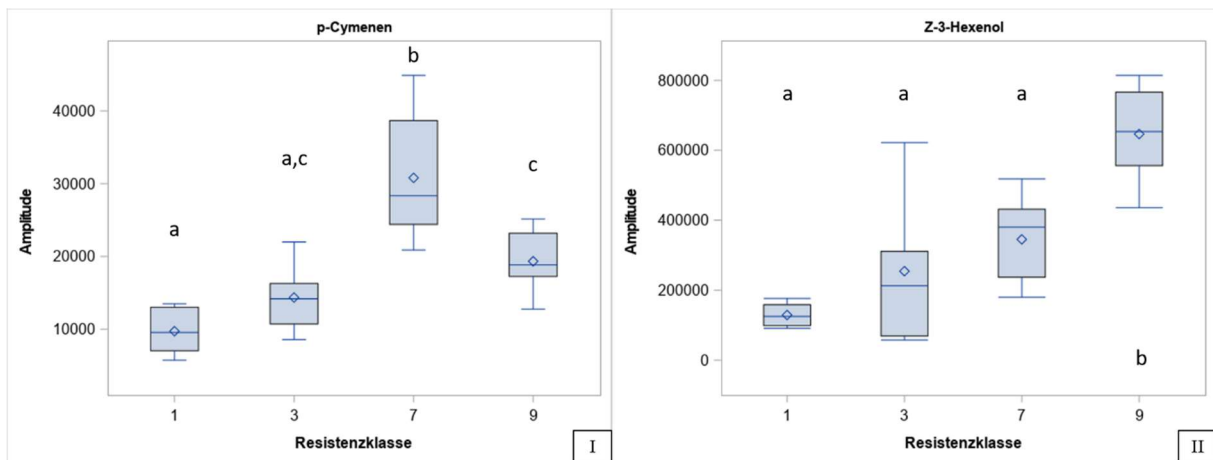


Abb. 28: „positive“ Resistenzmarker BBCH9 2011. Steigende Amplitudenwerte mit zunehmender Resistenzklasse I) p-Cymenen und II) (*Z*)-3-Hexenol. -) Median, ◇) arithmetisches Mittel, °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

<sup>19</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>20</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

BBCH9 2011 Zielgerichtete Analysen

28 Substanzen wurden in anderen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker identifiziert. Diese 28 Substanzen wurden zielgerichtet daraufhin überprüft, ob sie im Entwicklungsstadium BBCH9 2011 ebenfalls als Resistenzmarker eingestuft werden könnten (Tabelle 29). Neun dieser Metabolite wurden nicht detektiert (Alloocimen, Benzylbenzoat, Geraniumoxid, Nerol, die beiden  $\beta$ -Ocimen-Isomere und die unbekannt Substanzen u10,43, u33,95 und u40,86) und weitere neun Substanzen zeigten keine signifikanten Klassenunterschiede (Linalool, Megastigmatrienon, 2-Phenylethanol, (Z)-Rosenoxid,  $\alpha$ -Terpineol,  $\alpha$ -Terpinolen und die unbekannt Substanzen u15,19, u40,61 und u44,49). Die drei Metabolite Benzylalkohol,  $\alpha$ -Calacoren, und u43,43 besaßen zwar signifikante Unterschiede zwischen einigen Resistenzklassen, jedoch lagen die Amplitudenwerte aller Resistenzgruppen im selben Bereich. Einzelne Genotypen zeigten stark erhöhte Werte, wodurch der Mittelwert der ganzen Klasse signifikant angehoben wurde (Abb. 29 I). Benzylalkohol wurde nur in Delaware (Klasse 3) und  $\alpha$ -Calacoren nur in Riesling, aber nicht in Müller-Thurgau (beide Klasse 1) mit sehr hohen Gehalten detektiert. Ebenfalls wurde  $\beta$ -Myrcen in BBCH9 2011 nicht als Resistenzmarker eingestuft. Klasse 7 unterschied sich signifikant von Klasse 3, wobei die niedrigsten Gehalte in Resistenzklasse 7 detektiert wurden. Ein Zusammenhang mit Resistenzeigenschaften erschien eher unwahrscheinlich, da die Klassen 1, 3 und die resistente Klasse 9 alle ähnliche Amplitudenwerte aufwiesen (Abb. 29 II).

Die übrigen sechs Metabolite (2-Ethylfuran, (Z)-3-Hexenal, Nonanal, Nonanol, (E)- $\beta$ -Damascenon und die unbekannt Substanz u32,51) zeigten einen relativ stetigen Anstieg der Amplitudenwerte hin zu den resistenteren Genotypen. Daher wurden sie als weitere „positive“ Resistenzmarker für BBCH9 2011 annotiert. Wobei für (E)- $\beta$ -Damascenon die Werte in den Genotypen der Resistenzklasse 7 über den detektierten Werten der Klasse 9 lagen.

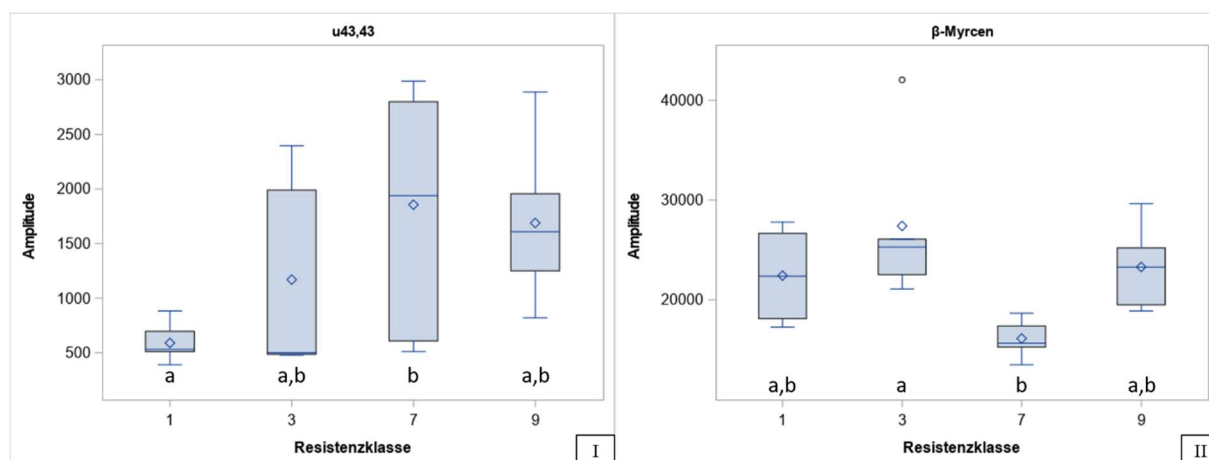


Abb. 29: Amplitudenwerte von I) der unbekannt Substanz u43,43 und II)  $\beta$ -Myrcen in BBCH9 2011. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert.

### BBCH9 2012 Ungerichtete Analyse

Im Entwicklungsstadium BBCH9 2012 wurden durch SR Analysen 164 Massenfragmente ermittelt, deren Korrelationskoeffizienten  $\rho > 70\%$  und 15 Massenfragmente, deren Koeffizienten  $\rho < -70\%$  waren. Durch die nachfolgenden Auswertungen konnten daraus vier hochkorrelierende Metabolite ermittelt werden. Mit PLS wurden 298 Massenfragmente ermittelt, die aus den Massenspektren von 30 Metaboliten stammten. Insgesamt wurden 32 Metabolite auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen untersucht (Tabelle 30). Neun Substanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klassen. Die unbekannte Substanz u49,03<sup>21</sup> besaß nur zwischen den resistenten Klassen 7 und 9 einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0397$ ) nicht aber zwischen einer resistenten und einer anfälligen Klasse. Daher wurde u49,03 nicht als Resistenzmarker eingestuft.

Bei den vier Metaboliten D-Limonen, Megastigmatrienon und den unbekannt Substanzen u44,74 und u40,86<sup>22</sup> lagen die signifikanten Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 9 und 3 vor, nicht jedoch zur stark anfälligen Klasse 1. Es zeigte sich bei genauerer Betrachtung, dass bei D-Limonen und u44,74 die Amplitudenwerte über alle Klassen verteilt im selben Bereich lagen. Wobei die minimalen Werte in Klasse 3, die maximalen Amplitudenwerte in Resistenzklasse 9 detektiert wurden. Klasse 3 besaß zudem jeweils die niedrigste Varianz, so dass sich die Mittelwerte signifikant voneinander unterschieden. Wegen der großen Datenüberschneidung wurden D-Limonen und u44,74 jedoch nicht als Resistenzmarker eingestuft (Abb. 30 I).

Megastigmatrienon und die unbekannte Substanz u40,86 besaßen ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 9 und der Klasse 3, welche u.a. die pilzwiderstandsfähigen *V. vinifera* Züchtungen Regent und Phoenix umfasste. Die Gehalte beider Substanzen besaßen in den Genotypen der Resistenzklasse 9 ihre Minimalwerte und der Boxplot zeigte, dass die Werte sich nicht über den ganzen Amplitudenbereich überschneiden. Für Megastigmatrienon waren in allen *V. vinifera* und *V. riparia* Genotypen die Gehalte höher als bei den Genotypen die von *V. labrusca* abstammten. Für die Substanz u40,86 wurde nur in den pilzwiderstandsfähigen Züchtungen *V. vinifera* cv. Regent und Phoenix erhöhte Gehalte detektiert, nicht jedoch in *V. riparia*. u40,86 könnte an der Resistenzantwort von *V. vinifera* beteiligt sein und Megastigmatrienon an Resistenzantworten von *V. vinifera* und *V. riparia*. Daher wurde

---

<sup>21</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>22</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

Megastigmatrienon zu den „positiven“ und u40,86 in BBCH9 2012 zu den „negativen“ Resistenzmarkern gezählt (Abb. 30 II) (Ausführliche Beschreibung zu Megastigmatrienon siehe Kapitel 3.3.7 Zweijähriger Vergleich aller Resistenzmarker).

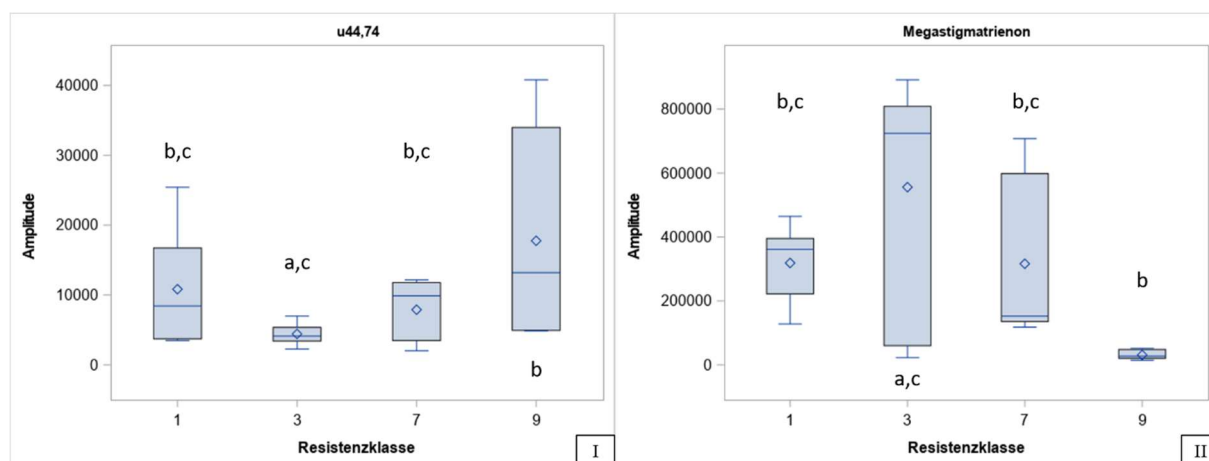


Abb. 30: Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Resistenzklassen 3 und 9. I) u44,74 und II) Megastigmatrienon -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel,  $\circ$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

Bei 18 Metaboliten lagen signifikante Unterschiede zwischen der stark anfälligen Resistenzklasse 1 zu mindestens einer der beiden resistenten Klassen 7 oder 9 vor. Die Einzelbetrachtungen der Amplitudenverteilung zeigten jedoch, dass damit nicht in jedem Fall der Metabolit als Resistenzmarker eingestuft werden konnte. Die drei Substanzen Ethylvinylketon, Geraniol und Nerol zeigten zwar signifikante Unterschiede zwischen mehreren Klassen, jedoch wurden die höchsten Amplitudenwerte in den Resistenzklassen 1 und 9 detektiert. Die Amplitudenwerte der Klassen 3 und 7 waren signifikant niedriger (Abb. 31 I). Ein solcher nahezu „U“-förmiger Verlauf deutet nicht auf einen Zusammenhang zu Resistenzantworten zwischen den Weinarten hin. Daher wurden Ethylvinylketon, Geraniol und Nerol für das Entwicklungsstadium BBCH9 2012 nicht als Resistenzmarker klassifiziert.  $\alpha$ -Terpinolen zeigte signifikante Unterschiede zwischen den anfälligen Klassen und Resistenzklasse 9. Jedoch wurden für Klasse 1 und 9 sich weitgehend überschneidende Amplitudenwerte detektiert. Daher kann  $\alpha$ -Terpinolen ebenfalls nicht als Resistenzmarker in BBCH9 2012 eingestuft werden.

1-Octanol und p-Cymol zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Resistenzklasse 7 zu allen drei anderen Klassen. Es stellt sich heraus, dass die Gehalte ausschließlich in den Blättern der Blauen Isabella erhöht vorlagen, wodurch die Amplitudenwerte der ganzen Gruppe erhöht wurden. Da die hohen Werte nur in einem Genotyp (einer Hybridrebe) detektiert wurden, wurden 1-Octanol und p-Cymol nicht zu den Resistenzmarkern gezählt.

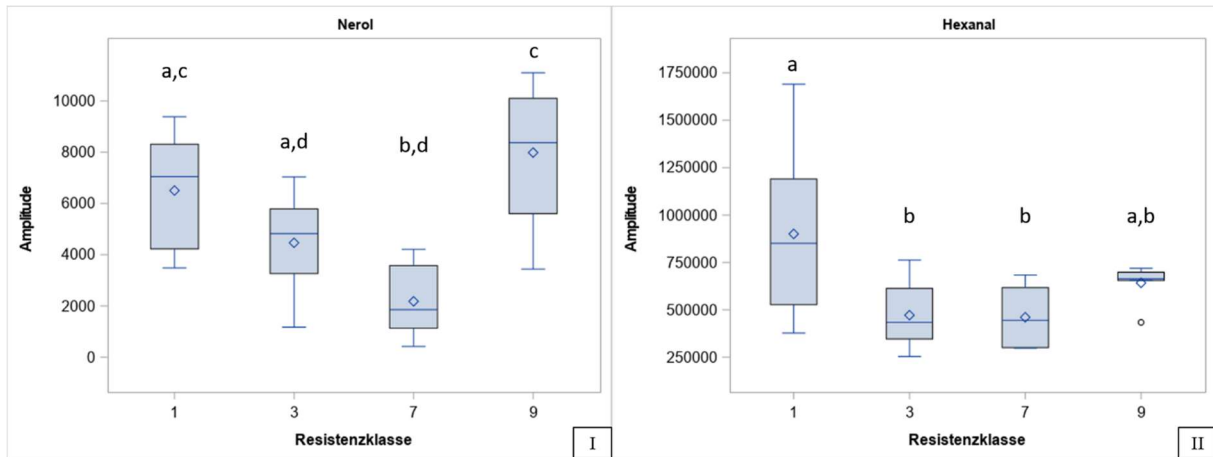


Abb. 31: Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen Resistenzklassen ohne Einstufung als Resistenzmarker in BBCH9 2012. I) Nerol und II) Hexanal. -) Median,  $\diamond$ ) arithmetisches Mittel,  $\circ$ ) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

Sieben Metabolite ( $\alpha$ -Calacoren, Geraniumoxid, Hexanal, (*E*)- $\beta$ -Ocimen und die unbekannt Substanzen u15,19, u33,95 und u44,49<sup>23</sup>) besaßen in der anfälligen Resistenzklasse 1 höhere Amplitudenwerte als in den resistenteren Klassen 7 und / oder 9. Bei Hexanal lagen die Amplitudenwerte der Klassen jedoch so eng beieinander, dass keine Zuordnung als Resistenzmarker vorgenommen wurde (Abb. 31 II). Die sieben übrigen Metabolite wurden als „negative“ Resistenzmarker eingestuft (Tabelle 27). Interessanterweise gab es in BBCH9 2012 bei diesen „negativen“ Resistenzmarkern keine „Treppenverläufe“ wo jeweils die beiden anfälligen bzw. resistenten Klassen ein gemeinsames Plateau bildeten. Sondern bei den hier vorliegenden negativen Resistenzmarkern war stets nur eine Klasse signifikant verschieden von den übrigen Resistenzklassen. Geraniumoxid und (*E*)- $\beta$ -Ocimen hatten die höchsten Gehalte in Resistenzklasse 1 und die niedrigsten in Klasse 7 (Abb. 32 I). Für  $\alpha$ -Calacoren wurden zwischen den Resistenzklassen 1, 3 und 7 keine signifikanten Unterschiede gemessen, jedoch zu Klasse 9. Bei u15,19, u33,95 und u44,49 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen 3, 7 und 9 detektiert, jedoch zu Resistenzklasse 1 (Abb. 32 II und III).

<sup>23</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

### 3 Resultate

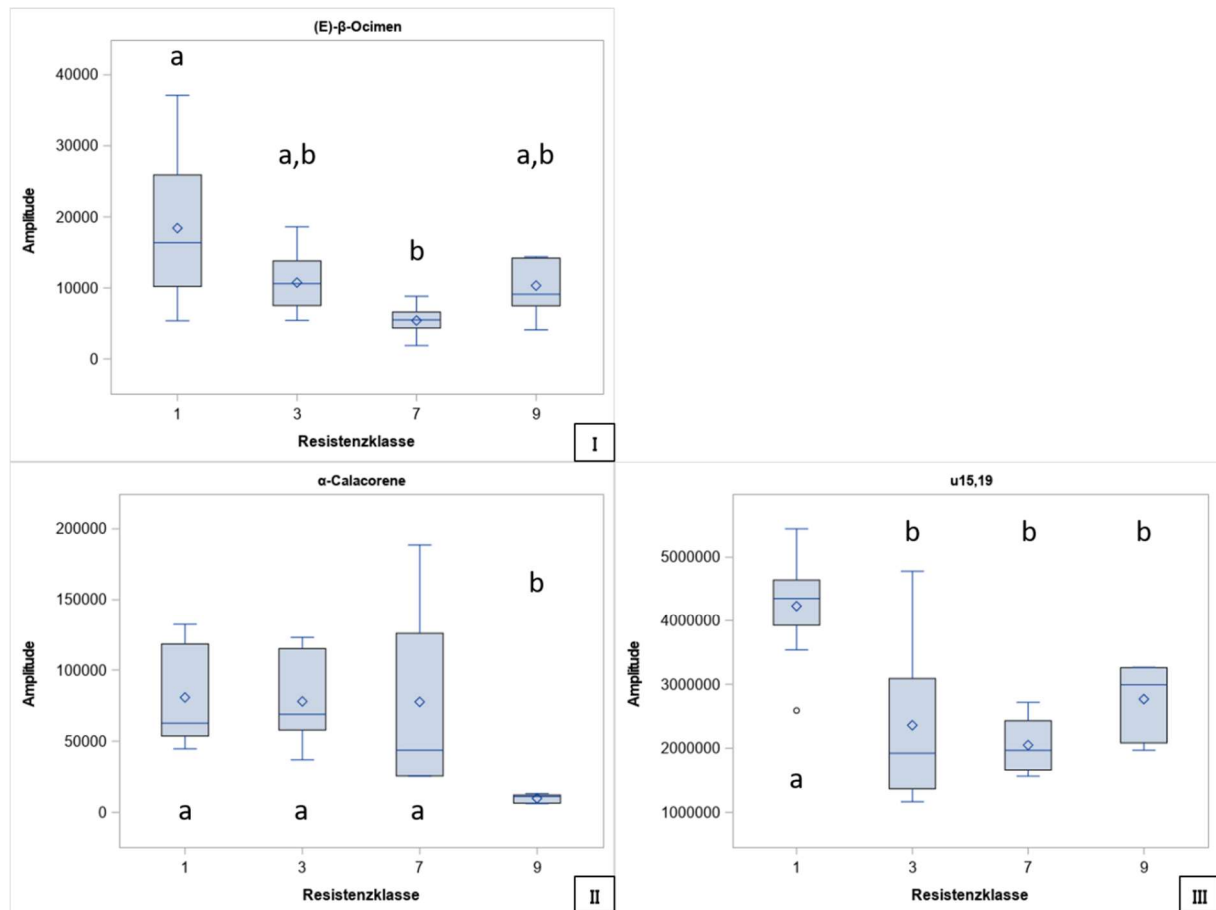


Abb. 32: „negative“ Resistenzmarker BBCH9 2012. Höhere Metabolitgehalte in der anfälligen Resistenzklassen 1. I) (E)-β-Ocimen II) α-Calacorene III) u15,19 (-) Median, (◇) arithmetisches Mittel, (°) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

Vier weitere Metabolite ((E)-β-Ionon, Methylsalicylsäure, 2-Phenylethanol und die unbekannte Substanz u43,43<sup>24</sup>) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den anfälligen und den resistenten Genotypen, wobei die Gehalte in resistenten Pflanzenblättern höher waren. Diese vier „positiven“ Resistenzmarker besaßen entweder einen relativ stetigen Anstieg ihrer Gehalte ((E)-β-Ionon und Methylsalicylsäure) oder Resistenzklasse 9 war signifikant höher als die anderen Resistenzklassen, die alle auf einem ähnlich niedrigen Niveau (Geranylaceton, 2-Phenylethanol, u43,43) lagen. Siehe hierzu die Amplitudenverteilung von Methylsalicylsäure und u43,43 in Abb. 33.

<sup>24</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

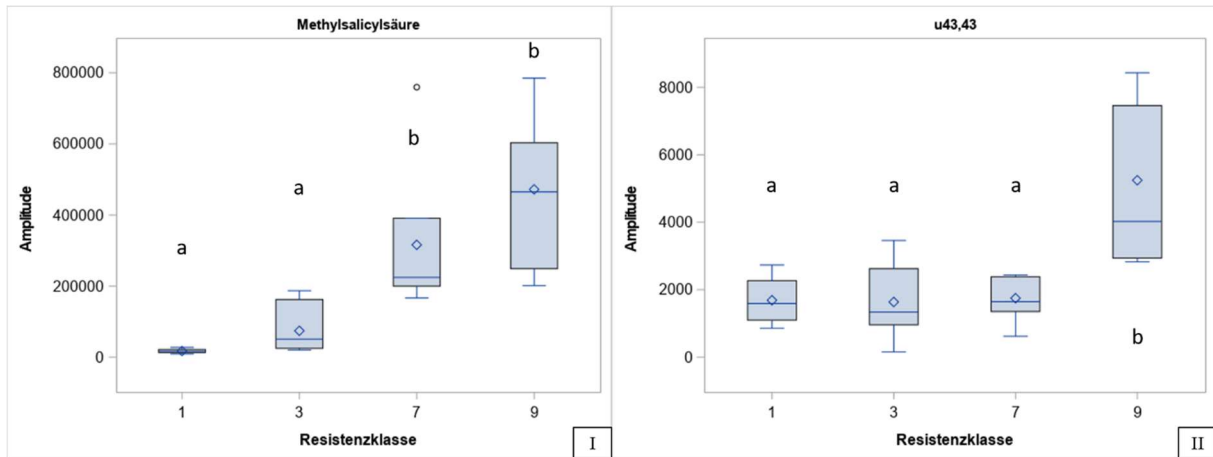


Abb. 33: „positive“ Resistenzmarker BBCH9 2012. I) Methysalicylsäure II) u43,43 (-) Median, (◇) arithmetisches Mittel °) Werte außerhalb der maximalen Whiskerdistanz vom 1,2fachen des oberen / unteren Quartils.

### BBCH9 2012 Zielgerichtete Analysen

21 weitere Metabolite wurden in anderen Entwicklungsstadien als konstitutive Resistenzmarker identifiziert. Daher wurden diese Substanzen im Entwicklungsstadium BBCH9 2012 zielgerichtet auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen überprüft (Tabelle 31). Acht Substanzen wurden nicht detektiert (Alloocimen, Benzylbenzoat, Hotrienol,  $\beta$ -Myrcen, (Z)-Rosenoxid und die unbekannteten Substanzen u10,43, u29,33 und u40,70). (E)- $\beta$ -Damascenon und Dihydroedulan I besaßen nur zwischen den beiden resistenten Klassen 7 und 9 signifikante Unterschiede und wurden daher für BBCH9 2012 nicht als Resistenzmarker eingestuft. Ebenfalls konnte keine Zuordnung als Resistenzmarker für die drei Metabolite Benzaldehyd, Linalool und u40,61 vorgenommen werden. Benzaldehyd und Linalool (Abb. 34 II) besaßen eine „U-förmige“ Verteilung der Amplitudenwerte, wobei die Gehalte in Klasse 1 und 9 am höchsten waren (siehe Beschreibung der „U-Form“ unter 3.3.6 für Ethylvinylketon, Geraniol und Nerol z.B. Abb. 31 I). u40,61 wurde nicht als Resistenzmarker eingestuft, da nur in Delaware sehr hohe Amplitudenwerte detektiert wurden. Alle anderen Amplitudenwerte unterschieden sich nicht signifikant. (Abb. 34 I).

Neun Metabolite wurden durch die zielgerichtete Untersuchung als „positive“ Resistenzmarker ermittelt (Benzylalkohol, p-Cymenen, (Z)-3-Hexenol, Nonanal, Nonanol, Theaspiran A,  $\alpha$ -Terpineol und die unbekannteten Substanzen u29,64 und u32,51). Sieben der Metabolite zeigten einen relativ stetigen Anstieg der Amplitudenwerte hin zu den Genotypen mit der höchsten Resistenz. Die zwei Metabolite p-Cymenen und Theaspiran A hatten jedoch die höchsten Gehalte in den Genotypen der Resistenzklasse 7. Die Werte waren für die Hybridrebe Blaue Isabella und die Wildrebe *V. riparia* erhöht.

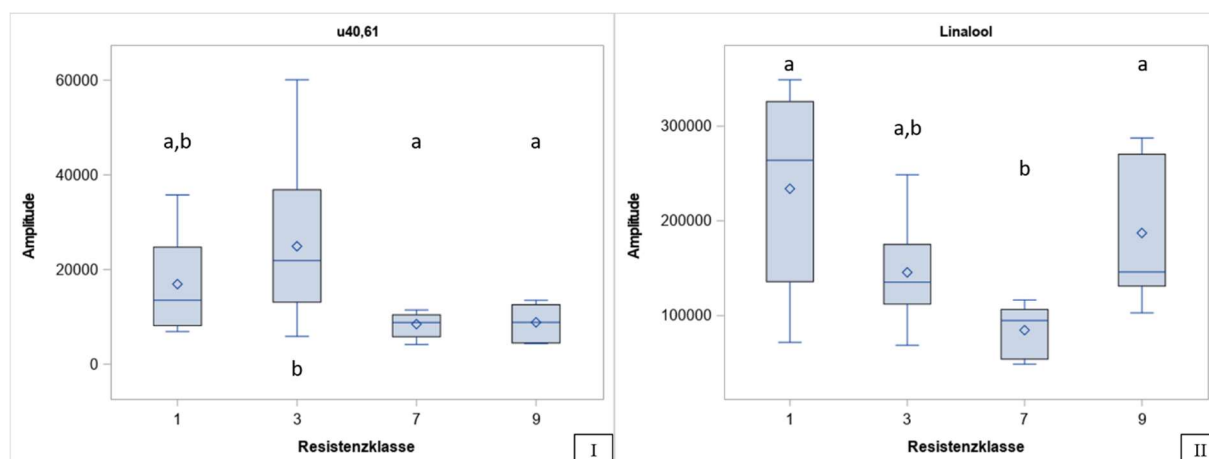


Abb. 34: Amplitudenwerte von I) der unbekannt Substanz u40,61 und II) Linalool in BBCH9 2012. Keine Resistenzmarker, trotz signifikantem p-Wert. Signifikante p-Wert Unterschiede werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet.

Im Entwicklungsstadium BBCH9 ergaben sich insgesamt 30 Resistenzmarker (22 „positive“, 7 „negative“ Resistenzmarker, sowie Megastigmatrienon<sup>25</sup>). Auch für das Entwicklungsstadium BBCH9 galt, dass die meisten Resistenzmarker durch die ungerichteten statistischen Verfahren in mindestens einem Jahr ermittelt wurden. Diese identifizierten 15 / 22 „positiven“ Resistenzmarker und Megastigmatrienon (12 Marker in 2011 und sieben Metabolite in 2012) sowie alle sieben „negativen“ Resistenzmarker. Ebenso wie in BBCH8 2011 wurden keine „negativen“ Resistenzmarker im ersten Versuchsjahr 2011 ermittelt. Die zehn Metabolite p-Cymenen, Geranylaceton, (Z)-3-Hexenol, (E)- $\beta$ -Ionon, Methylsalicylsäure, Nonanal, Nonanol, Theaspiran A und die beiden unbekannt Substanzen u29,64 und u32,51 traten in beiden Versuchsjahren als „positive“ Resistenzmarker auf (Tabelle 27).

---

*Im Entwicklungsstadium BBCH9 wurden 30 konstitutive Resistenzmarker identifiziert, wovon zehn Marker in beiden Jahren auftraten. In BBCH9 2011 wurden keine „negativen“ Resistenzmarker ermittelt.*

---

<sup>25</sup> Megastigmatrienon wird als Sonderfall und nicht als „positiver“ Resistenzmarker aufgeführt. Siehe hierzu die Erklärung in Kapitel 3.3.7.



Tabelle 27: Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH9 in den beiden Versuchsjahren 2011 + 2012

<b>"Positive" Resistenzmarker</b>	<b>BBCH9 2011</b>	<b>BBCH9 2012</b>
Benzaldehyd	X	
Benzylalkohol		X
p-Cymenen	X	X
(E)- $\beta$ -Damascenon	X	
Dihydroedulan I	X	
2-Ethylfuran	X	
Geranylaceton	X	X
(Z)-3-Hexenal	X	
(Z)-3-Hexenol	X	X
Hotrienol	X	
(E)- $\beta$ -Ionon	X	X
Methylsalicylsäure	X	X
Nonanal	X	X
Nonanol	X	X
2-Phenylethanol		X
Theaspiran A	X	X
$\alpha$ -Terpineol		X
u29,33	X	
u29,64	X	X
u32,51	X	X
u43,43		X
u44,70	X	
<b>Sonderfall</b>	<b>BBCH9 2011</b>	<b>BBCH9 2012</b>
Megastigmatrienon		X
<b>"Negative" Resistenzmarker</b>	<b>BBCH9 2011</b>	<b>BBCH9 2012</b>
$\alpha$ -Calacoren		X
Geraniumoxid		X
(E)- $\beta$ -Ocimen		X
u15,19		X
u33,95		X
u40,86		X
u44,49		X

### 3 Resultate

Tabelle 28: 14 Metabolite in BBCH9 2011, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Benzaldehyd	100-52-7	<b>&lt;0,0001</b>	0,2401	<b>0,0383</b>	0,5652	<b>0,0295</b>	<b>0,0010</b>
p-Cymenen	1195-32-0	<b>0,0424</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,4990	<b>0,0005</b>	0,5622	<b>0,0092</b>
Dihydroedulan I	63335-66-0	<b>&lt;0,0001</b>	0,1232	<b>&lt;0,0001</b>	0,1145	<b>0,0013</b>	<b>&lt;0,0001</b>
(E)-Edulan	41678-29-9	0,4727	0,9930	0,9887	0,4483	0,3494	0,5870
Geraniol	106-24-1	0,5644	0,0806	0,9471	0,9380	0,2983	0,6343
Geranylaceton	3796-70-1	0,8606	<b>0,0481</b>	0,8534	0,7119	0,4316	0,2217
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	<b>&lt;0,0001</b>	0,0647	<b>0,0013</b>	0,7116	0,5000	<b>0,0064</b>
Hotrienol	29957-43-5	<b>0,0029</b>	0,0694	<b>0,0495</b>	0,5673	0,6527	0,3730
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	0,1182	<b>0,0003</b>	0,9197	<b>0,0227</b>	0,3929	0,0650
Methyl- salicylsäure	119-36-8	<b>0,0005</b>	<b>0,0060</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0499</b>	0,8556	0,6032
Theaspiran A	36431-72-8	<b>0,0002</b>	<b>0,0329</b>	<b>0,0185</b>	0,6644	0,3768	0,1085
u29,64		<b>&lt;0,0001</b>	0,2858	<b>0,0003</b>	0,9992	0,4078	<b>0,0001</b>
u29,33		<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0250</b>	<b>0,0014</b>	0,9999	0,0561	<b>0,0008</b>
u44,70		0,0807	<b>0,0064</b>	0,4991	0,0839	0,7373	0,6866

Tabelle 29: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker BBCH9 2011 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7						nicht detektiert
Benzylalkohol	100-51-6	0,1884	0,9583	0,4496	<b>0,0250</b>	<b>0,0111</b>	0,3687
Benzylbenzoat	120-51-4						nicht detektiert
$\alpha$ -Calacoren	21391-99-1	<b>0,0478</b>	0,2725	0,9714	0,9453	0,1433	0,7233
(E)- $\beta$ -Da- mascenon	23726-93-4	0,9994	<b>0,0189</b>	0,1422	0,9072	0,1142	<b>0,0239</b>
2-Ethylfuran	124-18-5	<b>0,0029</b>	0,7944	<b>0,0064</b>	0,9026	0,9982	<b>0,0149</b>
Geraniumoxid	7392-19-0						nicht detektiert
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	<b>0,0065</b>	0,8871	<b>0,0445</b>	1,0000	0,8928	<b>0,0245</b>
Linalool	78-70-6	0,7712	0,9316	0,9859	0,2824	0,6093	0,4066
Megastigma- trienon	38818-55-2	0,6040	0,9602	0,2567	0,9923	0,8898	0,3081
$\beta$ -Myrcen	123-35-3	0,9871	0,1318	0,5282	<b>0,0045</b>	0,3675	0,0739

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2011					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Nerol	106-25-2			nicht detektiert			
Nonanal	124-19-6	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0422</b>	<b>0,0015</b>	0,6164	0,4816	<b>0,0124</b>
Nonanol	143-08-8	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0493</b>	<b>0,0053</b>	0,9606	0,1875	<b>0,0074</b>
(E)- $\beta$ -Ocimen	3779-61-1			nicht detektiert			
(Z)- $\beta$ -Ocimen	3338-55-4			nicht detektiert			
2-Phenylethanol	60-12-8	0,9779	0,4432	0,9778	0,4931	1,0000	0,2383
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	0,9944	0,9949	0,3908	0,6049	0,5101	0,9680
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	0,0926	0,6226	0,8063	0,9821	0,4728	0,5330
$\alpha$ -Terpinolen	586-62-9	0,1759	0,5085	0,6924	0,9820	0,7773	0,8457
u10,43				nicht detektiert			
u15,19		0,5464	0,9656	0,9900	0,4719	0,7498	0,2734
u32,51		<b>0,0002</b>	0,7205	<b>0,0030</b>	0,9992	0,7095	<b>0,0012</b>
u33,95				nicht detektiert			
u40,61		0,3317	0,2246	0,8458	0,7347	0,8346	0,9972
u40,86				nicht detektiert			
u43,43		0,1085	<b>0,0445</b>	0,7069	0,4737	0,6331	0,9803
u44,49		0,9822	0,5719	0,6825	0,9696	0,8662	0,3615

Tabelle 30: 32 Metabolite in BBCH9 2012, die in den non-Targeted Analysen durch PLS und SR Analysen signifikante Unterschiede von mindestens ein Massenfragment zwischen den Resistenzklassen zeigten und die p-Werte nach Vergleich dieser Metabolite mittels post-hoc *Simulate*-Test. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
$\alpha$ -Calacoren	21391-99-1	<b>0,0052</b>	0,9985	<b>0,0040</b>	1,0000	0,9985	<b>0,0100</b>
p-Cymol	99-87-6	0,8017	<b>&lt;0,0001</b>	0,7926	<b>&lt;0,0001</b>	0,9999	<b>0,0008</b>
2-Ethylfuran	124-18-5	0,9977	0,6810	0,0798	0,6779	0,0950	0,5913
Etyhlvinylketon	1629-58-9	0,1614	<b>0,0001</b>	<b>0,0174</b>	1,0000	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0365</b>
Geraniumoxid	7392-19-0	0,0667	<b>0,0009</b>	0,9915	0,2019	0,0699	0,4155
Geraniol	106-24-1	0,2253	0,3210	<b>0,0248</b>	0,7852	0,7719	<b>0,0060</b>
Geranylaceton	3796-70-1	<b>0,0444</b>	0,9560	<b>0,0091</b>	0,9998	0,9647	<b>0,0160</b>
Hexanal	66-25-1	0,2355	<b>0,0118</b>	0,5245	0,9997	<b>0,0059</b>	0,5545
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	0,5908	0,9999	0,0531	0,4916	0,5061	0,6563
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	<b>0,0004</b>	0,1762	<b>0,0005</b>	0,2759	0,9764	0,0923
D-Limonen	5989-27-5	0,1691	0,4607	<b>0,0296</b>	0,1374	0,9043	0,9259

### 3 Resultate

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Megastigma- trienon	38818-55-2	0,1070	1,0000	<b>0,0004</b>	0,1766	0,1570	0,1308
2-Methyl-4- Pental	5187-71-3	0,7857	0,9622	0,0841	0,8901	0,5725	0,3954
Methyl- salicylsäure	119-36-8	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0010</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0058</b>	0,8112	0,1728
Myrtenal	564-94-3	0,9703	0,9729	0,1624	0,6331	0,3265	0,8293
Nerol	106-25-2	0,5252	<b>0,0028</b>	<b>0,0079</b>	0,1311	0,1764	<b>&lt;0,0001</b>
(Z)-3-Nonenol	10340-23-5	0,8966	0,2483	0,5980	0,9999	0,1846	0,6449
(E)- $\beta$ -Ocimen	3779-61-1	0,0785	<b>0,0018</b>	0,9983	0,2961	0,0569	0,4531
(Z)- $\beta$ -Ocimen	3338-55-4	0,9974	0,7735	0,9964	0,7399	1,0000	0,6809
1-Octanol	111-87-5	0,3571	<b>0,0001</b>	0,7401	<b>&lt;0,0001</b>	0,8550	<b>0,0115</b>
2-Phenyl- ethanol	60-12-8	<b>0,0010</b>	0,8080	<b>0,0106</b>	0,9986	0,6571	<b>0,0162</b>
$\gamma$ -Terpinen	99-85-4	0,7927	1,0000	0,7963	0,9999	0,9999	0,8130
$\alpha$ -Terpinolen	586-62-9	<b>0,0012</b>	0,4279	<b>&lt;0,0001</b>	0,0614	0,7221	0,0819
u15,19		<b>0,0123</b>	<b>0,0002</b>	0,7627	0,8793	<b>&lt;0,0001</b>	0,4162
u33,95		<b>0,0028</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,9999	0,6404	<b>0,0005</b>	0,6676
u40,86		0,9958	0,6218	<b>0,0012</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>	0,4997
u43,43		<b>&lt;0,0001</b>	0,9997	<b>&lt;0,0001</b>	0,9983	0,9998	<b>0,0001</b>
u44,49		<b>0,0339</b>	<b>0,0398</b>	0,1005	0,1215	0,8770	0,9998
u44,74		0,3328	0,8847	<b>0,0071</b>	0,7936	0,3119	0,1053
u47,61		0,9976	0,9061	0,7721	1,0000	0,8571	0,8399
u48,25		0,5075	0,5510	0,6397	0,3277	0,9900	0,0616
u49,03		0,0632	0,9918	0,0616	0,9662	0,9984	<b>0,0397</b>

Tabelle 31: Zielgerichtete (targeted) Überprüfung der Resistenzmarker BBCH9 2012 aus allen untersuchten BBCH Stadien. **FETT gedruckt = p<0,05**

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
Alloocimen	673-84-7	nicht detektiert					
Benzaldehyd	100-52-7	0,9620	<b>0,0173</b>	0,0523	0,6433	0,1299	<b>0,0075</b>
Benzylalkohol	100-51-6	<b>0,0001</b>	0,9902	0,1009	<b>0,0090</b>	<b>0,0142</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Benzylbenzoat	120-51-4	nicht detektiert					
p-Cymenen	1195-32-0	0,0833	<b>&lt;0,0001</b>	0,1689	<b>&lt;0,0001</b>	0,9473	<b>&lt;0,0001</b>

Resistenz- marker	CAS	BBCH9 2012					
		1/9	1/7	3/9	3/7	1/3	7/9
(E)- $\beta$ -Da- mascenon	23726-93-4	0,5744	0,0738	0,1424	0,2556	0,8159	<b>0,0041</b>
Dihydroedulan I	63335-66-0	0,1983	0,7050	0,1959	0,5692	0,9983	<b>0,0255</b>
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	<b>0,0319</b>	<b>0,0093</b>	0,0669	<b>0,0172</b>	0,9498	0,9582
Hotrienol	29957-43-5	nicht detektiert					
Linalool	78-70-6	0,5711	<b>0,0012</b>	0,6153	0,2915	0,0513	<b>0,0478</b>
$\beta$ -Myrcen	123-35-3	nicht detektiert					
Nonanal	124-19-6	<b>0,0482</b>	<b>0,0092</b>	0,0689	<b>0,0115</b>	0,9857	0,9053
Nonanol	143-08-8	<b>&lt;0,0001</b>	0,5114	<b>0,0011</b>	0,9383	0,7816	<b>0,0140</b>
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	nicht detektiert					
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	<b>0,0140</b>	0,9893	<b>0,0028</b>	0,9985	0,9491	<b>0,0085</b>
Theaspiran A	43126-22-3	0,6978	<b>0,0080</b>	0,2661	0,8930	<b>0,0170</b>	0,1147
u10,43		nicht detektiert					
u29,33		nicht detektiert					
u29,64		<b>&lt;0,0001</b>	0,0827	<b>&lt;0,0001</b>	0,5587	0,4986	<b>0,0027</b>
u32,51		<b>0,0006</b>	0,8573	<b>&lt;0,0001</b>	0,4213	0,8884	<b>0,0059</b>
u40,61		0,4788	0,4413	<b>0,0213</b>	<b>0,0173</b>	0,3998	0,9999
u44,70		nicht detektiert					

### 3.3.7 Zweijähriger Vergleich aller Resistenzmarker

In beiden Versuchsjahren wurden durch ungerichtete Analysen mittels Spearman Rangkorrelation (SR) und Regression der partiell kleinsten Quadrate (PLS) insgesamt 41 konstitutive Resistenzmarker in den sechs Entwicklungsstadien der zwei Versuchsjahre ermittelt. Davon wurden 21 „positive“ (Tabelle 32), 17 „negative“ (Tabelle 34) und drei Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation detektiert (Tabelle 33). Für Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation gilt, dass sie zunächst in BBCH6 als „negative“ Resistenzmarker vorlagen und in BBCH9 dann als „positive“ Resistenzmarker identifiziert wurden.

