

Aus dem Fachgebiet Allgemeine Phytopathologie und Pflanzenschutz  
des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

**Europäisches Rassen-Monitoring und Pathogenesestudien  
zur Turcicum-Blattdürre (*Exserohilum turcicum*)  
an Mais (*Zea mays* L.)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Agrarwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
Hendrik Hanekamp  
geboren in Löningen

Göttingen, im März 2016

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Andreas von Tiedemann

2. Referent: Prof. Dr. Heiko Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2016

"We're going to teach you to be rebels.  
Not with guns and daggers, but with science and technology."

Norman Borlaug

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung des Maisanbaus in Europa und Deutschland .....	1
1.2	Turcicum-Blattdürre: Das Pathosystem Mais und <i>E. turcicum</i> .....	2
1.3	Fragestellungen und Ziele der Arbeit .....	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>8</b>
2.1	Chemikalien, Medien und Lösungen .....	8
2.2	<i>Exserohilum turcicum</i> Isolate .....	11
2.2.1	Herkunft der Pilzisolat e .....	11
2.2.2	Gewinnung und Lagerung der Einsporisolat e .....	13
2.3	Untersuchungen zu Kultureigenschaften von <i>E. turcicum</i> .....	15
2.4	Rassenbestimmung .....	16
2.4.1	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen .....	16
2.4.2	Inokulation .....	17
2.4.3	Klimabedingungen ab Inokulation .....	18
2.4.4	Bonitur .....	18
2.4.5	Regionale Diversität und Komplexität der <i>E. turcicum</i> Sammlungen .....	20
2.4.6	Regionale Virulenzhäufigkeiten von <i>E. turcicum</i> in Europa .....	21
2.4.7	Anbau und Bonitur verschiedener <i>Ht</i> -Differentialsortimente im Feld .....	21
2.5	Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der untersuchten Resistenzgene .....	23
2.5.1	Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit von <i>Ht</i> -Genen .....	23
2.5.1.1	Versuchsaufbau .....	23
2.5.1.2	Bonitur .....	25
2.5.2	Spezifischer Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit von <i>Ht2</i> .....	26
2.5.2.1	Versuchsaufbau .....	26
2.5.2.2	Bonitur und Probenahme zur DNA Quantifizierung .....	27
2.5.2.3	DNA – Quantifizierung durch Real-Time-PCR .....	27
2.6	Symptomausprägung an Genotypen mit dem Resistenzgen <i>Ht2</i> .....	29

2.6.1	<i>Exserohilum turcicum</i> Isolate .....	29
2.6.2	Pflanzenmaterial .....	30
2.6.3	Inokulation und Bonitur .....	31
2.6.4	Erfassung der Sporulation .....	31
2.6.5	DNA Quantifizierung durch Real-Time-PCR .....	33
2.7	Histologische Untersuchungen zur Pathogenese von <i>E. turcicum</i> .....	33
2.7.1	<i>E. turcicum</i> Isolate und Pflanzenmaterial .....	33
2.7.2	Versuchsaufbau und Probenahme .....	34
2.7.3	Färbung mit Chlorazol Black E (CBE) .....	35
2.7.4	Mikroskopische Untersuchungen .....	36
2.8	Statistische Auswertung.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Kultur- und Lagereigenschaften von <i>E. turcicum</i> .....	40
3.2	Rassencharakterisierung europäischer <i>E. turcicum</i> Isolate .....	42
3.2.1	Isolatsammlung von <i>E. turcicum</i> der Jahre 2011 und 2012.....	42
3.2.2	Regionale Rassenspektren der Jahre 2011 und 2012.....	43
3.2.3	Regionale Diversität und Komplexität der Rassen .....	45
3.2.4	Regionale Wirksamkeit der Resistenzgene .....	49
3.2.5	Feldbonitur verschiedener <i>Ht</i> -Differentialsortimente.....	51
3.3	Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Resistenzgene gegen <i>E. turcicum</i> ...53	
3.3.1	Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Gene <i>Ht1</i> , <i>Ht2</i> , <i>Ht3</i> und <i>HtN</i> .....	53
3.3.2	Spezifischer Temperatureinfluss auf das Resistenzgen <i>Ht2</i> .....	55
3.4	Symptomausprägung von <i>E. turcicum</i> an Genotypen mit dem Resistenzgen <i>Ht2</i> 60	
3.4.1	Symptomausprägungen verschiedener <i>E. turcicum</i> Isolate auf den nahisogenen Inzuchtlinien B37 und B37- <i>Ht2</i> .....	60
3.4.2	Epidemiepotential als Grundlage der Symptombewertung von <i>E. turcicum</i> am Genotyp B37- <i>Ht2</i> .....	65
3.4.3	Korrelation der Merkmale zur <i>Ht2</i> -Symptomatik am Genotyp B37 .....	67