Die wenigsten Metabolite wurden in allen Entwicklungsstadien gleichermaßen als potenzielle Resistenzmarker ermittelt. Metabolite, die in bestimmten Entwicklungsstadien als Resistenzmarker annotiert wurden, wurden anschließend gezielt in den anderen Entwicklungsstadien analysiert, so dass alle Marker in allen Stadien auf signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen überprüft wurden. Von den insgesamt 41 Resistenzmarkern wurden 11 Me-

tabolite nur ein einziges Mal als Resistenzmarker kategorisiert (positiv: 2-Phenylethanol, Hotrienol und die unbekanntes Substanzen u10,43, u29,33 und u43,43 / negativ: Benzylbenzoat,  $\alpha$ -Terpinolen, Geraniumoxid, Nerol und die beiden unbekanntes Substanzen u40,61 und u40,86). Zehn Metabolite wurden innerhalb eines Versuchsjahres in mindestens zwei Entwicklungsstadien als Resistenzmarker eingestuft (positiv: Benzaldehyd, 2-Ethylfuran, Megastigmatrienon / negativ: Geraniol,  $\alpha$ -Calacoren, u15,19, u33,95 und u44,49 / wechselnd: (Z)-3-Hexenal,  $\alpha$ -Terpineol). Die übrigen 20 Metabolite wurden in beiden Versuchsjahren in mindestens 1 Entwicklungsstadium als Resistenzmarker klassifiziert. Wobei die überwiegende Mehrheit (18 Metabolite) in beiden Versuchsjahren mindestens einmal im selben Entwicklungsstadium als Resistenzmarker eingestuft wurde (Methylsalicylsäure, Benzylalkohol, Nonanal, (Z)-3-Hexenol, Nonanol, (E)- $\beta$ -Damascenon, Theaspiran A, (E)- $\beta$ -Ionon, p-Cymen, u29,64, u32,51 / negativ: Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen, (E)- $\beta$ -Ocimen, (Z)- $\beta$ -Ocimen, (Z)-Rosenoxid, Linalool / wechselnd: Geranylaceton). In BBCH6 wurden sieben Metabolite, in BBCH8 nur vier Metabolite und in BBCH9 zehn Metabolite in beiden Jahren als Resistenzmarker ermittelt, wobei Methylsalicylsäure in allen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker identifiziert wurde.

Die beiden Resistenzmarker Dihydroedulan I und u44,70 traten in beiden Versuchsjahren nur in unterschiedlichen Entwicklungsstadien auf.

---

*Je häufiger ein Metabolit statistisch auffiel, umso wahrscheinlicher handelt es sich um einen wichtigen konstitutiven Resistenzmarker.*

---

Je häufiger ein Metabolit mit signifikanten Gehaltsunterschieden zwischen den anfälligen und resistenten Genotypen statistisch auffiel, umso wahrscheinlicher handelt es sich um einen wichtigen konstitutiven Resistenzmarker.

Auffällig an den ermittelten Resistenzmarkern war, dass fast alle identifizierten „negativen“ Resistenzmarker zur Gruppe der Monoterpenoide bzw.

Sesquiterpenoide gehörten. Ausnahme hierzu waren neben den fünf unbekanntes Substanzen nur das Benzoat-Derivat Benzylbenzoat, welches nur in BBCH8 2012 als Resistenzmarker eingestuft wurde und (Z)-3-Hexenal, welches zu den *green leaf volatiles* (GLV) zählt, wobei letzteres eine wechselnde Korrelation zur Resistenz aufwies.

Die „positiven“ Resistenzmarker gehörten hauptsächlich zur Gruppe der GLV, der Norisoprenoide oder der Benzoat-Derivate und zählten nur in drei Fällen zu den Monoterpenoiden, wobei zwei dieser Monoterpenoide wechselnde Korrelation zur Resistenz aufwiesen. Abb. 35 veranschaulicht die Verteilung der Marker-Stoffklassen in den Resistenzklassen. Das Norisoprenoid Megastigmatrienon wurde nicht in die grafische Auswertung einbezogen, da es sich um einen Sonderfall bei den Resistenzmarkern handelt, der in einem nachfolgenden Absatz (s.u. Norisoprenoide) besprochen wird. Im Folgenden wird nun das Auftreten der Stoffklassen

bzw. der zugehörigen Metabolite in den Resistenzklassen besprochen. Da die unbekannt Substanzen keine Gruppe mit ähnlichem Verhalten darstellten und für zukünftige Untersuchungen zunächst identifiziert werden müssten, werden sie nicht weiter in die Besprechung einbezogen. Es wird im Folgenden zunächst auf die drei Metabolite mit wechselnder Korrelation eingegangen und anschließend das Verhalten der sechs Stoffklassen beleuchtet.

Die „positiven“ Resistenzmarker gehörten hauptsächlich zur Gruppe der GLV, der Norisoprenoide oder der Benzoat-Derivate. Die meisten identifizierten „negativen“ Resistenzmarker waren Monoterpenoide.

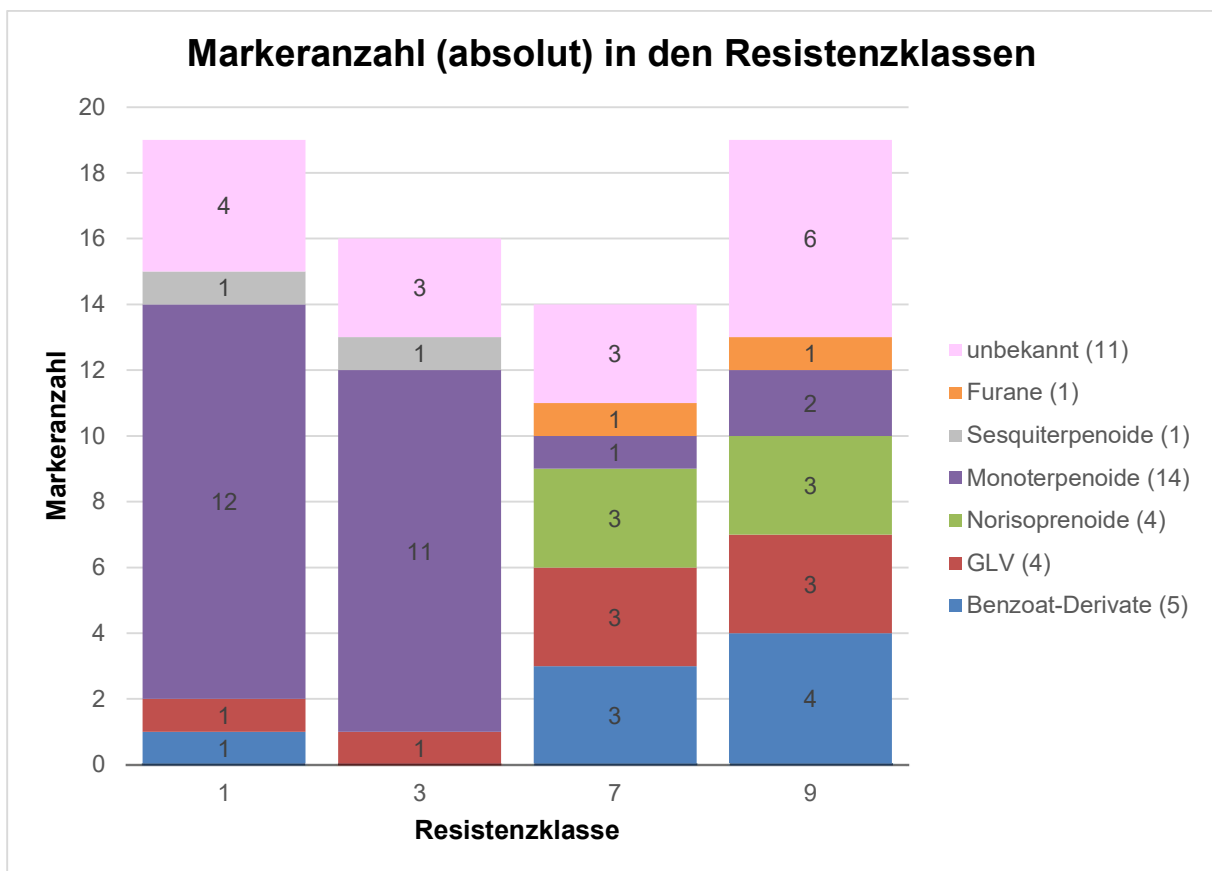


Abb. 35: Markeranzahl in den jeweiligen Resistenzklassen aufgegliedert nach Stoffklassen. Jeder Metabolit wird pro Resistenzklasse einmal gewertet. D.h. Methylsalicylsäure (MeSA) und Benzylbenzoat (BB) haben beide den Wert 1 in den entsprechenden Resistenzklassen, obwohl MeSA in jedem Entwicklungsstadium ein Resistenzmarker ist und BB nur 1x als Resistenzmarker identifiziert wurde. In der Legende ist die jeweilige Markeranzahl pro Stoffklasse in Klammern notiert. Daten ohne Berücksichtigung des Norisoprenoids Megastigmatrienon auf Grund seiner gesonderten Einordnung (siehe Ausführung im Text zu Norisoprenoiden). GLV: *green leaf volatile*

#### Marker mit wechselnder Korrelation

Es wurden drei Metabolite als Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation ermittelt. Dabei handelt es sich um die beiden Monoterpenoide Geranylaceton und  $\alpha$ -Terpineol, sowie um das GLV (Z)-3-Hexenal. Alle drei Metaboliten zeigten im Frühjahr eine negative Korrelation zu den Resistenzeigenschaften, d.h. ihr Gehalt war zunächst in den anfälligen Genotypen höher als in den resistenten. In BBCH8 des jeweiligen Jahres unterschieden sich die Amplitudenwerte der anfälligen und resistenten Klassen statistisch nicht voneinander. Daher wurde keiner dieser Metabolite als Resistenzmarker in BBCH8 eingestuft. Im dritten Entwicklungsstadium zeigten alle drei Metabolite schließlich eine positive Korrelation in Verbindung mit den Resistenzeigenschaften.

---

*Für Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation gilt, dass sie in BBCH6 als „negative“ Resistenzmarker vorlagen und in BBCH9 als „positive“ Resistenzmarker identifiziert wurden.*

---

Die Gehalte in den resistenten Genotypen waren nun signifikant höher als in den anfälligen Genotypen. Die beiden Monoterpenoide wurden im zweiten Versuchsjahr als Resistenzmarker in den Entwicklungsstadien BBCH6 und BBCH9 2012 detektiert. Anders als die beiden Monoterpenoide wurde das GLV (Z)-3-Hexenal im ersten Versuchsjahr als Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation in den Entwicklungsstadien BBCH6 und BBCH9 2011 detektiert.

#### GERANYLACETON

Geranylaceton trat als einziges der drei wechselnden Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren auf und war neben BBCH6 2012 auch in beiden BBCH9 vertreten. In BBCH6 2011 lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen vor, jedoch ist eine Tendenz hin zu kleineren Amplitudenwerten mit zunehmender Resistenz erkennbar. Die Einstufung als Resistenzmarker im ersten Versuchsjahr BBCH9 2011 bezog sich auf den signifikanten Unterschied zwischen den Klassen 7 und 1, nicht jedoch zwischen den Klassen 9 und 1. Im zweiten Versuchsjahr 2012 wurde die Einordnung als Resistenzmarker anhand der signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen 9 und 1 vorgenommen. Die Amplitudenwerte der anfälligen Reben in Resistenzklasse 1 sanken kontinuierlich im Verlauf der Vegetationsphase. Die Amplitudenwerte von Geranylaceton in den resistenten Reben der Klasse 9 blieben von BBCH6 zu BBCH8 2012 auf dem gleichen Niveau und stiegen dann zum Zeitpunkt BBCH9 2012 stark an. Sie lagen nun im Bereich der Amplitudenwerte, die die anfälligen Reben in BBCH6 besaßen.

#### A-TERPINEOL

Der  $\alpha$ -Terpineol Gehalt in den resistenten Reben blieb über die drei Entwicklungsstadien im zweiten VJ weitestgehend im gleichen Bereich. Jedoch sank gleichzeitig der Gehalt von  $\alpha$ -



Terpineol in den anfälligen Genotypen der Resistenzklasse 1 drastisch ab, so dass in BBCH9 2012 die Amplitudenwerte der Resistenzklasse 1 signifikant kleiner waren als in Klasse 9.

#### (Z)-3-HEXENAL

(Z)-3-Hexenal zeigte anders als die beiden Monoterpenoide im ersten Versuchsjahr eine wechselnde Korrelation als Resistenzmarker. Ähnlich wie bei Geranylaceton änderten sich sowohl die Amplitudenwerte der anfälligen als auch der resistenten Reben. Die Amplitudenwerte von Müller-Thurgau sanken in BBCH9 2011 so weit ab, dass sie den Werten von *V. labrusca* in BBCH6 2011 entsprachen. Gleichzeitig stiegen die detektierten Werte in *V. labrusca* deutlich an und überstiegen signifikant die Werte von Müller-Thurgau in BBCH9. Sie erreichten jedoch nicht die gleiche Höhe wie die Müller-Thurgau Amplitudenwerte in BBCH6 (Abb. 36).

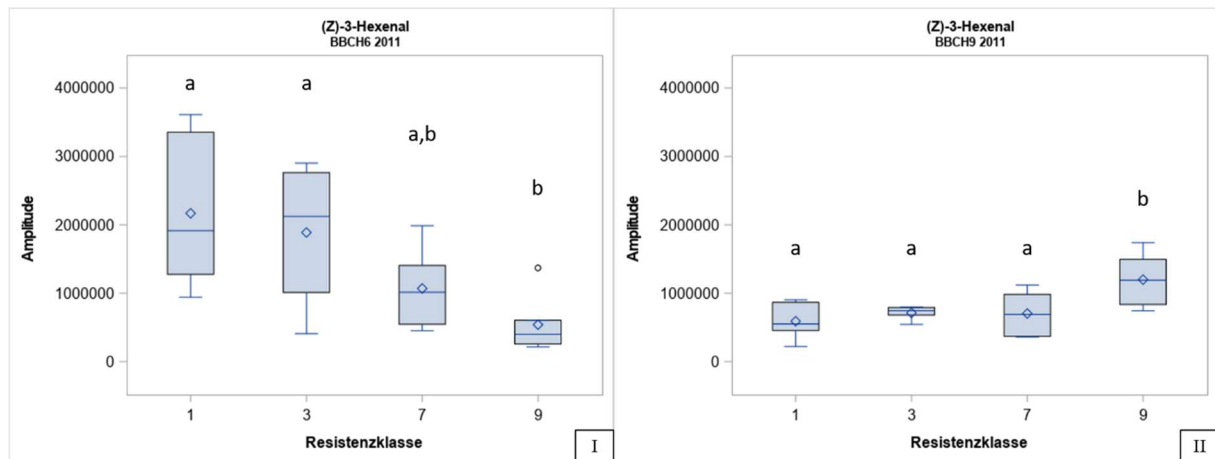


Abb. 36: (Z)-3-Hexenal als Beispiel wechselnder Korrelation. I) negative Korrelation in BBCH6 2011 II) positive Korrelation in BBCH9 2011. Verschiedene Buchstaben zeigen den signifikanten Unterschied zwischen den Resistenzklassen an.

#### Benzoat-Derivate

Es wurden vier Benzoat-Derivate (Methylsalicylsäure, Benzylalkohol, Benzaldehyd und 2-Phenylethanol) als „positive“ Resistenzmarker identifiziert und das Benzoat-Derivat Benzylbenzoat trat als „negativer“ Resistenzmarker auf. Methylsalicylsäure und Benzylalkohol wurden in beiden Versuchsjahren in mindestens einem übereinstimmenden Entwicklungsstadium detektiert. Benzaldehyd wurde im ersten Versuchsjahr zweimal als Resistenzmarker identifiziert, wohingegen 2-Phenylethanol nur in BBCH9 2012 als Resistenzmarker eingestuft wurde. Auch der negative Resistenzmarker Benzylbenzoat trat nur in einem Entwicklungsstadium (BBCH8 2012) auf.

#### METHYLSALICYLSÄURE (MeSA)

MeSA lag in jedem getesteten Entwicklungsstadium als positiver Resistenzmarker vor. MeSA ist ein sehr bekannter Resistenzmarker (Chalal, 2015; Koschier, 2007; Liu, von Dahl, &

---

*MeSA ist ein aus der Fachliteratur bekannter Resistenzmarker. Die Identifizierung von MeSA als „positiver“ Resistenzmarker in allen getesteten Entwicklungsstadien dieser Arbeit bestätigte, dass die verwendeten Detektions- und Auswerteanalysen in der Lage waren, Resistenzmarker zu ermitteln.*

---

Klessig, 2011; Liu, von Dahl, Park, , 2011; Lu, 2009; Park, 2009; Vlot, 2009; Zhang, 2006), der im Zusammenhang mit der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance SAR*) ein wichtiger volatiler Botenstoff ist. Daher war zu erwarten, dass MeSA detektiert werden würde. Dieser Befund bestätigte, dass die verwendeten Detektions- und Auswerteanalysen in der Lage waren, Resistenzmarker zu ermitteln. Der Gehalt an MeSA stieg in beiden

Jahren stark an zwischen der 1. und 2. Beprobung (Frühsommer zu Hochsommer, BBCH6 und BBCH8) und sank dann zum dritten Beprobungstermin im Spätsommer (BBCH9) wieder deutlich ab. Die Amplitudengehalte des dritten Termins lagen dennoch leicht oberhalb des ersten Beprobungstermins. Im ersten Jahr wurde generell ein wesentlich höherer MeSA Gehalt detektiert.

#### BENZYLALKOHOL

Benzylalkohol wurde in BBCH8 in beiden Jahren als Resistenzmarker identifiziert. Zusätzlich wurden in BBCH6 2011 und BBCH9 2012 signifikante Unterschiede zwischen der anfälligen Resistenzklasse 1 und der resistenten Klasse 9 festgestellt. Daher wurde Benzylalkohol in diesen Entwicklungsstadien ebenfalls als Resistenzmarker klassifiziert. An den anderen beiden Beprobungsterminen wurde Benzylalkohol zwar detektiert, jedoch ohne als Resistenzmarker eingestuft zu werden. Der Gehalt von Benzylalkohol in den Proben war über die beiden Versuchsjahre in allen Entwicklungsstadien relativ ähnlich.

#### BENZALDEHYD

Benzaldehyd wurde im ersten Versuchsjahr in den Entwicklungsstadien BBCH6 und BBCH9 als Resistenzmarker identifiziert. Es wurde in allen anderen Entwicklungsstadien ebenfalls detektiert, jedoch lagen dort keine signifikanten Gehaltsunterschiede zwischen den Resistenzklassen vor.

#### 2-PHENYLETHANOL

2-Phenylethanol wurde nur im Entwicklungsstadium BBCH9 2012 als Resistenzmarker eingeordnet. In allen anderen Entwicklungsstadien lag 2-Phenylethanol zwar vor, konnte jedoch nicht als Marker identifiziert werden.

#### BENZYLbenzoat

Benzylbenzoat ist das einzige Benzoat-Derivat, welches als „negativer“ Resistenzmarker identifiziert wurde. In dieser Arbeit wurde es jedoch nur im Entwicklungsstadium BBCH8 2012 als Resistenzmarker eingestuft. Im Entwicklungsstadium BBCH6 konnte es in beiden Jahren detektiert werden. In den übrigen Entwicklungsstadien BBCH8 2011, und in BBCH9 2011 und 2012 wurde Benzylbenzoat nicht detektiert.

#### Green leaf volatiles (GLV)

Es wurden drei GLV als „positive“ Resistenzmarker in Reben identifiziert. (Z)-3-Hexenol, Nonanol und Nonanal. Das GLV Aldehyd (Z)-3-Hexenal wurde ebenfalls als Resistenzmarker bestimmt. Es änderte im Entwicklungsverlauf jedoch seinen Korrelationszusammenhang von negativ zu positiv und wurde daher bereits bei den Resistenzmarkern mit wechselnder Korrelation besprochen.

---

*GLVs haben in beiden Versuchsjahren verstärkt zum Ende der Vegetationsphase in BBCH9 eine Bedeutung als „positive“ Resistenzmarker.*

---

(Z)-3-Hexenol, Nonanol und Nonanal wurden jeweils in beiden Versuchsjahren in BBCH9 und zusätzlich in BBCH8 2012 als Resistenzmarker eingeordnet. Nonanol war des Weiteren in BBCH6 2011 ein Resistenzmarker. Alle drei Metabolite zeigten einen relativ stetigen Anstieg der Amplitudenwerte hin zu den Genotypen höherer Resistenzeigenschaften. Für das GLV (Z)-3-Hexenal welches mit wechselnder Korrelation als Resistenzmarker detektiert wurde, gilt ebenfalls, dass es in BBCH9 als „positiver“ Resistenzmarker eingestuft wurde. Im Gegensatz zu den drei übrigen GLV wurde (Z)-3-Hexenal im ersten Versuchsjahr als Resistenzmarker klassifiziert. Es lässt sich jedoch der Zusammenhang erkennen, dass GLVs in beiden Versuchsjahren verstärkt zum Ende der Vegetationsphase in BBCH9 eine Bedeutung als „positive“ Resistenzmarker haben.

Nonanal besaß im Versuchsjahr 2012 in den Entwicklungsstadien BBCH8 und BBCH9 die höchsten Amplitudenwerte in den Genotypen der Resistenzklasse 7. In BBCH8 wurden die signifikanten Unterschiede zwischen Resistenzklasse 1 und 7 detektiert, nicht jedoch zwischen den Klassen 1 und 9. Beim folgenden Beprobungstermin traten signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzklassen 1 zu 7 und zu 9 auf, wobei die höchsten Gehalte in Resistenzklasse 7 detektiert worden waren.

#### Norisoprenoide

Insgesamt wurden fünf Norisoprenoide als Resistenzmarker eingestuft. Die drei Norisoprenoide (*E*)- $\beta$ -Damascenon, Theaspiran A und (*E*)- $\beta$ -Ionon wurden jeweils in mindestens einem Entwicklungsstadium in beiden Jahren als Resistenzmarker eingestuft. Theaspiran A sogar in den beiden Entwicklungsstadien BBCH8 und BBCH9. Dihydroedulan I wurde in zwei Jahren

als Resistenzmarker klassifiziert, jedoch in verschiedenen Entwicklungsstadien in den beiden Jahren (2011: BBCH9 / 2012: BBCH6 und BBCH8). Das Verhalten des fünften Norisoprenoids Megastigmatrienon wird weiter unten im Text ausführlich besprochen.

---

*Norisoprenoide korrelierten wesentlich häufiger in V. riparia als in V. labrusca mit Resistenzeigenschaften.*

---

Bei den drei Norisoprenoiden, die in beiden Jahren im gleichen Entwicklungsstadien auftraten [(*E*)- $\beta$ -Damascenon, Theaspiran A und (*E*)- $\beta$ -Ionon], ist zusätzlich auffällig, dass knapp die Hälfte der Resistenzmarkereिनordnung auf den signifikanten Unterschieden zwischen den Resistenzklassen 1 und 7 beruhten (vgl. Abb. 37: Häufigkeit der No-

risoprenoide (NI) in Resistenzklasse 7 = 11 NI; in Klasse 9 = 6 NI). Die höchsten Amplitudenwerte lagen in den Genotypen der *V. riparia* Akzessionen und der Hybridrebe Blaue Isabella vor. Die Amplitudenwerte von *V. labrusca* und der Hybridrebe Concord (beide Resistenzklasse 9) waren niedriger und unterschieden sich (meistens) nicht statistisch von den Werten der Resistenzklasse 1. In Tabelle 32 bis Tabelle 34 wird dies in der Spalte „1/7 [BBCH]“ aufgelistet. In dieser Spalte wird der BBCH und das Versuchsjahr angegeben, wenn eine Einordnung als Resistenzmarker auf Grund der Signifikanz zwischen Resistenzgruppe 1 und 7 erfolgte, z.B. BBCH8 2011 entspricht dem Kürzel 8 - 11. (*E*)- $\beta$ -Damascenon zeigte in allen vier Entwicklungsstadien, in denen es als Resistenzmarker eingestuft wurde, diese Auffälligkeit. (*E*)- $\beta$ -Ionon besaß in  $\frac{3}{4}$  der Fälle diese Auffälligkeit. Theaspiran A zeigte in beiden Entwicklungsstadien des zweiten Versuchsjahres (2012: BBCH8 und BBCH9) nicht jedoch im ersten Versuchsjahr (2011: BBCH8 und BBCH9) den Bezug zu Resistenzklasse 7. Dihydroedulan I wiederum besaß diese Besonderheit nicht. Seine Amplitudenwerte waren in den Genotypen der Resistenzklasse 1 am niedrigsten und am höchsten in der Resistenzklasse 9. In Abb. 37 wird die Markerhäufigkeit in den vier Resistenzklassen dargestellt. Dadurch ist erkennbar, dass bei den positiven Resistenzmarkern die Norisoprenoide häufiger in Klasse 7 als in Klasse 9 durch einen signifikanten Unterschied zu den anfälligen Klassen 1 oder 3 beschrieben wurden. Für alle anderen „positiven“ Resistenzmarker gilt, dass sie häufiger in Resistenzklasse 9 als Resistenzmarker identifiziert wurden.

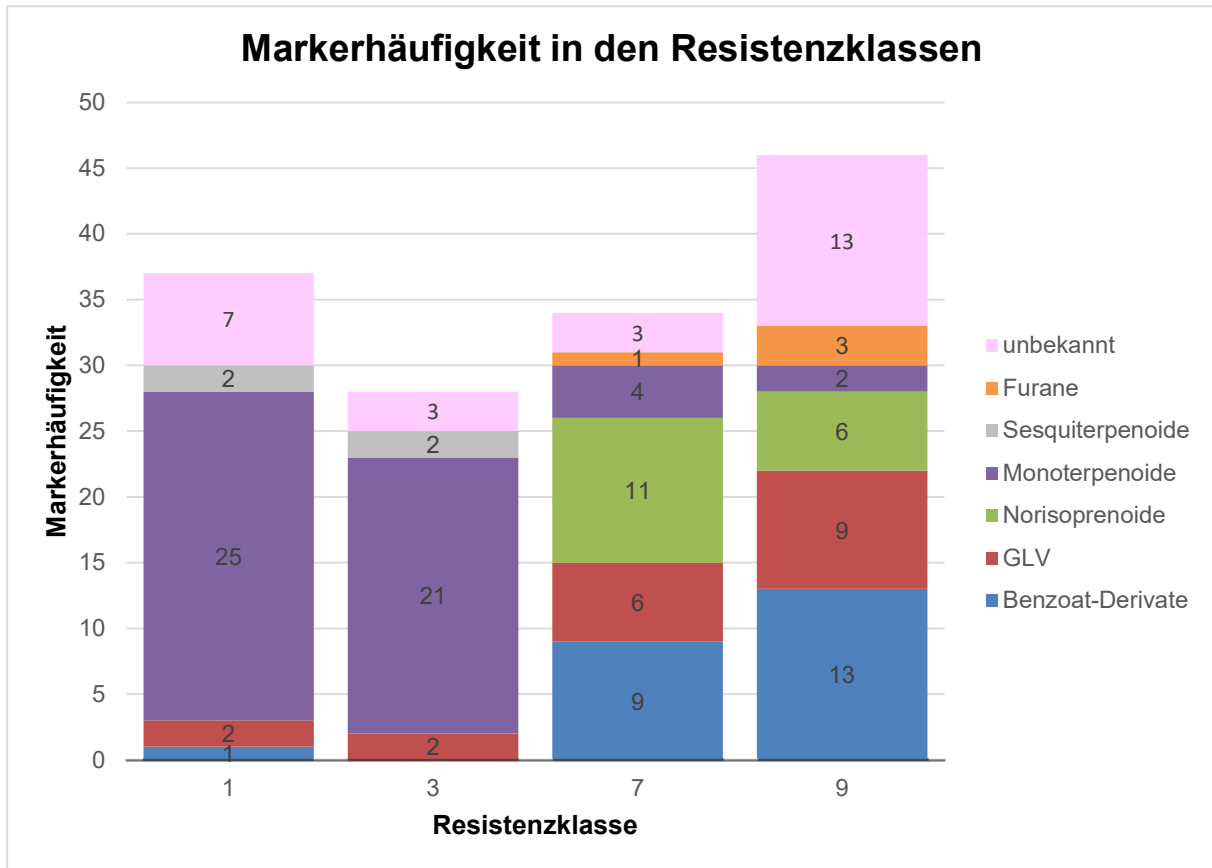


Abb. 37: Markerhäufigkeit in den jeweiligen Resistenzklassen aufgegliedert nach Stoffklassen. Gemeint ist die Häufigkeit, mit der ein Metabolit in der entsprechenden Resistenzklasse in den sechs getesteten Entwicklungsstadien auftrat. Beispiel: Methylsalicylsäure ist in beiden Jahren in allen drei Entwicklungsstadien ein Resistenzmarker und erhält in den Resistenzklassen 7 und 9 den Wert 6; wohingegen Benzylbenzoat nur in BBCH8 2012 Resistenzmarker ist und den Wert 1 erhält. Daten ohne Berücksichtigung des Norisoprenoids Megastigmatrienon auf Grund seiner gesonderten Einordnung (siehe Ausführung im Text).

#### MEGASTIGMATRIENON

Eine weitere Besonderheit zeigte sich bei der Auswertung des Norisoprenoids Megastigmatrienon. Es wurde im zweiten Versuchsjahr in den Entwicklungsstadien BBCH6 und BBCH9 als Resistenzmarker eingestuft. Die Amplitudenwerte der anfälligen Genotypen der Resistenzklasse 1 lagen über den Werten in Resistenzklasse 9. Es zeigte sich jedoch, dass die Megastigmatrienonwerte in Resistenzklasse 7 wesentlich höher waren. Die Resistenzklassen 1 und 7 unterschieden sich jedoch in ihrer Gesamtheit nicht signifikant voneinander. Eine Betrachtung der Amplitudenhöhe innerhalb der einzelnen Genotypen, zeigte, dass es von den anfälligen Genotypen der Resistenzklasse 1 (Müller-Thurgau, Riesling) zu den resistenten Genotypen *V. riparia* (Resistenzklasse 7) ein Anstieg vorlag. Die Amplitudenwerte aller Genotypen mit *V. labrusca* Abstammung waren deutlich niedriger. Daher traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resistenzklassen 1 und 7 auf, da die *V. labrusca* stämmige Hybridrebe Blaue Isabella zur Resistenzklasse 7 gehörte.

In den Entwicklungsstadien, in denen Megastigmatrienon detektiert, aber durch die Daten der Resistenzklassenvergleiche nicht als Resistenzmarker eingestuft wurde, zeigte sich dennoch ein Anstieg des Megastigmatrienongehalts ausgehend von *V. vinifera* zu *V. riparia* und ein wesentlich niedriger Gehalt in den *V. labrusca* stämmigen Reben (Abb. 38). Es muss jedoch erwähnt

---

*Als Sonderfall auf Grundlage der Vergleiche zwischen den Genotypen - nicht jedoch zwischen den Resistenzklassen - wird Megastigmatrienon zu den „positiven“ und nicht zu den „negativen“ Resistenzmarkern gezählt.*

---

werden, dass sich die Gehalte der beiden *V. riparia* Akzessionen teilweise stark voneinander unterschieden. In allen Entwicklungsstadien lagen die Amplitudenwerte der Akzession „76-50-1“ stets über denen der Akzession „76-49-22“. In den Entwicklungsstadien BBCH9 2011 und BBCH8 2012 wurde in der Akzession „76-50-1“ der höchste Megastigmatrienon Gehalt detektiert. Der Gehalt der Akzession „76-49-22“ entsprach aber dem Niveau der *V. labrusca* stämmigen Reben. In BBCH9 2012 standen keine Blätter der Akzession „76-49-22“ zur Verfügung, so dass nicht überprüft werden kann, ob der signifikante Unterschied zwischen Müller-Thurgau und *V. riparia* Akzession „76-50-1“ für Akzession „76-49-22“ ebenso galt. In den übrigen Entwicklungsstadien BBCH6 2011, BBCH8 2011, BBCH6 2012 waren die Amplitudenwerte von Akzession „76-49-22“ zwar niedriger als die der Akzession „76-50-1“, aber sie lagen oberhalb der Werte für Müller-Thurgau und Riesling und auch über den Werten der *V. labrusca* stämmigen Reben.

Als Sonderfall auf Grundlage der Vergleiche zwischen den Genotypen nicht jedoch zwischen den Resistenzklassen wird Megastigmatrienon zu den „positiven“ und nicht zu den „negativen“ Resistenzmarkern gezählt. Es könnte ähnlich wie (*E*)- $\beta$ -Damascenon, Theaspiran A und (*E*)- $\beta$ -Ionon hauptsächlich bei einer Resistenzantwort in nicht-*V. labrusca*-stämmigen Reben beteiligt sein.

Zusammenfassen lässt sich, dass Norisoprenoide in den Blättern aller Genotypen detektiert wurden. Sie korrelierten jedoch wesentlich häufiger in *V. riparia* als in *V. labrusca* mit Resistenzeigenschaften, d.h. dass sie in der resistenten Klasse 7 häufiger als Resistenzmarker identifiziert wurden als in Resistenzklasse 9.

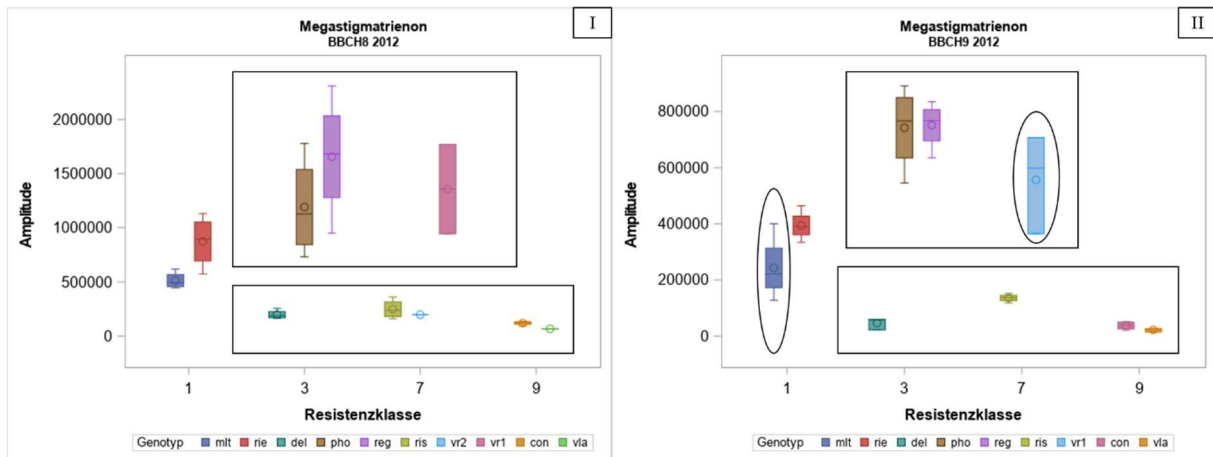


Abb. 38: Megastigmatrienon Amplitudenwerte in den Genotypen. I) In BBCH8 2012 und II) in BBCH9 2012. Signifikante Unterschiede liegen zwischen den Genotypen innerhalb der beiden Rechtecke (I u. II) bzw. der beiden Ovale (II) vor. mit) Müller-Thurgau, rie) Riesling, del) Delaware, pho) Phoenix, reg) Regent, ris) Blau Isabella, vr2) *Vitis riparia* Akzession 76-49-22, vr1) *Vitis riparia* Akzession 76-50-1, con) Concord, vla) *V. labrusca*.

### Furan

2-Ethylfuran trat im ersten Versuchsjahr in allen Entwicklungsstadien als Resistenzmarker auf. In allen Entwicklungsstadien lagen die höchsten Amplitudenwerte in den Genotypen der Resistenzklasse 9, die niedrigsten Werte in Resistenzklasse 1. Im zweiten Versuchsjahr wurde 2-Ethylfuran zwar in jedem Genotyp in allen Entwicklungsstadien detektiert, es erreichte jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Amplitudenwerten zwischen den Resistenzklassen. Alle Werte eines Entwicklungsstadiums lagen im selben Wertebereich. 2-Ethylfuran ist das einzige Furan unter den identifizierten Resistenzmarkern.

### Sesquiterpene

$\alpha$ -Calacoren ist das einzige detektierte Sesquiterpen, welches als Resistenzmarker eingestuft wurde. Es tritt als „negativer“ Resistenzmarker im zweiten Versuchsjahr in den Entwicklungsstadien BBCH8 und BBCH9 2012 auf. Zusätzlich wurde es in BBCH9 2011 detektiert, wobei die detektierten Amplitudenwerte wesentlich niedriger waren als die Werte im zweiten VJ. In den Entwicklungsstadien BBCH6 2011, BBCH8 2011 und BBCH6 2012 wurde  $\alpha$ -Calacoren nicht detektiert.

### Monoterpenoide

Es wurden 14 Monoterpenoide als Resistenzmarker identifiziert. Zehn dieser Monoterpenoide wurden als „negative“ Resistenzmarker eingestuft. Von den übrigen vier Substanzen sind die beiden Monoterpenoide Geranylaceton und  $\alpha$ -Terpineol Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation und wurden bereits dort besprochen. Zwei weitere Monoterpenoide ( $p$ -Cymenen und Hotrienol) waren „positive“ Resistenzmarker. Hotrienol wurde nur in BBCH9 2011 als „po-

sitiver“ Resistenzmarker identifiziert. Im darauffolgenden Jahr wurde es im selben Entwicklungsstadium nicht detektiert. In allen anderen getesteten Entwicklungsstadien wurde Hotrienol nachgewiesen, jedoch nicht als Resistenzmarker eingestuft.

p-Cymenen wurde ähnlich wie die Norisoprenoide aufgrund der signifikanten Klassenunterschiede der anfälligen Klassen zur Resistenzklasse 7 als „positiver“ Resistenzmarker eingestuft. Die hohen Gehalte von p-Cymenen wurden sowohl in den Blättern der *V. riparia* Akzessionen als auch in den Blättern der Hybride Blaue Isabella detektiert. In den Genotypen der Resistenzklasse 9 (*V. labrusca* und der Hybride Concord) wurden wesentlich niedrigere Amplitudenwerte detektiert als in den Genotypen der Klasse 7

---

*Die meisten Monoterpenoide wurden als „negative“ Resistenzmarker in beiden Jahren zu einem frühen Vegetationszeitpunkt in BBCH6 ermittelt.*

---

Neun der zehn „negativen“ Resistenzmarker traten im Entwicklungsstadium BBCH6 als Marker auf. Dies galt sowohl für die sechs zweijährig als auch für drei der vier einjährig auftretenden Monoterpenoide (zweijährig: Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen, (*E*)- $\beta$ -Ocimen, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, (*Z*)-Rosenoxid, Linalool / einjährig: Geraniol,  $\alpha$ -Terpinolen, Nerol). Ebenso galt dies für die beiden Monoterpenoide mit wechselnder Korrelation, die ebenfalls in BBCH6 zu den „negativen“ Resistenzmarkern zählten (Geranylaceton,  $\alpha$ -Terpineol).

Geraniumoxid bildete unter den „negativen“ Monoterpenoiden Resistenzmarker eine Ausnahme. Es wurde nur in BBCH9 2012 als Resistenzmarker identifiziert. Wobei der signifikante Klassenunterschied zwischen den Resistenzklassen 1 und 7 lag. Für (*E*)- $\beta$ -Ocimen beruhte im Entwicklungsstadium BBCH9 2012 die Einstufung als Resistenzmarker ebenfalls auf dem signifikanten Unterschied zwischen den Klassen 1 und 7, nicht jedoch 1 zu 9. Die Klassen 7 und 9 konnten jedoch für beide Verbindungen statistisch nicht voneinander unterschieden werden. In den anderen Entwicklungsstadien beider Versuchsjahre wurde (*E*)- $\beta$ -Ocimen aufgrund der statistischen Unterschiede zwischen den Resistenzklassen 1 und 9 als Resistenzmarker eingestuft.



Tabelle 32: „Positive“ Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7 nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, nd) nicht oberhalb des Basislinienrauschens detektiert, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium B) zweijährig, unterschiedliche Entwicklungsstadien, C) einjährig, mehrmals, D) nur 1x

"Positive" Resistenzmarker	CAS	Stoffklasse	2011			2012			Wiederfindung	1/7 [BBCH]
			BBCH6 2011	BBCH8 2011	BBCH9 2011	BBCH6 2012	BBCH8 2012	BBCH9 2012		
Benzylalkohol	100-51-6	Benzoat-Derivat	X	X	/	/	X	X	A	
Methylsalicylsäure	119-36-8	Benzoat-Derivat	X	X	X	X	X	X	A	
Nonanal	124-19-6	GLV	/	/	X	nd	X	X	A	8-12
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	GLV	/	/	X	/	X	X	A	
Nonanol	143-08-8	GLV	X	/	X	/	X	X	A	
(E)- $\beta$ -Damasconen	23726-93-4	Norisoprenoid	/	X	X	X	X	/	A	8-11, 9-11, 7-12, 8-12
Theaspiran A	43126-22-3	Norisoprenoid	/	X	X	/	X	X	A	8-12, 9-12
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	Norisoprenoid	X	/	X	nd	X	X	A	7-11, 9-11, 8-12
p-Cymenen	1195-32-0	Monoterpenoid	X	/	X	/	X	X	A	7-11, 9-11, 8-12, 9-12
u29,64			X	X	X	/	X	X	A	
u32,51			/	/	X	X	X	X	A	
Dihydroedulan I	63335-66-0	Norisoprenoid	nd	/	X	X	X	/	B	
u44,70			nd	/	X	nd	X	nd	B	9-11
Benzaldehyd	100-52-7	Benzoat-Derivat	X	/	X	/	/	/	C	
2-Ethylfuran	124-18-5	Furan	X	X	X	/	/	/	C	

"Positive" Resistenzmarker	CAS	Stoffklasse	2011			2012			Wiederfindung	1/7 [BBCH]
			BBCH6 2011	BBCH8 2011	BBCH9 2011	BBCH6 2012	BBCH8 2012	BBCH9 2012		
2-Phenylethanol	60-12-8	Benzoat-Derivat	/	/	/	/	/	X	D	
Hotrienol	29957-43-5	Monoterpenoid	/	/	X	/	/	nd	D	
u10,43			nd	nd	nd	nd	X	nd	D	
u29,33			nd	nd	X	nd	/	nd	D	
u43,43			nd	/	/	nd	nd	X	D	

Resistenzmarker Sonderfall	CAS	Stoffklasse	2011			2012			Wiederfindung	1/7 [BBCH]
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9		
Megastigma-trienon	38818-55-2	Norisoprenoid	/	/	/	X	/	X	C	

Tabelle 33: Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren mit wechselnder Korrelation. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7, nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, X+) „positiver“ Resistenzmarker, X-) „negativer“ Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium, C) einjährig, mehrmals.

Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation	CAS	Stoffklasse	2011			2012			Wiederfindung	1/7 [BBCH]
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9		
Geranylaceton	3796-70-1	Monoterpenoid	/	/	X+	X-	/	X+	A	09-11
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	GLV	X-	/	X+	/	/	/	C	
α-Terpineol	98-55-5	Monoterpenoid	/	/	/	X-	/	X+	C	

Tabelle 34: „Negative“ Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren. Angabe mit CAS Nummer, chemischer Stoffklasse, der Wiederfindung (A-D) als Resistenzmarker in beiden Versuchsjahren und der Angabe (1/7), ob die Einordnung als Resistenzmarker auf einem signifikanten Unterschied der Resistenzklassen 1 und 7, nicht jedoch 1 und 9 beruhte. X) Resistenzmarker, /) kein Resistenzmarker, nd) nicht oberhalb des Basislinienrauschens detektiert, A) zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium B) zweijährig, unterschiedliche Entwicklungsstadien, C) einjährig, mehrmals, D) nur 1x

"Negative" Re- sistenzmarker	CAS	Stoffklasse	2011			2012			Wiederfindung	1/7 [BBCH]
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9		
Alloocimen	673-84-7	Monoterpen	X	/	nd	X	/	nd	A	
β-Myrcen	123-35-3	Monoterpen	X	/	/	X	nd	nd	A	
(E)-β-Ocimen	3779-61-1	Monoterpen	X	/	nd	X	X	X	A	09-12
(Z)-β-Ocimen	3338-55-4	Monoterpen	X	/	nd	X	X	/	A	
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	Monoterpenoid	X	/	/	X	nd	nd	A	
Linalool	78-70-6	Monoterpenoid	X	/	/	X	/	/	A	
Geraniol	106-24-1	Monoterpenoid	/	/	/	X	X	/	C	
α-Calacoren	21391-99-1	Sesquiterpenoid	nd	nd	/	nd	X	X	C	
u15,19			X	/	/	/	/	X	C	
u33,95			/	/	nd	nd	X	X	C	
u44,49			nd	/	/	/	X	X	C	
Benzylbenzoat	120-51-4	Benzoat-Derivat	/	nd	nd	/	X	nd	D	
α-Terpinolen	586-62-9	Monoterpenoid	/	/	/	X	/	/	D	
Geraniumoxid	7392-19-0	Monoterpenoid	/	/	nd	/	nd	X	D	09-12
Nerol	106-25-2	Monoterpenoid	/	/	nd	X	/	/	D	
u40,61			/	/	/	/	X	/	D	
u40,86			/	nd	nd	nd	nd	X	D	

### **3.3.8 Vergleich der Marker für Resistenz und Blattposition**

In Abschnitt 3.3.1 *Blattposition* wurde bereits das Fazit gezogen, dass die Untersuchung der Blattposition für die Ermittlung von konstitutiven Resistenzmarkern aus resistenten Genotypen eine untergeordnete Rolle spielte. Daher wurden alle weiteren Blattproben als Mischproben erstellt. Dennoch soll hier kurz besprochen werden, wie sich ein Vergleich zwischen den Blattpositionsmarkern der Entwicklungsstadiums BBCH8 2011 zu der Gesamtheit der über zwei Jahre ermittelten Resistenzmarker verhält.

Durch die in Abschnitt 3.3.1 besprochenen ungerichteten (non-targeted) Analysen wurden 20 Blattmarker ermittelt. Zusätzlich wird hier nun ein zielgerichteter Ansatz besprochen, in dem die insgesamt 42 konstitutiven Resistenzmarker auf signifikante Unterschiede in der Blattposition im Entwicklungsstadium BBCH8 2011 überprüft werden. Dadurch erhöhte sich die Gesamtanzahl der Blattpositionsmarker auf 32. 14 Metabolite wurden sowohl als Resistenzmarker als auch als Blattpositionsmarker (BPM) ermittelt, sodass sich eine Summe aus 62 Markern ergab (Tabelle 35).

14 Marker wurden sowohl als BPM als auch als Resistenzmarker eingestuft (Benzaldehyd, p-Cymenen, 2-Ethylfuran, Geraniol, Geraniumoxid, (Z)-3-Hexenal, Linalool, Megastigmatrienon, MeSA,  $\beta$ -Myrcen, Nerol,  $\alpha$ -Terpineol und die beiden unbekannt Substanzen u15,19 und u44,49). Unter diesen Substanzen befanden sich sowohl Resistenzmarker mit einer hohen Wiederfindung in zwei Jahren (z.B. MeSA) wie auch Metabolite, die nur zu einem einzigen Zeitpunkt als Resistenzmarker eingestuft wurden (z.B. Geraniumoxid oder Nerol).

---

*14 der 32 Blattpositionsmarker wurden auch als konstitutive Resistenzmarker eingestuft. Jedoch sind nur zwei Metabolite (2-Ethylfuran und MeSA) im überprüften Entwicklungsstadium BBCH8 2011 sowohl Marker für Resistenz als auch für Blattposition.*

---

Auffällig ist, dass nur zwei dieser Metabolite (MeSA und 2-Ethylfuran) im Entwicklungsstadium BBCH8 2011 als Resistenzmarker vorlagen. Im direkten Vergleich des Entwicklungsstadiums BBCH8 2011 ergab sich also, dass nur zwei der 36 BPM auch Resistenzmarker waren. In BBCH8 2011 wurden insgesamt sechs Resistenzmarker identifiziert. Die übrigen vier Resistenzmarker (Benzylalkohol, (E)- $\beta$ -Damascenon, Theaspiran A und die unbekannte Substanz u29,64) wurden nicht in signifikant verschiedenen Konzentrationen in den Blattpositionen ermittelt. Interessanterweise ist jedoch Theaspiran B ein Marker für die Blattposition. Theaspiran B ist einer von 22 der 36 BPM, die nicht gleichzeitig als Resistenzmarker eingestuft wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zwar zu Überschneidungen der beiden Testmengen kommt, jedoch insbesondere im Hinblick auf den Vergleich

desselben Entwicklungsstadiums eine gesonderte Auswertung der Resistenzmarker nach Blattpositionen vernachlässigt werden kann.

Tabelle 35: Vergleich der Marker für konstitutive Resistenz und Blattposition. Angabe mit CAS Nummer, J) Blattpositionsmarker, X+) „positiver“ Resistenzmarker, X-) „negativer“ Resistenzmarker

Metabolit	CAS	Blattpositi- onsmarker	Resistenzmarker 2011		Resistenzmarker 2012			
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9
Alloocimen	673-84-7	/	X-	/	/	X-	/	/
Benzaldehyd	100-52-7	J	X+	/	X+	/	/	/
Benzylalkohol	100-51-6	/	X+	X+	/	/	X+	X+
Benzylbenzoat	120-51-4	/	/	/	/	/	X-	/
$\alpha$ -Calacoren	21391-99-1	/	/	/	/	/	X-	X-
p-Cymenen	1195-32-0	J	X+	/	X+	/	X+	X+
(E)- $\beta$ -Damasce- non	23726-93-4	/	/	X+	X+	X+	X+	/
Dihydroedulan I	63335-66-0	/	/	/	X+	X+	X+	/
2-Ethylfuran	124-18-5	J	X+	X+	X+	/	/	/
Geraniol	106-24-1	J	/	/	/	X-	X-	/
Geraniumoxid	7392-19-0	J	/	/	/	/	/	X-
Geranylaceton	3796-70-1	/	/	/	X+	X-	/	X+
(E,E)-2,4-He- xadienal	142-83-6	J	/	/	/	/	/	/
Hexanal	66-25-1	J	/	/	/	/	/	/
Hexanol	111-27-3	J	/	/	/	/	/	/
(E)-2-Hexenal	6728-26-3	J	/	/	/	/	/	/
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	J	X-	/	X+	/	/	/
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	/	/	/	X+	/	X+	X+
Hotrienol	29957-43-5	/	/	/	X+	/	/	/
(E)- $\beta$ -Ionon	79-77-6	/	X+	/	X+	/	X+	X+
D-Limonen	5989-27-5	J	/	/	/	/	/	/
Linalool	78-70-6	J	X-	/	/	X-	/	/
Megastigmatri- enon	38818-55-2	J	/	/	/	X+	/	X+
Methylsalicyl- säure	119-36-8	J	X+	X+	X+	X+	X+	X+

Metabolit	CAS	Blattpositi- onsmarker	Resistenzmarker 2011			Resistenzmarker 2012		
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9
$\beta$ -Myrcen	123-35-3	J	X-	/	/	X-	/	/
Nerol	106-25-2	J	/	/	/	X-	/	/
Nonanal	124-19-6	/	/	/	X+	/	X+	X+
Nonanol	143-08-8	/	X+	/	X+	/	X+	X+
(E)- $\beta$ -Ocimen	3779-61-1	/	X-	/	/	X-	X-	X-
(Z)- $\beta$ -Ocimen	3338-55-4	/	X-	/	/	X-	X-	/
1-Octanol	111-87-5	J	/	/	/	/	/	/
(E)-2-Pentenal	1576-87-0	J	/	/	/	/	/	/
(Z)-2-(2-Pent- enyl)furan	7024-13-4 / 14-5	J	/	/	/	/	/	/
2-Phenyletha- nol	60-12-8	/	/	/	/	/	/	X+
(Z)-Rosenoxid	16409-43-1	/	X-	/	/	X-	/	/
$\alpha$ -Santalol	11031-45-1	J	/	/	/	/	/	/
Sulcaton	110-93-0	J	/	/	/	/	/	/
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	J	/	/	/	X-	/	X+
$\alpha$ -Terpinolen	586-62-9	/	/	/	/	X-	/	/
Theaspiran A	43126-22-3	/	/	X+	X+	/	X+	X+
Theaspiran B	36431-72-8	J	/	/	/	/	/	/
u10,43		/	/	/	/	/	X+	/
u15,19		J	X-	/	/	/	/	X-
u19,02		J	/	/	/	/	/	/
u20,91		J	/	/	/	/	/	/
u25,27		J	/	/	/	/	/	/
u29,33		/	/	/	X+	/	/	/
u29,64		/	X+	X+	X+	/	X+	X+
u29,78		J	/	/	/	/	/	/
u30,19		J	/	/	/	/	/	/
u32,51		/	/	/	X+	X+	X+	X+
u33,95		/	/	/	/	/	X-	X-
u35,90		J	/	/	/	/	/	/
u39,19		J	/	/	/	/	/	/

Metabolit	CAS	Blattpositiv- onsmarker	Resistenzmarker 2011			Resistenzmarker 2012		
			BBCH6	BBCH8	BBCH9	BBCH6	BBCH8	BBCH9
u40,61		/	/	/	/	/	X-	/
u40,86		/	/	/	/	/	/	X-
u43,43		/	/	/	/	/	/	X+
u44,49		J	/	/	/	/	X-	X-
u45,16		J	/	/	/	/	/	/
u46,84		J	/	/	/	/	/	/
u44,70		/	/	/	X+	/	X+	/
u48,38		J	/	/	/	/	/	/

### 3.4 Induzierte Marker (Gewächshaus-Pflanzen)

Die vereinigten Datensätze des Infektionsversuchs bestanden aus 71 302 Massenfragmenten in den 22 Proben. Zunächst wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und die Hauptkomponente in einem Punktdiagramm dargestellt. Der PCA Plot der ersten drei Hauptkomponenten ergab keine Cluster, die die Metabolitprofile der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppen unterschieden hätten. Es zeigten sich eine Trennung zwischen den Metabolitprofilen von *V. vinifera* und den Genotypen der Resistenzklasse 7 (*V. riparia* und Blaue Isabella) (Abb. 39). Daher wurde in einem Folgeschritt zwei voneinander getrennte PCAs durchgeführt, zum einen für die Datensätze von Müller-Thurgau und Regent und davon getrennt für die Datensätze von Blauer Isabella und *V. riparia*. Jedoch konnte auch auf diesem Weg bei den ersten fünf Hauptkomponenten kein Einfluss der Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die ersten fünf Hauptkomponenten erklärten 97,31 % (Blaue Isabella und *V. riparia*) und 99,16 % (*V. vinifera*) der Gesamtvarianz.

Nachdem die PCA keine Unterschiede zwischen den behandelten Blättern und den Kontrollblättern nachweisen konnte, wurde eine weitere Auswertung der Daten über PLS vorgenommen. Für die PLS wurde ein Vergleich der Kontrolle und der Behandlung für jeden Genotyp einzeln analysiert. Durch die PLS Analysen wurden 43 Metabolite ermittelt, die über den *Simulate*-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Varianten eines Genotyps überprüft wurden. Zusätzlich wurden mit einem zielgerichteten Ansatz alle konstitutiven Resistenzmarker auf signifikante Unterschiede getestet. Insgesamt wurden 69 Substanzen auf Unterschiede im Gehalt am achten Tag nach der Inokulation (8 dpi) überprüft. 11 konstitutive Resistenzmarker wurden nicht detektiert (Alloocimen, Benzylbenzoat,

Hotrienol, (*E*)- $\beta$ -Ionon,  $\beta$ -Myrcen, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, Rosenoxid, u10,43, u33,95, u40,86 und u44,49).

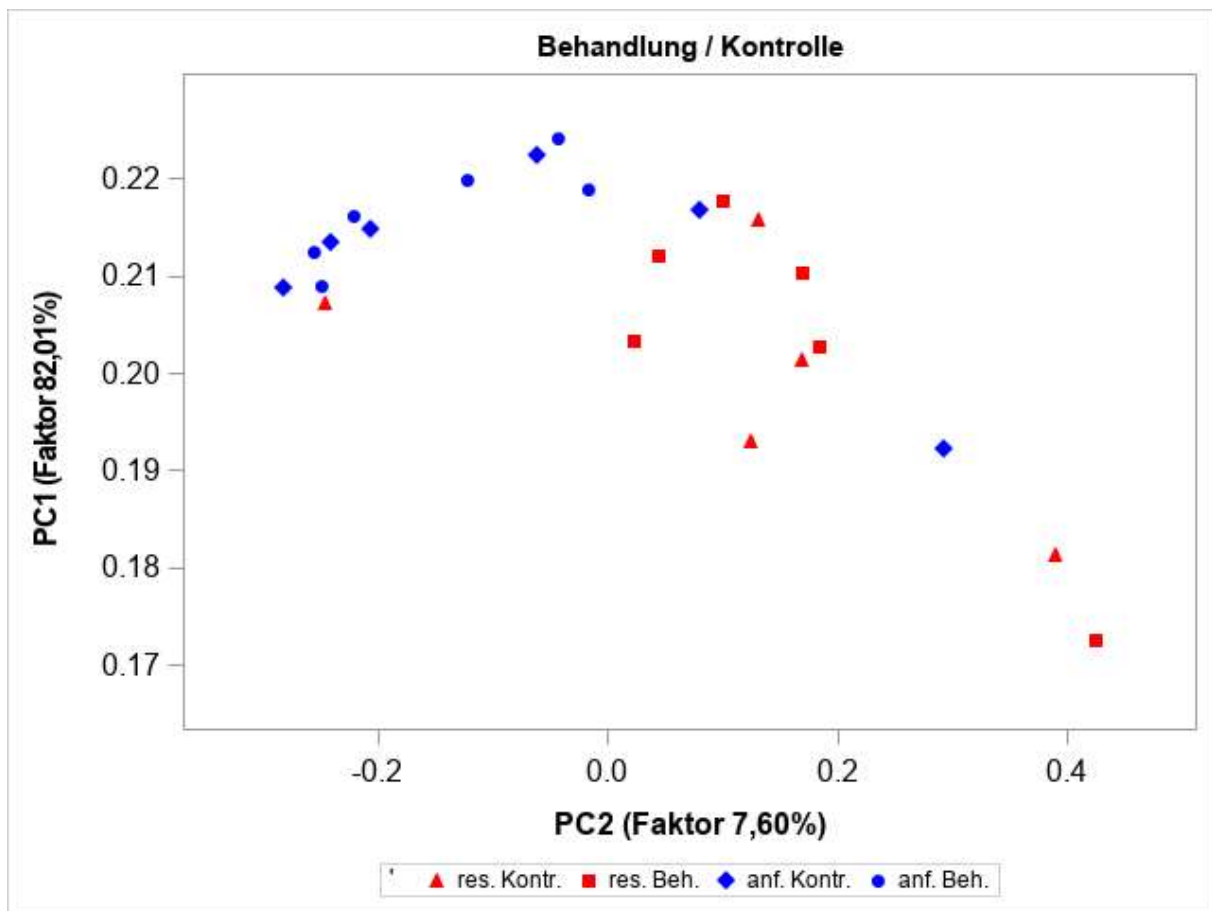


Abb. 39: Hauptkomponentenanalyse der Metabolitprofile von infizierten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Keine Unterschiede sichtbar zwischen Behandlung und Kontrolle, jedoch angedeutete Trennung nach konstitutiven Resistenzeigenschaften. res.) resistente Genotypen Blaue Isabella und *V riparia*, anf.) anfällige Genotypen *V. vinifera* cv Müller-Thurgau und Regent, Kontr.) Kontrollbehandlung mit Wasser, Beh.) Behandlung mit *P. viticola* Sporensuspension.

Von diesen 11 konstitutiven Resistenzmarkern wurden drei niemals im Herbst (BBCH9) detektiert (Alloocimen, Benzylbenzoat und u10,43), weitere drei Substanzen wurden in einem der beiden Jahre nicht in BBCH9 detektiert und im anderen Jahr wurden sie nicht in BBCH9 als konstitutiver Resistenzmarker klassifiziert ( $\beta$ -Myrcen, (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, Rosenoxid). Zusammengefasst gesagt, keiner dieser sechs Metabolite trat im Herbst als konstitutiver Resistenzmarker auf. Die Test zur Ermittlung von induzierten Markern fanden jedoch im Herbst statt. Die restlichen fünf der 11 konstitutiven Marker, die nicht im Infektionsversuch detektiert wurden, wurden jedoch in mindestens einem Jahr in BBCH9 als konstitutive Resistenzmarker klassifiziert (Hotrienol, (*E*)- $\beta$ -Ionon, u33,95, u40,86 und u44,49).



Von den übrigen 58 Metaboliten zeigten 24 Substanzen in mindestens einem Genotyp signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den infizierten und unbehandelten Blättern (Tabelle 36). Alle anderen Metabolite besaßen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen (Daten nicht gezeigt).

Fast alle der 24 Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsvarianten wurden acht Tage nach der Inokulation mit einem wesentlich niedrigeren Gehalt detektiert als in den Kontrollblättern. Nur fünf Marker (Geraniol, Geranylaceton, (Z)-3-Hexenylaceton, Sulcaton und u46,93) zeigten in einem Genotyp einen erhöhten Gehalt nach der Inokulation.

In *V. riparia* wurden vier Metabolite (Geraniol, MeSA, Sulcaton und die unbekannte Substanz u39,41<sup>26</sup>) als induzierte Marker ermittelt (Abb. 40), deren Amplitudenwerte sich nach der Infektion signifikant mit  $p < 0,05$  von den Kontrollwerten unterschieden. Die beiden Metabolite Geraniol und MeSA wurden bereits als konstitutive Resistenzmarker eingestuft, Geraniol als „negativer“ und MeSA als „positiver“ Resistenzmarker. Diese Konzentrationsverteilung zeigte sich auch in den jungen Topfpflanzen. Der Gehalt an Geraniol nahm mit zunehmender konstitutiver Resistenz ab, wohingegen MeSA in den Blättern von Müller-Thurgau und Regent in wesentlich geringeren Konzentrationen vorlag als in den resistenten Genotypen Blaue Isabella und *V. riparia*. Für beide Metabolite galt diese Beobachtung auch für den Vergleich der unbehandelten und behandelten Gruppen. Der Geraniolgehalt stieg nach der Inokulation in *V. riparia* signifikant an. Wobei auch der erhöhte Geraniolgehalt immer noch deutlich unter den Gehalten in anfälligen Genotypen (mit oder ohne Infektion) lag (Abb. 40 I). Die Unterschiede der Methylsalicylsäure-Amplituden zwischen den be-

behandelten und unbehandelten Blättern sanken mit abnehmender Resistenz. Nur in *V. riparia* war der Unterschied signifikant. Bei der Blauen Isabella war jedoch immer noch ein deutlicher Unterschied zu erkennen ( $p = 0,0798$ ), wohingegen der Unterschied bei Regent ( $p = 0,1317$ ) und Müller-Thurgau ( $p = 0,6495$ ) immer geringer wurde (Abb. 40 III).

Sulcaton zeigte in *V. riparia* ähnlich wie Geraniol einen signifikant erhöhten Gehalt nach der Inokulation in *V. riparia*. Im Gegensatz zu Geraniol überstieg der Sulcatongehalt nach Inokulation jedoch auch den Sulcatongehalt in den Kontrollblättern der anderen Genotypen. Auch in der anfälligen Sorte Müller-Thurgau stieg der Sulcatongehalt nach der Infektion stark an. Mit einem p-Wert von  $p = 0,0523$  lag der statistische Unterschied zwischen den Kontrollblättern

---

*Für V. riparia wurden vier induzierte Resistenzmarker ermittelt. Davon traten Geraniol und MeSA auch als konstitutive Resistenzmarker auf.*

---

---

<sup>26</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekanntesten Substanzen finden sich in Anhang A7

### 3 Resultate

und den infizierten Blättern nur knapp oberhalb der gewählten Grenze von  $p < 0,05$  (Abb. 40 II). Die Amplitudenwerte der infizierten Blätter lagen im selben Bereich wie die von Sulcaton in inokulierten *V. riparia* Blättern.

Die unbekannte Substanz u39,41 änderte in Müller-Thurgau ihre Konzentration nicht. In den anderen drei Genotypen sank der Gehalt nach der Inokulation signifikant ab, wobei die Amplitudenwerte in den Kontrollen bei diesen drei Genotypen deutlich höher waren als in Müller-Thurgau.

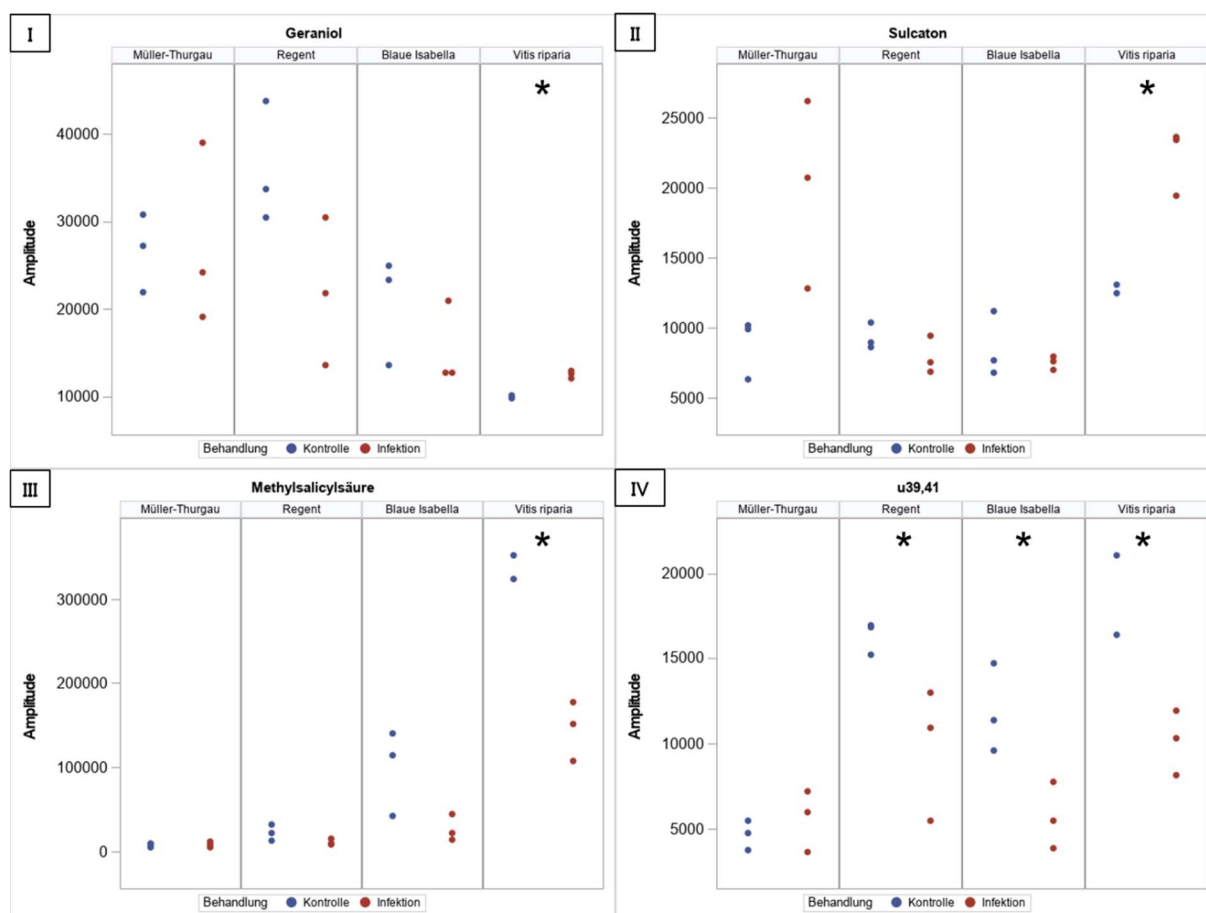


Abb. 40: Metabolite in *V. riparia* mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion. I) Geraniol, II) Sulcaton, III) Methylsalicylsäure IV) u39,41, \*) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle).

In der Hybridrebe Blaue Isabella wurden drei Metabolite als induzierte Marker bestimmt. Neben der bereits erwähnten Substanz u39,41 wurden auch für (R)-(+)-Citronellol und Megastigmatrienon signifikante Unterschiede zwischen inokulierten Blättern und Kontrolle nachgewiesen (Abb. 41). Für beide Marker galt, dass die Amplitudenwerte in Blauer Isabella nach der Inokulation mit *P. viticola* signifikant niedriger waren als in den Kontrollblättern. Megastigmatrienon wurde im Versuchsjahr 2012 als „positiver“ konstitutiver Resistenzmarker eingestuft, der in *V. riparia* in deutlich erhöhten Konzentration vorlag im Vergleich zu *V. vinifera* oder den *V. labrusca*-stämmigen Genotypen. Diese Beobachtung wurde in den jungen Topfpflanzen nicht gemacht. Ähnlich wie im Versuchsjahr 2011, in welchem Megastigmatrienon nicht als

konstitutiver Resistenzmarker eingestuft wurde, lagen im Vergleich der Amplitudenwerte von drei der vier Genotypen keine Unterschiede vor. Die höchsten Amplitudenwerte wurden in Regent detektiert.

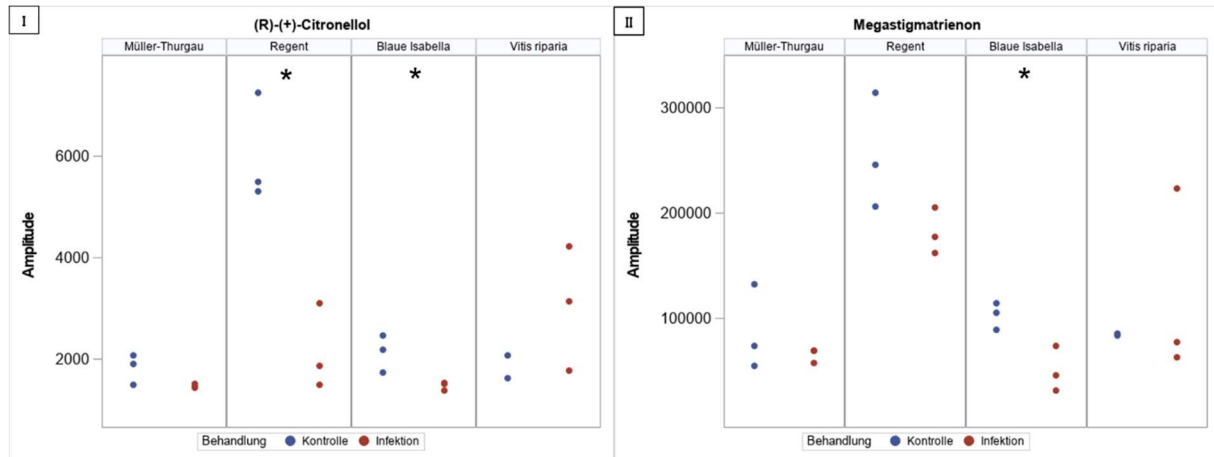


Abb. 41: Metabolite in Blaue Isabella mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion. I) (R)-(+)-Citronellol, II) Megastigmatrienon, \*) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle).

Die meisten induzierten Marker (19 der 24 Marker) traten in Regentblättern mit signifikanten

\_\_\_\_\_ *Die meisten induzierten Marker (19 / 24) traten in Regentblättern auf.* \_\_\_\_\_

Unterschieden zwischen den Behandlungsvarianten auf. Die Marker ließen sich anhand ihrer Amplitudenverteilung grob in vier Gruppen aufteilen. In Gruppe R1 lagen die Amplitudenwerte der Substanzen in den Genotypen Müller-Thurgau, Blaue Isabella und *V. riparia* im Gesamtvergleich in einem relativ ähnlichen Bereich. Zwischen den Genotypen und auch

zwischen den Behandlungsvarianten lagen keine statistisch relevanten Unterschiede vor. Auch die Amplitudenwerte der inokulierten Regentblätter lagen in diesem Bereich. Allerdings waren die Werte in den Kontrollblättern von Regent bei den sieben Metaboliten dieser Gruppe ((R)-(+)-Citronellol, d-Limonen, Linalool, (E)- $\beta$ -Ocimen,  $\alpha$ -Terpinolen, u39,01 und u40,61<sup>27</sup>) stets höher als in allen anderen Proben (Abb. 41 I). Linalool, (E)- $\beta$ -Ocimen und  $\alpha$ -Terpinolen wurden als konstitutive Resistenzmarker klassifiziert. Linalool und (E)- $\beta$ -Ocimen wurden als „negative“ Resistenzmarker eingestuft. Die hohen Gehalte in den Kontrollblättern könnten einen Hinweis darauf geben, dass diese Einstufung auch für junge Pflanzen gilt. Hierzu wäre ein Vergleich der Gehalte in *V. labrusca* hilfreich gewesen. Denn die Gehalte in Müller-Thurgau unterschieden sich nicht von den Gehalten in Blauer Isabella und *V. riparia*.  $\alpha$ -Terpinolen ist

<sup>27</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

ein konstitutiver Resistenzmarker mit wechselnder Korrelation. Für eine Aussage, ob sich  $\alpha$ -Terpinolen in jungen Topfpflanzen ebenfalls als konstitutiver Resistenzmarker (und unter welchem Vorzeichen) einstufen ließe, können keine Aussagen getroffen werden. Auch hier wäre ein Vergleich der Gehalte in *V. labrusca* hilfreich gewesen.

In der zweiten Gruppe (R2) wurden die Metabolite zusammengefasst, bei denen die Amplitudenwerte der Regentkontrollblätter vergleichbar mit den Amplitudenwerten der beiden resistenteren Genotypen waren. Die Metabolite der Markergruppe R2 waren Carvomenthenaol A,  $\beta$ -Damascon und u39,41. Die Amplitudenwerte von u39,41 sind in Abb. 40 IV dargestellt. Die drei Metabolite p-Cymenen, 1-Octanol und u33,01<sup>28</sup> können im Verlauf der Amplitudenwerte mit dem Verlauf der „aufsteigenden Treppe“ gleichgesetzt werden, wie sie bei den konstitutiven Markern zu beobachten ist. Sie bildeten zusammen die Gruppe R3. Die Werte für Müller-Thurgau und Regent lagen deutlich unter den Werten von Blauer Isabella und *V. riparia*. Wobei die Amplitudenwerte der beiden Behandlungsvarianten innerhalb eines Genotyps bei allen Genotypen außer Regent statistisch nicht unterscheidbar waren. Für Regent lag in allen drei Fällen  $p < 0,05$  vor. Die Werte lagen jedoch im Bereich der Amplitudenwerte von Müller-Thurgau. In Müller-Thurgau war die Datenvarianz jedoch höher, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten nachgewiesen werden konnten (Abb. 42 I). Aus dieser Gruppe (R3) ist p-Cymenen gleichzeitig ein „positiver“ konstitutiver Resistenzmarker. Auch in den Topfpflanzen wurden höheren p-Cymenen Gehalten in den resistenteren Genotypen beobachtet. In der letzten und vierten Gruppe (R4) wurden die übrigen sechs Marker ( $\beta$ -Cyclocitral, p-Cymol, Geranylaceton, Nerol und die beiden unbekannt Substanzen u40,40 und u46,93<sup>29</sup>) zusammengefasst. Ihre Gemeinsamkeit lag darin, dass sich die Amplitudenwerte aller Genotypen und aller Behandlungsvarianten im gleichen Bereich befanden. Dies galt in diesem Versuch auch für die beiden Metabolite Geranylaceton und Nerol, die in den Feldversuchen als konstitutive Marker ermittelt wurden. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten in Regent beruhten darauf, dass die Varianz innerhalb der Behandlungen gering war, so dass die beiden Behandlungsvarianten statistisch voneinander unterschieden werden konnten (Abb. 42 II).

In Regent wurden bis auf die unbekannte Substanz u46,93 bei allen Markern in den Kontrollblättern höhere Amplitudenwerte detektiert als in den infizierten Blättern (Abb. 42 II).

---

<sup>28</sup> Massenspektrum und Retentionsindex (Kovats-Index) zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Substanzen finden sich in Anhang A7

<sup>29</sup> Ebd.

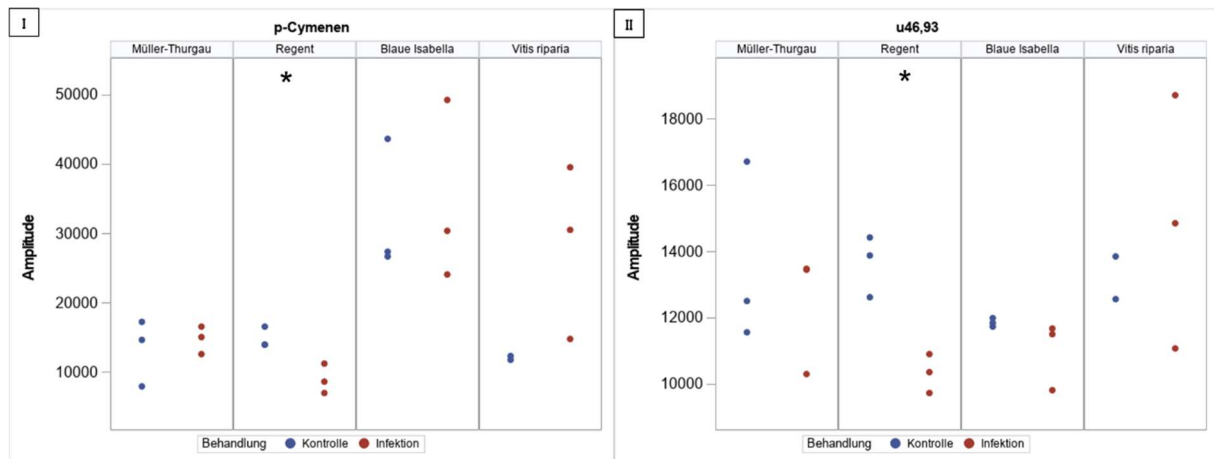


Abb. 42: p-Cymenen und die unbekannte Substanz u46,93 mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion in Regent. I) p-Cymenen, II) u46,93, \*) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle).

Geranylaceton aus der Regentgruppe R4 wurde auch in Müller-Thurgau mit signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsvarianten detektiert. Hier war jedoch der Gehalt von Geranylaceton in den infizierten Blättern höher als in den Kontrollblättern. Ebenso verhielt sich der einzige weitere Marker in Müller-Thurgau (Z)-3-Hexenylacetat, der ebenfalls höhere Gehalte nach einer Infektion aufwies. Müller-Thurgau als stark anfälliger Genotyp in diesem

---

*Im stark anfälligen Genotyp Müller-Thurgau wurden zwei induzierte Marker ermittelt (Geranylaceton und (Z)-3-Hexenylacetat). In beiden Fällen stieg der Gehalt nach einer Infektion signifikant an.*

---

Versuch zeigte demnach zwei induzierte Marker, die beide acht Tage nach der Infektion einen erhöhten Gehalt aufwiesen (Abb. 43). Diese Beobachtung steht im Kontrast zu der Aussage von Lazazzara (2018) dass keine signifikanten Veränderungen in anfälligen Sorten entstehen<sup>30</sup>. Lazazzara (2018) nutzen als anfällige Sorte jedoch nicht Müller-Thurgau, sondern Pinot noir.

<sup>30</sup> Lazazzara et al. (2018) untersuchten Metabolitänderungen nach *P. viticola* Infektion an fünf Genotypen: drei interspezifische Kreuzungen BC4, Kober 5BB und SO4, sowie *V. vinifera* cv. Solaris als pilzwiderstandsfähige Züchtung und *V. vinifera* cv. Pinot noir als anfällige Sorte.

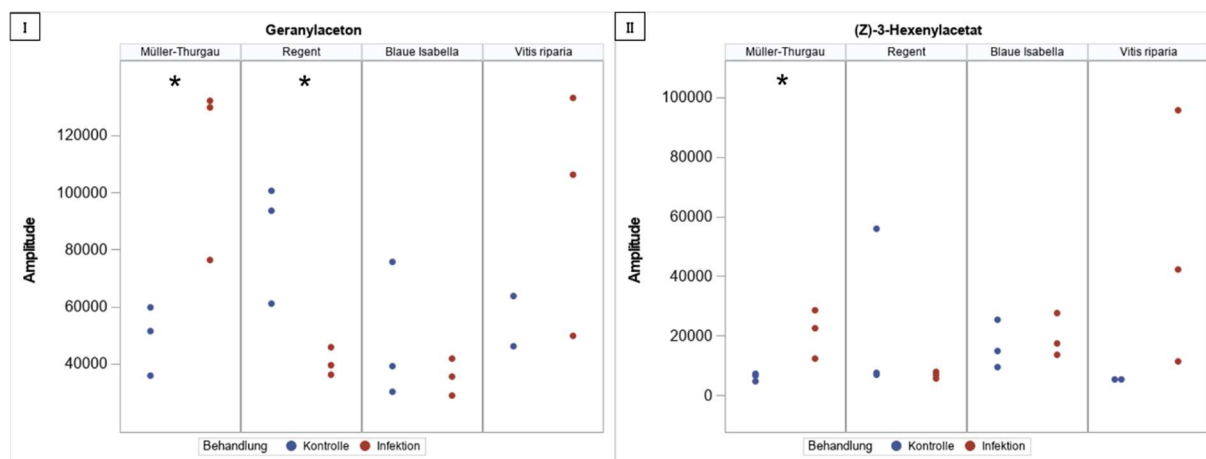


Abb. 43: Geranylacetone und (Z)-3-Hexenylacetat mit signifikanter Änderung der Amplitudenwerte nach einer Infektion in Müller-Thurgau und Regent. I) Geranylacetone, II) (Z)-3-Hexenylacetat, (\*) signifikanter Unterschied zwischen infizierten Blättern (Infektion) und Kontrollblättern (Kontrolle).

Die neun konstitutiven Resistenzmarker p-Cymenen, Geraniol, Geranylacetone, Linalool, Megastigmatrienon, Methylsalicylsäure, Nerol, (*E*)- $\beta$ -Ocimen und  $\alpha$ -Terpinolen wurden in diesem Versuch ebenfalls als induzierte Marker identifiziert. Von den neun konstitutiven Resistenzmarkern waren die vier Metabolite p-Cymenen, Geraniol, Megastigmatrienon und MeSA in den beiden resistenten Genotypen auch induzierte Marker.

Die anderen fünf konstitutiven Marker zeigten signifikante Unterschiede nach der Infektion in Regent und Müller-Thurgau.

Die pilzwiderstandsfähige Züchtung *V. vinifera* cv. Regent wies die Immunantwort mit der größten Anzahl an flüchtigen Inhaltsstoffen auf. Die Regentblätter zeigten bei der Beprobung acht Tage nach der Inokulation deutliche Infektionsanzeichen. An den Blättern von Blauer Isabella und *V. riparia* waren keine Infektionsanzeichen zu erkennen. Zum Messzeitpunkt lagen die meisten induzierten Marker in deutlich niedrigeren Konzentrationen in den inokulierten Blättern vor als in den Kontrollblättern. Im stark anfälligen Müller-Thurgau wurden zwei Marker identifiziert, die im Gegensatz zum vorgenannten beide höhere Konzentrationen in den infizierten Blättern aufwiesen.

### 3.4 Induzierte Marker (Gewächshaus-Pflanzen)

Tabelle 36: Infektionsmarker. Substanzen, die in den vier Genotypen *V. vinifera* cv. Müller-Thurgau und Regent, Blaue Isabella (Hybridrebe) und *V. riparia* signifikant verschiedene Amplitudenwerte zwischen den infizierten Blättern und den Kontrollblättern aufwiesen. **FETT gedruckt = p<0,05 #**) konstitutiver Resistenzmarker

Substanz	CAS Nr.	p-Werte				Regent- gruppe
		Müller- Thurgau	Regent	Blaue Isabella	<i>V. riparia</i>	
Carvomenthenal A	29548-14-9	0,8953	<b>0,0265</b>	0,4347	0,4306	R2
(R)-(+)-β-Citronel- lol	1117-61-9	0,1062	<b>0,0081</b>	<b>0,0408</b>	0,2903	R1
β-Cyclocitral	432-25-7	0,2262	<b>0,0333</b>	0,3155	0,2241	R4
p-Cymenen <sup>#</sup>	1195-32-0	0,6580	<b>0,0170</b>	0,8428	0,1804	R3
p-Cymol	99-87-6	0,2964	<b>0,0191</b>	0,5155	0,0919	R4
(E)-β-Damascon	85949-43-5	0,2961	<b>0,0044</b>	0,5153	0,1810	R2
Geraniol <sup>#</sup>	106-24-1	0,9076	0,0909	0,3108	<b>0,0057</b>	
Geranylaceton <sup>#</sup>	3796-70-1	<b>0,0310</b>	<b>0,0230</b>	0,4235	0,2905	R4
(Z)-3-Hexe- nylacetat	3681-71-8	<b>0,0349</b>	0,3624	0,6673	0,2561	
d-Limonen	5989-27-5	0,3757	<b>0,0136</b>	0,6100	0,4408	R1
Linalool <sup>#</sup>	78-70-6	0,5535	<b>0,0143</b>	0,0661	0,8071	R1
Megastigmatri- enon <sup>#</sup>	38818-55-2	0,4115	0,0950	<b>0,0223</b>	0,6190	
Methylsalicyl- säure <sup>#</sup>	119-36-8	0,6495	0,1317	0,0798	<b>0,0062</b>	
Nerol <sup>#</sup>	106-25-2	0,0596	<b>0,0032</b>	0,4642	0,9125	R4
(E)-β-Ocimen <sup>#</sup>	3779-61-1	0,1934	<b>0,0142</b>	0,1107	0,5334	R1
1-Octanol	111-87-5	0,4284	<b>0,0328</b>	0,1012	0,9150	R3
Sulcaton	110-93-0	0,0523	0,2170	0,4942	<b>0,0131</b>	
α-Terpinolen <sup>#</sup>	586-62-9	0,2390	<b>0,0029</b>	0,8569	0,5325	R1
u33,01		0,5380	<b>0,0194</b>	0,6243	0,1544	R3
u39,01		0,1576	<b>0,0052</b>	0,0621	0,3479	R1
u39,41		0,4678	<b>0,0473</b>	<b>0,0296</b>	<b>0,0311</b>	R2
u40,40		0,7214	<b>0,0087</b>	0,4574	0,3650	R4
u40,61		0,2400	<b>0,0043</b>	0,4563	0,3381	R1
u46,93		0,5682	<b>0,0064</b>	0,2284	0,6052	R4

## 4 Diskussion

In den folgenden Abschnitten soll diskutiert werden, wie verlässlich die Einordnung der Blattmetabolite als Resistenzmarker gelten kann, indem z.B. verschiedene Vorbehalte angesprochen werden. Wie verlässlich sind die Daten der konstitutiven Resistenzmarker, die aus Freilandversuchen gewonnen wurden? Dies zu beleuchten ist wichtig, da im Freiland unzählige unbeachtete Faktoren Einfluss auf das Metabolom der Pflanze haben. Wie können die Ergebnisse der induzierten Resistenzmarker eingeordnet werden, insbesondere in Bezug auf die Feststellung, dass die meisten dieser Substanzen nach einer *P. viticola* Behandlung eine niedrigere Konzentrationen als in den unbehandelten Kontrollen aufwiesen? Wie passen die Beobachtungen zusammen, dass die meisten terpenoiden Resistenzmarker eine negative Korrelation zu den Resistenzeigenschaften haben, in anderen Publikationen aber mit erhöhter Resistenz in Verbindung stehen, oder sogar eine direkte Wirksamkeit gegen *P. viticola* berichtet wird? Zudem wird eine kurze Übersicht über die bekannte Bioaktivität der einzelnen RM gegeben.

### **4.1 Freiland oder Gewächshaus – verschiedene Entwicklungsstadien vs. mögliche unbemerkte Infektion**

Zur Ermittlung der konstitutiven Resistenzmarker wurden Blätter von anfälligen und resistenten Genotypen aus dem Freiland verwendet. Der Nachteil von Freilandproben gegenüber Pflanzen aus dem Gewächshaus, die unter kontrollierten und weitestgehend konstanten Bedingungen kultiviert werden, besteht darin, dass im Freiland unzählige Einflüsse auf die Pflanzen und somit auch auf das Blattmetabolom wirken. Diese Einflüsse lassen sich nicht kontrollieren oder vollumfänglich erfassen und bewerten. Die verschiedenen Einflüsse, die im Freiland auf die Reben einwirken, können unter anderem Insektenbefall, Sonneneinstrahlung, Witterungsbedingungen an den Tagen vor oder am Tag der Probenahme, Herbivorenfraß oder andere Blattverletzungen, Befall mit anderen Pathogenen oder sogar mit dem Zielpathogen *P. viticola* selbst sein. Im Gewächshaus können die Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen kultiviert werden und somit unbekannte Einflüsse auf das Blattmetabolom deutlich reduziert und einfacher vernachlässigt werden. Allerdings wurden im Gewächshaus des JKI Siebeldingen alljährlich nur junge, vegetativ vermehrte Reben (Stecklinge) in kleineren Pflanztöpfen kultiviert. Die jungen kleinen Rebpflanzen besaßen naturgemäß weniger Blätter als die Reben im Freiland. Für die hier verwendete Extraktionsmethode der VOCs wurde eine sehr große Ausgangsmenge an Blattmaterial benötigt. Dies überstieg bei weitem die Gewächshauskapazität. Die Extraktionsmethode hätte natürlich angepasst werden können. Aber in dieser Arbeit sollte neben dem Vergleich des Blattmetaboloms der verschiedenen Genotypen auch untersucht wer-



den, inwiefern die Blattposition bei der Beprobung einen Einfluss auf die Ermittlung von Resistenzmarkern hatte. Für diese Untersuchung mussten entsprechend groß gewachsene Pflanzen zur Verfügung stehen, wie sie im Freiland zu finden waren. Des Weiteren war eine ausdrückliche Zielsetzung dieser Arbeit das Blattmetabolom zu verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze zu untersuchen. Insbesondere für diese Zielsetzung waren vollentwickelte Freilandpflanzen notwendig. Das Forschungsprojekt, in dem diese Dissertationsarbeit integriert war, war zudem daran ausgerichtet, die Kupferanwendungen im Ökoweinbau zu reduzieren. Daher war ein früher Ansatz des Verbundprojektes, die ermittelten Resistenzmarker in Zukunft im Pflanzenschutz anwenden zu können. Eine zu Projektbeginn verfolgte Idee war, aus den resistenten Blättern wirksame Blattextrakte herzustellen. Aus diesem Grund wurde auf Blätter von Freilandreben zurückgegriffen, um bereits zu einem frühen Projektzeitpunkt die später zu verwendenden Freilandblätter analysiert zu haben. Es wurde bewusst zugelassen, dass unkontrollierbare Umwelteinflüsse auf das Blattmetabolom einwirken konnten, genau wie es beim Prozess eines anwendbaren Blattextraktes der Fall sein würde. Um die Anzahl an Metaboliten klein zu halten, die aus induzierten Resistenzantworten durch z.B. Blattverletzung oder Pathogenbefall stammen konnten, wurden nur ganze Blätter mit Stiel und mit augenscheinlicher Symptomfreiheit beprobt. Die Zuverlässigkeit der Aussagen zu den Resistenzmarkern sollte durch die zweijährige Wiederholung abgesichert werden. Je häufiger ein Metabolit während der zweijährigen Versuchszeit als RM identifiziert werden könnte, umso wahrscheinlicher erschien eine von Umwelteinflüssen unabhängige Bestätigung der korrekten Einordnung. Hierzu siehe jedoch die Beobachtung von einmalig ermittelten RM wie 2-Phenylethanol und dessen inhibierende Wirkung auf *P. viticola* in Abschnitt 4.4 Bioaktivität der Resistenzmarker.

Was allerdings bedeutet eine augenscheinliche Symptomfreiheit von Freilandblättern, wenn die Symptome erst ca. acht Tage nach der ersten Infektion am Blatt sichtbar werden? Monoterpene wurden bereits als Resistenzmarker für eine *P. viticola* Infektion beschrieben, die wenige Stunden nach einer gezielten Infektion detektiert wurden (Algarra Alarcon, 2015; Chitarrini, 2017; Lazazzara, 2021; Lazazzara, 2018; Ricciardi, 2021).

Die monoterpeneidischen konstitutiven Resistenzmarker dieser Arbeit lagen hauptsächlich als negative RM vor, d.h. sie waren in den anfälligen Genotypen höher konzentriert als in den resistenten Genotypen. Ist vielleicht das verstärkte Auftreten von Monoterpenoiden ein Indiz für eine unbemerkte Infektion?

Gegen eine noch nicht sichtbare Infektion spricht jedoch, dass die Monoterpene hauptsächlich in der frühen Probeterminen zu BBCH6 auftraten. Hätte eine Infektion vorgelegen, hätten beim folgenden Probetermin in BBCH8 die anfälligen Genotypen Symptome aufweisen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall. Wie passt also das Auftreten von negativen Resistenzmarkern

zu den erwähnten Publikationen über Monoterpene, die nach einer Infektion verstärkt auftreten? Ähnlich wie in dieser Arbeit wurden in den Publikationen von Algarra Alarcon (2015), Chitarrini (2017), Lazazzara (2021; 2018) und Ricciardi (2021) Blattmetabolite von anfälligen und resistenten Genotypen miteinander verglichen. Die Autoren verwendeten jedoch als resistente Genotypen keine reinen nordamerikanischen Wildtypen wie *V. labrusca* oder *V. riparia*, sondern Unterlagssorten ohne *V. vinifera* Status (z.B. SO4 oder Kober 5BB) und sie legten den Schwerpunkt ihrer Arbeit auf induzierte RM. Monoterpene liegen in *V. vinifera* Reben auch vor, wenn nachweislich keine Infektion stattgefunden hat. Sie sind wichtige Geschmacksträger in Weinen und Trauben von *V. vinifera* (Caffrey, 2021; Gerós, 2012; Petric, 2016; Rapp, 1995; Sun, 2015), so dass das gehäufte Auftreten von Monoterpenen in *V. vinifera* im Vergleich zu den Wildtypen *V. riparia* und *V. labrusca* nicht zwangsläufig für eine unbemerkte Infektion spricht, sondern auch ein Artspezifischer Effekt sein könnte bzw. durch die Selektion der Kultursorten nach höheren Monoterpenkonzentrationen in den Trauben bedingt sein könnte. Diese Hypothese wird durch das Ausbleiben der Symptome in BBCH8 verstärkt. Die bereits publizierten Analysen zur Bioaktivität von Monoterpenen bekräftigen zusätzlich, dass das Vorhandensein von Monoterpenen keineswegs ein rein artspezifischer Effekt sein kann, der ausschließlich unabhängig von Abwehrreaktionen auftreten würde (siehe auch 4.4 Bioaktivität der Resistenzmarker).

### **4.2 Resistenzklassen Einteilung durch Blattscheibentest**

Die Einteilung der Resistenzklassen wurde für diese Arbeit durch den unterschiedlich starken Befall von Blattscheiben nach gezielter Inokulation ermittelt. Die Resistenzklassen wurden für die statistische Berechnung gleichgesetzt mit der Stärke der Resistenz, die allein auf flüchtigen Inhaltsstoffen beruht. Die Befallstärke der Blätter spiegelt jedoch das gesamte Zusammenspiel aller Resistenzantworten der Blätter wider. Hierzu zählen neben den flüchtigen Inhaltsstoffe ebenso die nicht-flüchtigen (z.B. Stilbene), sowie die strukturellen und morphologischen Eigenschaften der Pflanze, wie Stomata-Morphologie, Wachsaufgabe oder das Vorhandensein bzw. Fehlen von Trichomen.

Blaue Isabella besitzt im Gegensatz zu Delaware z.B. eine starke, hydrophobe Behaarung (Trichome) an der Blattunterseite. Eine hohe Trichomdichte kann den Kontakt zwischen Wasserfilm und der unteren Epidermis deutlich verringern, teilweise sogar ganz unterbinden. Die begeißelten Zoosporen von *P. viticola* sind jedoch auf eine durchgehende Benetzung der Epidermis der Blattunterseite angewiesen, um zu den Stomata zu gelangen und dort das Blatt zu infizieren (Kortekamp, 1999). Die starke Behaarung der Blätter von Blaue Isabella im Gegensatz zu den Delaware-Blättern scheint im Blattscheibentest einen großen Einfluss auf die Einteilung in die Resistenzklassen zu haben. Daher zeigte die Hybridsorte Blaue Isabella eine Klassenzugehörigkeit, die der (weitgehend unbehaarten) Wildart *V. riparia* entsprach. Auch

die Stomata Morphologie hat einen Einfluss auf die Resistenz der Pflanzen. Jürges et al. (2009) zeigten, dass resistente Nordamerikanische *Vitis* Arten wie *V. riparia* an der inneren Cuticulaseite der Stomata eine zusätzliche Wulst besaßen. Diese Wulst (*inner cuticula rim*) konnte von den Keimungsschläuchen nicht oder nur selten überwunden werden.

Obwohl verschiedene Abwehrmechanismen in die Einteilung der Resistenzklassen durch den Blattscheibentest einfließen, wird er standardmäßig zur Einteilung der Resistenzstärke verwendet (Bellin, 2009; Brown, 1999; Gómez-Zeledón, 2016; Li, 2020; Schwander, 2012). Der in dieser Arbeit detektierte Anstieg des MeSA Gehalts von anfälligen hin zu resistenten Genotypen zeigt deutlich, dass diese Einteilung auch für die Ermittlung von flüchtigen Resistenzmarkern verwendet werden kann.

### **4.3 Problematik bei induzierten Markern**

Die meisten induzierten Marker, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, lagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach einer Infektion mit einem geringeren Gehalt vor. Wie lässt sich dieser Befund erklären, wo doch schon das Wort „induziert“ eine erhöhte Konzentration von bioaktiven Stoffen nach einer Infektion impliziert und dies auch eher so publiziert wird (Chitarrini, 2017; Ciubotaru, 2021; Ricciardi, 2021)? Häufig wird in diesen Publikationen zum einen bereits wenige Stunden nach der erfolgten Inokulation die Konzentrationsänderung von exprimierten Genen, Primär- oder Sekundärmetaboliten analysiert. Dennoch ist es nicht ungewöhnlich, die Resistenzantwort der Pflanze erst einige Tage nach der Inokulation (wie hier 8 dpi) zu beobachten (Billet, 2020; Fass, 2020; Lazazzara, 2018). Des Weiteren werden die VOC Emissionslevel meistens in der Umgebungsluft und nicht innerhalb der Pflanzen analysiert. Würden die VOCs ausschließlich außerhalb der Pflanzen detektiert, konnte es in der Pflanze zu niedrigeren Konzentrationsleveln führen. Dies trifft jedoch nur teilweise zu, da mindestens ebenso häufig die Metabolite innerhalb der Pflanze detektiert werden (Lazazzara, 2021; Lazazzara, 2018; Weingart, 2012). Wie also lässt sich der hier vorliegende Befund erklären? Hierfür gibt es mehrere in Frage kommende Hypothesen. Zum einen bedeutet die bessere Abwehrstrategie der resistenten Genotypen, dass eine *P. viticola* Infektion so frühzeitig gestoppt wurde, dass die Metabolitkaskade, die zur Bildung und Freisetzung von flüchtigen Markern führen würde, nicht induziert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass die beiden resistenten Genotypen ihre Abwehrmechanismen so frühzeitig starten konnten, dass die Infektion verhindert wurde und die Produktion von flüchtigen Markern zum Beprobungszeitpunkt acht Tage nach der Inokulation bereits wieder rückläufig bzw. gestoppt war. Für beide Versionen gibt es verschiedene Hinweise. In resistenten Genotypen wird die Infektion häufig unterbunden, bevor es zu einer Ausbildung von Infektionsschläuchen und somit bevor eine Infiltrierung des Gewebes entstehen kann. Bei *Vitis riparia* wird z.B. die Pathogenentwicklung inhibiert,

sobald die Sporen an den Schließzellen anlagern (Jürges, 2009). Zum Zeitpunkt der Probenahme acht Tage nach der Inokulation waren keine Infektionssymptome an den resistenten Genotypen sichtbar. Zum anderen besitzen die resistenten Genotypen Resistenzgene, die eine schnelle Abwehrreaktion starten. In *V. vinifera* cv. Regent sind die Resistenzgene Ren3, Ren9, Rpv3.1 eingekreuzt worden (siehe VIVC, Stand 31.10.2021 publiziert durch (Maul, 2020)). Regent verfügt jedoch nicht über die Stomata Morphologie mit *inner cuticula rim* wie sie bei *V. riparia* vorliegt oder über die hohe Dichte an Trichomen, wie sie bei Rote Isabella anzutreffen ist. D.h. das *P. viticola* die Pflanzen über die Stomata infizieren kann und erst dort die Resistenzantwort startet. Dies erklärt die erhöhte Anzahl an Markern in Regent im Vergleich zur anfälligen *V. vinifera* cv. Müller-Thurgau. Es könnte auch erklären, warum die meisten flüchtigen Metabolite in den infizierten Blättern in niedrigerer Konzentration vorlagen als in den Kontrollblättern. Wahrscheinlich wurden diese Metabolite im Verlauf der Infektion bzw. der Abwehrmechanismen als Warnstoffe freigesetzt oder anderweitig verstoffwechselt. Generell ist eine Konzentrationsabnahme bestimmter Metabolite während bzw. nach einer Resistenzantwort nicht ungewöhnlich. Auch in Lazazzara et al. (2018) traten einige Biomarker nach der Infektion (6 dpi) mit niedrigerer Konzentration auf.

#### **4.4 Bioaktivität der Resistenzmarker**

In diesem Abschnitt wird auf die bekannten bioaktiven Eigenschaften der potenziellen konstitutiven oder induzierten Resistenzmarker eingegangen. Wie bei allen anderen rein statistisch ermittelten Markern, bleibt die Einstufung der Biomarker so lange theoretischer Natur, bis sie in verschiedenen Bioaktivitätstest *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden, um eine zufällige Korrelation ausschließen zu können. Neben den statistisch bedingten falsch positiven Ergebnissen (Fehler 1. und 2. Art, p-Wert Korrektur) können zufällige Korrelationen u.a. dadurch zu Stande kommen, dass eine Substanz in resistenten Genotypen oder Arten erhöht vorliegt z.B. in *V. labrusca*. *V. labrusca* hat in diesem Testaufbau die höchste Pathogenresistenz. Es könnte also sein, dass eine Substanz spezifisch für *V. labrusca* ist, aber keine Funktion im Resistenzmechanismus hat. Trotzdem würde die Substanz in diesem Test als Resistenzmarker gelten, da die Zugehörigkeit zu *V. labrusca* hier gleichgesetzt wurde mit hoher Resistenz. Daher ist die Recherche von beschriebenen Bioaktivitäten als wichtige zusätzliche Einordnung der Ergebnisse hier zusammengefasst.

Insgesamt wurden 55 potenzielle konstitutive oder induzierte RM ermittelt, von denen 39 identifiziert werden konnten. 19 dieser Metabolite sind bereits im Zusammenhang mit einer *P. viticola* Infektion beschrieben worden (MeSA, Benzylalkohol, Benzaldehyd, 2-Phenylethanol, 2-Ethylfuran,  $\beta$ -Cyclocitral, Ocimen [ohne Stereoisomerenbestimmung],  $\beta$ -Ionon, Linalool, (Z)-2-Hexenal, (Z)-2-Hexenol, Geranylaceton, 1-Octanol, Geraniol, Nerol,  $\alpha$ -Terpinolen,  $\alpha$ -Terpineol und Nonanal). Doch auch die übrigen Metabolite weisen biologische Aktivität auf. Für viele von

ihnen wurde bereits eine fungizide Wirkung auf bestimmte Organismen publiziert. Im Folgenden werden die bioaktiven Eigenschaften der potenziellen RM innerhalb der gemeinsamen Stoffklassen besprochen.

#### Bioaktivität bestimmter Benzoat-Derivate

Seit langem ist bekannt das MeSA auch im System *Vitis / P. viticola* eine entscheidende Rolle in der Resistenzantwort einnimmt (Ciubotaru, 2021; Le Henanff, 2009). Benzylalkohol und Benzaldehyd sind beide Benzoatderivate und sind Vorstufen im Syntheseweg zu Salicylsäure bzw. Methylsalicylat. Benzaldehyd spielt eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von Salicylsäure, induziert die Expression von PR Proteinen (PR-1

mRNA in Tabak) und erhöht beispielsweise die Resistenz von Tabak gegen das Tabakmosaikvirus (Ribnicky, 1998). Beide Metabolite haben außerdem nachweislich direkte fungizide Wirkung; sie inhibieren die Sporenkeimung und das Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Monilinia fructicola* (Martínez, 2012). Benzaldehyd konnte auch in anderen Untersuchungen am System *Vitis / P. viticola* in erhöhter Konzentration nach einer *P. viticola* Infektion detektiert werden (Chitarrini, 2020; Chitarrini, 2017; Ciubotaru, 2021). Wohingegen Benzylalkohol bei Lazazzara (2018) nach einer *P. viticola* Infektion in niedrigerer Konzentration als in der unbehandelten Kontrolle detektiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Benzaldehyd als auch Benzylalkohol als konstitutive positive RM identifiziert. Nicht jedoch als induzierte RM, d.h. die Konzentrationen beider Stoffe nach einer *P. viticola* Infektion unterschieden sich nicht signifikant von der unbehandelten Kontrolle. Benzylalkohol wurde als wichtiger konstitutiver RM der Kategorie A (zweijährig, mindestens 1x im selben Entwicklungsstadium), Benzaldehyd allerdings nur mit einer Wiederfindung der Kategorie C (einjährig, mehrmals) ermittelt.

Benzylbenzoat ist ebenfalls ein Benzoat-Derivat, welches als konstitutiver negativer RM der Kategorie D (einmaliges Auftreten als RM) eingeordnet wurde. Es ist in der EU laut Robert-Koch-Institut u.a. als Akarizid z.B. gegen Krätze zugelassen ([https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Skabies.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Skabies.html) Stand: 11.01.2022). Es hat jedoch keine Zulassung als Biozid im Agrarbereich (Fischer, 2012). Auch im Zusammenhang mit *P. viticola* sind mir keine Publikationen bekannt. Es wurde jedoch eine fungizide Wirkung gegen *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* und *Sclerotium rolfsii* beschrieben (Tuntipaleepun, 2012).

---

*Konstitutive RM der Kategorie D (einmaliges Auftreten in zwei Jahren) wie 2-Phenylethanol besitzen Bioaktivität gegen P. viticola.*

---

2-Phenylethanol wurde als konstitutiver positiver RM ebenfalls in der Kategorie D (einmaliges Auftreten) ermittelt. Es wurde nicht als induzierter RM eingestuft. Bei Untersuchungen zur induzierten Resistenz an vier verschiedenen resistenten Züchtungen (BC4, SO4, Solaris, Kober 5BB) und Pinot noir als anfällige *V. vinifera* Sorte ermittelten Lazazzara et al. (2018) 2-Phenylethanol als induzierten RM. Die Autoren konnten im Blattscheibenversuch zeigen, dass die Gegenwart von 2-Phenylethanol im Luftraum die Symptome einer *P. viticola* Infektion verhindern konnten.

---

*2-Phenylethanol inhibiert die P. viticola Infektion im Blattscheibenversuch (Lazazzara, 2018).*

---

Die Hinweise aus der Literatur legen nahe, dass neben MeSA auch Benzaldehyd, Benzylalkohol und sogar das nur einmalig ermittelte Metabolite wie 2-Phenylethanol Biomarker für Resistenzantworten gegen *P. viticola* Infektion sind.

### Bioaktivität bestimmter Norisoprenoide

Von den insgesamt zehn Norisoprenoiden wurden für die beiden Metabolite (*E*)- $\beta$ -Ionon und

---

*Für  $\beta$ -Cyclocitral wurde eine Wirkung gegen die Symptome des Falschen Mehltaus nachgewiesen (Lazazzara, 2018).*

---

$\beta$ -Cyclocitral eine erhöhte Konzentration nach einer *P. viticola* Infektion bereits publiziert (Lazazzara, 2018).  $\beta$ -Cyclocitral wurde auch in dieser Arbeit als induzierter RM klassifiziert, aber (*E*)- $\beta$ -Ionon wurde

ausschließlich als konstitutiver positiver RM eingeordnet. Für  $\beta$ -Cyclocitral konnten Lazazzara et al. eine Wirkung gegen Falschen Mehltau nachweisen, die Bioaktivität von (*E*)- $\beta$ -Ionon wurde jedoch nicht überprüft (Lazazzara, 2018). Synthetische Derivate von (*E*)- $\beta$ -Ionon wurden allerdings 1991 als Pflanzenschutzmittel gegen Peronosporaceae (*Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*) patentiert, was eine mögliche Wirkung auch gegen *P. viticola* nahe legt, da beide Pathogene zur Familie der *Peronosporaceae* innerhalb der Oomyceten gehören. In einer Studie zu Carotenoidspaltenden Dioxygenasen (CCD *carotenoid cleavage dioxygenase*) in Wein gehören die beiden Metabolite (*E*)- $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral zum selben Cluster, deren Akkumulation mit erhöhter Exprimierung von *VvCCD1*, *VvCCD4a* und *VvCCD4b* korreliert (Meng, 2020). In derselben Studie wurde Sulcaton (6-Methyl-5-Hepten-2-on) zum selben Cluster wie (*E*)- $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral eingeordnet. Sulcaton wurde hier als induzierter Resistenzmarker ermittelt. Die bisher bekannte Bioaktivität von Sulcaton beschränkt sich weitgehend auf sein Auftreten als Pheromon (Mozūraitis, 2020; Slodowicz, 2019).

---

*Sulcaton wird in dieser Arbeit das erste Mal durch statistische Auswertung als induzierter Resistenzmarker gegen P. viticola ermittelt.*

---

Sulcaton wurde von Lazazzara et al. (2021) in Verbindung mit *P. viticola* gebracht, indem

Chitarrini et al. (2017) zitiert wird. Diese Aussage von Lazazzara wird aber weder durch den Original-Artikel noch durch dessen Supplements bestätigt. Sulcaton wird in dieser Arbeit folglich erstmalig statistisch belegt mit einer *P. viticola* Resistenzantwort in Verbindung gebracht. (*E*)- $\beta$ -Damascon ist ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese von  $\beta$ -Cyclocitral zu (*E*)- $\beta$ -Damascenon (Mosaferi, 2022). (*E*)- $\beta$ -Damascon wurde hier ausschließlich als induzierter RM und (*E*)- $\beta$ -Damascenon ausschließlich als konstitutiver positiver RM ermittelt. (*E*)- $\beta$ -Damascon ist neben seiner insektiziden Wirkung (Kaufman, 2011) auch ein Aromastoff. Daher wird es weltweit in Kosmetika, Reinigungsmitteln aber auch in Lebensmitteln eingesetzt (Lapczynski, 2007). (*E*)- $\beta$ -Damascenon gilt als wichtiger Aromastoff in Trauben und Weinen, der mit Attributen wie Honigduft, frischem Holz, fruchtig-blumig, Apfel oder gebackener Apfel beschrieben wird (Mosaferi, 2022; Sefton, 2011). Es bindet an ATP Synthasen, daher werden (*E*)- $\beta$ -Damascenon auch entzündungshemmende und antibakterielle Wirkungen zugeschrieben (Liu, 2017; Pan, 2019).

Dihydroedulan I und Geranylaceton stehen mit der (*E*)- $\beta$ -Damascenon Akkumulation in Trauben in Verbindung. Die (*E*)- $\beta$ -Damascenon Akkumulation korreliert mit einer erhöhten Expression der Carotenoidspaltenden Dioxygenase *VvCCD4b*, welche ein Schlüsselenzym in der Norisoprenoid Synthese zu sein scheint (Meng, 2020). Für Geranylaceton sind verschiedene Wechselwirkungen mit Insekten beschrieben worden. Zum einen wirkt es abschreckend auf die Tsetse Fliege (Diallo, 2020), zum anderen ist es ein Pheromon des Kalifornischen Bockkäfers (*Asemum nitidum* und *A. caseyi*) (Halloran, 2018). Geranylaceton bindet an eine aktive Bindestelle von Acetylcholinesterase, daher wird auch eine insektizide Wirkung vermutet (Johnson, 2021). Es wird nach einer *P. viticola* Infektion mit erhöhter Konzentration detektiert, aber nicht im signifikanten Bereich. Daher wird es von den Autoren nicht weiter untersucht (Ricciardi, 2021).

---

*Von den zehn Norisoprenoiden, die als RM eingestuft wurden, wurden acht zum ersten Mal mit einer Resistenz gegen *P. viticola* in Verbindung gebracht.*

---

Theaspiran hat eine inhibierende Wirkung auf *Fusarium oxysporum* (Zhang, 2021). Theaspiran A gehört zu den konstitutiven positiven RM der Kategorie A (zweijährig, mind. ein gleiches Entwicklungsstadium). Megastigmatrienon gehört zu der Gruppe der Megastigmane, zu der auch Damascenon und Damascon zählen. Carvomenthenal A ist ein Aromastoff, der an würzige Kräutern erinnert. Für beide Verbindungen sind mir keine Publikationen zu dessen Bioaktivität bekannt.

Dihydroedulan I, Geranylaceton, Megastigmatrienon, Sulcaton, Carvomenthenal A werden hier das erste Mal als eigenständige Substanzen (also nicht nur als Inhaltsstoff eines wirksamen Pflanzenöls) mit Resistenzeigenschaften in Verbindung gebracht.

Für Theaspiran, (*E*)- $\beta$ -Damascon und (*E*)- $\beta$ -Damasconenon sind (fungizide) Wirkungen beschrieben und für  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral wurde ein Zusammenhang zu einer *P. viticola* Infektion bereits publiziert. Die acht Norisoprenoide (Theaspiran, (*E*)- $\beta$ -Damascon, (*E*)- $\beta$ -Damasconenon, Dihydroedulan I, Geranylaceton, Megastigmatrienon, Sulcaton und Carvomenthenal A) jedoch werden hier das erste Mal mit Resistenzeigenschaften im Wirt-Pathogen-System *Vitis* / *P. viticola* in Verbindung gebracht.

### Bioaktivität bestimmter GLV und 2-Ethylfuran

Es wurden insgesamt sechs GLV als induzierte (1-Octanol und (*Z*)-3-Hexenylacetat) oder konstitutive (Nonanol, Nonanal, (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenal) RM ermittelt. Die 1-Octanol Konzentration erhöht sich z.B. nach einer *P. viticola* Inokulation signifikant (Chitarrini, 2020). Dies stimmt mit den Ergebnissen der hier beschriebenen Arbeit überein, welche 1-Octanol als induzierten RM ermittelten.

Nonanal und Nonanol wurden als konstitutive RM der Kategorie A (zweijährig, mindestens ein

---

*Vier von sechs GLV und 2-Ethylfuran sind bereits im Zusammenhang mit P. viticola Resistenzantworten beschrieben worden.*

---

BBCH gleich) klassifiziert. Nonanol und Nonanal können durch Redox-Wechselwirkungen leicht ineinander umgebaut werden. Nonanol hat fungizide Wirkung auf *Geotrichum candidum citrus race* (Suprpta, 1997) und *Fusarium graminearum* (Cruz, 2012). Das Aldehyd Nonanal wurde nach einer *P. viticola* Infektion in erhöhter Konzentration

detektiert und als potenzieller Resistenzmarker beschrieben (Ciubotaru, 2021). Allerdings fördert Nonanal das Wachstum der Haustorien von *Uromyces fabae* (Mendgen, 2006). Und es wirkt auf *P. viticola* Zoosporen ebenso anziehend wie ein intaktes Müller-Thurgau Blatt. Wird Nonanal allerdings im Blattscheibenversuch neben einer Blattscheibe positioniert, kann die Infektionsrate um ca. 75 % reduziert werden (Ciubotaru, 2021).

(*Z*)-3-Hexenol ist ebenfalls ein konstitutiver Resistenzmarker der Kategorie A. Wohingegen (*Z*)-3-Hexenal der Kategorie C (einjährig) ange-

---

*Die beiden GLV Nonanol und (Z)-3-Hexenylacetat werden hier das erste Mal als Resistenzmarker beschrieben. Sie können enzymatisch leicht aus den bekannten RM Nonanal bzw. (Z)-3-Hexenol synthetisiert werden.*

---

hört und wechselnde Korrelation zur Resistenz besitzt. (*Z*)-3-Hexenol ist die Hauptkomponente des Geruchs von frisch geschnittenem Gras. Durch (*Z*)-3-Hexenol kann eine *Botrytis cinerea* Infektion eingedämmt (Kishimoto, 2005), das Wachstum von *Fusarium graminearum* und *F. avenaceum* vollständig (Cruz, 2012) und von *Colletorichum camelliae* Masea teilweise eingeschränkt werden (Zhang, 2006). Es hat also generell eine fungizide Wirkung. (*Z*)-3-Hexenol



wurde nach einer *P. viticola* Infektion in erhöhter Konzentration detektiert und daher als Resistenzmarker beschrieben (Lazazzara, 2021). (Z)-3-Hexenal induziert nach einer *P. viticola* Infektion den Zelltod befallener Zellen (Akaberi, 2018). Für beide C6 Verbindungen ist also bereits ein Zusammenhang im Abwehrmechanismus gegen *P. viticola* belegt.

(Z)-3-Hexenylacetat ist ein Ester von (Z)-3-Hexenol und kann in Pflanzen über Acetyltransferase synthetisiert werden (Sugimoto, 2021). Es ist ein Primer für nachfolgende Abwehrreaktionen, indem es verschiedene Gene und die Synthese von flüchtigen Terpenen induziert (Frost, 2008). Es wird hier aber zum ersten Mal als Marker in der Abwehrreaktionskette bei *P. viticola* Infektion berichtet.

2-Ethylfuran verhindert Mehltau Symptome an Blattscheiben bei einer Konzentration von 1,0 g / L in wässriger Lösung bzw. 20 mg / L im Luftraum. Allerdings verursacht eine Konzentration von 10,0 g / L in einer wässrigen Suspension phytotoxische Effekte an den Blattscheiben (Lazazzara, 2018). In eigenen Tests zur Phytotoxizität von 2-Ethylfuran führten bereits wesentlich geringere Konzentrationen zu Läsionen auf den verwendeten Blattscheiben (400 ml / L auf Wasseragar bzw. 250 ml / L auf Filterpapier, Daten nicht gezeigt). Es zeigt sich erneut, dass auch konstitutive Marker niedrigerer Kategorie (2-Ethylfuran Kategorie C [mehrmals in nur einem Versuchsjahr]) zur Resistenz gegen *P. viticola* beitragen.

---

*2-Ethylfuran verhindert die Bildung von Symptomen des Falschen Mehltaus im Blattscheibentest*

---

#### Bioaktivität bestimmter Terpen-Verbindungen

Insgesamt wurden 17 Monoterpenoide und ein Sesquiterpen als RM ermittelt. Davon waren drei Metabolite ausschließlich induzierte RM (Citronellol, p-Cymol und d-Limonen) und sieben weitere wurden sowohl als induzierte als auch als konstitutive RM klassifiziert (Linalool, (E)- $\beta$ -Ocimen, p-Cymenen, Geraniol, Nerol,  $\alpha$ -Terpinolen und Geranylaceton). Nur vier Monoterpenoide wurden als konstitutive positive RM mit erhöhten Konzentrationen in den resistenten Genotypen detektiert: p-Cymenen, Hotrienol,  $\alpha$ -Terpineol und Geranylaceton, wobei die beiden letzteren eine wechselnde Korrelation aufwiesen und p-Cymenen und Geranylaceton auch induzierte RM waren. Die übrigen sechs Terpen-Verbindungen (Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen, (Z)- $\beta$ -Ocimen, (Z)-Rosenoxid, Geraniumoxid und  $\alpha$ -Calacoren) wurden in erhöhter Konzentration in den anfälligen *V. vinifera* Genotypen detektiert und wurden ausschließlich als konstitutive negative RM ermittelt. Geranylaceton wurde bereits bei den Norisoprenoiden besprochen, da durch Meng et al. (2020), ein Bezug zu Norisoprenoidclustern hergestellt werden konnte. Geranylaceton entsteht beim Abbau von Carotenoiden und kann daher als Norisoprenoid eingestuft werden. Da es aus zwei Isopreneinheiten und dem Acetonrest besteht, wurde es bei der übrigen Auswertung dieser Arbeit als Monoterpenoid eingeordnet.

Ganz allgemein werden Terpene als konstitutive Resistenzmarker gegen *P. viticola* klassifiziert (Algarra Alarcon, 2015) und als induzierte Resistenzmarker gegen *P. viticola* eingeordnet (Chalal, 2015). In beiden Artikeln wird jedoch nicht über Einzelverbindungen, sondern nur über die Stoffklassenverbindungen gesprochen. Dennoch konnten auch schon Einzelverbindungen als RM in verschiedenen Publikationen ermittelt werden.

### MONOTERPENOIDE MIT PUBLIZIERTEN ZUSAMMENHANG ZUR RESISTENZANTWORT VON *VITIS SPP.* AUF *P. VITICOLA*

Von acht hier identifizierten Monoterpenen sind bereits Zusammenhänge zu einer *P. viticola* Resistenzantwort beschrieben worden. Die induzierten und konstitutiven RM Linalool, (*E*)- $\beta$ -Ocimen, Geraniol, Nerol,  $\alpha$ -Terpinolen und Geranylaceton, sowie die ausschließlich konstitutiven RM  $\alpha$ -Terpineol und (*Z*)- $\beta$ -Ocimen wurden alle auch in anderen Arbeiten mit erhöhter Konzentration nach einer *P. viticola* Infektion detektiert (Chitarrini, 2020; Chitarrini, 2017; Lazazzara, 2018; Ricciardi, 2021).  $\beta$ -Linalool inhibiert z.B. die Keimung von *Colletotrichum lindemuthianum* (Lazazzara, 2018).

---

*Für acht der 17 monoterpenoiden RM wurde bereits ein Zusammenhang zu einer P. viticola Infektion publiziert.*

---

Geraniol ist ein azyklisches Monoterpen. Es entsteht direkt aus Geranyldiphosphat. Die Oxidationsprodukte von Geraniol sind Geranial und Neral. Beide zusammen werden als Citral bezeichnet. Geraniol ist außerdem der Ausgangsstoff für Nerol, Citronellol und deren Ester bzw. auch für Geranylacetat. Geraniol, Nerol, Citral,  $\alpha$ -Terpineol und auch  $\beta$ -Citronellol wirken fungizid durch ihre Membrandestabilisierenden Eigenschaften. Für Nerol

---

*Eine fungizide Wirkung von Linalool, Geraniol, Nerol, Geranylaceton,  $\alpha$ -Terpinolen und  $\alpha$ -Terpineol gegen P. viticola ist nicht publiziert, wohl aber eine erhöhte Konzentration nach einer Infektion.*

---

ist die Membrandestabilisierende Wirkung auf eine Inhibition der Ergosterolbildung zurückzuführen, wodurch Nerol das Myzelwachstum und die Sporenkeimung von *Aspergillus niger* auf Weintrauben verhindert (Wang, 2015). Geraniol und Citronellol verhindern dadurch z.B. die Keimung von *Colletotrichum spp.* Sporen (Scariot, 2020) und der Weinpathogene *Sphaceloma ampelinum* und *Pseudocercopora vitis*. Die beiden

letzten genannten spielen in Europa allerdings eine untergeordnete Rolle, da sie vermehrt auf *V. labrusca* stämmigen Kultivaren in Südamerika zu finden sind (Rozwalka, 2020). Allerdings spielen Ergosterole für

---

*Ein Isomerenmix aus Ocimen reduziert die Keimung von P. viticola.*

---

die Membranstabilisierung von Oomyceten eine untergeordnete Rolle, auch wenn derzeit diskutiert wird, dass Oomyceten Sterolverbindungen zur Membranstabilisierung aus ihrer Umgebung aufnehmen würden (Wang, 2021). Daher ist es fraglich, ob Nerol, Geraniol oder Citronellol ähnliche Wirkweisen in Oomyceten aufweisen.  $\alpha$ -Terpinolen hat eine beschriebene antibakterielle Wirkung (Schuphan, 1967) und ist ein Wein-Aromastoff (Petric, 2016). Zu einer fungiziden Wirkung auf *P. viticola* sind mir keine Veröffentlichungen bekannt. Ähnlich wie  $\alpha$ -Terpinolen ist auch  $\alpha$ -Terpineol ein wichtiger Aromastoff in Trauben und Wein (Arrhenius, 1996; Sefton, 1994; Slaghenaufi, 2019; Yang, 2017). Seine Konzentration in den Trauben ist abhängig von der direkten Sonneneinstrahlung auf die Trauben, sie nimmt bei Sonnenbrand ab (Gambetta, 2022).  $\alpha$ -Terpineol hat fungizide Wirkung auf *Colletotrichum gloeosporioides* und *Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis* (Jiang, 2020) und *Botryosphaeria dothidea* (Zhang, 2018). Neben dem Bericht über eine erhöhte Konzentration nach einer *P. viticola* Infektion (Ricciardi, 2021), sind mir keine Zusammenhänge zu einer Wirkung von  $\alpha$ -Terpineol auf *P. viticola* bekannt.

Ein erhöhte Konzentration von Ocimen nach einer Infektion veranlasste Ricciardi et al. zu einer Überprüfung der Bioaktivität gegen *P. viticola*. Sie verwendeten einen Isomerenmix aus Ocimen, welcher zu einer signifikanten Reduktion der *P. viticola* Keimung führte (Ricciardi, 2021). Ocimen ist daher das einzige Monoterpen dieser Arbeit, für welches bereits eine direkte Wirkung gegen den Erreger des Falschen Mehltaus beschrieben wurde.

#### TERPENOIDE OHNE PUBLIZIERTEN ZUSAMMENHANG ZUR RESISTENZANTWORT VON *VITIS SPP.* AUF *P. VITICOLA*

Es könnten in dieser Arbeit neun Monoterpenoide und ein Sesquiterpen als RM ermittelt werden, für die zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zu einer Resistenzantwort auf *P. viticola* gebracht wurden. Einige in diesem Abschnitt beschriebene Substanzen wurden jedoch bereits in Ätherischen Ölen detektiert, welche in ihrer Gesamtheit gegen eine *P. viticola* Infektion wirksam waren. Dabei wurde keine Aussage zur Wirksamkeit der Einzelkomponenten oder zumindest nicht zu den hier behandelten Substanzen vorgenommen.

Zu den zehn Terpenoiden, die zum ersten Mal mit einer Resistenzantwort zu *P. viticola* in Verbindung gebracht werden, zählen die zwei positiven RM Hotrienol und p-Cymenen, die drei ausschließlich induzierten RM p-Cymol, (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol sowie d-Limonen und fünf ausschließlich konstitutive RM Alloocimen, Geraniumoxid,  $\beta$ -Myrcen, (Z)-Rosenoxid und das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren.

*Zehn Terpene wurden in dieser Arbeit zum allerersten Mal als Marker für eine *P. viticola* Resistenzantwort beschrieben.*

Hotrienol ist ein wichtiger Aromastoff in Trauben und Weinen (Gerós, 2012). Mir sind keine Berichte über einen Zusammenhang zu Abwehrreaktionen in irgendeinem Bereich bekannt. Der positive Resistenzmarker p-Cymenen ist Komponente verschiedener Ätherischer Öle mit fungizider oder antibakterieller Wirkung (Arcila-Lozano, 2004; Nie, 2020; Safar, 2020; Solís-Quispe, 2019), u.a. auch Oregano-

---

*Für p-Cymenen, p-Cymol,  $\beta$ -Citronellol, d-Limonen, Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen wurde eine Wirkung auf verschieden Mikroorganismen nachgewiesen.*

---

Öl, welches die Entwicklung von *P. viticola* verhindert (Rienth, 2019). P-Cymenen agiert als Radikalfänger in Sternanis-Öl (Nie, 2020).

p-Cymol ist die reduzierte Form von p-Cymenen, es ist einer der drei aus-

schließlich induzierten monoterpenoiden Resistenzmarker. Der deutsche Name p-Cymol ist bzgl. seiner chemisch funktionellen Gruppen etwas irreführend, da es sich nicht um ein Alkohol, sondern ein Alkylbenzol (1-Methyl-4-isopropylbenzol) handelt (Abb. 44). Der englische Name „*p-cymene*“ verdeutlicht nicht nur die Zuordnung der korrekten funktionellen Gruppen eindeutig, sondern zeigt auch den Zusammenhang zu p-Cymenen klarer. Durch Reduktion des Isopropyl-Restes zu einem Isopropenyl-

---

*Limonen hat eine Wirkung auf den Oomyceten *Peronospora destructor*. Es wird bereits an einer Formulierung zur kontrollierbaren Anwendung im Pflanzenschutz geforscht.*

---

Rest entsteht aus p-Cymol (englischer Trivialname: *p-cymene*) dann p-Cymenen (englischer Trivialname: *p-cymenene*). P-Cymol ist ebenfalls in verschiedenen Pflanzenölen detektiert worden, u.a. auch in Oregano-Öl sowie in Thymian-Öl. Beide zeigen eine Wirkung gegen *P. viticola* (Rienth, 2019). Für p-Cymol konnte eine inhibierende Wirkung auf die Keimschlauchausbildung von *Candida albicans* nachgewiesen werden (Pina Vaz, 2004).