3.4.4	Symptome von <i>E. turcicum</i> auf den nah-isogenen Inzuchtlinien Pa91 und Pa91- <i>Ht2</i> bzw. KWS und KWS- <i>Ht2</i> .....	71
3.5	Histologische Untersuchungen zur Pathogenese von <i>E. turcicum</i> an Mais .....	77
3.5.1	Infektionsprozess von <i>E. turcicum</i> an Mais .....	77
3.5.2	Vergleichende Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen .....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1	Kultur- und Lagereigenschaften von <i>E. turcicum</i> .....	88
4.2	Rassencharakterisierung europäischer <i>E. turcicum</i> Isolate .....	89
4.3	Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Resistenzgene .....	108
4.4	<i>Ht2</i> Symptomatik und Epidemiepotential.....	111
4.5	Histologische Untersuchungen.....	114
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>134</b>
<b>Danksagung .....</b>		<b>146</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>		<b>147</b>
<b>Lebenslauf.....</b>		<b>148</b>

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d. h.	das heißt
dpi	Tage nach Inokulation (days past inoculation)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
ha	Hektar
M	molare Masse
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
RPM	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunde
TM	Trockenmasse
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
+/- Stbw	+/- Standardabweichung

## 1 Einleitung

### 1.1 Bedeutung des Maisanbaus in Europa und Deutschland

Mais (*Zea mays* L.) wurde in Europa (EU-28) im Jahr 2014 auf einer Fläche von etwa 15,7 Mio. ha angebaut und stellt damit nach Weizen flächenmäßig die zweitwichtigste Fruchtart dar. Die Maisfläche in Europa wurde 2014 zu 60% für die Körnermaiserzeugung und zu 40% zur Produktion von Silomais genutzt. Der Körnermaisbau ist auf die südlichen Maisanbauregionen in Südwestfrankreich, Ungarn und Italien konzentriert, wohingegen knapp 60% der europäischen Silomaisfläche auf Deutschland und die nördlichen Regionen in Frankreich entfallen (EUROSTAT, 2016). Aufgrund des hohen Temperaturbedarfs der ersten wenig kältetoleranten Sorten etablierte sich in den 1950er Jahren zunächst nur in den warmen südlichen Regionen ein nennenswerter Maisanbau. Sortenbezeichnung wie „Inntaler Mais“, „Badener Mais“ oder „Rheintaler Mais“ belegen die historische Bedeutung der Maisnutzung in den heute durch intensiven Maisanbau gekennzeichneten Regionen. Insbesondere die Regionen Südwestfrankreich, Italien, die Oststeiermark und die Oberrheinregion, aber auch nördliche Küstenregionen, wie z. B. in den Niederlanden sind durch sehr enge Fruchtfolgen von zum Teil über 50% Mais gekennzeichnet. Darüber hinaus findet der Maisanbau in den warm-trockenen südlichen Regionen vermehrt unter dem Einsatz von Beregnung statt (Meissle et al., 2010; WIFO, 2015; AGPM, 2016)