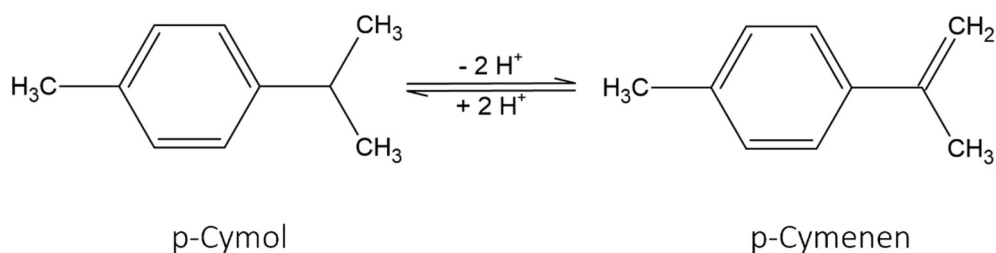


Abb. 44: Redox-Reaktion zwischen p-Cymol zu p-Cymenen

Der induzierte RM  $\beta$ -Citronellol hat ein angenehmes Aroma, das an den Duft blühender Rosen erinnert. Daher wird es auch in der kosmetischen Industrie vielfach eingesetzt (Pino-Otín,

2021).  $\beta$ -Citronellol hat eine häufig beschriebene fungizide Wirkung. Neben der bereits erwähnten Wirkung auf von *Colletotrichum spp.* (Scariot, 2020) und die Weinpathogene *Sphaceloma ampelinum* und *Pseudocercopora vitis* (Rozwalka, 2020), auch gegen *Fusarium avenaceum* oder *F. graminearum* (Giamperi, 2020; Pino-Otín, 2021; Shin, 2004; Zore, 2011).  $\beta$ -Citronellol wird außerdem herbizide, insektizide und repellerende Wirkung zugeschrieben (Pino-Otín, 2021).

Der induzierte RM d-Limonen wird wegen seines angenehmen limonigen Geruchs in vielen Kosmetikprodukten, Reinigungsmitteln oder Lebensmitteln verwendet. Zudem wird Limonen antimikrobielle, antikanzerogene und antidiabetische Eigenschaften zugeschrieben, so dass es auch Anwendung in der pharmazeutischen Industrie findet (Feng, 2020). In *Arabidopsis thaliana* induziert d-Limonen Resistenzgene, die bei der Abwehr von *Colletotrichum higginsianum* eine Rolle spielen (Fujioka, 2015). In direkter Anwendung im Gewächshaus und in Freilandversuchen reduziert Limonen die Krankheitsmerkmale von Falschem Zwiebelmehltau, der durch den Oomyceten *Peronospora destructor* hervorgerufen wird (Abd-Elbaky, 2021). Daher ist Limonen neben (*E*)- $\beta$ -Ionon und Ocimen eine der wenigen RM Marker dieser Arbeit, für den nicht nur allgemein fungizide Wirkung, sondern auch Wirkung gegen Oomyceten beschrieben wurde. Da Limonen eine flüchtige Substanz ist, wird an der Formulierung von d-Limonen geforscht, um es im Pflanzenschutz kontrollierbar einsetzen zu können. Beispielsweise konnte durch eine d-Limonen beladene Nanoemulsion das Wachstum verschiedener pilzlicher Pathogene wie *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* oder *Phomopsis amygdale* inhibiert werden (Feng, 2020).

Alloocimen ist ein konstitutiver negativer RM. Es induziert in *Arabidopsis thaliana* die Genexpression von mehreren Abwehrgenen (Kishimoto, 2005) und trägt u.a. zu einer erhöhten Resistenz gegen *Botrytis cinerea* in *A. thaliana* bei (Algarra Alarcon, 2015).

Der negative konstitutive RM  $\beta$ -Myrcen ist ein Isomer zu Ocimen und Alloocimen. Es entsteht aus der Hydrolyse von Linalool und ist ein wichtiger Aromastoff, mit einer breiten Aromabeschreibung von fruchtig, zitronig bis herb und krautig (the good scents company: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1016531.html> Stand: 24.01.2022).  $\beta$ -Myrcen hat verschiedene bioaktive Eigenschaften, u.a. fungizide Wirkung. Wobei hier widersprüchliche Publikationsergebnisse vorliegen. Es wurde zum einen leichte Aktivität von  $\beta$ -Myrcen gegen *Candida spp.* *Penicillium digitatum* und *P. expansum* (Caccioni, 1994; Candelaria-Dueñas, 2021) beschrieben, wohingegen Hammer et al. (2003) keine Aktivität von  $\beta$ -Myrcen auf verschiedene *Candida spp.*<sup>31</sup>, *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* detektieren konnten.

---

<sup>31</sup> *C. albicans* wurde in beiden Fällen untersucht.

Im Sternanis-Öl wirkt  $\beta$ -Myrcen als Radikalfänger und hat somit anti-oxidierende Wirkung (Nie, 2020).

(Z)-Rosenoxid ist ein blumig, fruchtiger Aromastoff in Trauben, Rosinen und Wein (Furdíková, 2017; Javed, 2018; Vasile Simone, 2018). Es soll entzündungshemmende Eigenschaften haben (Nonato, 2012), jedoch ist mir keine Publikation über Eigenschaften im Rahmen einer pflanzlichen Resistenzantwort bekannt.

---

*$\alpha$ -Calacoren wurde statistisch als Hauptwirkkomponente von Pfefferbaum-Öl mit Wirkung gegen *Fusarium graminearum* ermittelt.*

---

Geraniumoxid wurde bereits in Weinreben detektiert (Caffrey, 2021; Csóka, 2013). Es ist ein negativer konstitutiver RM, der in den getesteten Blättern nur zu einem einzigen Zeitpunkt als RM ermittelt wurde. Meines Wissens wurde Gerani-

umoxid bisher noch nie mit Abwehrreaktionen in Verbindung gebracht.

Das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren kommt in vielen Ätherischen Ölen vor, die inhibierende Wirkung auf verschiedene Organismen wie Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*) (Kouame, 2017), Viren (u.a. auf SARS-CoV-2) (Amparo, 2021) und Pilze (*Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*) (Cerritos-Garcia, 2021; Owolabi, 2020; Sampietro, 2014) haben. Sampietro et al. (2014) ermittelten über eine PCA, dass  $\alpha$ -Calacoren einer der hauptsächlich wirksamen Komponenten von ätherischem Öl aus *Schinus spp.* gegen *F. graminearum* ist. Soweit mir bekannt ist, wurde jedoch noch keine fungizide Wirkung überprüft.

Die konstitutiven negativen terpenoiden RM lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen.

Für p-Cymen, p-Cymol,  $\beta$ -Citronellol, d-Limonen, Alloocimen und  $\beta$ -Myrcen wurden Wirkungen auf verschiedenen Mikroorganismen nachgewiesen, für d-Limonen sogar gegen einen Oomyceten. Das Sesquiterpen

---

*Hotrienol, (Z)-Rosenoxid und Geraniumoxid werden hier zum allerersten Mal in Verbindung mit einer pflanzlichen Abwehrreaktion in Verbindung gebracht.*

---

$\alpha$ -Calacoren wurde statistisch als Hauptwirkkomponente von Pfefferbaum-Öl mit Wirkung gegen *Fusarium graminearum* ermittelt (Sampietro, 2014); die drei Monoterpenoide Hotrienol, (Z)-Rosenoxid und Geraniumoxid wurden hier erstmalig mit einer pflanzlichen Abwehrreaktion in Verbindung gebracht.

Abschließend lässt sich die Recherche zur Bioaktivität wie folgt zusammenfassen. Von den 55 ermittelten potenziellen RM konnten 39 stofflich identifiziert werden. Zu den meisten dieser Metabolite lässt sich eine Beschreibung ihrer Bioaktivität finden. Dies liegt zum einen daran,

dass es sich bei den besprochenen Metaboliten um häufig vorkommende Naturstoffe handelt, die daher schon häufig untersucht wurden. Zum anderen besitzen Monoterpenoide, Norisoprenoide und Benzoat-Derivate viele chemisch reaktive Gruppen wie Alkohol- oder Ketogruppen, Doppelbindungen oder Benzylringe, die  $\pi$ - $\pi$ -Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder auch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eingehen können. Daher ist es nicht verwunderlich, dass diese Metabolite in vielen Tests auf die eine oder andere Weise als bioaktiv eingestuft werden. Diese unspezifische Wirkweise bedeutet, dass Pflanzen mithilfe dieser Substanzen ihre Resistenzantwort auf eine Vielzahl von Pathogenen regeln. Gerade unspezifische Wirkung wie z.B. die Destabilisierung des Ergosterolgerüsts der pilzlichen Membran gewährleistet für die Pflanze einen schnellen Schutz. Ob ein bioaktiver Resistenzmarker auch eine Neuzulassung als Pflanzenschutzmittel bekommen könnte, ist jedoch mit der Frage eines gut beschriebenen Wirkmechanismus verbunden. Dieser sollte möglichst spezifisch für die Zielorganismen sein, also z.B. ein bestimmtes Pilzenzym inhibieren. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass der Wirkstoff nur das Zielpathogen schädigt und nicht andere Organismen in der Umwelt der behandelten Pflanzen. Die Problematik von vielversprechenden unspezifisch wirkenden Einzelkomponenten auf zulassungswürdige Wirkstoffe zu kommen, wird seit einigen Jahren in der (medizinischen) Fachliteratur diskutiert. Es gibt unzählige Beispiele von angeblichen „Wunderstoffen“, die sowohl kanzerogene, entzündungshemmende, antibakterielle und fungizide bzw. antimykotische Wirkung haben sollen. Beispiele hierfür sind das derzeit diskutierte Curcumin, aber auch Resveratrol (Baell, 2014). Bei diesen Substanzen kommt es im Wesentlichen zu einer unspezifischen Wirkung durch Ausbildung von reaktiven Sauerstoffmoleküle (ROS *reactive oxygen species*) oder eben einer Membrandestabilisierung. Bekannte Substanzen und Molekülstrukturen wurden zunächst im Bereich der Medizinalforschung, kurze Zeit später aber bereits im Bereich des fungiziden Pflanzenschutzes angewandt. Sie werden als PAINS (*pan assay interference compounds*) oder als *promiscuous groups* (Baell, 2014; Pouliot, 2016) bezeichnet. Bevor also einer dieser 39 potenziellen Resistenzmarker zur fungiziden Anwendung vorgeschlagen wird, müssen die Strukturformeln genauestens betrachtet und Pathogen-spezifische Tests durchgeführt werden. Alle Substanzen, die eine unspezifische Wirkweise, wie beispielsweise eine Membrandestabilisierung hervorrufen oder deren inhibierende Wirkung auf der Bildung von ROS beruht, haben kaum eine Chance, eine Zulassung als Fungizid zu erhalten. Dennoch tragen sie als Resistenzmarker zum Verständnis der pflanzlichen Abwehrstrategien bei und sind somit wichtige Bausteine auf dem Weg zu einem umfassenden Bild der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen, Weinpflanze und *P. viticola*.

## 5 Fazit

Der Vergleich der Metabolitprofile der drei analysierten Entwicklungsstadien zeigte, dass das Entwicklungsstadium einen starken Einfluss auf das Metabolitprofil hatte. Der Einfluss des Entwicklungsstadiums überstieg den Einfluss der verschiedenen Genotypen. Dies war im ersten Versuchsjahr besonders deutlich, wo die PCA klar getrennte Cluster für jedes Entwicklungsstadium zeigte (Abb. 16). Im zweiten Versuchsjahr fiel der Einfluss des Entwicklungsstadiums geringer aus. Er war aber immer noch deutlich größer als der Einfluss der Genotypen. Im Gegensatz dazu überstieg der Einfluss der Genotypen den Einfluss der Blattposition bzw. des ontogenetischen Effekts. Es wurden dennoch 32 Metabolite ermittelt, die als Blattpositionsmarker (BPM) eingestuft wurden. Insgesamt waren 14 Metabolite sowohl BPM als auch konstitutive RM. Jedoch waren nur die beiden BPM 2-Ethylfuran und MeSA im Entwicklungsstadium BBCH8 2011 auch konstitutive RM. Beide Metabolite lagen in allen Genotypen in den apikalen Blättern in höherer Konzentration vor als in den basalen. Dennoch überstieg der Einfluss der Genotypen den ontogenetischen Effekt, da die Konzentration sowohl von MeSA als auch 2-Ethylfuran in den Mischproben der resistenten Genotypen höher lag als in den Mischproben der anfälligen Genotypen. Hier konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Genotypen ausschlaggebender als die Blattposition ist. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, für eine potentielle Blattextraktherstellung für den Pflanzenschutz auf Basis flüchtiger Metabolite.

Der Einfluss der Genotypen wurde als Einfluss der Resistenzstärke definiert. Diese wurde über den Blattscheibentest (3.1) mit definierter, künstlicher Inokulation ermittelt. Durch die Analysen von symptomfreien Freilandreben konnten 41 konstitutive RM ermittelt werden. Die identifizierten Metabolite stammten aus den Stoffklassen der GLV, Norisoprenoide, Benzoat-Derivate, Monoterpenoide und jeweils ein Furan und ein Sesquiterpen. Hierbei zeigte sich, dass GLV, Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und 2-Ethylfuran (fast) ausschließlich in den resistenten Genotypen in höherer Konzentration vorlagen als in den anfälligen („positive“ RM). Monoterpenoide und das Sesquiterpen  $\alpha$ -Calacoren lagen hauptsächlich in anfälligen Genotypen in höherer Konzentration vor als in resistenten Genotypen („negative“ RM). Weiterhin konnte durch die zweijährigen Vergleiche von drei Entwicklungsstadien gezeigt werden, dass Monoterpenoide verstärkt im Entwicklungsstadium BBCH6 als negative RM ermittelt wurden. Wohingegen das Sesquiterpen niemals in BBCH6, sondern erst in den späteren Entwicklungsstadien als negativer RM ermittelt wurde. GLVs traten ebenfalls erst in späteren Entwicklungsstadien als positive RM in Erscheinung, hauptsächlich im Entwicklungsstadium BBCH9. Die konstitutiven RM der Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und Furan zeigten keine Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums. Für alle RM mit wechselnder Korrelation galt, dass sie zu Beginn der Vegetationsphase in BBCH6 zu den „negativen“ und in BBCH9 zu den „positiven“ RM zählten.



RM mit wechselnder Korrelation waren die beiden Monoterpenoide Geranylaceton und  $\alpha$ -Terpineol, sowie das GLV (Z)-3-Hexenal. Der Zusammenhang zwischen Auftreten der konstitutiven Resistenzmarker und Entwicklungsstadium wird in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Es ist zudem eine neue Erkenntnis dieser Arbeit, dass Monoterpenoide als „negative“ RM in Reben hauptsächlich in BBCH6 auftreten und GLV sowie Sesquiterpene hauptsächlich in BBCH9 als „positive“ RM ermittelt wurden wohingegen Norisoprenoide, Benzoat-Derivate und Furan zu allen getesteten Entwicklungsstadien „positive“ RM darstellen.

Die Bezeichnungen „negative“ und „positive“ konstitutive RM beziehen sich in dieser Arbeit darauf, ob die Marker in anfälligen oder in resistenten Genotypen in höherer Konzentration vorlagen. Die anfälligen Genotypen Müller-Thurgau, Riesling, Phoenix und Regent sind alle Kultivare von *V. vinifera*. Delaware ist eine Hybridrebe mit väterlicher Abstammung von *V. vinifera*. Monoterpenoide und das Sesquiterpen treten also artspezifisch häufiger in der Kulturform *V. vinifera* als konstitutive RM auf als in den anderen Wildart *Vitis spp.*. Auch für die „positiven“ RM konnten artspezifische Zusammenhänge beobachtet werden, wenn diese auch weniger deutlich waren als bei den Terpenoiden. Das Furan 2-Ethylfuran trat niemals in *V. vinifera* als RM in Erscheinung. Benzoat-Derivate und GLVs wurden häufiger in *V. labrusca* stämmigen Genotypen als RM detektiert, wohingegen Norisoprenoide häufiger, aber nicht ausschließlich in *V. riparia* als RM in Erscheinung traten. Nach bestem Wissen und Gewissen ist der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Norisoprenoiden als RM und der Artspezifität zu *V. riparia* eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Dennoch soll hier kurz erwähnt werden, dass diese Artspezifität sich ausschließlich auf die Eingruppierung als konstitutive Resistenzmarker bezieht. Monoterpene sind auch Bestandteil des Metabolitprofils von *V. labrusca* und treten dort sogar als induzierte Resistenzmarker auf (Algarra Alarcon, 2015). Norisoprenoide sind wichtige Geschmacksträger in Qualitätsweinen und werden daher natürlich auch in *V. vinifera* Reben gebildet; sie sind aber keine Marker für Resistenzeigenschaften in *V. vinifera*.

Durch die künstliche Infektion von einjährigen Gewächshausreben mit *P. viticola* konnten 24 induzierte RM ermittelt werden. Dabei stellte sich entgegen der ursprünglichen Erwartung heraus, dass die meisten induzierten RM (19 von 24) in der pilzwiderstandsfähigen Züchtung Regent auftraten und nur sechs RM in der resistenten *V. labrusca*-stämmigen Hybride Blaue Isabella und in *V. riparia*. An beiden Genotypen waren zum Zeitpunkt der Beprobung 8 dpi keine Infektionssymptome sichtbar. Wie bereits diskutiert, konnten die beiden resistenten Genotypen die Infektion wahrscheinlich so frühzeitig verhindern, dass keine zusätzlichen flüchtigen Resistenzmarker synthetisiert werden mussten.

Zum Abschluss dieser Arbeit wurden für alle Resistenzmarker (konstitutiv oder induziert) in der Literatur nach Hinweisen zur Bioaktivität recherchiert. Für die vier Benzoat-Derivate MeSA, Benzaldehyd, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol wurde bereits ein Bezug zu Resistenzant-

worten bei *P. viticola* Infektion publiziert. Auch für 2-Ethylfuran, vier der sechs GLVs (1-Octanol, Nonanal, (Z)-3-Hexenol sowie (Z)-3-Hexenal), zwei Norisoprenoide ( $\beta$ -Cyclocitral und (E)- $\beta$ -Ionon) sowie acht der 17 Monoterpenoide (Linalool, Geraniol, Nerol, Geranylaceton,  $\alpha$ -Terpinolen,  $\alpha$ -Terpineol und die beiden Ocimen-Isomere) besteht ein Zusammenhang zu Resistenzantworten bzgl. einer *P. viticola* Infektion. Für 2-Ethylfuran, ein Isomeren-Mix aus (Z)- und (E)-Ocimen sowie  $\beta$ -Cyclocitral wurde bereits eine inhibierende Wirkung auf *P. viticola* publiziert.

20 Verbindungen wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal mit einer Resistenzantwort auf eine *P. viticola* Infektion in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich um die sieben Norisoprenoide (Theaspiran, (E)- $\beta$ -Damascon, (E)- $\beta$ -Damascenon, Dihydroedulan I, Megastigmatrienon, Sulcaton und Carvomenthinal A), die zwei GLVs Nonanol und (Z)-3-Hexenylacetat, sowie die zehn Terpenoide p-Cymen, p-Cymol, d-Limonen, Alloocimen,  $\beta$ -Myrcen,  $\beta$ -Citronellol, Hotrienol, (Z)-Rosenoxid, Geraniumoxid und  $\alpha$ -Calacoren.

### Ausblick

Eine Weiterführung der hier vorgestellten Forschungsergebnisse könnte sich mit der Überprüfung der Bioaktivität der ermittelten Resistenzmarker beschäftigen. Bisher wurden 39 der 55 Resistenzmarker identifiziert und nur für vier Marker eine inhibierende Wirkung auf *P. viticola* publiziert. Die Bioaktivität der Resistenzmarker sollte in Blattscheibentest und nachfolgend auch an intakten Reben im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Hierbei kann überprüft werden, ob die Metabolite eine direkte inhibierende Wirkung auf das Pathogen haben, oder ob sie als Elizitoren für die Resistenzantwortkaskade in Frage kommen. Für die Überprüfung einer direkten inhibierenden Wirkung können Blattscheiben von anfälligen Reben wie z.B. Riesling oder Müller-Thurgau mit einer wässrigen Lösung mit geeigneter Konzentration der Marker benetzt und mit einer definierten Konzentration an aktiven *P. viticola* Sporen inokuliert werden. Für die Überprüfung einer elizierenden Wirkung sollten die Blattscheiben zunächst nur mit den Markerlösungen versetzt und eine gewisse Zeit inkubiert werden, bevor die Sporensuspension von *P. viticola* auf die Blattscheiben pipettiert werden. Nach erfolgreichem Blattscheibentest muss eine weitere Verifizierung der Bioaktivität an Gewächshauspflanzen erfolgen.

Ein weiterer Aspekt zukünftiger Forschung ist die Identifizierung der bisher unbekanntenen 16 Resistenzmarker. Für die Identifizierung könnten z.B. Analysen mit einem hochauflösenden Massenspektrometer vorgenommen werden, um die exakten Massen der unbekanntenen Resistenzmarker zu bestimmen und so möglicherweise die Strukturformel zu ermitteln. Sollte dies nicht zum Ziel führen, müssten die infrage kommenden Substanzen präparativ isoliert werden

und die Strukturaufklärung mit NMR vorangetrieben werden. Wobei aus der präparativ gewonnenen Fraktion vor der NMR Strukturaufklärung auch eine Überprüfung der Bioaktivität die kostengünstigere Version wäre.

Wenn sich unter den ermittelten Resistenzmarkern weitere Metabolite mit direkt inhibierender Wirkung befinden, wäre ein anschließender Schritt die Kooperation mit einem Wirtschaftsunternehmen, um geeignete Formulierungen für die protektiv wirkenden Naturstoffe zu finden, um den Einsatz der Naturstoffe im Pflanzenschutz zu erheben.

Eine andere Möglichkeit zur Anwendung der Resistenzmarker könnte in der Züchtungsforschung liegen. Derzeit werden junge neue Züchtungen mit molekulargenetischen Methoden überprüft, ob sich bestimmte Resistenzgene oder genomische Bereiche (Resistenzloci) in den Abkömmlingen befinden. Die Anwesenheit eines Resistenzgens/-locus bedeutet aber nicht automatisch, dass der zugehörige Resistenzmechanismus auch immer aktiv, bzw. die Resistenzantwort ausreichend stark ausgeprägt ist. Die Überprüfung auf vorhandene Resistenzmarker in den Züchtungen könnte in Diagnoseverfahren für die Resistenzzüchtung von pilzwiderstandsfähigen Reben einfließen. Durch Optimierung von Diagnoseverfahren in der Resistenzzüchtung kann der langwierige Züchtungsprozess verkürzt werden. Die Züchtung von pilzwiderstandsfähigen und marktfähigen Weinreben trägt zur Kupferminimierung im Ök Weinbau bei, indem deutlich weniger kupferhaltige Pflanzenschutzmittel (bis 80% Einsparung) in mit PIWIs bestockten Weinbergen ausgebracht werden müssen als bei klassischen, anfälligen, aber leichter vermarktbareren Rebsorten.

## 6 Literaturverzeichnis

- (OIV), O. I. d. I. V. e. d. V. (2009). OIV descriptor code No OIV 452-1. In: Paris, France.
- Abd-Elbaky, A. A., Abo-Zaid, G. A., El-Fatah Mostafa Ahmed, H., Matar, S. M., & Abdel-Gayed, M. A. (2021). Reducing the incidence of onion downy mildew disease using bio-formulation of *Pseudomonas fluorescens*, limonene and acetyl salicylic acid [Article]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(1-2), 103-120. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85100265566&partnerID=40&md5=63b581210bd1006719b5f09ea5f12caf>
- Akaberi, S., Wang, H., Claudel, P., Riemann, M., Hause, B., Hugueney, P., & Nick, P. (2018). Grapevine fatty acid hydroperoxide lyase generates actin-disrupting volatiles and promotes defence-related cell death. *Journal of Experimental Botany*, 69(12), 2883-2896. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery133>
- Algarra Alarcon, A., Lazazzara, V., Cappellin, L., Bianchedi, P. L., Schuhmacher, R., Wohlfahrt, G., Pertot, I., Biasioli, F., & Perazzolli, M. (2015). Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(8), 1013-1022. <https://doi.org/10.1002/jms.3615>
- Allègre, M., Daire, X., Héloir, M.-C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M., & Pugin, A. (2007). Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytologist*, 173(4), 832-840. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01959.x>
- Amparo, T. R., Seibert, J. B., Silveira, B. M., Costa, F. S. F., Almeida, T. C., Braga, S. F. P., da Silva, G. N., dos Santos, O. D. H., & de Souza, G. H. B. (2021). Brazilian essential oils as source for the discovery of new anti-COVID-19 drug: a review guided by in silico study [Review]. *Phytochemistry Reviews*, 20(5), 1013-1032. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09754-4>
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González De Mejía, E. (2004). Oregano: Properties, composition and biological activity [Article]. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54(1), 100-111. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-4344696250&partnerID=40&md5=167201b8a4153b68331a821696d84668>
- Aromdee, C., Anorach, R., & Sriubolmas, N. (2005). ESSENTIAL OIL OF THE FLOWER OF *AZADIRACHTA INDICA* (MELIACEAE).
- Arrhenius, S. P., McCloskey, L. P., & Sylvan, M. (1996). Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* Var. Chardonnay regional wines [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1085-1090. <https://doi.org/10.1021/jf9505943>
- Baell, J., & Walters, M. A. (2014). Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*, 513(7519), 481-483. <https://doi.org/10.1038/513481a>
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., & Di Gaspero, G. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(1), 163-176. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1167-2>
- Billet, K., Malinowska, M. A., Munsch, T., Unlubayir, M., Adler, S., Delanoue, G., & Lanoue, A. (2020). Semi-targeted metabolomics to validate biomarkers of grape downy mildew infection under field conditions. *Plants*, 9, 1008. <https://doi.org/10.3390/plants9081008>
- Binder, R. G., & Flath, R. A. (1989). Volatile components of pineapple guava. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 734-736. <https://doi.org/10.1021/jf00087a034>

- Binder, R. G., Turner, C. E., & Flath, R. A. (1990). Volatile components of purple starthistle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1053-1055. <https://doi.org/10.1021/jf00094a030>
- Brown, M. V., Moore, J. N., Fenn, P., & McNew, R. W. (1999). Comparison of Leaf Disk, Greenhouse, and Field Screening Procedures for Evaluation of Grape Seedlings for Downy Mildew Resistance. *HortScience*, 34(2), 331-333. <http://hortsci.ashspublications.org/content/34/2/331.abstract>
- Bruce, T. J., & Cork, A. (2001). Electrophysiological and Behavioral Responses of Female *Helicoverpa armigera* to Compounds Identified in Flowers of African Marigold, *Tagetes erecta*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(6), 1119-1131. <https://doi.org/10.1023/A:1010359811418>
- Buttery, R. G., Light, D. M., Nam, Y., Merrill, G. B., & Roitman, J. N. (2000). Volatile components of green walnut husks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2858-2861. <https://doi.org/10.1021/jf000288b>
- Caccioni, D. R. L., & Guizzardi, M. (1994). Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components [Article]. *Journal of Essential Oil Research*, 6(2), 173-179. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698349>
- Caffrey, A. J., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2021). Characterization of Free and Bound Monoterpene Alcohols during Riesling Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(45), 13286-13298. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01216>
- Candelaria-Dueñas, S., Serrano-Parrales, R., Ávila-Romero, M., Meraz-Martínez, S., Orozco-Martínez, J., Ávila-Acevedo, J. G., García-Bores, A. M., Cespedes-Acuña, C. L., Peñalosa-Castro, I., & Hernandez-Delgado, T. (2021). Evaluation of the antimicrobial activity of some components of the essential oils of plants used in the traditional medicine of the tehuacán-cuicatlán valley, puebla, México [Article]. *Antibiotics*, 10(3), 1-15, Article 295. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030295>
- Carrascal, L. M., Galván, I., & Gordo, O. (2009). Partial least squares regression as an alternative to current regression methods used in ecology. *Oikos*, 118(5), 681-690. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.16881.x>
- Cerritos-Garcia, D. G., Avery, P. B., Martini, X., Candian, V., Cano, L. M., & Cave, R. D. (2021). In vitro effects of leaf extracts from brassica rapa on the growth of two entomopathogenic fungi [Article]. *Journal of Fungi*, 7(9), Article 779. <https://doi.org/10.3390/jof7090779>
- Chalal, M., Winkler, J. B., Gourrat, K., Trouvelot, S., Adrian, M., Schnitzler, J.-P., Jamois, F., & Daire, X. (2015). Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00350>
- Chitarrini, G., Riccadonna, S., Zulini, L., Vecchione, A., Stefanini, M., Larger, S., Pindo, M., Cestaro, A., Franceschi, P., Magris, G., Foria, S., Morgante, M., Di Gaspero, G., & Vrhovsek, U. (2020). Two-omics data revealed commonalities and differences between Rpv12- and Rpv3-mediated resistance in grapevine. *Scientific Reports*, 10(1), 12193. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69051-6>
- Chitarrini, G., Soini, E., Riccadonna, S., Franceschi, P., Zulini, L., Masuero, D., Vecchione, A., Stefanini, M., Di Gaspero, G., Mattivi, F., & Vrhovsek, U. (2017). Identification of Biomarkers for Defense Response to *Plasmopara viticola* in a Resistant Grape Variety. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01524>

- Choi, H.-S. (2005). Characteristic Odor Components of Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) Peel Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1642-1647. <https://doi.org/10.1021/jf040324x>
- Choi, H. S. (2003). Character impact odorants of Citrus Hallabong [(C-unshiu marcov x C-sinensis Osbeck) X C-reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2687-2692.
- Chung, T. Y., Eiserich, J. P., & Shibamoto, T. (1994). Volatile compounds produced from peanut oil heated with different amounts of cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1743-1746. <https://doi.org/10.1021/jf00044a032>
- Ciubotaru, R. M., Franceschi, P., Zulini, L., Stefanini, M., Škrab, D., Rossarolla, M. D., Robatscher, P., Oberhuber, M., Vrhovsek, U., & Chitarrini, G. (2021). Mono-Locus and Pyramided Resistant Grapevine Cultivars Reveal Early Putative Biomarkers Upon Artificial Inoculation With *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 693887-693887. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.693887>
- Cruz, A. F., Hamel, C., Yang, C., Matsubara, T., Gan, Y., Singh, A. K., Kuwada, K., & Ishii, T. (2012). Phytochemicals to suppress Fusarium head blight in wheat–chickpea rotation. *Phytochemistry*, 78, 72-80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.03.003>
- Csóka, M., Amtmann, M., Sárdy, D. N., Kállay, M., & Korány, K. (2013). GC-MS Description of the primary aroma structure of two Kadarka wines considered indigenous in Hungary. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86, 104-112. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.015>
- Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Gas Chromatography–Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1653-1660. <https://doi.org/10.1021/jf0350820>
- Di Gaspero, G., Copetti, D., Coleman, C., Castellarin, S. D., Eibach, R., Kozma, P., Lacombe, T., Gambetta, G., Zvyagin, A., Cindrić, P., Kovács, L., Morgante, M., & Testolin, R. (2012). Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(2), 277-286. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1703-8>
- Diallo, S., Shahbaaz, M., Torto, B., Christoffels, A., Masiga, D., & Getahun, M. N. (2020). Cellular and Molecular Targets of Waterbuck Repellent Blend Odors in Antennae of *Glossina fuscipes fuscipes* Newstead, 1910 [Article]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, Article 137. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00137>
- Duque, C., Bonilla, A., Bautista, E., & Zea, S. (2001). Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(5), 459-467. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00081-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00081-8)
- Edwards, D., & Berry, J. J. (1987). The Efficiency of Simulation-Based Multiple Comparisons. *Biometrics*, 43(4), 913-928. <https://doi.org/10.2307/2531545>
- Everaerts, C., Roisin, Y., Le Quéré, J. L., Bonnard, O., & Pasteels, J. M. (1993). Sesquiterpenes in the frontal gland secretions of nasute soldier termites from New Guinea. *Journal of Chemical Ecology*, 19(12), 2865-2879. <https://doi.org/10.1007/BF00980588>
- Fass, M. I., Rivarola, M., Ehrenbolger, G. F., Maringolo, C. A., Montecchia, J. F., Quiroz, F., García-García, F., Dopazo Blázquez, J., Hopp, H. E., Heinz, R. A., Paniago, N. B., & Lia, V. V. (2020). Exploring sunflower responses to *Sclerotinia* head rot at early stages of infection using RNA-seq analysis. *Scientific Reports*, 10, 13347. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70315-4>

- Feng, J., Wang, R., Chen, Z., Zhang, S., Yuan, S., Cao, H., Jafari, S. M., & Yang, W. (2020). Formulation optimization of D-limonene-loaded nanoemulsions as a natural and efficient biopesticide [Article]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 596, Article 124746. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124746>
- Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., & Cacho, J. (2001). Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4818-4824. <https://doi.org/10.1021/jf010283u>
- Fischer, R., Schäfers, C., & Rüdell, H. (2012). *Bericht zu FKZ 360 04 036 - Vorbereitung eines Monitoring-Konzepts für Biozide in der Umwelt*. Retrieved from [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/384/dokumente/dokument\\_uba-gutachten\\_-\\_monitoring\\_biozide.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/384/dokumente/dokument_uba-gutachten_-_monitoring_biozide.pdf)
- Fröbel, S., & Zyprian, E. (2019). Colonization of Different Grapevine Tissues by *Plasmopara viticola*—A Histological Study [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 10(951). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00951>
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Dervinis, C., Davis, J. M., Carlson, J. E., & De Moraes, C. M. (2008). Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate [Article]. *New Phytologist*, 180(3), 722-734. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02599.x>
- Fujioka, K., Gotoh, H., Noumi, T., Yoshida, A., Noutoshi, Y., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., & Toyoda, K. (2015). Protection induced by volatile limonene against anthracnose disease in *Arabidopsis thaliana* [Article]. *Journal of General Plant Pathology*, 81(6), 415-419. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0621-z>
- Furdíková, K., Bajnociová, L., Malík, F., & Špánik, I. (2017). Investigation of volatile profile of varietal gewürztraminer wines using two-dimensional gas chromatography [Article]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56(1), 73-85. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85014781946&partnerID=40&md5=40be39c6a6407c3cf33fe11ac6cd569a>
- Gambetta, J. M., Romat, V., Schmidtke, L. M., & Holzapfel, B. P. (2022). Secondary metabolites coordinately protect grapes from excessive light and sunburn damage during development [Article]. *Biomolecules*, 12(1), Article 42. <https://doi.org/10.3390/biom12010042>
- Gerós, H., Chaves, M., & Delrot, S. (2012). *The biochemistry of the grape berry* (H. Gerós, M. Chaves, & S. Delrot, Eds.). Bentham Books. <https://doi.org/10.2174/97816080536051120101>
- Gessler, C., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 3-44. <Go to ISI>://WOS:000292472000001
- Giamperi, L., Ada Bucchini, A. E., Ricci, D., Tirillini, B., Nicoletti, M., Rakotosaona, R., & Maggi, F. (2020). *Vepris macrophylla* (Baker) I. Verd essential oil: An antifungal agent against phytopathogenic fungi [Article]. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), Article 2776. <https://doi.org/10.3390/ijms21082776>
- Gindro, K., Pezet, R., & Viret, O. (2003). Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(9), 846-853. [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(03\)00124-4](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(03)00124-4)
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O., & Gindro, K. (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(9), 827-837.

- Gómez-Zeledón, J., Kaiser, M., & Spring, O. (2016). An extended leaf disc test for virulence assessment in *Plasmopara viticola* and detection of downy mildew resistance in *Vitis*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(5). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000353>
- Goodner, K. L. (2008). Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 951-958. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.007>
- Halloran, S. T., Collignon, R. M., McElfresh, J. S., & Millar, J. G. (2018). Fuscumol and geranylacetone as pheromone components of californian longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in the subfamily spondylidinae [Article]. *Environmental Entomology*, 47(5), 1300-1305. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy101>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil [Article]. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853-860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x>
- Havlik, J., Kokoska, L., Vasickova, S., & Valterova, I. (2006). Chemical composition of essential oil from the seeds of *Nigella arvensis* L. and assessment of its antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(4), 713-717. <https://doi.org/10.1002/ffj.1713>
- Hayata, Y., Sakamoto, T., Maneerat, C., Li, X., Kozuka, H., & Sakamoto, K. (2003). Evaluation of Aroma Compounds Contributing to Muskmelon Flavor in Porapak Q Extracts by Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3415-3418. <https://doi.org/10.1021/jf0209950>
- Högnadóttir, Á., & Rouseff, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998(1), 201-211. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00524-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00524-7)
- Indelicato, S., Bongiorno, D., Indelicato, S., Ceraulo, L., Tranchina, E., Avellone, G., Arcadipane, C., & Giambartino, F. (2014). Halogenated Anesthetics Determination in Urine by SPME/GC/MS and Urine Levels Relationship Evaluation with Surgical Theatres Contamination. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 753237. <https://doi.org/10.1155/2014/753237>
- Iwaoka, W., Hagi, Y., Umamo, K., & Shibamoto, T. (1994). Volatile Chemicals Identified in Fresh and Cooked Breadfruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 975-976. <https://doi.org/10.1021/jf00040a026>
- Javed, H. U., Wang, D., Shi, Y., Wu, G. F., Xie, H., Pan, Y. Q., & Duan, C. Q. (2018). Changes of free-form volatile compounds in pre-treated raisins with different packaging materials during storage [Article]. *Food Research International*, 107, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.019>
- Jiang, H., Zhang, M., Qin, L., Wang, D., Yu, F., Liang, W., Song, C., & Granato, D. (2020). Chemical composition of a supercritical fluid (Sfe-CO<sub>2</sub>) extract from *Baeckea frutescens* L. leaves and its bioactivity against two pathogenic fungi isolated from the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [Article]. *Plants*, 9(9), 1-15, Article 1119. <https://doi.org/10.3390/plants9091119>
- Johnson, T. O., Ojo, O. A., Ikiriko, S., Ogunkua, J., Akinyemi, G. O., Rotimi, D. E., Oche, J. R., & Adegboyega, A. E. (2021). Biochemical evaluation and molecular docking assessment of *Cymbopogon citratus* as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)- targeting insecticides [Article]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 28, Article 101175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101175>



- Joichi, A., Yomogida, K., Awano, K.-I., & Ueda, Y. (2005). Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 152-157. <https://doi.org/10.1002/ffj.1388>
- Judas, M., & De Smet, S. (2008). Optimierung der Variablen-Selektion für die PLS-Regression. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjq86eIwdfsAhUjx4UKHU8vCUwQFjAAegQIBRAC&url=http%3A%2F%2Fsas.wiki.org%2Fimages%2Fd%2Fd3%2F12.KSFE-2008-Judas-Variablenselektion\\_f%25C3%25BCr\\_PLS-Regression.pdf&usg=AOvVaw3AXr0ZUSqpB-BdD5Z7UjXt](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjq86eIwdfsAhUjx4UKHU8vCUwQFjAAegQIBRAC&url=http%3A%2F%2Fsas.wiki.org%2Fimages%2Fd%2Fd3%2F12.KSFE-2008-Judas-Variablenselektion_f%25C3%25BCr_PLS-Regression.pdf&usg=AOvVaw3AXr0ZUSqpB-BdD5Z7UjXt)
- Jun, C.-H., Lee, S.-H., Park, H.-S., & Lee, J.-H. (2009). Use of Partial Least squares regression for variable selection and quality prediction. International Conference on Computers & Industrial Engineering,
- Jürges, G., Kassemeyer, H., Dürrenberger, M., Düggelin, M., & Nick, P. (2009). The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology*, 11(6), 886-898.
- Kallio, H. (1989). Aroma of birch syrup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1367-1371. <https://doi.org/10.1021/jf00089a035>
- Karlsson, M. F., Birgersson, G., Cotes Prado, A. M., Bosa, F., Bengtsson, M., & Witzgall, P. (2009). Plant Odor Analysis of Potato: Response of Guatemalan Moth to Above- and Belowground Potato Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5903-5909. <https://doi.org/10.1021/jf803730h>
- Kaufman, P. E., Mann, R. S., & Butler, J. F. (2011). Insecticidal potency of novel compounds on multiple insect species of medical and veterinary importance [<https://doi.org/10.1002/ps.2025>]. *Pest Management Science*, 67(1), 26-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.2025>
- Kiefer, B., Riemann, M., Buche, C., Kassemeyer, H. H., & Nick, P. (2002). The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, 215(3), 387-393.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46(7), 1093-1102. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci122>
- Kortekamp, A., & Zyprian, E. (1999). Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape [Article]. *Journal of Phytopathology*, 147(7-8), 453-459. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00409.x>
- Koschier, E. H., Hoffmann, D., & Riefler, J. (2007). Influence of salicylaldehyde and methyl salicylate on post-landing behaviour of *Frankliniella occidentalis* Pergande. *Journal of Applied Entomology*, 131(5), 362-367. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01191.x>
- Kouame, B. K. F. P., Toure, D., Kablan, A. L. C., Bedi, S. G., Tea, I., Robins, R. J., Chalchat, J. C., & Tonzibo, Z. F. (2017). Chemical constituents and antibacterial activity of essential oils from flowers and stems of *Ageratum conyzoides* from ivory coast [Article]. *Records of Natural Products*, 12(2), 160-168. <https://doi.org/10.25135/rnp.22.17.06.040>
- La Torre, A., Mandala, C., Pezza, L., Caradonia, F., & Battaglia, V. (2014). Evaluation of essential plant oils for the control of *Plasmopara viticola*. *Journal of Essential Oil Research*, 26(4), 282-291. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.889049>
- Lapczynski, A., Lalko, J., McGinty, D., Bhatia, S., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2007). Fragrance material review on trans- $\beta$ -damascone. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1, Supplement 1), S199-S204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.015>

- Lazazzara, V., Avesani, S., Robatscher, P., Oberhuber, M., Pertot, I., Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2021). Biogenic volatile organic compounds in the grapevine response to pathogens, beneficial microorganisms, resistance inducers, and abiotic factors. *Journal of Experimental Botany*, erab367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab367>
- Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19776-2>
- Le Guen, S., Prost, C., & Demaimay, M. (2000). Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 896(1-2), 361-371. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00729-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00729-9)
- Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., & Chong, J. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-54>
- Lee, S.-J., & Noble, A. C. (2003). Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8036-8044. <https://doi.org/10.1021/jf034747v>
- Li, H., Tao, Y.-S., Wang, H., & Zhang, L. (2008). Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *European Food Research and Technology*, 227(1), 287-292. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0722-9>
- Li, M.-Y., Jiao, Y.-T., Wang, Y.-T., Zhang, N., Wang, B.-B., Liu, R.-Q., Yin, X., Xu, Y., & Liu, G.-T. (2020). CRISPR/Cas9-mediated *VvPR4b* editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Horticulture Research*, 7(149). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00371-4>
- Liu, M., Amini, A., & Ahmad, Z. (2017). Safranal and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.038>
- Liu, P.-P., von Dahl, C. C., & Klessig, D. F. (2011). The Extent to Which Methyl Salicylate Is Required for Signaling Systemic Acquired Resistance Is Dependent on Exposure to Light after Infection. *Plant Physiology*, 157(4), 2216-2226. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187773>
- Liu, P.-P., von Dahl, C. C., Park, S.-W., & Klessig, D. F. (2011). Interconnection between Methyl Salicylate and Lipid-Based Long-Distance Signaling during the Development of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis and Tobacco. *Plant Physiology*, 155(4), 1762-1768. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171694>
- Lommen, A. (2009). MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Analytical Chemistry*, 81(8), 3079-3086. <https://doi.org/10.1021/ac900036d>
- Lommen, A., & Kools, H. J. (2012). MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware. *Metabolomics*, 8(4), 719-726. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0369-1>
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732-1738. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Lu, H. (2009). Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 713-717. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9173>

- Martínez, J. A. (2012). Natural Fungicides Obtained from Plants. In D. Dhanasekaran (Ed.), *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/26336>
- Maul, E. (2020). Vitis International Variety Catalogue. In I. f. G. B.-G. Z. Julius Kühn-Institut - Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI) (Ed.).
- Mendgen, K., Wirsal, S. R., Jux, A., Hoffmann, J., & Boland, W. (2006). Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. *Planta*, 224(6), 1353-1361. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0320-2>
- Meng, N., Wei, Y., Gao, Y., Yu, K., Cheng, J., Li, X. Y., Duan, C. Q., & Pan, Q. H. (2020). Characterization of Transcriptional Expression and Regulation of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4b in Grapes [Article]. *Frontiers in Plant Science*, 11, Article 483. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00483>
- Miyazaki, T., Plotto, A., Goodner, K., & Gmitter, F. G. (2011). Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 449-460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4205>
- Mohr, H. D. E. (2012). *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe* (H. D. Mohr, Ed.). Ulmer Eugen Verlag.
- Monson, S. (2011). *Profile of missouri norton wine aroma using solid phase microextraction of headspace, gas chromatography - olfactometry, mass spectrometry* University of Missouri]. <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/12610/research.pdf?sequence=1>
- Mosaferi, S., Jelley, R. E., Fedrizzi, B., & Barker, D. (2022). Synthesis of d6-deuterated analogues of aroma molecules-β-damascenone, β-damascone and safranal. *Results in Chemistry*, 4, 100264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100264>
- Mozūraitis, R., Hajkazemian, M., Zawada, J. W., Szymczak, J., Pålsson, K., Sekar, V., Biryukova, I., Friedländer, M. R., Koekemoer, L. L., Baird, J. K., Borg-Karlson, A.-K., & Emami, S. N. (2020). Male swarming aggregation pheromones increase female attraction and mating success among multiple African malaria vector mosquito species. *Nature Ecology & Evolution*, 4(10), 1395-1401. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1264-9>
- Nie, J. Y., Zhang, Y., Li, R., Jiang, Z. T., Wang, Y., Tan, J., & Tang, S. H. (2020). Screening of radical scavenging activity and chemical constituents of the essential oil from star anise by ultra-fast GC electronic nose coupled with DPPH, OH, and ABTS assays. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15022>
- Nonato, F. R., Santana, D. G., De Melo, F. M., Dos Santos, G. G. L., Brustolim, D., Camargo, E. A., De Sousa, D. P., Soares, M. B. P., & Villarreal, C. F. (2012). Anti-inflammatory properties of rose oxide [Article]. *International Immunopharmacology*, 14(4), 779-784. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.10.015>
- Olbricht, K., Grafe, C., Weiss, K., & Ulrich, D. (2008). Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. *Plant Breeding*, 127(1), 87-93.
- Olivero, J., Gracia, T., Payares, P., Vivas, R., Díaz, D., Daza, E., & Geerlings, P. (1997). Molecular Structure and Gas Chromatographic Retention Behavior of the Components of Ylang-Ylang Oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(5), 625-630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/js960196u>
- Owolabi, M. S., Ogundajo, A., Ndukwe, N., Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2020). Antimicrobial Activities and Chemical Compositions of *Daniellia oliveri* and *Leptoderris micrantha* (Fabaceae) Essential Oils From Nigeria [Article]. *Natural Product Communications*, 15(10). <https://doi.org/10.1177/1934578X20965462>
- Pan, S.-P., Pirker, T., Kunert, O., Kretschmer, N., Hummelbrunner, S., Latkolik, S. L., Rappai, J., Dirsch, V. M., Bochkov, V., & Bauer, R. (2019). C13 Megastigmane Derivatives

- From *Epipremnum pinnatum*:  $\beta$ -Damascenone Inhibits the Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Leukocyte Adhesion Molecules as Well as NF- $\kappa$ B Signaling. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01351>
- Park, S.-W., Liu, P.-P., Forouhar, F., Vlot, A. C., Tong, L., Tietjen, K., & Klessig, D. F. (2009). Use of a Synthetic Salicylic Acid Analog to Investigate the Roles of Methyl Salicylate and Its Esterases in Plant Disease Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 7307-7317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807968200>
- Pennarun, A.-L., Prost, C., Haure, J., & Demaimay, M. (2003). Comparison of Two Microalgal Diets. 2. Influence on Odorant Composition and Organoleptic Qualities of Raw Oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2011-2018. <https://doi.org/10.1021/jf020549c>
- Petric, I. V., Košmerl, T., Pejić, I., Kubanović, V., & Zlatic, E. (2016). Clone candidates differentiation of grapevine *Vitis vinifera* 'Škrlet bijeli' using aroma compounds detected by gas chromatography-mass spectrometry [Article]. *Acta Agriculturae Slovenica*, 107(2), 483-496. <https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.2.19>
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., & Viret, O. (2003). delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5488-5492.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308-316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pino-Otín, M. R., Langa, E., Val, J., Mainar, A. M., & Ballester, D. (2021). Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations [Article]. *Journal of Environmental Management*, 287, Article 112303. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112303>
- Pirouz, D. M. (2006). An Overview of Partial Least Squares. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.1631359>
- Pouliot, M., & Jeanmart, S. (2016). Pan Assay Interference Compounds (PAINS) and Other Promiscuous Compounds in Antifungal Research. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(2), 497-503. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00361>
- Rapp, A. (1995). Possibilities of characterizing wine varieties by means of volatile flavor compounds. In C. George (Ed.), (Vol. Volume 37, pp. 1703-1722). Elsevier.
- Ribnicky, D. M., Shulaev, V., & Raskin, I. (1998). Intermediates of Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology*, 118(2), 565-572. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.565>
- Ricciardi, V., Marcianò, D., Sargolzaei, M., Maddalena, G., Maghradze, D., Tirelli, A., Casati, P., Bianco, P. A., Failla, O., Fracassetti, D., Toffolatti, S. L., & De Lorenzis, G. (2021). From plant resistance response to the discovery of antimicrobial compounds: The role of volatile organic compounds (VOCs) in grapevine downy mildew infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 294-305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.035>
- Rienth, M., Crovadore, J., Ghaffari, S., & Lefort, F. (2019). Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant immunity mechanisms. *PLoS ONE*, 14(9), e0222854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222854>
- Röckel, F., Trapp, O., Zyprian, E., Hausmann, L., Migliaro, D., Vezzulli, S., Töpfer, R., & Maul, E. (2021). A 'Regent' pedigree update: ancestor, offspring and their confirmed resistance loci. *Vitis*, 60, 189-193. <https://doi.org/10.5073/vitis.2021.60.189-193>
- Rozwalka, L. C., Moreira, R. R., Ballesteros Garcia, M. J., Marques, F. A., & May De Mio, L. L. (2020). Chemical components of essential oils as a base to control two grape

- pathogens: Sphaceloma ampelinum and Pseudocercopora vitis [Article]. *Journal of Phytopathology*, 168(6), 342-352. <https://doi.org/10.1111/jph.12898>
- Ruther, J. (2000). Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 890(2), 313-319. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00618-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00618-X)
- Safar, A., Ghafoor, A., & Dastan, D. (2020). Screening of Chemical Characterization, Antifungal and Cytotoxic Activities of Essential Oil Constituents of *Tagetes erecta* L. from Erbil, Kurdistan Region-Iraq. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(3), 2317-2326. <https://doi.org/10.15244/pjoes/110612>
- Sampietro, D. A., Belizan, M. M. E., Baptista, Z. P. T., Vattuone, M. A., & Catalán, C. A. N. (2014). Essential oils from Schinus species of Northwest Argentina: Composition and antifungal activity [Article]. *Natural Product Communications*, 9(7), 1019-1022. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900734>
- Sanz, C., Ansorena, D., Bello, J., & Cid, C. (2001). Optimizing Headspace Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1364-1369. <https://doi.org/10.1021/jf001100r>
- SAS. (2015). SAS/STAT<sup>(R)</sup> 14.1 User's Guide. In *SAS/STAT<sup>(R)</sup> 14.1 User's Guide*. SAS Institute Inc.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M., & Schuurink, R. (2013). Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17781-17811. <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/17781>
- Scariot, F. J., Foresti, L., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, A. P. L. S. (2020). Activity of monoterpenoids on the in vitro growth of two Colletotrichum species and the mode of action on C. acutatum [Article]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, Article 104698. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104698>
- Schmidt, G., Full, G., Winterhalter, P., & Schreier, P. (1992). Synthesis and enantiomer differentiation of isomeric thespiranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1188-1191. <https://doi.org/10.1021/jf00019a022>
- Schröder, S. (2010). *Plant immunity as a result of co - evolution: Using the pair grapevine / downy mildew as a model* [Ph.D. thesis, <http://dx.doi.org/10.5445/IR/1000021293>
- Schuhmacher, E., & Weimer, M. (2006). Multiple Vergleiche mit der SAS-Prozedur MIXED. 10. Konferenz der SAS-Anwender in Forschung und Entwicklung (KSFE), Hamburg.
- Schulze, B., Kost, C., Arimura, G. I., & Boland, W. (2006). Signal reception, biosynthesis and ecology - Fragrance: The language of plants [Editorial Material]. *Chemie in Unserer Zeit*, 40(6), 366-377. <https://doi.org/10.1002/ciuz.200600387>
- Schuphan, W., & Weiller, H. (1967). Untersuchungen Über die antibakterielle Wirksamkeit des Ätherischen Öls der Möhre (Daucus carota L.) und seiner Bestandteile [Article]. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 15(2), 81-101. <https://doi.org/10.1007/BF01100522>
- Schwab, W., & Wüst, M. (2015). Understanding the Constitutive and Induced Biosynthesis of Mono- and Sesquiterpenes in Grapes (Vitis vinifera): A Key to Unlocking the Biochemical Secrets of Unique Grape Aroma Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(49), 10591-10603. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04398>
- Schwander, F. (2011). *Identifikation des Mehltreueristenzlocus Rpv10 für die Rebenzüchtung*
- Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E., & Töpfer, R. (2012). Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance

- loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(1), 163-176. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1695-4>
- Sefton, M. A., Francis, I. L., & Williams, P. J. (1994). Free and Bound Volatile Secondary Metabolites of *Vitis Vhifera* Grape cv. Sauvignon Blanc [Article]. *Journal of Food Science*, 59(1), 142-147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06919.x>
- Sefton, M. A., Skouroumounis, G. K., Else, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Occurrence, Sensory Impact, Formation, and Fate of Damascenone in Grapes, Wines, and Other Foods and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9717-9746. <https://doi.org/10.1021/jf201450q>
- Seibicke, T. (2002). *Untersuchungen zur induzierten Resistenz an Vitis spec.* Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. <http://www.biocrop.de/site/images/Dissertation%20Tobias%20Seibicke.pdf>
- Shin, S., & Lim, S. (2004). Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp [https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02417.x]. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1289-1296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02417.x>
- Slaghenaufi, D., Guardini, S., Tedeschi, R., & Ugliano, M. (2019). Volatile terpenoids, norisoprenoids and benzenoids as markers of fine scale vineyard segmentation for Corvina grapes and wines [Article]. *Food Research International*, 125, Article 108507. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108507>
- Slodowicz, M., Ceriani-Nakamurakare, E., Carmarán, C., & González-Audino, P. (2019). Sex pheromone component produced by microbial associates of the forest pest *Megaplatypus mutatus* [Article]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 231-240. <https://doi.org/10.1111/eea.12744>
- Solis-Quispe, L., Pino, J. A., Falco, A. S., Tomaylla-Cruz, C., Quispe-Tonccochi, E. G., Solís-Quispe, J. A., Aragón-Alencastre, L. J., & Solís-Quispe, A. (2019). Chemical composition and antibacterial activities of essential oil from *Ageratina pentlandiana* (DC.) R.M. King & H. Rob. leaves grown in the Peruvian Andes. *Journal of Essential Oil Research*, 1-5. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1593891>
- Sugimoto, K., Iijima, Y., Takabayashi, J., & Matsui, K. (2021). Processing of Airborne Green Leaf Volatiles for Their Glycosylation in the Exposed Plants [Article]. *Frontiers in Plant Science*, 12, Article 721572. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721572>
- Sun, L., Zhu, B. Q., Sun, X. R., Xu, X. Q., Zhang, G. J., Yan, A. L., & Xu, H. Y. (2015). Monoterpene accumulation and its biosynthesis: Gene transcript profiles of two grape cultivars during berry development. In J. London, D. Archbold, & S. H. Li (Eds.), *Acta Horticulturae* (Vol. 1082, pp. 37-42): International Society for Horticultural Science.
- Supranta, D. N., Arai, K., & Iwai, H. (1997). Effects of volatile compounds on arthrospore germination and mycelial growth of *Geotrichum candidum* citrus race [Article]. *Mycoscience*, 38(1), 31-35. <https://doi.org/10.1007/BF02464966>
- Tao, Y., Li, H., Wang, H., & Zhang, L. (2008). Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 689-694. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.05.007>
- Tobias, R. D. (2003). An Introduction to Partial Least Squares Regression. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewif7uOnitfsAhWB4IUKHcrRDVMQFjASegQIOBAC&url=https%3A%2F%2Fstats.idre.ucla.edu%2Fwp-content%2Fuploads%2F2016%2F02%2Fpls.pdf&usq=AOvVaw2k6MojvtnidipGAmPvrexN>
- Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., & Zyprian, E. (2011). New Horizons for Grapevine Breeding. *Methods in Temperate Fruit Breeding*, 5(Spec. Issue 1), 79-100.

- [https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00008630](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00008630) (Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology)
- Tuntipaleepun, M., Chakthong, S., Ponglimanont, C., Plodpai, P., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Antifungal and cytotoxic substances from the stem barks of *Desmos chinensis*. *Chinese Chemical Letters*, 23(5), 587-590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2012.03.019>
- Umano, K., Hagi, Y., & Shibamoto, T. (2002). Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5355-5359. <https://doi.org/10.1021/jf0203951>
- Vasile Simone, G., Montevecchi, G., Masino, F., Imazio, S. A., Bignami, C., & Antonelli, A. (2018). Aromatic characterisation of Malvasia Olorosissima grapevines and comparison with Malvasia di Candia Aromatica [Article]. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(1), 77-88. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85055778995&partnerID=40&md5=5c19d328e42838079cf38af082c039fe>
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 177-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Wang, W., Liu, X., & Govers, F. (2021). The mysterious route of sterols in oomycetes. *PLoS pathogens*, 17(6), e1009591-e1009591. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009591>
- Wang, Y., Zeng, X., Zhou, Z., Xing, K., Tessema, A., Zeng, H., & Tian, J. (2015). Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism [Article]. *Food Control*, 55, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.029>
- Weaver, K. F., Morales, V., Dunn, S. L., Godde, K., & Weaver, P. F. (2017). Pearson's and Spearman's Correlation. In *An Introduction to Statistical Analysis in Research* (pp. 435-471). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119454205.ch10>
- Weingart, G., Kluger, B., Forneck, A., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2012). Establishment and Application of a Metabolomics Workflow for Identification and Profiling of Volatiles from Leaves of *Vitis vinifera* by HS-SPME-GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 23(4), 345-358. <https://doi.org/10.1002/pca.1364>
- Welke, J. E., Manfroi, V., Zanus, M., Lazarotto, M., & Alcaraz Zini, C. (2012). Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1226, 124-139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.002>
- Welter, L. J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., & Zyprian, E. M. (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding*, 20(4), 359-374. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9097-7>
- Werkhoff, P., & Güntert, M. (1997). Identification of some Ester Compounds in Bourbon Vanilla Beans. *LWT - Food Science and Technology*, 30(4), 429-431. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0194>
- Werkhoff, P., Güntert, M., Krammer, G., Sommer, H., & Kaulen, J. (1998). Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1076-1093. <https://doi.org/10.1021/jf970655s>
- Wicklin, R. (2014a, 21.07.2014). Add a prediction ellipse to a scatter plot in SAS. <https://blogs.sas.com/content/iml/2014/07/21/add-prediction-ellipse.html>
- Wicklin, R. (2014b, 23.07.2014). Computing prediction ellipses from a covariance matrix. <https://blogs.sas.com/content/iml/2014/07/23/prediction-ellipses-from-covariance.html>

- Winterhalter, P., & Schreier, P. (1988). Free and bound C13 norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1251-1256. <https://doi.org/10.1021/jf00084a031>
- Wong, F. P., Burr, H. N., & Wilcox, W. F. (2001). Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 50(4), 427-432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00573.x>
- Yang, X., Guo, Y., Zhu, J., Ma, N., Sun, T., Liu, Z., Li, K., & Guo, X. (2017). Associations between the  $\alpha$ -terpineol synthase gene and  $\alpha$ -terpineol content in different grapevine varieties [Article]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(6), 1100-1105. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1364978>
- Zendler, D., Schneider, P., Töpfer, R., & Zyprian, E. (2017). Fine mapping of Ren3 reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in grapevine. *Euphytica*, 213(3), 68. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1857-9>
- Zhang, X. Z., Wang, C. L., Liu, D., Sa, R. N., Gao, J. Y., Liu, X. F., Liu, D. W., Yang, S., Ma, T., Li, X. L., Chen, R. X., Du, H. R., & Zhang, Y. J. (2021). Antimicrobial activity and component analysis of *Cleome spinosa* against *Fusarium oxysporum* [Article]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 31(5), 1427-1438. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2021.5.0344>
- Zhang, Z.-Z., Li, Y.-B., Qi, L., & Wan, X.-C. (2006). Antifungal Activities of Major Tea Leaf Volatile Constituents toward *Colletorichum camelliae* Masea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3936-3940. <https://doi.org/10.1021/jf060017m>
- Zhang, Z., Xie, Y., Hu, X., Shi, H., Wei, M., & Lin, Z. (2018). Antifungal activity of monoterpenes against *Botryosphaeria dothidea* [Article]. *Natural Product Communications*, 13(12), 1721-1724. <https://doi.org/10.1177/1934578x1801301234>
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Rathod, V., & Karuppayil, S. M. (2011). Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01852.x>]. *Mycoses*, 54(4), e99-e109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01852.x>



## Anhang

### Inhaltsverzeichnis Anhang

<i>A1: Liste der detektierten Substanzen. Angabe mit Substanzname, CAS Nummer, Retentionsindex (RI) (Kovats Index), Literaturnachweis, wenn darüber die vorläufige Identifizierung bestätigt wurde Identifikationsstatus. a) vollständig identifiziert durch Referenzsubstanz, b) vorläufige Identifizierung über NIST Datenbankabgleich, c) vorläufige Identifizierung durch NIST und Literaturabgleich, d) nicht identifiziert. ....</i>	<i>150</i>
<i>A2: Referenzsubstanzen mit Lösungsmittel, CAS-Nr., Retentionsindex (Kovats Index). C5: Pentan. isoC8: Isooctan .....</i>	<i>176</i>
<i>A3: MetAlign Einstellung zur Zusammenführung der GC-MS Datensätze. In der MetAlign Oberfläche sind die veränderbaren Feldfunktionen mit Zahlen gekennzeichnet. Diese Zahlen finden sich in der ersten Spalte der Tabelle wieder. Die Feldeinstellungen für Nr. 6-9 entsprechen den RIKILT Empfehlungen für Agilent GC-MS Instrumente.....</i>	<i>178</i>
<i>A4: Partial least squares Prozedur in SAS. Am Beispiel des Entwicklungsstadiums BBCH6 2011. Entwicklung der Prozedur von Jörg Sellmann, JKI. Zugehöriges Makro siehe A5. ....</i>	<i>179</i>
<i>A5: PLS Makro von Jörg Sellmann, JKI.....</i>	<i>184</i>
<i>A6: Beispiel für die SAS Befehle zur Erstellung von Boxplot Diagrammen und zum Simulate-Test. ....</i>	<i>211</i>
<i>A7: Unbekannte Substanzen. Retentionsindex und Massenspektrum zur eindeutigen Identifizierung. ....</i>	<i>212</i>

## Anhang

A1: Liste der detektierten Substanzen. Angabe mit Substanzname, CAS Nummer, Retentionsindex (RI) (Kovats Index), Literaturnachweis, wenn darüber die vorläufige Identifizierung bestätigt wurde Identifikationsstatus. a) vollständig identifiziert durch Referenzsubstanz, b) vorläufige Identifizierung über NIST Datenbankabgleich, c) vorläufige Identifizierung durch NIST und Literaturabgleich, d) nicht identifiziert.

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Heptane	142-82-5	653	c	Chung, T.Y., Eiserich, J.P., and Shibamoto, T. 1994. Volatile compounds produced from peanut oil heated with different amounts of cysteine. J. Agric. Food Chem. 42:1743-1746.
2,4-dimethyl-1-heptene	19549-87-2	882	b	
Ethyl acetate	141-78-6	896	a	Goodner, K. L. 2008. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. LWT 41: 951-958
2-Butanone	79-93-3	906	b	
u4,92		947	b	
2-Ethylfuran	3208-16-0	955	c	Duque, C., et al. 2001. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge <i>Ircinia felix</i> . Biochemical Systematics and Ecology 29:459-467
Decane	124-18-5	1000	a	
u7,48		1023	d	
Toluene	108-88-3	1044	b	
u9,06		1072	d	
u9,22		1076	d	
Hexanal	66-25-1	1090	a	
u10,03		1090	d	
u10,13		1090	d	
u9,97		1096	d	
u10,08		1099	d	
u10,24		1101	d	
u10,37		1104	d	
u10,43		1107	d	
Geranic oxide A	7392-19-0	1116	b	
Geranic oxide B	7392-19-1	1119	b	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Ethyl benzene		1126	c	Chung, T.Y., Eiserich, J.P., and Shibamoto, T. 1994. Volatile compounds produced from peanut oil heated with different amounts of cysteine. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 42:1743-1746.
(E)-2-Pentenal	1576-87-0	1138	a	Umano, R.P., Hagi, Y., and Shibamoto, T. 2002. Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon ( <i>Shiranuhi mandarin Suppl. J.</i> ). <i>J. Agric. Food Chem.</i> 50:5355-5359.
u12,17		1143	d	
2-Methyl-2-Pentenal	623-36-9	1144	b	
u12,21		1144	d	
2,3-dimethyl-1-Pentene	3404-72-6	1147	b	
2-Methyl-4-Pentenal	5187-71-3	1147	c	Iwaoka, W., Hagi, Y., Umano, K., and Shibamoto, T. 1994. Volatile chemicals identified in fresh and cooked breadfruit. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 42:975-976.
(E)-2-Methyl-3-Hexene	692-24-0	1148	b	
u12,36		1148	d	
(Z)-3-Methyl-2-Hexene	10574-36-4	1149	b	
(Z)-3-Hexenal	6789-80-6	1153	a	Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. <i>J. Chromatogr. A.</i> 998:201-211.
u12,67		1154	d	
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	514-95-4	1155	b	
3-Heptanone	106-35-4	1157	b	
3-Carene	13466-78-9	1158	a	Miyazaki, T., Plotto, A., Goodner, K., Gmitter Jr, F. G. 2011. Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. <i>J. Sci Food Agric</i> 91: 449-460
u13,00		1162	d	
u13,07		1163	d	
4,4-Dimethyl-cyclohexa-dienone	1073-14-9	1164	b	
β-Myrcene	123-35-3	1171	a	Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. <i>J. Chromatogr. A.</i> 998:201-211.
u13,66		1176	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u13,67		1176	d	
u13,71		1177	d	
$\alpha$ -Terpinene	99-86-5	1187	a	
u14,38		1192	d	
Heptanal	111-71-7	1194	a	Le Guen, S., Prost, C., and Demaimay, M. 2000. Characterization of odorant compounds of mussels ( <i>Mytilus edulis</i> ) according to their origin using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 896:361-371.
D-Limonene	5989-27-5	1206	a	Bruce, T.J., and Cork, A. 2001. Electrophysiological and behavioral responses of female <i>Helicoverpa armigera</i> to compounds identified in flowers of African marigold, <i>Tagetes erecta</i> . J. Chem. Ecol. 27:1119-1131.
3-Methyl-3-Penten-2-one	565-62-8	1206	b	
u15,07		1207	d	
u15,19		1210	d	
Eucalyptol	470-82-6	1218	b	
u15,56		1218	d	
Dehydroxylinalool oxide	54750-70-8	1220	b	
(Z)-2,6-dimethyl-1,6-Octadiene	6874-34-6	1221	b	
3-methyl-1-Butanol	123-51-3	1223	b	
(Z)-2-Dodecene	7206-26-0	1228	b	
E-2-Hexenal	6728-26-3	1230	a	
1-Dodecene	112-41-4	1231	b	
u16,22		1232	d	
1S- $\alpha$ -Pinene	7785-26-4	1236	b	
u16,36		1236	d	
u16,52		1239	d	
Hexanoic acid ethyl ester	123-66-0	1243	a	Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., and Cacho, J. 2001. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 49:4818-4824.

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
(Z)- $\beta$ -Ocimene	3338-55-4	1244	a	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu Marcov</i> x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
(E)-5-Dodecene	7206-16-8	1250	b	
$\gamma$ -Terpinene	99-85-4	1252	a	
u17,08		1252	d	
Styrene	100-42-5	1262	c	<a href="http://cdn.intechopen.com/pdfs/27025/InTech-Olive_oil_composition_volatile_compounds.pdf">http://cdn.intechopen.com/pdfs/27025/InTech-Olive_oil_composition_volatile_compounds.pdf</a>
(E)- $\beta$ -Ocimene	3779-61-1	1263	a	
u17,63		1266	d	
p-Cymene (p-Cymol auf deutsch)	99-87-6	1280	a	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu Marcov</i> x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
Hexyl cyclohexane	4292-75-5	1281	b	
Acetic acid hexyl ester	149-92-7	1285	c	Ruther, J. 2000. Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 890:313-319.
$\alpha$ -Terpinolene	586-62-9	1294	a	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu Marcov</i> x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
u19,02		1295	d	
Octanal	124-13-0	1300	a	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.
u19,30		1303	d	
u19,64		1309	d	
u19,74		1311	d	
4-Octen-3-one	3728-55-0	1312	b	
3-Hexanoic acid ethyl ester	2396-83-0	1313	b	
u19,80		1314	b	
u19,82		1314	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u19,88		1314	d	
u19,90		1315	d	
u20,04		1318	d	
4-Hexenyl acetate	72237-36-3	1322	b	
u20,44		1327	d	
2,2,6-trimethyl-Cyclohexanone	2408-37-9	1328	b	
(Z)-3-Hexenyl acetate	3681-71-8	1330	a	
(E)-2-Heptenal	18829-55-5	1334	a	Le Guen, S., Prost, C., and Demaimay, M. 2000. Characterization of odorant compounds of mussels ( <i>Mytilus edulis</i> ) according to their origin using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 896:361-371.
u 20,88		1336	d	
u20,91		1337	d	
2-Heptanol	543-49-7	1338	a	Sanz, C., Ansorena, D., Bello, J., and Cid, C.C. 2001. Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted Arabica coffee. J. Agric. Food Chem. 49:1364-1369.
(Z)-2-Pentenol (oder E?)	1576-95-0 (E: 1576-96-1)	1339	c	Guen, S. L., Prost, C., and Demaimay, M. 2000. Characterization of odorant compounds of mussels ( <i>Mytilus edulis</i> ) according to their origin using chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 896:361-371.
Heptanoic acid ethyl ester	106-30-9	1342	a	
u21,35		1349	d	
Sulcaton = 6-Methyl-5-Hepten-2-one	110-93-0	1351	a	
2-Acetylcyclopentanone (=u21,64)	1670-46-8	1354	b	
u21,52		1354	d	
u21,90		1359	d	
u21,93		1362	d	
u21,97		1363	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u22,03		1364	d	
(Z)-Rose oxide	16409-43-1	1365	a	
Germacrane (=u22,22)	645-10-3	1366	b	
u22,12		1366	d	
1-Hexanol	111-27-3	1371	a	
u22,55		1376	d	
u22,63		1377	d	
u22,68		1378	d	
u22,78		1379	d	
(Z)-2-Pentenyl ester butanoic acid,	42125-13-3	1380	b	
(E)-3-Hexenol	928-97-2	1381	a	
Allo-Ocimene	673-84-7	1384	c	Miyazaki, T., Plotto A., Goodner K. and Gmitter Jr. F.G. 2011. Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. J Sci Food Agric 91: 449–460
u23,13		1387	d	
u23,18		1387	d	
Tetradecane	629-59-4	1390	c	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu</i> Marcov x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
u23,30		1392	d	
u23,47		1394	d	
u23,57		1397	d	
4-Hexen-1-yl propanoate / Z-3-Hexen-1-yl propanoate	33467-73-1 / 33467-74-2	1398	b	
(E,E)-1,3,5-Undecatriene oder (3Z, 5E)	19883-29-5 / 51447-08-6	1399	b	
(Z)-3-Hexenol	928-96-1	1400	a	
Ethyl decyl ether	16976-29-6	1404	b	
Nonanal	124-19-6	1406	a	
u23,69		1407	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u24,02		1407	d	
u24,01		1408	d	
(E,E)-2,4-Hexadienal 1	142-83-6	1411	b	
2,3-dicyclohexyl-Butane	74663-71-1	1413	b	
(E,E)-2,4-Hexadienal 2	142-83-6	1416	a	
u24,59		1421	d	
u24,65		1422	d	
(E)-2-Hexenol	928-95-0	1425	a	
u24,89		1429	d	
u25,00		1432	d	
m-Di-tert-Butylbenzene	1014-60-4	1435	b	
u25,22		1435	d	
u25,27		1435	d	
u25,23		1436	d	
u25,24		1436	d	
u25,21		1437	d	
(S)-(+)-2-Octanol	6169-06-8	1439	a	
1-Tetradecene	1120-36-1	1442	b	
(E)-2-Octenal	2548-87-0	1442	c	Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 998:201-211.
u25,53		1442	d	
u25,56		1445	d	
Octanoic acid ethyl ester	106-32-1	1446	a	Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., and Cacho, J. 2001. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 49:4818-4824.
3-Cyclohexenyl acetate	10437-78-2	1446	b	
p-dehydro-Cymene	768-49-0	1448	c	Miyazaki, T., Plotto A., Goodner K. and Gmitter Jr. F.G. 2011. Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. J Sci Food Agric 91: 449–460



Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u25,76		1448	d	
p-Cymenene	1195-32-0	1450	c	Havlik J., Kokoska L., Vasickova S. Valterova I. 2006. Chemical composition of essential oil from the seeds of <i>Nigella arvensis</i> L. and assessment of its antimicrobial activity. <i>Flavour Fragr. J.</i> 21:713-717
u25,84		1451	d	
u27,51		1451	d	
u26,05		1454	d	
u26,03		1455	d	
(Z)-Linalool oxide (furanoid)	5989-33-3	1459	a	
(E)-2-Tetradecene	35953-53-8	1459	b	
$\alpha$ -Ionene A	457-03-6	1459	b	
2,3-dihydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-Indene	1078-04-2	1459	b	
u26,29		1462	d	
u26,39		1462	d	
u26,40		1463	d	
u26,46		1464	d	
u26,50		1466	d	
u26,60		1466	d	
u26,48		1467	d	
1-Octen-3-ol	3391-86-4	1468	a	
1,3,5,8-Undecatetraene	50277-31-1	1469	b	
u26,75		1470	d	
1-Heptanol	111-70-6	1474	a	
(Z)-3-Hexenyl butyrate	16491-36-4	1475	c	Ruther, J. 2000. Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. <i>J. Chromatogr. A.</i> 890:313-319.
u26,91		1476	d	
u27,07		1478	d	
u27,05		1479	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u27,14		1480	d	
u27,08		1481	d	
Sulcatol	1569-60-4	1483	a	
(Z)-3-Hexenyl- $\alpha$ -methylbutyrate	53398-85-9	1484	b	
u27,37		1485	d	
Z-3-Hexenyl valerate	35852-46-1	1486	b	
u27,32		1486	d	
(E)-Linalool oxide (furanoid)	34995-77-2	1489	a	
Ylangene	14912-44-8	1490	c	Olivero, J., Gracia, T., Payares, P., Vivas, R., Diaz, D., Daza, E., and Geerlings, P. 1997. Molecular structure and gas chromatographic retention behavior of the components of ylang-ylang oil. J. Pharm. Sci. 86:625-630.
$\alpha$ -Ionene B	475-03-6	1493	b	
u27,66		1494	d	
Octyl-Cyclohexane	1795-15-9	1501	b	
2-Ethyl-m-xylene	2870-04-4	1501	b	
u28,07		1502	d	
(Z)-3-Hexenyl isovalerate (oder n-valerate)	35154-45-1 (35852-46-1)	1503	b	
u28,04		1503	d	
u28,16		1504	d	
u28,14		1506	d	
2-Ethyl-1-Hexanol	104-76-7	1507	c	Pennarun Anne-Laure, 2003, Comparison of Two Microalgal Diets. 2. Influence on Odorant Composition and Organoleptic Qualities of Raw Oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ). J. Agric. Food Chem. 51:2011–2018
u28,18		1507	d	
u28,22		1507	d	
(E,Z)-2,4-Heptadienal	4313-02-4	1508	a	
(E)-2-Methyl-2-Pentenoic acid	16957-70-3	1509	b	
u28,27		1509	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u28,52		1513	d	
u28,49		1514	d	
p-tert-butyl-Benzyl alcohol	877-65-6	1515	b	
Theaspirane isomer 1 (Z-?) A	36431-72-8	1516	a	
u28,70		1517	d	
u28,76		1518	d	
u28,84		1523	d	
(-)- $\beta$ - Bourbonene	5208-59-3	1525	c	Karlsson M. F., Birgersson G., Prado A. M. C., Bosa F., Bengtsson M., Witzgall P. 2009. Plant Odor Analysis of Potato: Response of Guatemalan Moth to Above- and Belowground Potato Volatiles. J. Agric Food Chem. 57:5903-5909
Camphor	76-22-2	1529	c	Choi, H.-S. 2005. Characteristic odor components of kumquat ( <i>Fortunella japonica Swingle</i> ) peel oil. J. Agric. Food Chem. 53:1642-1647.
3-Ethyl-4-methylpentanol	38514-13-5	1529	c	Tao, Y., Li H. Wang, H., Zhang, L. 2008. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). Journal of Food Composition and Analysis 21:689-694
3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobezofuran	70786-44-6	1532	b	
u29,33		1535	d	
Dihydroedulan I	63335-66-0	1536	b	
2-Nonanol	628-99-9	1538	a	
Benzaldehyde	100-52-7	1538	a	
u29,46		1538	d	
u29,52		1540	d	
u29,64		1543	d	
u29,78		1546	d	
Nonanoic acid ethyl ester	123-29-5	1548	c	Hua Li, 2008, Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China), Eur Food Res Rechnol 227:287-292
u29,96		1548	d	
u30,05		1552	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u30,07		1553	d	
u30,19		1553	d	
Theaspirane isomer 2 (E-?) B	36431-72-8	1554	a	
(E)-1,2-dimethyl-Cyclo- pentane	822-50-4	1554	b	
5-Methyl-(Z)-2-Hexene	3404-62-4	1556	b	
u30,18		1556	d	
u30,22		1556	d	
u30,26		1558	d	
Linalool	78-70-6	1564	a	
u30,54		1565	d	
u30,75		1568	d	
(Z)-3-Hexenyl isovale- rate 2	35154-45-1	1573	b	
1-Octanol	111-87-5	1577	a	
Longifolene	475-20-7	1579	b	
u31,63		1589	d	
u31,80		1593	d	
u31,81		1593	d	
Bornyl acetate	76-49-3	1594	a	
u31,88		1595	d	
u31,83		1596	d	
2,3-Butanediol	513-85-9	1597	c	Kallio, H. 1989. Aroma of birch syrup. J. Agric. Food Chem. 37:1367-1371.
u31,93		1598	d	
Isobornyl acetate	125-12-2	1599	c	Werkhoff, P., Güntert, M. 1997. Identification of some Ester Compounds in Bourbon Vanilla Beans. LWT - Food Science and Technology 30:429-431
5-Ethyl-2-furanone	2407-43-4	1608	b	
Isophorol	470-99-5	1609	b	
Caryophyllene	87-44-5	1610	b	
u32,47		1613	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u32,61		1613	d	
u32,51		1614	d	
( <i>E,Z</i> )-2-Butenoic acid 3-hexenyl ester	65405-80-3	1615	c	Werkhoff, P. 1998, Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits, J. Agric. Food Chem. 46, 1076-1093
u32,58		1615	d	
u32,62		1616	d	
(-)-Terpinen-4-ol	562-74-3	1621	a	
u33,01		1627	d	
Hotrienol = Dehydrolinalool = (5 <i>E</i> )-3,7-dimethylocta-1,5,7-trien-3-ol	29957-43-5 (unbestimmte Konformation), 20053-88-7 (3 <i>R</i> ,5 <i>E</i> ), 538834-70-1 (5 <i>E</i> )	1627	b	
2-Allyl-4-methylphenol	6628-06-4	1628	b	
trans-Edulan	41678-29-9	1628	c	Werkhoff, P. Güntert, M. Krammer, G., Sommer, H., Kaulen, J. 1998. Vacuum Headspace Method in Aroma research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits. J. Agric. Food Chem. 46:1076-1093
Carvomenthenal A	29548-14-9	1630	b	
( <i>E</i> )-2-Octen-1-ol	18409-17-1	1631	b	
u33,18		1631	d	
u33,29		1631	d	
Carvomenthenal B	29548-14-9	1634	b	
u33,39		1636	d	
β-Cyclocitral	432-25-7	1637	a	
Isopropylcycloundecane	62338-56-1	1646	b	
u33,79		1646	d	
u33,77		1646	d	
u33,81		1647	d	
u33,95		1648	d	
Butanoic acid	107-92-6	1650	a	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Decanoic acid ethyl ester	110-38-3	1650	c	Lee, S.-J., Noble, A.C. 2003. Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. J. of Agric. Food Chem. 51:8036-8044.
u34,03		1650	d	
γ-Tertbutyl-clycohexanone	98-53-3	1651	b	
Creosol	93-51-6	1652	b	
u34,19		1654	d	
u34,12		1655	d	
u34,15		1656	d	
2-Cyclohexen-1-ol	822-67-3	1657	b	
u34,20		1657	d	
u34,31		1657	d	
Menthol	89-78-1	1660	b	
u34,35		1661	d	
Methyl-Benzaldehyde	ortho: 529-20-4; meta: 620-23-5; para: 104-87-0	1662	b	
Safranal	116-26-7	1662	b	
u34,41		1663	d	
Acetophenone	98-86-2	1664	c	Werkhoff, P. Güntert, M. Krammer, G., Sommer, H., Kaulen, J. 1998. Vacuum Headspace Method in Aroma research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits. J. Agric. Food Chem. 46:1076-1093
(Z)-3-Hexenyl hexanoate	31501-11-8	1671	b	
Ocimenol	5986-38-9	1672	b	
u34,89		1675	d	
u35,01		1678	d	
1-Nonanol	143-08-8	1679	a	
Dipropylene glycol	106-62-7	1682	b	
u35,27		1682	d	
Benzoic acid ethylester	93-89-0	1683	b	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
$\alpha$ -Caryophyllene (Humulene)	6753-98-6	1683	c	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu</i> Marcov x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
Diethoxymethan	462-95-3	1684	b	
u35,23		1684	d	
u35,24		1684	d	
u35,42		1685	d	
$\gamma$ -Selinene	515-17-3	1687	c	Everaerts, C., Roisin, Y., Le Quere, J.-L., and Bonnard, O., and Pasteels, J.M. 1993. Sesquiterpenes in the frontal gland secretions of nasute soldier termites from New Guinea. J. Chem. Ecol. 19:2865-2879.
u35,52		1691	d	
Isovaleric acid	503-74-2	1692	c	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.
u35,61		1693	d	
u35,73		1693	d	
Dipropylene glycol	108-61-2	1694	b	
Ocimenol	5986-38-9	1696	b	
u35,82		1696	d	
(S)-(-)-Ipsenol	35628-05-8	1697	b	
u35,89		1698	d	
u35,90		1698	d	
3-Isopropenyl- 5,5-dimethyl cyclopentene		1699	b	
u35,83		1699	d	
u35,84		1699	d	
u35,85		1699	d	
u35,94		1699	d	
Tetrahydrogeranyl-acetone =Hexahydropseudo-ionone	1604-34-8	1700	b	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u35,95		1702	d	
(Z)-3-Nonenol	10340-23-5	1703	c	Hayata, Y., Sakamoto, T., Maneerat, C., Li, X., Kozuka, H., and Sakamoto K. 2003. Evaluation of aroma compounds contributing to muskmelon flavor in Porapak Q extracts by aroma extract dilution analysis. J. Agric. Food Chem. 51:3415-3418.
u36,03		1704	d	
u36,06		1705	d	
u36,26		1708	d	
u36,29		1708	d	
u36,36		1710	d	
u36,28		1711	d	
u36,30		1712	d	
u36,45		1713	d	
u36,46		1713	d	
u36,47		1716	d	
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	1717	a	
u36,63		1720	d	
u36,72		1720	d	
$\alpha$ -Santalol	11031-45-1	1721	c	Welke, J. E., Manfroi, V., Zanus, M. Lazarotto, M. Zini, C. A. 2012. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 1226:124-138
u36,78		1722	d	
u36,85		1723	d	
u36,73		1723	d	
u36,84		1726	d	
u36,88		1727	d	
u37,22		1734	d	
$\alpha$ -Muurolene	31983-22-9	1739	b	
u37,43		1739	d	
u37,46		1742	d	



Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u37,54		1742	d	
u37,59		1745	d	
Geranial	141-27-5	1747	a	
u37,77		1750	d	
(1-butylhexyl)-Benzene	4537-11-5	1752	b	
u37,92		1752	d	
Naphthalene	91-20-3	1754	c	Peng C.T., 1994. Gas chromatographic identification of aromatic hydrocarbons. In Liquid Scintillation Spectrometry, ed. Cook G.T., Harkness D.D., MacKenzie A.B., Miller B.F. Scott E.M. in Radiocarbon 1996 page 221-232
u37,91		1754	d	
1,3,4-trimethyl-3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	40702-26-9	1758	b	
u38,14		1758	d	
$\alpha$ -Farnesene	502-61-4	1760	a	
Dehydro-ar-lonene (TDN)	30364-38-6	1760	c	Monson S. 2011, Profile of missouri norton wine aroma using solid phase microextraction of headspace, gas chromatography - olfactometry, mass spectrometry. Master Thesis at University of Missouri. <a href="https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/12610/research.pdf?sequence=1">https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/12610/research.pdf?sequence=1</a>
u38,13		1761	d	
2-Undecenal	2463-77-6	1764	c	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu</i> Marcov x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
u38,33		1765	d	
$\beta$ -Santalene	25532-78-9 (endo) / 511-59-1 (exo)	1766	b	
u38,37		1766	d	
u38,43		1768	d	
u38,52		1769	d	
u38,56		1771	d	
u38,61		1771	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Nerol acetate ( <i>Z</i> ) / Geranyl acetate ( <i>E</i> )	( <i>Z</i> ) 141-12-8 / ( <i>E</i> ): 105-87-3	1772	b	
δ-Cadinene	483-76-1	1772	c	Olivero, J., Gracia, T., Payares, P., Vivas, R., Diaz, D., Daza, E., and Geerlings, P.1997. Molecular structure and gas chromatographic retention behavior of the components of ylang-ylang oil. J. Pharm. Sci. 86:625-630.
3,6-Nonadien-1-ol	56805-23-3	1772	c	Pennarun Anne-Laure, 2003, Comparison of Two Microalgal Diets. 2. Influence on Odorant Composition and Organoleptic Qualities of Raw Oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ). J. Agric. Food Chem. 51:2011–2018
u38,60		1772	d	
u38,64		1772	d	
5-Ethyl-2(5H)-Furanone	2407-43-4	1773	b	
u38,65		1773	d	
5,6-Diethyl-Cyclohexa-1,3-diene	100015-46-4	1776	b	
u38,78		1777	d	
u38,89		1780	d	
u38,95		1781	d	
Linalool oxide (pyranoid) (=Epoxylinool)	14049-11-7	1782	b	
u39,02		1782	d	
u39,00		1782	d	
u39,01		1782	d	
(R-)(+)-β-Citronellol	1117-61-9	1785	a	
u39,19		1787	d	
Methylsalicylsäure	119-36-8	1792	a	
u39,41		1793	d	
u39,44		1794	d	
u39,45		1794	d	
u39,46		1794	d	
u39,55		1797	d	
u39,71		1801	d	
Myrtenal	564-94-3	1803	b	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u39,82		1804	d	
u39,97		1811	d	
u40,11		1813	d	
u40,16		1814	d	
u 40,17		1814	d	
Myrtenol	515-00-4	1816	c	Buttery, R. G., Douglas, M. L., Nam, Y., Merril, G. B., Roitman, J. N. 2000. Volatile Components of Green Walnut Husks. J. Agric Food Chem 48:2858-2861
u40,38		1821	d	
u40,40		1821	d	
Nerol	106-25-2	1822	a	
Geranyl acetate	105-87-3	1822	b	
2-Tridecanone	593-08-8	1823	c	Binder, R.G., and Flath, R.A. 1989. Volatile components of pineapple guava. J. Agric. Food Chem. 37:734-736.
u40,56		1826	d	
u40,55		1828	d	
u40,62		1828	d	
u40,61		1828	d	
u40,63		1828	d	
u40,70		1830	d	
u40,84		1834	d	
(E)- $\beta$ -Damascone	85949-43-5	1835	a	
u40.86		1835	d	
u 40,87		1835	d	
u 40,89		1835	d	
u40,91		1836	d	
u40,88		1837	d	
$\beta$ -Damasconone	23726-93-4	1838	a	
u40,90		1838	d	
u41,18		1844	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u41,23		1846	d	
u41,26		1846	d	
u41,29		1847	d	
u41,30		1848	d	
u41,33		1848	d	
Dodecanoic acid ethyl ester	106-33-2	1857	b	
Ipsdienol	35628-00-3	1858	b	
2-Isopropylbenzaldehyde	6502-22-3	1858	b	
u41,81		1864	d	
u41,86		1864	d	
u41,87		1865	d	
u41,91		1865	d	
u41,92		1865	d	
Methylnaphthalene	1-Methyl:90-12-0 2 Methyl:91-57-6	1866	b	
u41,93		1866	d	
u41,95		1866	d	
u41,99		1866	d	
Geraniol	106-24-1	1870	a	
(E)-Geranyl acetone	3796-70-1	1875	a	
u42,37		1878	d	
o-Guaiacol	90-05-1	1880	c	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.
u42,64		1886	d	
$\alpha$ -Curmumene	644-30-4	1891	b	
u42,81		1891	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Propanoic acid 2-methyl-1-(1,1-dimthylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	74381-40-1	1892	b	
u42,89		1893	d	
Benzyl alcohol	100-51-6	1894	a	
u42,94		1897	d	
u43,30		1905	d	
u43,25		1906	d	
u43,32		1908	d	
u43,43		1911	d	
u43,63		1917	d	
4,5,9,10-Dehydro-Iso-longifolene	156747-45-4	1921	b	
u43,84		1921	d	
p-Menth-2-ene	5256-65-5	1923	b	
u43,87		1924	d	
u44,08		1928	d	
Megastigmatrienone	38818-55-2	1936	b	
2-Phenylethylalkohol	60-12-8	1938	a	
$\alpha$ -Calacorene	21391-99-1	1941	c	Aromdee C., Sriubolmas N., 2006. Essential oil of the flowers of <i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae). Songklanakarin J. Sci. Technol. 28(1):115-119
3-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-Propenal,   Isomer 1	4951-40-0	1943	b	
u44,49		1943	d	
u44,51		1943	d	
u44,63		1944	d	
u44,60		1946	d	
u44,59		1946	d	
u44,70		1949	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u44,74		1950	d	
u44,86		1950	d	
u44,94		1956	d	
u45,16		1959	d	
u45,22		1961	d	
β-Ionone	79-77-6	1963	a	
(Z)-Jasmone	488-10-8	1966	b	
3-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-Propenal   Isomer 2	4951-40-0	1969	b	
2-Propenal 3-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)	4951-40-4	1969	b	
3,7-Octadiene-2,6-diol, 2,6-dimethyl	13741-21-4	1973	b	
Benzothiazole	95-16-9	1977	a	
2-Methoxy-3-methylphenol	18102-31-3	1977	b	
u45,77		1980	d	
u46,00		1987	d	
u46,12		1987	d	
2-Ethyl-Hexanoic acid	149-57-5	1988	b	
u46,16		1988	d	
Cyclotetradecane	295-17-0	1989	b	
u46,14		1992	d	
u46,28		1992	d	
u46,39		1995	d	
u46,69		2004	d	
u46,71		2005	d	
u46,77		2007	d	
u46,68		2008	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u40,70		2009	d	
u46,86		2010	d	
u46,93		2012	d	
u46,84 / 2,3-dihydro-2,2,4,6-tetramethyl-Benzofuran	3698-49-5	2014	b	
u46,87		2014	d	
u47,13		2018	d	
2,6-Dimethylnaphthalene	581-42-0	2021	c	Le Guen, S., Prost, C., and Demaimay, M. 2000. Characterization of odorant compounds of mussels ( <i>Mytilus edulis</i> ) according to their origin using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 896:361-371.
u47,04		2021	d	
2,3-dihydro-1,1-dimethyl-1H-Indene-4-carboxylic acid	55712-38-4	2025	b	
3,4-Dehydro- $\beta$ -Ionone	1203-08-3	2028	b	
u47,43		2028	d	
u47,44		2028	d	
u47,61		2034	d	
u47,73		2038	d	
u48,19		2053	d	
u48,20		2053	d	
u48,21		2054	d	
Isopropyl Myristate	110-27-0	2057	b	
4-Ethylguaiaicol	2785-89-9	2057	c	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.
u48,35		2059	d	
u48,38		2060	d	
u48,25		2061	d	

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
Tetradecanoic acid ethyl ester	124-06-1	2063	b	
u48,50		2063	d	
u48,56		2065	d	
Nerolidol [(E-)]	40716-66-3 (E)	2068	c	Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [( <i>C. unshiu</i> Marcov x <i>C. sinensis</i> OSBECK) x <i>C. reticulata</i> BLANCO] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
u48,49		2069	d	
u49,03		2080	d	
u49,13		2084	d	
u 49,35		2091	d	
u49,36		2091	d	
u49,22		2094	d	
u49,46		2095	d	
u49,48		2095	d	
u49,38		2098	d	
u49,37		2098	d	
u49,77		2105	d	
Triacetin	120-76-1	2106	b	
Octanoic acid	124-07-2	2110	b	
u50,00		2113	d	
u49,86		2115	d	
u 49,96		2118	d	
u49,99		2119	d	
u50,42		2127	d	
u50,52		2130	d	
u50,37		2132	d	
u50,39		2133	d	
u50,49		2136	d	
u51,16		2151	d	



Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
(Z)-3-Hexen-1-ol zoate	25152-85-6	2152	b	
u50,99		2153	d	
u51,30		2155	d	
u51,18		2159	d	
u51,32		2164	d	
u51,63		2166	d	
$\alpha$ -Copaene-11-ol	41370-56-3	2171	b	
u52,04		2180	d	
u52,06		2180	d	
2,6-Diisopropyl-naphtha- lene	24157-81-1	2181	b	
u51,83		2181	d	
u52,10		2182	d	
u52,00		2187	d	
u52,03		2188	d	
u52,38		2191	d	
u52,47		2193	d	
u52,63		2199	d	
Eugenol	97-53-0	2203	c	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.
Isoeugenol	97-54-1	2204	a	
u52,50		2205	d	
$\beta$ -Eudesmol	473-15-4	2209	c	Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Kolodziejczyk, P.P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry 69: 1732-1738
4-Ethyl-Phenol,	123-07-9	2211	c	Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J. Agric. Food Chem. 52:1653-1660.

## Anhang

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u52,99		2211	d	
u53,08		2214	d	
u53,11		2215	d	
Nonanoic acid / Pelar-gonsäure	112-05-0	2220	a	
4-Methyl-2-Pyrimidina-mid	108-52-1	2228	b	
u53,55		2229	d	
u53,59		2240	d	
u53,61		2240	d	
2,3-dihydro-1,1,3-trime-thyl-3-phenyl-1H-Indene	3910-35-8	2242	b	
n-Hexyl salicylate	6259-76-3	2246	b	
u53,98		2253	d	
1-Acetyl-4,6,8-trimethyl-azulene	834-97-9	2256	b	
Azulol	489-84-9	2258	b	
Cadalene	483-78-3	2258	b	
u54,49		2260	d	
1-(2,3,6-trimehtylphe-nyl)-3-Butanone	58720-40-4	2271	b	
Hexadecanoic acid ethyl ester	628-97-7	2271	c	Yoangsheng Tao, 2008, Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China), Journal of Food Composition and Analysis 21; 689-694
u55,12		2291	d	
u55,51		2294	d	
u55,61		2297	d	
u55,69		2310	d	
u55,78		2313	d	
u56,27		2319	d	
u56,29		2320	d	
u56,30		2331	d	

Substanz	CAS	RI	Identifikationsstatus	Literaturnachweis
u56,56		2339	d	
3,5-Di-tert-butylphenol	1138-52-9	2349	b	
2-(4-Methoxyphenyl)ethanol	702-23-8	2369	b	
u57,87		2371	d	
u57,97		2375	d	
u57,59		2376	d	
Cuparene	16982-00-6	2382	b	
u58,27		2385	d	
Farnesyl acetone	1117-52-8	2396	b	
Diethylphthalate		2398	b	
u58,71		2399	d	
u59,32		2414	d	
Coumaran	496-16-2	2415	b	
u62,31		2486	d	
1,2-Benzenedicarboxylic acid butyl octyl ester	84-78-6	2564	b	
1,2-Benzenedicarboxylic acid butyl 2-ethylhexyl ester	85-69-8	2568	b	
u66,66		2590	d	
Hydroxyfurfural	67-47-0	2605	b	
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid ethyl ester	1191-41-9	2630	b	
u68,90		2644	d	
Frambinone	5471-51-2	2661	b	
Benzylbenzoate	120-51-4	2682	b	
u73,24		2749	d	
1,2-Benzenedicarboxylic acid butyl 2-ethylhexyl ester 2	85-69-8	2800	b	

A2: Referenzsubstanzen mit Lösungsmittel, CAS-Nr., Retentionsindex (Kovats Index). C5: Pentan. isoC8: Isooctan

Referenzsubstanz	Lösungsmittel	CAS-Nr.	Retentionsindex
(-)-Terpinen-4-ol	C5	20126-76-5	1622
(+)-3-Caren	C5	498-15-7	1156
(E)-2-Heptenal	C5	18829-55-5	1337
(E)-2-Hexenal	C5	6728-26-3	1228
(E)-2-Hexenol	C5	928-95-0	1425
(E)-2-Pentenal	C5	1576-87-0	1137
(E)-3-Hexenol	C5	928-97-2	1382
(E)-Geranylaceton	C5	3796-70-1	1874
(E)-Linalooloxid	C5	34995-77-2	1490
(E)-Theaspiran bzw. B (2R,5R laut PubChem)	C5	36431-72-8	1557
(E)- $\beta$ -Damasconon	C5	23696-85-7	1835
(E)- $\beta$ -Damascon	C5	85949-43-5	1836
(E)- $\beta$ -Ocimen	C5	3779-61-1	1260
(E,E)-2,4-Hexadienal	C5	142-83-6	1415
(E,Z)-2,4-Heptadienal	C5	4313-02-4	1509
(R)-(+)- $\beta$ -Citronellol	C5	1117-61-9	1783
(S)-(+)-2-Octanol	C5	6169-06-8	1438
(Z)-3-Hexenal	C5	6789-80-6	1153
(Z)-3-Hexenol	C5	928-96-1	1403
(Z)-3-Hexenylacetat	C5	3681-71-8	1332
(Z)-Linalooloxid	C5	5989-33-3	1461
(Z)-Rosenoxid	C5	16409-43-1	1367
(Z)-Theaspiran bzw. A	C5	43126-21-2	1518
(Z)- $\beta$ -Ocimen	C5	3338-55-4	1247
1-Heptanol	C5	111-70-6	1475
1-Nonanol	isoC8	143-08-8	1674
2-Heptanol	C5	543-49-7	1338
2-Nonanol	C5	628-99-9	1539
2-Phenylethanol	C5	60-12-8	1931
Benzaldehyd	C5	100-52-7	1534
Benzylalkohol	isoC8	100-51-6	1892
Bornylacetat	C5	76-49-3	1600

Referenzsubstanz	Lösungsmittel	CAS-Nr.	Retentionsindex
Buttersäure	C5	107-92-6	1649
Decan	C5	124-18-5	1000
D-Limonen	C5	5989-27-5	1204
Ethylacetat	C5	141-78-6	898
Ethylheptanoat (Heptansäureethyl- hylester)	C5	106-30-9	1348
Ethylhexanoat (Hexansäureethyl- ester)	C5	123-66-0	1246
Ethyl-octanoat (Octansäureethyl- ester)	C5	106-32-1	1450
Geranial	C5	141-27-5	1748
Geraniol	C5	106-24-1	1867
Heptanal	C5	111-71-7	1195
Hexanol	C5	111-27-3	1372
Isoeugenol	C5	97-54-1	2195
Linalool	C5	78-70-6	1565
Methylsalicylsäure	C5	119-36-8	1791
Nerol	C5	106-25-2	1823
Nonanal	C5	124-19-6	1408
Oct-1-en-3-ol	C5	3391-86-4	1469
Octanal	C5	124-13-0	1302
Octanol	C5	111-87-5	1579
p-Cymen (p-Cymol)	isoC8		1283
Pelargonsäure	C5	112-05-0	2212
Sulcatol	C5	1569-60-4	1486
Sulcaton	C5	110-93-0	1352
$\alpha$ -Farnesen	C5	502-61-4	1759
$\alpha$ -Terpinen	C5	99-86-5	1185
$\alpha$ -Terpineol	C5	98-55-5	1718
$\alpha$ -Terpinolen	C5	586-62-9	1291
$\beta$ -Cyclocitral	C5	432-25-7	1639
$\beta$ -Ionon	C5	79-77-6	1956
$\beta$ -Myrcen	C5	123-35-3	1170
$\gamma$ -Terpinen	C5	99-85-4	1253

## Anhang

Referenzsubstanz	Lösungsmittel	CAS-Nr.	Retentionsindex
<b>Nicht bestätigt</b>			
(S)-(+)-2-Octanol	C5	6169-06-08	1438
2,4-Dimethylbenzaldehyd	C5	15764-16-6	1760
Farnesol Isomerengemisch	C5	4602-84-0	2341 / 2354 / 2380
$\alpha$ -Ionone	C5	127-41-3	1867
$\beta$ -Pinen	C5	127-91-3	1114

A3: MetAlign Einstellung zur Zusammenführung der GC-MS Datensätze. In der MetAlign Oberfläche sind die veränderbaren Feldfunktionen mit Zahlen gekennzeichnet. Diese Zahlen finden sich in der ersten Spalte der Tabelle wieder. Die Feldeinstellungen für Nr. 6-9 entsprechen den RIKILT Empfehlungen für Agilent GC-MS Instrumente.

Feld-Nr.	Feldbeschreibung	Einstellung
1A	Program configuration	Input → HP / Agilent Chemstation Input function selection → total no. of function = 1; Function no. to be used = 1 Output format → Net CDF No. of processors used = 1
1B	Mass Resolution / Bin	Nominal Mass Mode Mass Bin 0,65
2A	Group 1: List of Data Sets	Eingabe des Speicherpfads
4	Retention Begin (Scan Nr.)	1314
5	Retention End (Scan Nr.)	24030
6	Maximum Amplitude	6 000 000
7	Peak Slope Factor (x Noise)	0,5
8A	Peak Threshold Factor (x Noise)	1
8B	Peak Threshold (Abs. Value)	100
9	Average Peak Width at Half Height (Scans)	5
10A	Keep Peak Shape (no alignment)	Unchecked
10B	Pre-Synchronize Scans	
11	Run Baseline Correction	Klick
PART B		
12	Scaling options	No Scaling

Feld-Nr.	Feldbeschreibung	Einstellung		
13	Initial peak search criteria		Scan Nr.	Max Shift
		Begin of Region 1	1313	36
		End of Region 1	24030	36
		Begin of Region 2	0	0
		End of Region 2	0	0
14	Tuning alignment options and criteria	No-Pre-align (Rough)		
15-17		unavailable		
18	Select min. Nr. Per Peak set Group 1	0		
19	Select min. Nr. Per Peak set Group 2	0		
20	Run Scaling and Alignment	Output folder		
21		Multivariate compatible output Mass 35-400 Retention 0-200 Peak Threshold Factor (x Noise) 1.000 000		
22-30		Nicht verwendet, da die weitere Auswertung in SAS erfolgte		

A4: Partial least squares Prozedur in SAS. Am Beispiel des Entwicklungsstadiums BBCH6 2011. Entwicklung der Prozedur von Jörg Sellmann, JKI. Zugehöriges Makro siehe A5.

```

/*****
/
partial least squares regression
/
*****/
ods graphics on / reset=all;
ods output VariableImportancePlot=VIP1;

```

```
proc pls data=ows0611m.bonitur_short method=pls outmodel=est1 lv=25
plot=vip; * plot=vip ergibt die VIPs ; * lv = Limit of factors to ex-
tract at each loop;
model bonitur=massnr1-massnr12227;
run;
ods output close;
ods graphics off;

proc sort data=VIP1; by descending vip; run;

PROC EXPORT DATA= vip1
              OUTFILE= "/folders/myfolders/sasuser.v94/OWS0611/vip1_1.csv"
              DBMS=CSV REPLACE;
              PUTNAMES=YES;
RUN;

data pre;
informat label $20.;
input label$ &;
cards;
%LET xvars=
;
run;

data post;
label="";
output;
run;

data werte;
set pre VIP1(where=(vip>1.6)) post;
drop vip;
run;

data ows0611m.werte;
set werte;
run;

proc export outfile='/folders/myfolders/sasuser.v94/OWS0611/bbch7_in-
clude.sas' data=ows0611m.werte dbms=dml replace;
delimiter=',';
```



```
putnames=no;
run;

/*****
*****
/
/
Teil 2
/
/
*****
*****/

title " ";
title2 " ";

%include "/folders/myfolders/sasuser.v94/jörg/makros.sas";

data bonitur2;
set ows0611m.bonitur_short;
n=_n_;
run;

/*
NOTE: There were 24 observations read from the data set OWS0611M.BONITUR_SHORT.
NOTE: The data set WORK.BONITUR2 has 24 observations and 12232 variables.
*/

%include '/folders/myfolders/sasuser.v94/OWS0611/bbch7_include.sas';

%let yvars=bonitur;
%let ypred=yhat1;
%let yres=yres1;
%let predname=yhat;
%let resname=res;
```

```
%let xscrname=xscr;
%let yscrname=yscr;
%let num_y=1;
%let num_x=25;

ods graphics on / reset=all;
ods output VariableImportancePlot=VIP2;
proc pls data=bonitur2 method=pls outmodel=est2 lv=25 plot=vip;
model &yvars = &xvars;
output out=outpls p=yhat1 yresidual=yres1
xresidual=xres1-xres&num_x xscore=xscr yscore=yscr
stdy=stdy stdx=stdx h=h press=press t2=t2
xqres=xqres yqres=yqres;
run;
ods output close;
ods graphics off;

/*
NOTE: The data set WORK.VIP2 has 1171 observations and 2 variables.
NOTE: There were 24 observations read from the data set WORK.BONITUR2.
NOTE: The data set WORK.EST2 has 79 observations and 1176 variables.
NOTE: The data set WORK.OUTPLS has 24 observations and 12316 variables.
NOTE: PROZEDUR PLS used (Total process time):
      real time          3.15 seconds
      cpu time           1.89 seconds
*/
proc sort data=VIP2; by descending vip; run;

data VIP3;
    set VIP2;
    length massnr 5.;
    massnr=substr(label,7,5); *mn; /*erstellt eine Spalte mnf nur mit
den Zahlenwerten.*/
run;

%let lv=25;

/*****/
/* Compute the X-weights for each PLS component */
/*****/
%get_wts(est2, dsxwts=xwts);
```

```
/* Compute X-loadings p1-p2 for the two components */
%getxload(est2,dsxload=xloads);
%res_plot(outpls);
%nor_plot(outpls);
data ows0611m.VIP3;
set VIP3;
run;
PROC EXPORT DATA= OWS0611m.vip3
             OUTFILE= "/folders/myfolders/sasuser.v94/OWS0611/vip3.csv"
             DBMS=CSV REPLACE;
             PUTNAMES=YES;
RUN;
data VIP3_olpoint1;
set ows0611m.VIP3;
if vip>1.1 then output;
run;
data VIP3_olpoint1;
set VIP3_olpoint1;
proc sort data = VIP3_olpoint1 out = p_1point1;
by massnr;
run;
*
46 vips = Massnr bei vip>1.6 in Teil1 und vip>1.2 in Teil2
;
*****
*****/
```

```

%macro res_plot(ds);

/*****
/ Plots Y-residuals vs. predicted values for each PLS      /
/   component.                                           /
/ Variable:                                             /
/   DS -          The input data set: Must at least      /
/                 contain variables N for observation    /
/                 numbers, as well as predicted values and /
/                 residuals and should not contain missing /
/                 values.                               /
/ Required Global Variables:                             /
/   %RESNAME -    Prefix given to Y-residuals when OUT=  /
/                 data set was defined in PROC PLS.     /
/   %PREDNAME -   Prefix given to predictions when OUT=  /
/                 data set was defined in PROC PLS.     /
/   %NUM_Y       - Number of response variables Y.       /
*****/

data _NULL_; set &ds;
  call symput('max_n',n);
run;

%do i=1 %to &num_y;

  axis1 label=(angle=270 rotate=90 "Residual")
        major=(number=5) minor=none;

  axis2 label=("Prediction for Response &i") minor=none;

  data res_anno;      *** Annotation Data Set for Plot ***;
    length text $ %length(&max_n);
    retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
    set &ds;
    text=%str(n); x=&predname&i; y=y&resname&i;
run;

proc gplot data=&ds;
  plot y&resname&i*&predname&i/anno=res_anno vaxis=axis1
        haxis=axis2 vref=0 lvref=2 frame;
  symbol1 v=none i=none;

```

---

```

run;

%end;

%mend;

%macro nor_plot(ds);

  /*****
  / Plots Y-residuals vs. Normal quantiles for each PLS      /
  / component.                                               /
  / Variable:                                               /
  /   DS -          The input data set: Must at least      /
  /                 contain variables for observation      /
  /                 numbers, predicted values and residuals /
  /                 and should not contain missing values. /
  / Required Global Variables:                               /
  /   %RESNAME - Prefix given to Y-residuals when OUT=     /
  /                 data set was defined in PROC PLS.      /
  /   %NUM_Y   - Number of response variables Y.          /
  *****/

  data ds; set &ds;
  run;

  data _NULL_; set &ds;
    call symput('max_n',n);
  run;

  %do i=1 %to &num_y;
    data ds; set ds;
      if y&resname&i=. then delete;
    run;
  %end;

  data _NULL_; set ds;
    call symput('numobs',_N_);
  run;

  %do i=1 %to &num_y;

```

---

```
proc sort data=ds; by y&resname&i;

/*****
/ Calculate the expected values under normality for each /
/ residual. /
*****/

data resid&i; set ds(keep=n y&resname&i);
  v=( _n_ - 0.375) / (&numobs+0.25);
  z=probit(v);
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "Y&i Residual")
  major=(number=5) minor=none;

axis2 label=('Normal Quantile') minor=none;

data nor_anno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
  length text $ %length(&max_n);
  retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
  set resid&i;
  text=%str(n); x=z; y=y&resname&i;
run;

proc gplot data=resid&i;
  plot y&resname&i*z/anno=nor_anno vaxis=axis1 haxis=axis2
      frame;
  symbol1 v=none i=none;
run;

%end;

%mend;

%macro plot_scr(ds,
  max_lv=&lv);

/*****
/ Plots the Y-scores vs. the corresponding X-scores for /
/ each PLS component. /
/ Variables: /
/ DS - The data set containing the scores and a /
```

```

/          variable N containing the observation /
/          numbers. /
/      MAX_LV - Number of the last PLS component to have /
/          its scores plotted. /
/ Required Global Variables: /
/      %XSCRNAME - Prefix given to X-scores when OUT= data /
/          set was defined. /
/      %YSCRNAME - Prefix given to Y-scores when OUT= data /
/          set was defined in PROC PLS. /
*****/

data dsout; set &ds;          *** Uses nonmissing observations ***;
    if n ^= .;
run;

data _NULL_; set &ds;
    call symput('max_n',n);
run;

%do i=1 %to &max_lv;

    data pltanno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
        length text $ %length(&max_n);
        retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
        set dsout;
        text=%str(n); x=&xscrname&i; y=&yscrname&i;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "Y score &i")
        major=(number=5) minor=none;

axis2 label=("X-score &i") minor=none;

proc gplot data=dsout;
    plot &yscrname&i*&xscrname&i/anno=pltanno vaxis=axis1
        haxis=axis2 frame;

    symbol1 v=none i=none;
run;

%end;
%mend plot_scr;

```

```
%macro plotxscr(ds,
               max_lv=&lv);

/*****
/ Plots X-scores for a given number of PLS components      /
/ vs. those of the preceding PLS component.                /
/ Variables:                                              /
/   DS -          The data set containing the scores and a /
/                 variable N containing the observation    /
/                 numbers.                                /
/   MAX_LV -      Number of the last PLS component to have /
/                 its scores plotted.                      /
/ Required Global Variables                               /
/   %XSCRNAME -   Prefix given to X-scores when OUT= data /
/                 set was defined in PROC PLS.            /
*****/

data dsout; set &ds;
  if n ^= .;          *** Uses nonmissing observations ***;
run;

data _NULL_; set &ds;
  call symput('max_n',n);
run;

%do i=1 %to %eval(&max_lv-1);

  %let j=%eval(&i+1);

  data pltanno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
    length text $ %length(&max_n);
    retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
    set dsout;
    text=%str(n); x=&xscrname&i; y=&xscrname&j;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "X score &j")
       major=(number=5) minor=none;

axis2 label=("X-score &i") minor=none;
```



```

proc gplot data=dsout;
  plot &xscrname&j*&xscrname&i/anno=pltanno vaxis=axis1
      haxis=axis2 frame;

  symbol1 v=none i=none;
run;

%end;

%mend plotxscr;

%macro get_wts(dsoutmod,
              dsxwts=xwts);

  /*****
  / Gets X-weights w from OUTMODEL data set:           /
  / 1. Gets appropriate section of OUTMODEL data set. /
  / 2. Outputs this data set as DSXWTS1 (will be used /
  /    in VIP calculation.)                            /
  / 3. Transposes the data set so the w's are the     /
  /    variables.                                       /
  / 4. Renames the columns to w1 - wA, where A is the /
  /    number of PLS components LV in the final model. /
  / Variables:                                         /
  /   DSOUTMOD - Name of the OUTMODEL data set generated /
  /              by proc PLS.                           /
  /   DSXWTS - Name of the data set containing the      /
  /            X-weights as variables that is output   /
  /            by this macro.                           /
  / Required Global Variable:                           /
  /   %XVARS - Macro variable containing the names of  /
  /            the X-variables in a string with space  /
  /            delimiters.                               /
  *****/

data &dsxwts; set &dsoutmod(keep=_TYPE_ _LV_ &xvars);
  if _TYPE_='WB' then output;

proc transpose data=&dsxwts out=&dsxwts; run;

data &dsxwts; set &dsxwts;
  if _NAME_='_LV_' then delete;
  n=_n_-1;

```

## Anhang

---

```
run;

%do i=1 %to &lv;

    data &dsxwts; set &dsxwts;
        rename col&i=w&i;
    run;

%end;

%mend;

%macro plot_wt(ds,
               max_lv=&lv);

    /*****
    / Plots X-weights for a given number of PLS components      /
    / vs. those of the preceding PLS component.                 /
    / Variables:                                               /
    /     DS -          Name of the data set containing the    /
    /                   weights as variables w1-wA, where A=LV, /
    /                   the number of PLS components, and a    /
    /                   character variable _NAME_ containing the /
    /                   X-variable names.                       /
    /     MAX_LV -     Number of the last PLS component to have /
    /                   its weights plotted.                   /
    / Required Global Variable:                                 /
    /     %XVARS -     Macro variable containing the names of  /
    /                   the X-variables in a string with space /
    /                   delimiters.                             /
    *****/

    /*****
    / Determine the largest label to be put on plot            /
    *****/

%let name_len=1;

data _NULL_; set &ds;
    call symput('num_x',_N_);
run;
```

```
%do i=1 %to &num_x;
  %let temp=%scan(&xvars,&i,%str( ));
  %if %length(&temp)>&name_len %then %do;
    %let name_len=%length(&temp);
  %end;
%end;

/*****
/ Plot X-weights for each PLS component /
*****/

%do i=1 %to %eval(&max_lv-1);

  %let j=%eval(&i+1);

  data wt_anno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
    length text $ &name_len;
    retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
    set &ds;
    text=%str(_name_); x=w&i; y=w&j;
  run;

  axis1 label=(angle=270 rotate=90 "X weight &j")
    major=(number=5) minor=none;

  axis2 label=("X-weight &i") minor=none;

  proc gplot data=&ds;
    plot w&j*w&i/anno=wt_anno vaxis=axis1 haxis=axis2 frame;
    symbol1 v=none i=none;
  run;

%end;

%mend;

%macro pltwtfrq(ds,
  plotyvar=W,
  plotxvar=f,
  max_lv=&lv,
  label=Weight);
```

## Anhang

```

/*****
/ Plots X-Weights or X-Loadings versus the frequency for /
/ spectrometric calibration data sets. /
/ Variables: /
/ DS - Data set containing the weights/loadings /
/ as variables with each observation /
/ representing the weights for a particular /
/ X-variable, which in this case is a /
/ frequency. /
/ PLOTYVAR - The name (excluding the component number) /
/ of the weight/loading variables. For /
/ example, PLOTYVAR=w if the variables to /
/ be plotted are w1, w2, w3,... /
/ PLOTXVAR - The variable name of the frequency /
/ variable. /
/ MAX_LV - Number of PLS components to be plotted /
/ LABEL - The label for the vertical axis in the /
/ plot. /
*****/
```

```
axis1 label=(angle=270 rotate=90 "&label")
```

```
major=(number=5) minor=none;
```

```
axis2 label=("Frequency") minor=none;
```

```
%let plotvars=%str( );
```

```
%do i=1 %to &max_lv;
```

```
%let plotvars=%str(&plotvars &plotyvar&i);
```

```
%end;
```

```
proc gplot data=&ds;
```

```
plot (&plotvars)*&plotxvar/overlay legend vaxis=axis1
```

```
haxis=axis2 vref=0 lvref=2 frame;
```

```
symbol1 v=none i=spline;
```

```
run;
```

```
%mend;
```

```
%macro getxload(dsoutmod,
```

```
dsxload=xloads);
```

```

/*****
```

---

```

/ Gets X-loadings p from OUTMODEL data set: /
/ 1. Gets appropriate section of OUTMODEL data set. /
/ 2. Transposes it so the p's are column vectors. /
/ 3. Renames the columns to p1 - pA, where A is the /
/ number of PLS components in the final model. /
/ Variables: /
/ DSOUTMOD - Name of the OUTMODEL data set produced /
/ by proc PLS. /
/ DSXLOAD - Name of the data set to contain the /
/ X-loadings as variables. /
/ Required Global Variable: /
/ %XVARS - Macro variable containing the names of /
/ the X-variables in a string with space /
/ delimiters. /
*****/

data &dsxload; set &dsoutmod(keep=_TYPE_ &xvars);
  if _TYPE_='PQ' then output;

proc transpose data=&dsxload out=&dsxload; run;

data &dsxload; set &dsxload;
  n=_N_;
run;

%do i=1 %to &lv;

  data &dsxload; set &dsxload;
    rename col&i=p&i;
  run;

%end;

%mend;

%macro pltxload(ds,
               max_lv=&lv);

/*****
/ Plots X-loadings for a given number of PLS components /
/ vs. those of the preceding PLS component. /
/ Variables: /

```

## Anhang

```
/      DS -      Name of the data set containing the      /
/
/      loadings as variables p1-pA, where A=LV,      /
/
/      the number of PLS components, and a      /
/
/      character variable _NAME_ containing the      /
/
/      X-variable names.      /
/
/      MAX_LV -  Number of the last PLS component to have      /
/
/      its loadings plotted.      /
/
/      Required Global Variable:      /
/
/      %XVARS -  Macro variable containing the names of      /
/
/      the X-variables in a string with space      /
/
/      delimiters.      /
/
/*****/

/*****/
/ Determine the largest label to be put on plot      /
/
/*****/

%let name_len=1;

data _NULL_; set &ds;
  call symput('num_x',_N_);
run;

%do i=1 %to &num_x;
  %let temp=%scan(&xvars,&i,%str( ));
  %if %length(&temp)>&name_len %then %do;
    %let name_len=%length(&temp);
  %end;
%end;

/*****/
/ Plot X-loadings for each PLS component      /
/
/*****/

%do i=1 %to %eval(&max_lv - 1);

  %let j=%eval(&i+1);

  data pltanno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
    length text $ &name_len;
    retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
    set &ds;
```

---

```

text=%str(_name_); x=p&i; y=p&j;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "X loading &j")
      major=(number=5) minor=none;

axis2 label=("X-loading &i") minor=none;

proc gplot data=&ds;
  plot p&j*p&i/anno=pltanno vaxis=axis1 haxis=axis2 frame;
  symbol1 v=none i=none;
run;

%end;

%mend;

%macro getyload(dsoutmod,
               dsyload=yloads);

/*****
/ Gets Y-loadings q from OUTMODEL data set:
/ 1. Gets appropriate section of OUTMODEL data set.
/ 2. Transposes it so the q's are column vectors.
/ 3. Renames the columns to q1 - qA, where A is the
/    number of latent variables in the final model.
/ Variables:
/   DSOUTMOD - Name of the OUTMODEL data set produced
/              by proc PLS.
/   DSYLOAD  - Name of the data set to contain the
/              Y-loadings as variables.
/ Required Global Variable:
/   %YVARS - Macro variable containing the names of
/            the Y-variables in a string with space
/            delimiters.
*****/

data &dsyload; set &dsoutmod(keep=_TYPE_ _LV_ &yvars);
  if _TYPE_='PQ' then output;

proc transpose data=&dsyload out=&dsyload; run;

```

## Anhang

---

```
data &dsyload; set &dsyload;
  if _NAME_='_LV_' then delete;
run;

%do i = 1 %to &lv;

  data &dsyload; set &dsyload;
    rename col&i=q&i;
  run;

%end;

%mend;

%macro plt_y_lv(dsoutmod);

  /*****
  / Plots Y-loadings for each Y-variable versus the PLS      /
  / component.                                              /
  / Variable:                                              /
  /   DSOUTMOD - The OUTMODEL data set from proc PLS.      /
  / Required Global Variable:                               /
  /   %YVARS - Macro variable containing the names of      /
  /             the Y-variables in a string with space     /
  /             delimiters.                                  /
  *****/

  data dsyload; set &dsoutmod(keep=_TYPE_ _LV_ &yvars);
    if _TYPE_='PQ' then output;

  goptions reset=symbol;

  axis1 label=(angle=270 rotate=90 'Y loading')
    major=(number=5) minor=none;
  axis2 label=('PLS Component') order=(1 to &lv by 1) minor=none;

  proc gplot data=dsyload;
    plot (&yvars)*_LV_/overlay legend vaxis=axis1 haxis=axis2
      vref=0 lvref=2 frame;
  run;

%mend;

```



```

%macro pltyload(ds,
               max_lv=&lv);

/*****
/ Plots Y-loadings for a given number of PLS components /
/ vs. those of the preceding PLS component. /
/ Variables: /
/ DS - Name of the data set containing the /
/ loadings as variables q1-qA, where A=LV, /
/ the number of PLS components, and a /
/ character variable _NAME_ containing the /
/ Y-variable names. /
/ MAX_LV - Number of the last PLS component to have /
/ its loadings plotted. /
/ Required Global Variable: /
/ %YVARS - Macro variable containing the names of /
/ the Y-variables in a string with space /
/ delimiters. /
*****/

/*****
/ Determine the largest label to be put on plot /
*****/

data _NULL_; set &ds;
  call symput('num_y',_N_);
run;

%let name_len=1;

%do i=1 %to &num_y;
  %let temp=%scan(&yvars,&i,%str( ));
  %if %length(&temp)>&name_len %then %do;
    %let name_len=%length(&temp);
  %end;
%end;

/*****
/ Plot Y-loadings for each PLS component /
*****/

```

## Anhang

---

```
%do i=1 %to %eval(&max_lv-1);

%let j=%eval(&i+1);

data pltanno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
  length text $ &name_len;
  retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
  set &ds;
  text=%str(_NAME_); x=q&i; y=q&j;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "Y loading &j")
  major=(number=5) minor=none;

axis2 label=("Y-loading &i") minor=none;

proc gplot data=&ds;
  plot q&j*q&i/anno=pltanno vaxis=axis1 haxis=axis2;
  symbol1 v=none i=none;
run;

%end;

%mend;

%macro pltxywts(dsxwts,
               dsyloads,
               norm=1,
               max_lv=&lv);

/*****
/ Plots X-weights and Y-loadings on the same axes for a
/ given number of PLS components vs. those of the
/ preceding PLS component.
/ Variables:
/   DSXWTS - Name of the data set containing the X-
/             weights as variables w1-wA, where A=LV,
/             the number of PLS components, and a
/             character variable _NAME_ containing the
/             X-variable names.
/   DSYLOADS - Name of the data set containing the Y-
/             loadings as variables q1-qA, where A=LV,
```

---

```

/          the number of PLS components, and a          /
/          character variable _NAME_ containing the     /
/          Y-variable names.                          /
/    NORM - Indicates whether to normalize the        /
/          X-weights and Y-loadings or not.          /
/          (1=Yes, 0=No)                              /
/    MAX_LV - Number of the last PLS component to have /
/          its weights plotted.                      /
/ Required Global Variables:                          /
/    %XVARS - Macro variable containing the names of  /
/          the X-variables in a string with space    /
/          delimiters.                               /
/    %YVARS - Macro variable containing the names of  /
/          the Y-variables in a string with space    /
/          delimiters.                               /
/*****/

/*****
/ Determine the largest label to be put on plot      /
/*****/

data _NULL_; set &dsxwts;
  call symput('num_x',_N_);
run;

data _NULL_; set &dsyloads;
  call symput('num_y',_N_);
run;

%let name_len=1;

%do i=1 %to &num_x;
  %let temp=%scan(&xvars,&i,%str( ));
  %if %length(&temp)>&name_len %then %do;
    %let name_len=%length(&temp);
  %end;
%end;

%let nameleny=1;

%do i=1 %to &num_y;
  %let temp=%scan(&yvars,&i,%str( ));

```

## Anhang

---

```
%if %length(&temp)>&nameleny %then %do;
  %let nameleny=%length(&temp);
%end;
%end;

%if &name_len < &nameleny %then %let name_len = &nameleny;

/*****
/  Normalize weights if desired
*****/

%if %eval(&norm) %then %do;

proc iml;
  use &dsxwts;
  read all var ("w1":"w&max_lv") into W;
  use &dsyloads;
  read all var ("q1":"q&max_lv") into Q;
  W=W#sqrt(1/W[##,]);  *** Normalize X-weights ***;
  Q=Q#sqrt(1/Q[##,]);  *** Normalize Y-loadings ***;
  w_col=("WQ1":"WQ&max_lv");
  _NAME_={&xvars};
  create dsxwts from W[colname=w_col rowname=_NAME_];
  append from W[rowname=_NAME_];
  q_col=("WQ1":"WQ&max_lv");
  _NAME_={&yvars};
  create dsyloads from Q[colname=q_col rowname=_NAME_];
  append from Q[rowname=_NAME_];
quit;

%end;

%else %do;

data dsxwts; set &dsxwts;

data dsyloads; set &dsyloads;

%end;

/*****
```

---

```

/ Plot X-weights and Y-loadings for each PLS component /
*****/

%if &name_len>&nameleny %then %do;
  data ds; set dsxwts dsyloads;
%end;
%else %do;
  data ds; set dsyloads dsxwts;
%end;

%do i=1 %to %eval(&max_lv-1);

  %let j=%eval(&i+1);

  data wt_anno;          *** Annotation Data Set for Plot ***;
  length text $ &name_len;
  retain function 'label' position '5' hsys '3' xsys '2' ysys '2' ;
  set ds;
  text=%str(_name_); x=wq&i; y=wq&j;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 "Component &j Weight")
      major=(number=5) minor=none;

axis2 label=("Component &i Weight") minor=none;

proc gplot data=ds;
  plot wq&j*wq&i/anno=wt_anno vaxis=axis1 haxis=axis2 frame
      vref=0 href=0;
  symbol1 v=none i=none;
run;

%end;

%mend;

%macro get_bpls(dsoutmod,
               dsout=bpls);

/*****
/ Gets B(PLS), the matrix of PLS regression coefficients /
/ of Y on X. For each Y, the values represent the /

```

## Anhang

---

```
/ importance of each X-variable in the modeling of the /
/ corresponding Y-variable. /
/ Variables: /
/     DSOUTMOD - Name of the OUTMODEL data set produced /
/               by proc PLS. /
/     DSOUT -   Name of the data set to contain the /
/               regression coefficients, with the /
/               variables representing columns in /
/               B(PLS), and one variable naming the /
/               X-variable for each row of B(PLS). /
/ Required Global Variables: /
/     %XVARS -   Macro variable containing the names of /
/               the X-variables in a string with space /
/               delimiters. /
/     %YVARS -   Macro variable containing the names of /
/               the Y-variables in a string with space /
/               delimiters. /
/     %NUM_Y    - Number of response variables Y. /
*****/
```

```
data est_wb; set &dsoutmod; if _TYPE_='WB' then output; run;
data est_pq; set &dsoutmod; if _TYPE_='PQ' then output; run;
```

```
proc iml;
  use est_wb;
  read all var {&xvars} into w_prime;
  read all var {_Y_} into b;
  use est_pq;
  read all var {&xvars} into p_prime;
  read all var {&yvars} into q_prime;
  W=w_prime`;
  P=p_prime`;
  Q=q_prime`;
  B_PLS = W*inv(P`*W)*diag(b)*Q`;
  b_col=('B1':"B&num_y");
  x_var={&xvars};
  create &dsout from B_PLS[colname=b_col rowname=x_var];
  append from B_PLS[rowname=x_var];
quit;
```

```
%mend;
```

---

```

%macro plt_bpls(ds);

/*****
/ Plot the PLS predictor (regression) coefficients in      /
/ B(PLS) vs. the frequency, for each response variable.  /
/ Variables:                                             /
/   DS -          Data set containing the columns of     /
/                B(PLS) as variables, as well as a      /
/                variable for the frequency.            /
/ Required Global Variable:                             /
/   %NUM_Y -      Number of response variables Y.       /
*****/

data &ds; set &ds;
  f=_n_;
run;

%let plotvars=%str( );

%do i=1 %to &num_y;
  %let plotvars=%str(&plotvars b&i);
%end;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 'Coefficient')
  major=(number=5) minor=none;
axis2 label=('Frequency') minor=none;

proc gplot data=&ds;
  plot (&plotvars)*f / overlay legend vaxis=axis1 haxis=axis2
      vref=0 lvref=2 frame;
  symbol1 v=none i=spline;
run;

%mend;

%macro get_vip(dsoutmod,
  dsvip=vip_data);

/*****
/ Calculate VIP: Variable Importance for the Projection. /
/ This represents the importance of each X-variable in  /
/ the PLS modeling of both the X- and Y-variables.     /
*****/