Als wichtige Einflussfaktoren auf die regional verschiedenen Nutzungsrichtungen sind vor allem die vorherrschenden Temperaturen und die Niederschlagsmengen zu nennen. Generell werden die kühl-nassen Bedingungen in den nordwestlichen Regionen Europas vorwiegend für die Silomaiserzeugung und die warm-trockenen südlichen Regionen verstärkt zur Körnermaiserzeugung genutzt (Meissle et al., 2010). Darüber hinaus ist die Möglichkeit zur innerbetrieblichen Verwendung für die Wahl der Nutzungsrichtung von ebenso großer Bedeutung. Insbesondere in der Wiederkäuerfütterung in den nördlichen Küstenregionen spielt Silomais zur direkten Verwertung als energiereiches Futtermittel eine wichtige Rolle. Körnermais wird zum überwiegenden Teil als Futtermittel in der Schweine- und Geflügelhaltung verwendet, wobei Körnermais nicht an eine innerbetriebliche Verwertung gebunden ist, sondern oft wie Getreide als Marktfrucht vermarktet wird (Weiss, 2002).

Neben der Nutzung als Futtermittel wird Mais aufgrund der hohen Biomasseerträge bevorzugt auch als Energiepflanze in der Biogaserzeugung verwendet. Durch Vorgaben der Europäischen Union zur Förderung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energiequellen (Anonymus 1, 2001) kam es daraufhin in der EU zu einer Ausweitung der Silomaisfläche um etwa 25% (EUROSTAT, 2016). Die Umsetzung dieser Vorgaben in nationales Recht

erfolgte in Deutschland durch das *Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien* (Erneuerbare-Energien-Gesetz, EEG). Jedoch erst mit der Novellierung des EEGs im Jahr 2004 wurde die Attraktivität der Nutzung von Biomasse zur Strom- bzw. Gaserzeugung deutlich erhöht. Im Rahmen dieser Novellierung wurde in Deutschland ein Bonus eingeführt, der speziell den Einsatz nachwachsender Rohstoffe (NawaRo-Bonus) finanziell fördert (Anonymus 2, 2004). Den Erzeugern von Energie aus Biomasse wurden mit dieser Novellierung feste Vergütungssätze für 20 Jahre garantiert. Nach Einführung des EEGs hat die Anbaufläche von Mais in Deutschland zwischen 2000 und 2014 um etwa 1 Mio. ha bzw. 70% zugenommen (DESTATIS, 2016). Der in Europa verzeichnete Anstieg der Maisfläche ist demnach zum überwiegenden Teil auf die Anbauausweitung in Deutschland zurückzuführen.

Der beschriebene Anstieg des Maisanbaus in Verbindung mit hohen Anbauintensitäten kann als Ursache für ein höheres Aufkommen von Blattkrankheiten im Mais in den vergangenen Jahren angesehen werden (Imgraben, 2002). Die ertragsrelevanteste Blattkrankheit im Mais ist die Turcicum-Blattdürre, die durch den Pilz *Exserohilum turcicum* hervorgerufen wird. Im Folgenden werden der Erreger, dessen Bedeutung und die Bekämpfungsmöglichkeiten näher erläutert.

## 1.2 Turcicum-Blattdürre: Das Pathosystem Mais und *E. turcicum*

Der Ascomycet *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs, anamorph *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs ist der Erreger der Turcicum-Blattdürre an Mais (engl. Northern corn leaf blight). Die Turcicum-Blattdürre ist in Maisanbaugebieten weltweit sowohl in tropischen als auch in gemäßigten Regionen als bedeutende Blattkrankheit bekannt (Welz, 1998). Die Symptome beginnen meist an den unteren Bereichen der Pflanze auf den Blattspreiten mit grau-grünen, länglich-ovalen Läsionen mit einer Größe von 2 bis 3 cm. Im weiteren Krankheitsverlauf dehnen sich die Läsionen auf 15 bis 20 cm aus, um schließlich zu großflächigen braunen Nekrosen zu verschmelzen. Dies führt zum Absterben großer Teile der Blattfläche. Dunkle, grau-schwarze Zonen in den Läsionen sind ein Indikator für Sporulation. Die Sporen sind oliv-grau, spindelförmig und drei- bis achtfach septiert. Das eindeutige Charakteristikum der Sporen von *E. turcicum* ist das herausragende Hilum der bis zu 120 µm langen Konidien (Abbildung 2). Die Sporen werden durch Wind und Regenspritzer innerhalb des Bestandes, aber auch über größere Distanzen in andere Bestände verbreitet und können so zur epidemischen Ausbreitung beitragen. Temperaturen zwischen 18° und 25°C in Verbindung mit Nebel- oder Tauphasen von mehreren Stunden sind Voraussetzung sowohl für eine optimale Infektion als auch für die Sporenbildung (Carson,

1999). Die Überwinterung des Erregers erfolgt als Spore oder Myzel an bzw. in Pflanzenresten, die im folgenden Jahr als Inokulum dienen. Bei kühlen Temperaturen zum Ende der Vegetationsperiode kommt es darüber hinaus zur Bildung von Chlamydosporen als Überdauerungsform (Levy, 1984). Die Beseitigung von Pflanzenresten durch entsprechende Bodenbearbeitung kann somit als wirksame vorbeugende Maßnahme zur Reduktion des Inokulums im Folgejahr dienen. Der Lebenszyklus von *E. turcicum* ist in Abbildung 1 dargestellt.

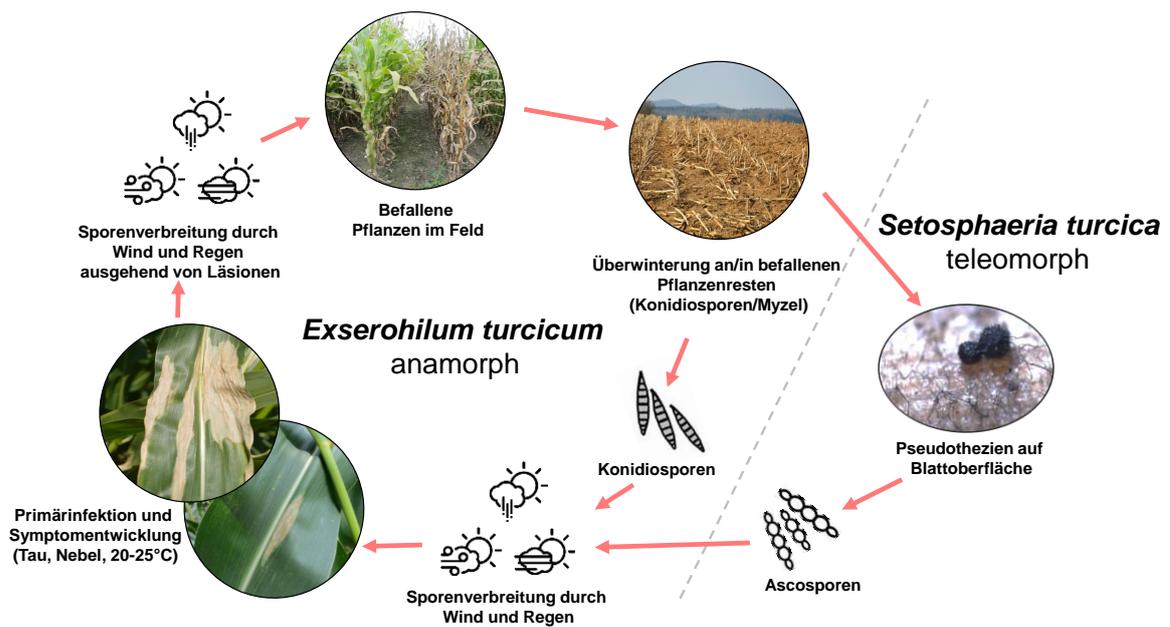


Abb. 1: Lebenszyklus von *E. turcicum* dem Erreger der Turcicum-Blattdürre an Mais



Abb. 2: (A) Konidiosporen von *E. turcicum*, mehrfach septiert mit herausragendem Hilum (h); (B) Konidienträger (k) mit Konidiosporen (s) auf Maisblatt