```

## Anhang

```
/ Variables: /
/   DSOUTMOD - Name of the OUTMODEL data set produced /
/               by proc PLS. /
/   DSVIP - Name of the data set to contain the /
/           variable named 'VIP' and the names of /
/           X-variables. /
/ Required Global Variables: /
/   %XVARS - Macro variable containing the names of /
/           the X-variables in a string with space /
/           delimiters. /
/   %YVARS - Macro variable containing the names of /
/           the Y-variables in a string with space /
/           delimiters. /
*****/

data dsxwts; set &dsoutmod(keep=_TYPE_ _LV_ &xvars);
  if _TYPE_='WB' then output;

data y_rsqr; set &dsoutmod(keep=_LV_ _TYPE_ &yvars _Y_);
  if _TYPE_='V' then output;
  drop _TYPE_;
run;

data y_rsqr; merge y_rsqr dsxwts; by _LV_;
  if _LV_=0 then delete;
run;

proc iml;
  use y_rsqr;
  read all var {_Y_} into rsqr_y;
  read all var {&xvars} into w_prime;
  A=nrow(rsqr_y);
  K=ncol(w_prime);
  W=w_prime`;
  Wnorm=W#(1/sqrt(W[##,]));
  if A > 1 then do;
    part_rsqr=rsqr_y-(0//rsqr_y[1:(A-1),]);
    tot_rsqr=rsqr_y[A,];
    vip_sq=((Wnorm##2)*part_rsqr)#(K/tot_rsqr);
    VIP=sqrt(vip_sq);
  end;
  else VIP=Wnorm#sqrt(K);
run;
```



```

x_var={&xvars};
create &dsvip from VIP[colname='VIP' rowname=x_var];
append from VIP[rowname=x_var];
quit;

%mend;

%macro plot_vip(ds);

/*****
/ Plot the VIP: Variable Importance for the Projection. /
/ Variables: /
/ DS - Data set containing the frequencies /
/ the VIP for each frequency. /
*****/

data &ds; set &ds;
f=_N_;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 'VIP')
major=(number=10) minor=none;
axis2 label=('Frequency') minor=none;

proc gplot data=&ds;
plot vip*f / overlay vaxis=axis1 haxis=axis2 vref=0.8 lvref=2
frame;
symbol1 v=none i=join;
run;

%mend;

%macro get_dmod(dsoutput,
dsdmod=dmod,
qresname=qres,
id=n);

/*****
/ Calculate the distance from each data point to the model /
/ in both the X-space (DMODX) and in the Y-space (DMODY). /
/ Variables: /

```

## Anhang

---

```
/      DSOUTPUT - OUTPUT data set from proc PLS.          /
/      DSDMOD -   Data set to contain the distances to    /
/                  the model.                            /
/      QRESNAME - Suffix of variable names for XQRES and  /
/                  YQRES assigned by the user in the     /
/                  proc PLS OUTPUT statement.           /
/      ID -      Observation identification variable      /
/                  in input data set.                   /
/ Required Global Variable:                               /
/      %LV -     Number of Latent Variables (PLS factors) /
*****/
```

```
data trn_out; set &dsoutput;
  if y&qresname ^= . then output;
run;
```

```
proc means data=trn_out noprint;
  var xqres;
  output out=outmeans n=n mean=xqres_mn;
run;
```

```
data _NULL_; set outmeans;
  call symput('num_trn',n);
  call symput('xqres_mn', xqres_mn);
run;
```

```
proc iml;
  use &dsoutput;
  read all var {x&qresname} into xqres;
  read all var {y&qresname} into yqres;
  read all var{&id} into id;
  dmodx=sqrt(xqres/&xqres_mn);

  do i=1 to nrow(xqres);
    if yqres[i]=. then
      dmodx[i]=dmodx[i]/sqrt(&num_trn/(&num_trn-&lv-1));
  end;

  dmody=sqrt(yqres*(&num_trn/(&num_trn-&lv-1)));
  dmodboth=id||dmodx||dmody;
  col={&ID DMODX DMODY};
  create &dsdmod from dmodboth[colname=col];
```

```

append from dmodboth;
quit;

%mend;

%macro cont_scr(est,
                out,
                dsout,
                obsnum,
                idvar=n,
                a=1);

/*****
/ Calculates and plots the contribution of each X-variable /
/ to an X-score for a particular observation. This is /
/ useful in diagnosing the cause of an outlying X-score. /
/ EST - Name of the OUTMODEL data set from /
/ PROC PLS containing the weights w1-wA /
/ where A=LV, the number of PLS components. /
/ OUT - Name of the OUTPUT data set containing /
/ the X-scores as variables. /
/ DSOUT - Name of the data set to be generated by /
/ the macro containing the contributions /
/ for each X-variable. /
/ OBSNUM - Number of the observation in /
/ question. /
/ IDVAR - Name of variable in the OUT data set /
/ numbering the data points. The default /
/ is N. /
/ A - PLS component associated with the /
/ X-score of interest. The default is 1. /
/ Required Global Variables: /
/ %XVARS - Macro variable containing the names of /
/ the X-variables in a string with space /
/ delimiters. /
/ %LV - Number of Latent Variables (PLS factors) /
*****/

data est; set &est;

if (_TYPE_='WB' or _TYPE_='PQ') then output;

run;

```

## Anhang

---

```
data out; set &out;
  if &idvar=&obsnum then output;
run;

proc iml;
  use est;
  read all var {&xvars} into WP;
  W=WP[1:&lv,];
  P=WP[(&lv+1):(2*&lv),];
  Wstar=W`*inv(P*W`);
  use &out;
  read all var {&xvars} into X;
  use out;
  read all var {&xvars} into x_i;
  contrib=(Wstar[,&a])` # (x_i - X[:,]);
  quantity=('contrib');
  xvar={&xvars};
  create &dsout from contrib[rowname=quantity colname=xvar];
  append from contrib[rowname=quantity];
quit;

proc transpose data=&dsout out=&dsout; run;

data &dsout; set &dsout;
  rename coll=contrib;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 'Contribution');

axis2 label=('X-variable');

proc gplot data=&dsout;
  plot contrib * _NAME_ / haxis=axis2 vaxis=axis1;
  symbol1 i=needles v=dot;
run;
quit;

%mend;

%macro cont2scr(est,
               out,
               dsout,
```

```

obsnum,
idvar=n,
a1=1,
a2=2);

/*****
/ Calculates and plots the contribution of each X-variable /
/ to a pair of X-scores for a particular observation. /
/ This is useful in diagnosing the cause of an outlying /
/ pair of X-scores. /
/ EST - Name of the OUTMODEL data set from /
/ PROC PLS containing the weights w1-wA /
/ where A=LV, the number of PLS components. /
/ OUT - Name of the OUTPUT data set containing /
/ the X-scores as variables. /
/ DSOUT - Name of the data set to be generated by /
/ the macro containing the contributions /
/ for each X-variable. /
/ OBSNUM - Number of the observation in /
/ question. /
/ IDVAR - Name of variable in the OUT data set /
/ numbering the data points. The default /
/ is N. /
/ A1 - PLS component associated with the first /
/ X-score of interest. The default is 1. /
/ A2 - PLS component associated with the second /
/ X-score of interest. The default is 2. /
/ Required Global Variables: /
/ %XVARS - Macro variable containing the names of /
/ the X-variables in a string with space /
/ delimiters. /
/ %XSCRNAME - Prefix given to X-scores when OUT= data /
/ set was defined. /
/ %LV - Number of Latent Variables (PLS factors) /
*****/

data est; set &est;
if (_TYPE_='WB' or _TYPE_='PQ') then output;
run;

data out; set &out;
if &idvar=&obsnum then output;

```

## Anhang

---

```
run;

proc iml;
  use est;
  read all var {&xvars} into WP;
  W=WP[1:&lv,];
  P=WP[(&lv+1):(2*&lv),];
  Wstar=W`*inv(P*W`);
  use &out;
  read all var {&xscrname&a1 &xscrname&a2} into T;
  read all var {&xvars} into X;
  use out;
  read all var {&xscrname&a1 &xscrname&a2} into t_i;
  read all var {&xvars} into x_i;
  delta_t1=t_i[,1]-T[:,1];
  delta_t2=t_i[,2]-T[:,2];
  sd_t1=sqrt((T[##,1]-nrow(T)*T[:,1]**2)/(nrow(T)-1));
  sd_t2=sqrt((T[##,2]-nrow(T)*T[:,2]**2)/(nrow(T)-1));
  w1star=Wstar[,&a1];
  w2star=Wstar[,&a2];
  v_sq=(delta_t1/sd_t1)**2*(w1star)`##2+
        (delta_t2/sd_t2)**2*(w2star)`##2;
  v=sqrt(v_sq);
  delta_x=x_i-X[:,];
  contrib=(v#delta_x);
  quantity=('contrib');
  xvar={&xvars};
  create &dsout from contrib[rowname=quantity colname=xvar];
  append from contrib[rowname=quantity];
quit;

proc transpose data=&dsout out=&dsout; run;

data &dsout; set &dsout;
  rename coll=contrib;
run;

axis1 label=(angle=270 rotate=90 'Contribution');

axis2 label=('X-variable');

proc gplot data=&dsout;
```

```
plot contrib * _NAME_ / haxis=axis2 vaxis=axis1;
symbol1 i=needles v=dot;
run;
quit;
```

A6: Beispiel für die SAS Befehle zur Erstellung von Boxplot Diagrammen und zum *Simulate*-Test.

```
title "Benzaldehyde";

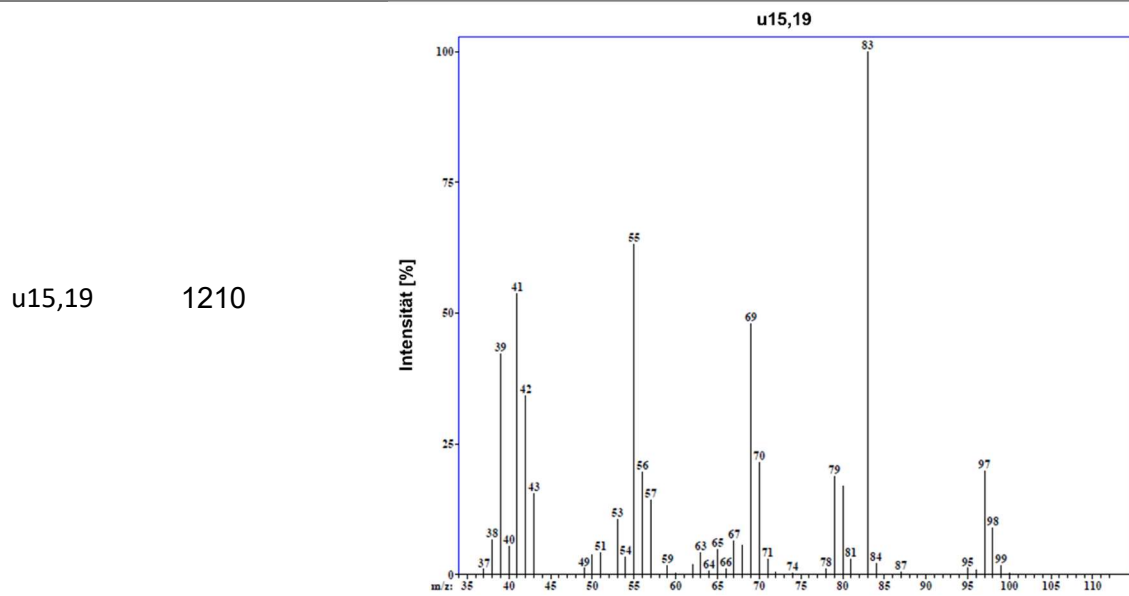
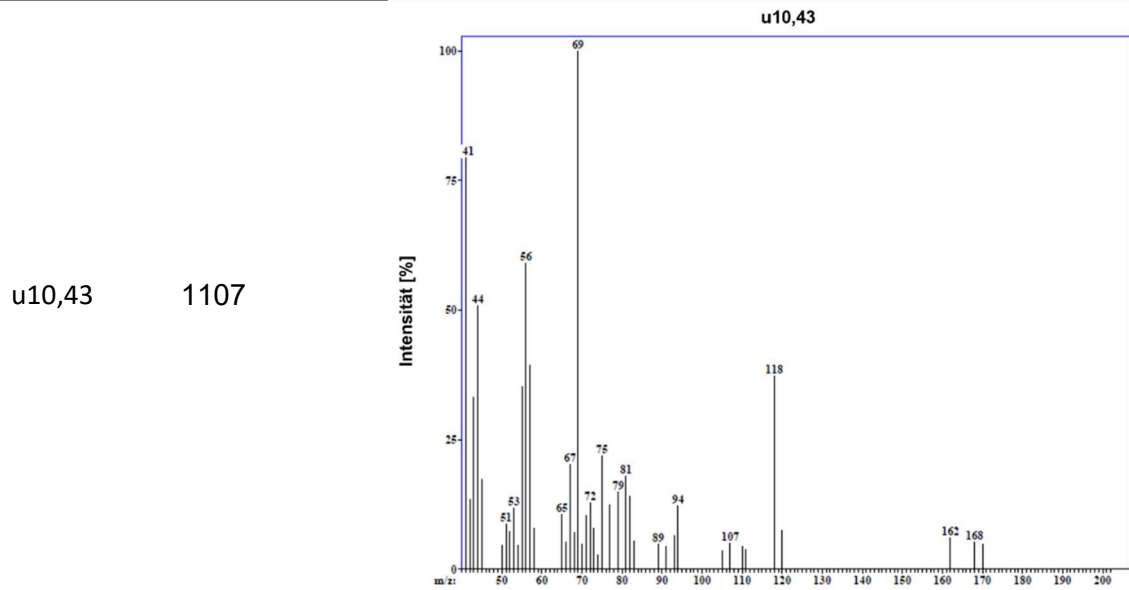
proc sgplot data = ows0611m.sti4;
vbox s1 / extreme category = bonitur group = cultivar grouporder=data
capshape=bracket;
label s1 = "amplitude";
run;

proc mixed data=ows0611m.sti4;
class bonitur;
model s1 =bonitur;
LSMEANS bonitur / A=0.05 CL ADJUST=SIMULATE(SEED=121211 ACC=0.01 EPS=0.01
REPORT CVADJUST);
run;

proc mixed data=ows0611m.sti6;
class cultivar;
model s1 = cultivar;
LSMEANS cultivar / A=0.05 CL ADJUST=SIMULATE(SEED=121211 ACC=0.01
EPS=0.01 REPORT CVADJUST);
run;
```

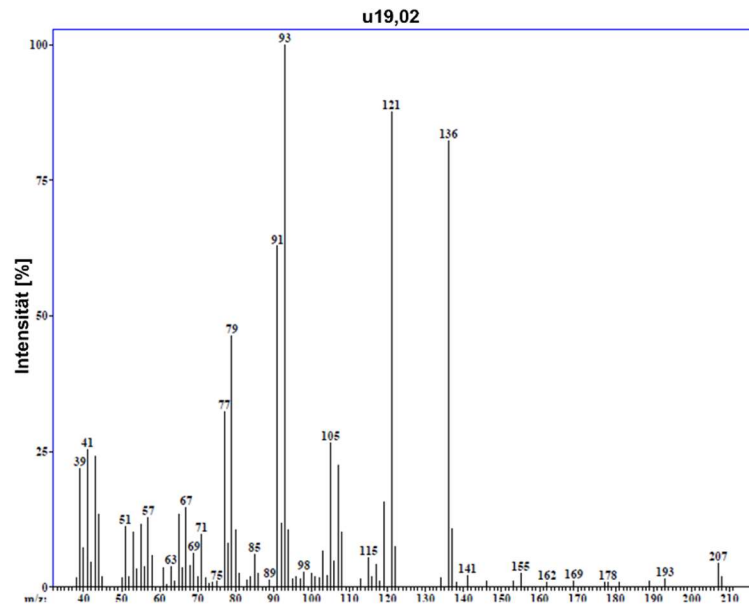
A7: Unbekannte Substanzen. Retentionsindex und Massenspektrum zur eindeutigen Identifizierung.

Substanz	Retentions- index	Massenspektrum
----------	----------------------	----------------

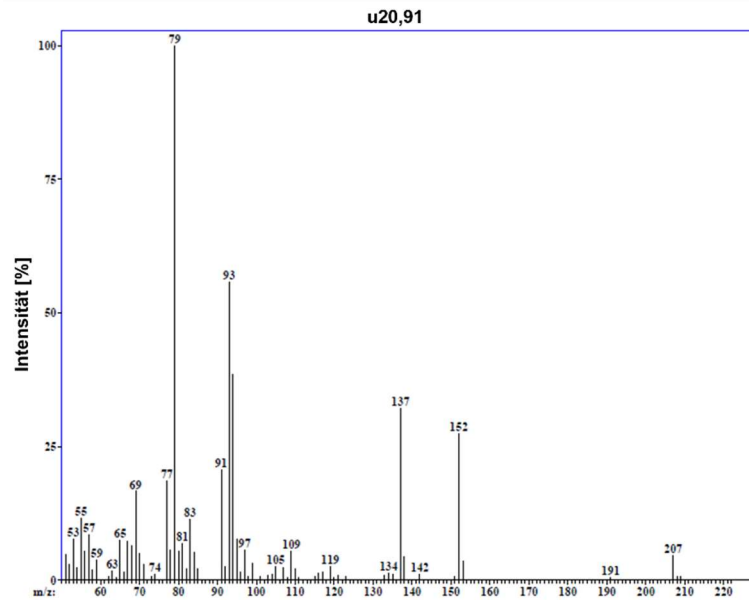




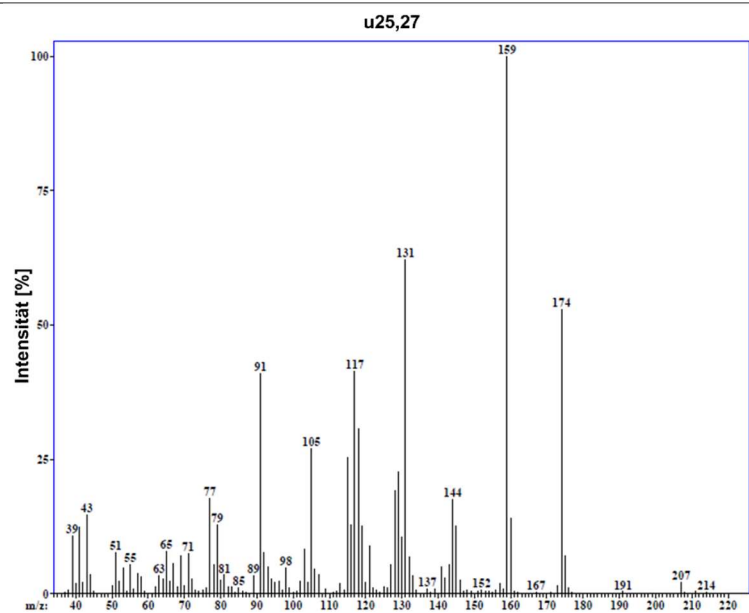
u19,02 1295



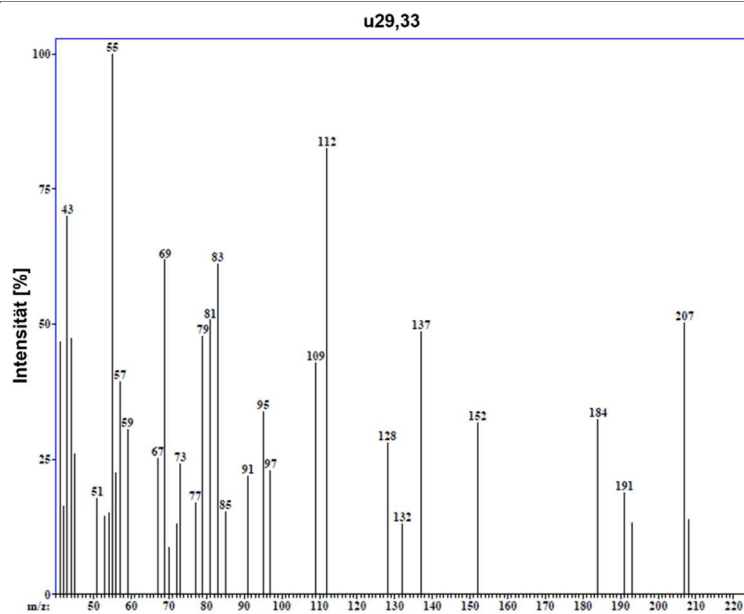
u20,91 1337



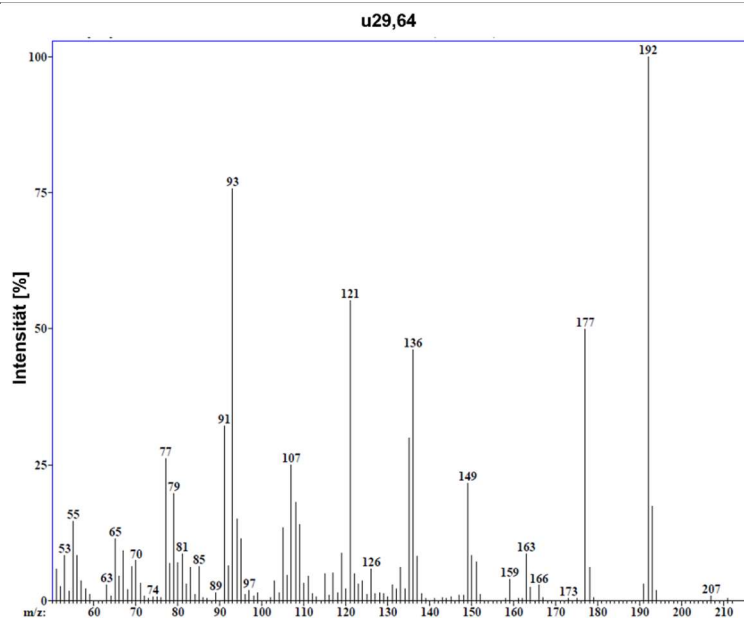
u25,27 1435



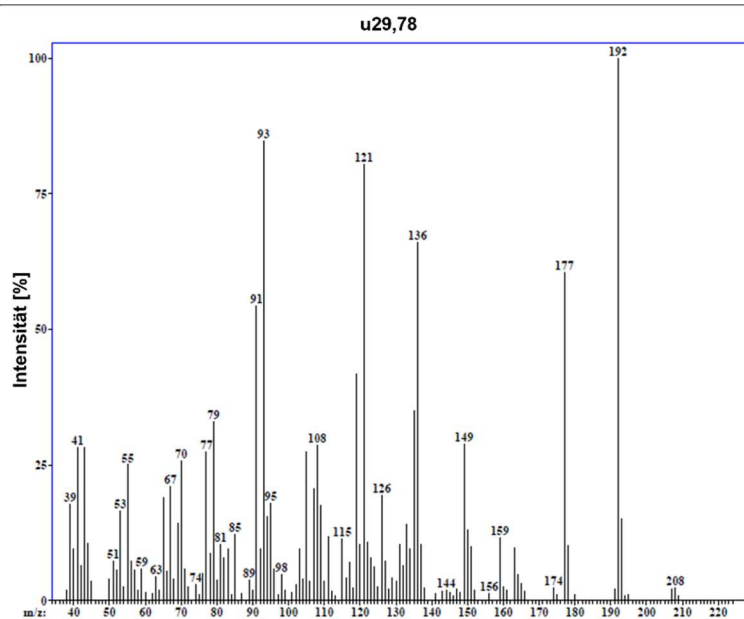
u29,33 1535

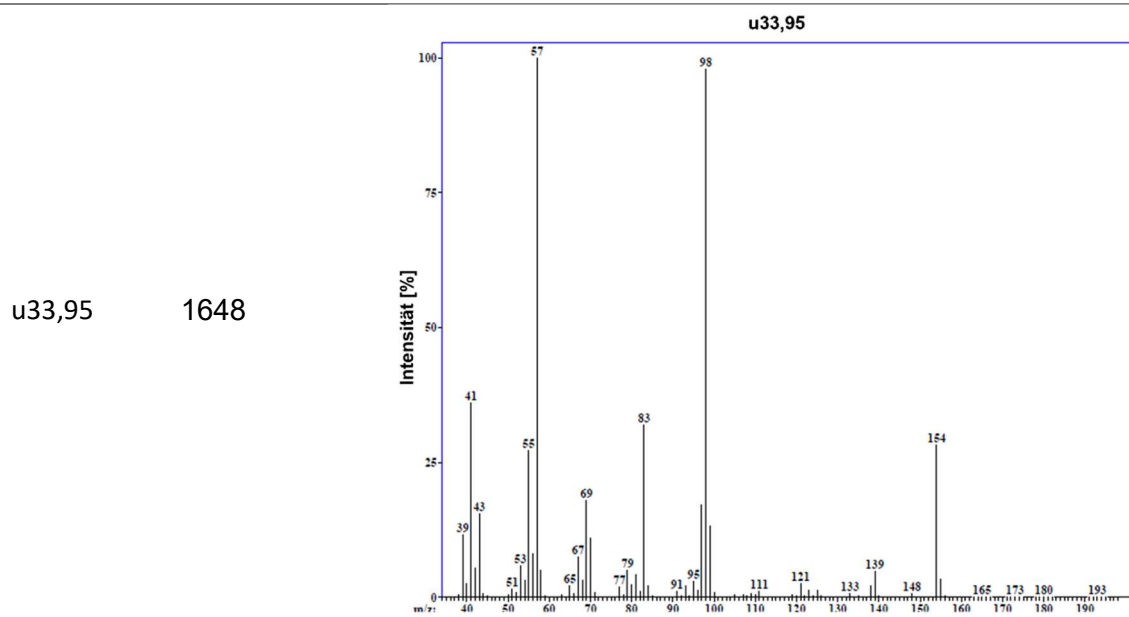
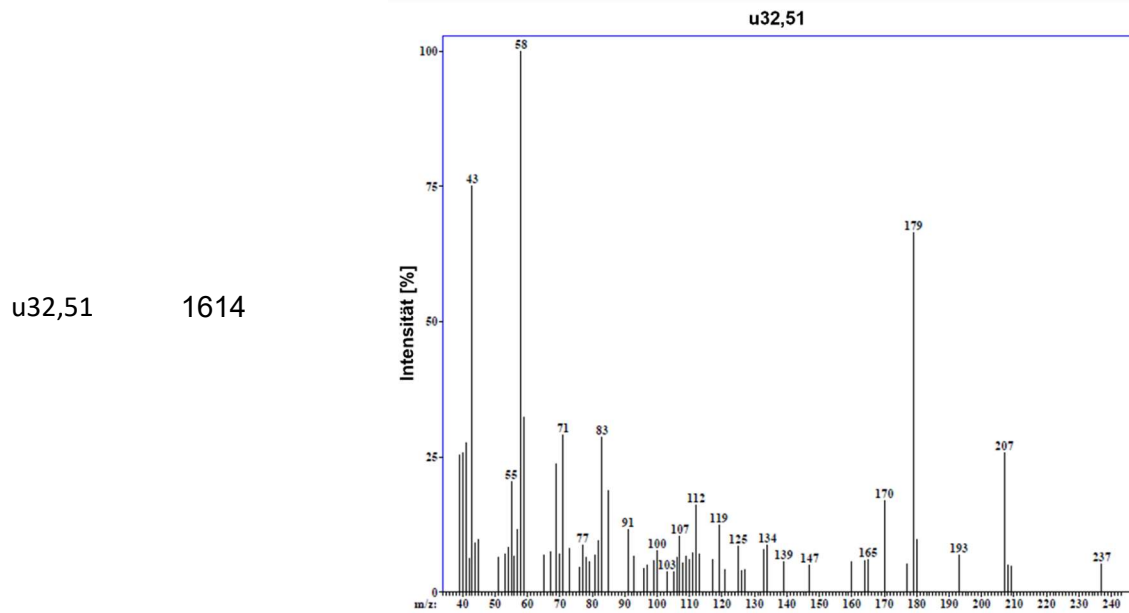
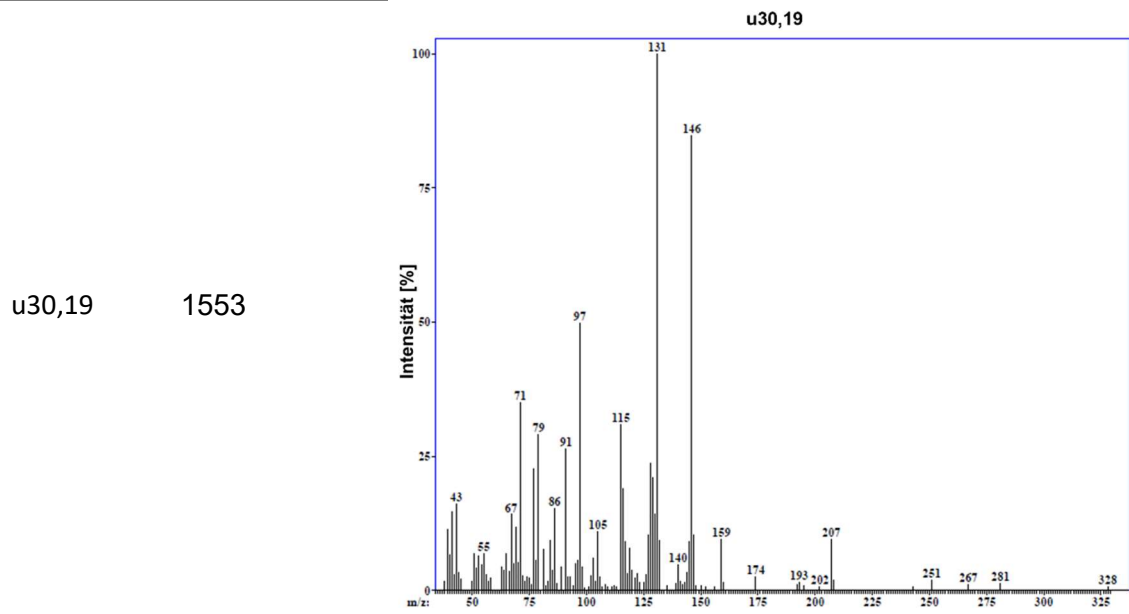


u29,64 1543

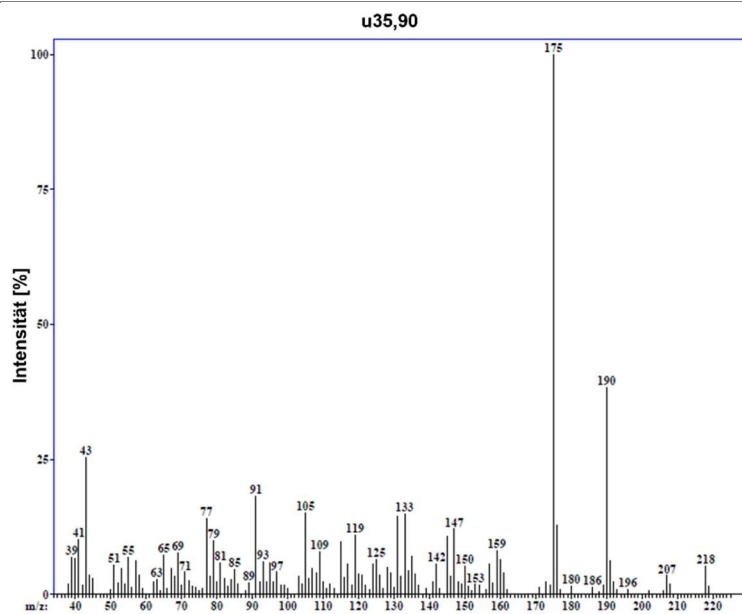


u29,78 1546

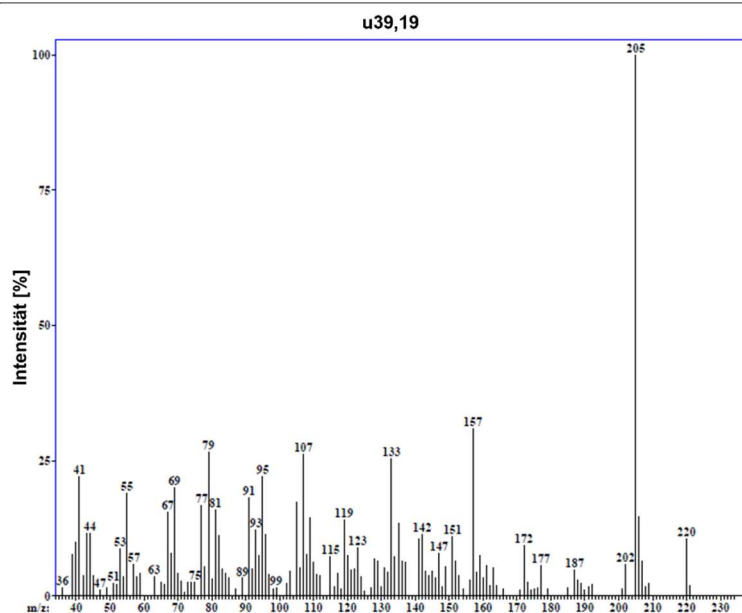




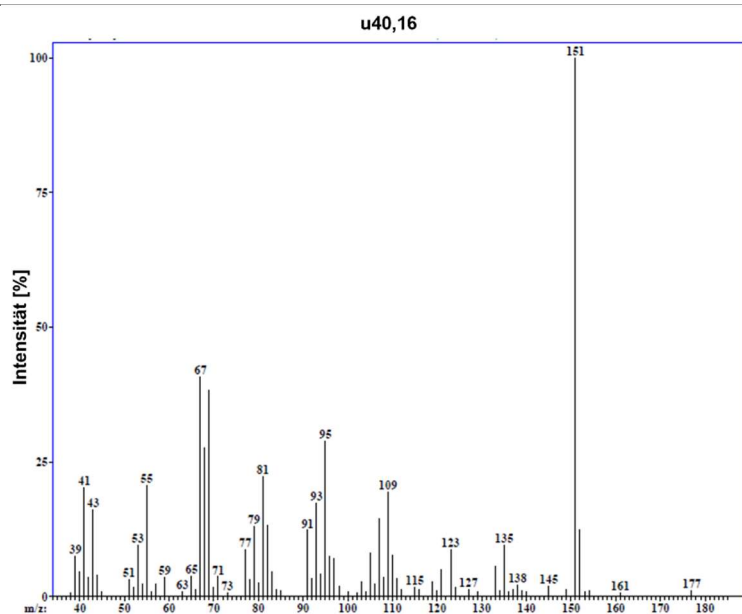
u35,90 1698



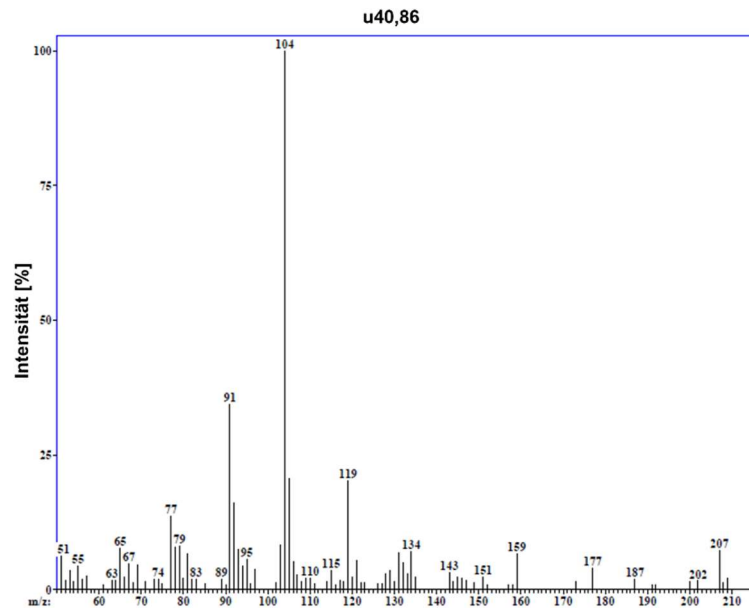
u39,19 1787



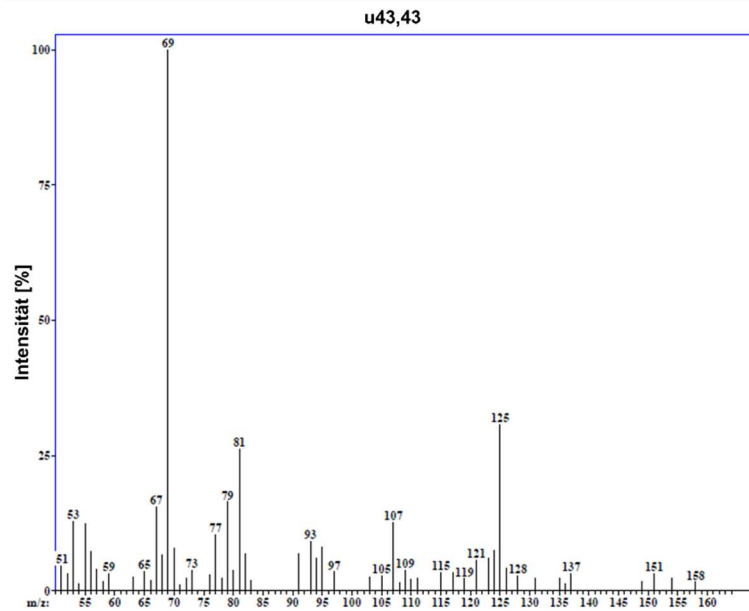
u40,61 1828



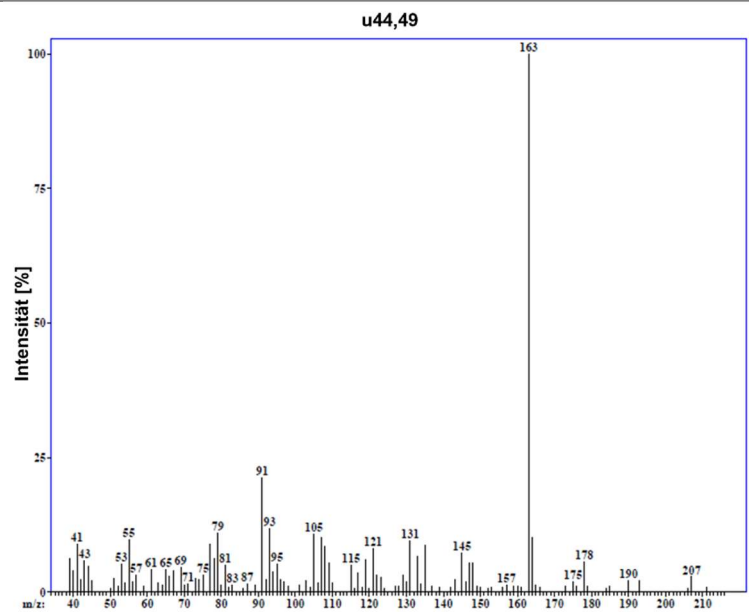
u40,86 1835



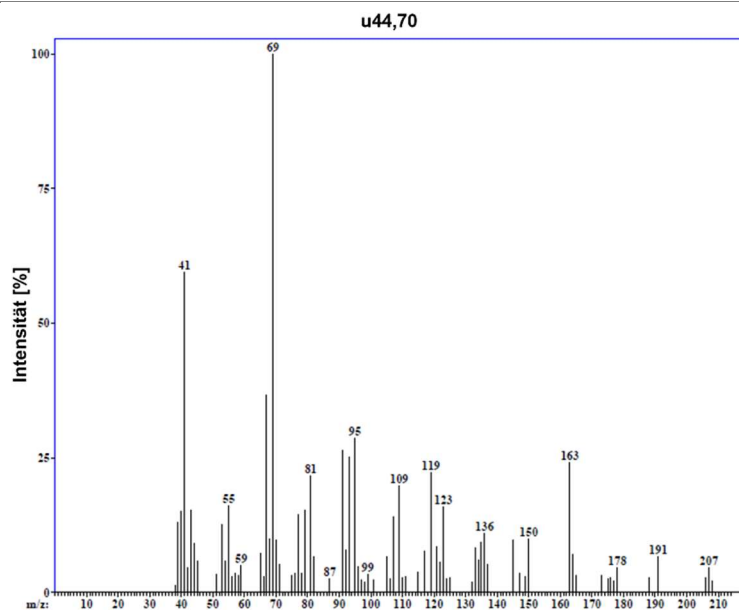
u43,43 1911



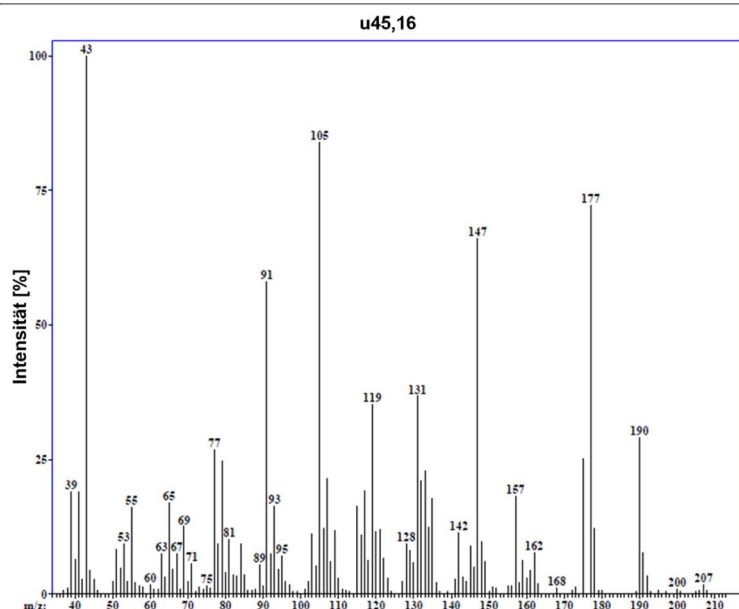
u44,49 1943



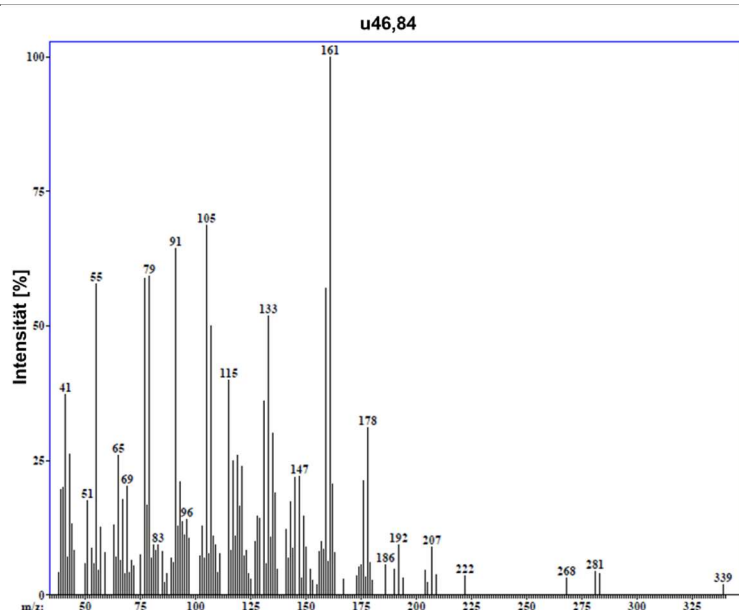
u44,70 1949



u45,16 1959



u46,84 2014



u48,38 2060