Ertragsausfälle bzw. Ertragsreduktionen sind vor allem eine Folge der verringerten photosynthetisch aktiven Blattfläche. Darüber hinaus kann starker Befall zu hohen Trockensubstanzgehalten in der Maispflanze führen und somit die Futterqualität der Maissilage herabsetzen (Weiss, 2002). Wenn es zu frühem Befall auf anfälligen Sorten unter günstigen Bedingungen für den Pilz kommt, sind Ertragsverluste von über 60% bis hin zu Totalausfällen dokumentiert (Raymundo et al., 1981; Bowen & Pedersen, 1988). Tritt der Befall hingegen erst später in der Vegetationsperiode auf, d. h. nach der Blüte, sind die Auswirkungen auf den Ertrag deutlich reduziert. Levy & Leonard (1990) konnten in Versuchen in den USA zeigen, dass je 10% Befallsstärke etwa 4% Kernertragsverluste zur Folge haben

In den Maisanbauregionen der USA tritt die Turcicum-Blattdürre bereits seit den 1950er Jahren immer wieder in Form von Epidemien auf. In dokumentierten Fällen werden vor allem feuchte und milde Bedingungen in den frühen Sommermonaten in Verbindung mit großflächigem Anbau anfälliger Sorten als Ursache für die Entstehung von Turcicum-Epidemien genannt. Epidemien sind für die Turcicum-Blattdürre in den 1950er und 1960er Jahren im nördlichen Wisconsin und in den 1980er Jahren in North Carolina an der Ostküste dokumentiert. In den 1990er Jahren trat *E. turcicum* auch im südlichen Texas epidemisch auf und verursachte in anfälligen Sorten Ertragsverluste von bis zu 50%, wohingegen resistente Sorten kaum Ertragsverluste aufwiesen (Meredith, 1966; Leonard & Leath, 1986; Krausz et al., 1993).

In Europa nimmt seit Anfang der 1990er Jahre die Bedeutung der Turcicum-Blattdürre zu. So trat *E. turcicum* zu Beginn der 1990er Jahre in der Schweiz und 1995 vor allem in Österreich in epidemischer Form auf. Im Jahr 1995 ist *E. turcicum* erstmalig auch in Deutschland im Rheintal in einem Maisbestand zur Saatgutvermehrung nachgewiesen worden. In der Region Südwestfrankreich trat die Turcicum-Blattdürre bereits vor 1990 gelegentlich auf (Welz et al., 1996; Welz, 1998). Im Jahr 2002 ist erstmals ein epidemisches Auftreten der Turcicum-Blattdürre in der Oberrheinregion beschrieben, wobei auch in diesem Fall neben den Wetterbedingungen anfällige Sorten als Hauptursache für das starke Auftreten genannt wurden (Imgraben, 2002). In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass resistente bzw. weniger anfällige Sorten in den meisten Fällen in der Lage sind, Ertragsverluste vollständig zu verhindern oder zumindest deutlich zu reduzieren (Raymundo et al., 1981; Pataky, 1992; Pataky & Ledencan, 2006). Die beschriebenen Fälle belegen, dass der Einsatz resistenter Sorten sowohl unter ökologischen als auch unter ökonomischen Gesichtspunkten die effektivste Methode zur Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre im Mais darstellt.

Seit 2014 sind in Deutschland zwei Fungizide für die Anwendung im Mais gegen die Turcicum-Blattdürre zugelassen (BVL, 2016). In einer Meta-Analyse, die einen Zeitraum von acht Jahren im Corn-Belt der USA berücksichtigt, konnte gezeigt werden, dass durch den

Anbau resistenter bzw. toleranter Maissorten der Einsatz von Fungiziden unter ökonomischen Gesichtspunkten in den meisten Fällen nicht gerechtfertigt ist (Paul et al., 2011). Dennoch unterstreicht die erstmalige Zulassung von Fungiziden gegen die Turcicum-Blattdürre dessen gestiegene Bedeutung in Deutschland.

Grundsätzlich gibt es zwei Formen der Resistenz gegen *E. turcicum* im Mais. Die quantitative, rassenunspezifische Resistenz wird durch viele Gene (polygen) vererbt und wird als dauerhaft wirksam beschrieben. Im Pathosystem Mais – *E. turcicum* sind in vielen Genotypen quantitative Resistenzen nachgewiesen (Freymark, 1993; Dingerdissen et al., 1996; Welz et al., 1999; Chung et al., 2010). Die Eigenschaft der polygenen Vererbung ist einerseits ein Vorteil für die Dauer der Wirksamkeit, andererseits stellt diese Eigenschaft eine Herausforderung für eine gezielte Nutzung in der Pflanzenzüchtung dar (Becker, 1993). Die qualitative, rassenspezifische Resistenz wird durch ein (monogen) oder sehr wenige Gene vererbt. Dadurch ist sie einerseits relativ einfach züchterisch zu nutzen, andererseits besteht die Gefahr der Entstehung virulenter Rassen, die in der Lage sind, diese Resistenz zu überwinden. Die Wirkungsdauer der qualitativen Resistenz wird deshalb im Vergleich zur quantitativen Resistenz als kurzweilig beschrieben. Das Konzept der qualitativen Resistenz wurde erstmals von Flor (1955) mit monogenen Resistenzen in Flachs gegen Rost beschrieben. Basierend auf der Beschreibung nach Flor (1955) steht bei monogen vererbter Resistenz jedem Resistenzgen im Wirt ein korrespondierendes Avirulenzgen im Pathogen gegenüber. Die vom Avirulenzgen codierten Elicitoren werden durch die vom korrespondierenden Resistenzgen codierten Rezeptoren erkannt, woraufhin Abwehrmechanismen im Wirt eingeleitet werden. In diesem Fall ist das Pathogen avirulent. Bei einer Defektmutation im Avirulenzgen wird daraufhin kein Elicitor synthetisiert und eine Erkennung durch den Rezeptor im Wirt ist nicht mehr möglich. In diesem Fall ist das Pathogen virulent und das Resistenzgen unwirksam. Aufgrund der einzelnen korrespondierenden Gene wird dieses Modell als Gen-für-Gen-Konzept beschrieben und ist in vielen Pathosystemen bekannt (Agrios, 2008).

Gegen die Turcicum-Blattdürre im Mais sind acht monogene Resistenzen als *Ht*-Gene beschrieben (*Ht* für die ehemalige Bezeichnung: *Helminthosporium turcicum*). Vier dieser *Ht*-Gene (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN*) wurden bereits intensiv vor allem in den USA in der Maiszüchtung verwendet. Informationen zur Nutzung der *Ht*-Gene in europäischen Maiszüchtungsprogrammen stehen bisher nicht öffentlich zur Verfügung. Für die vier weiteren Resistenzgene *ht4*, *Htm1*, *Htp* und *rt* (Carson, 1995; Robbins & Warren, 1993; Ogliari et al., 2007) ist bisher eine züchterische Nutzung nicht dokumentiert. Das Gen *Ht1* wurde von Hooker (1963) zeitgleich in der amerikanischen Linie GE440 und der peruanischen Popcornsorte „Ladyfinger“ in den USA beschrieben. Hooker beschrieb die Resistenzreaktion durch *Ht1* als „chlorotic-

lesion-resistance“, also als chlorotische Nekrosen mit deutlich verminderter Sporulation. Das Gen *Ht2* wurde ebenfalls durch Hooker (1977) in der australischen Linie NN14B beschrieben. Dieses Gen ist auch durch chlorotische Reaktionen charakterisiert, allerdings mit deutlich größeren Anteilen an Nekrosen, verglichen mit *Ht1*. Die Resistenzreaktionen des Gens *Ht3* sind ebenfalls durch chlorotische Nekrosen gekennzeichnet und unterscheiden sich nicht wesentlich von *Ht2*. Das Gen *Ht3* wurde von Hooker (1981) beschrieben und ist das einzige *Ht*-Gen, das aus der verwandten Art *Tripsacum floridanum* in Mais übertragen wurde (Welz & Geiger, 2000). Grundsätzlich verschieden zu den Genen *Ht1*, *Ht2* und *Ht3* ist das von Gevers (1975) beschriebene Gen *HtN*. Es reagiert nicht durch Chlorosen als Resistenzreaktion, sondern ist durch eine Verlängerung der Inkubationszeit und der Reduktion der Anzahl an Läsionen beschrieben (Raymundo et al., 1981).

Für einige *Ht*-Gene konnten ein Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit und somit veränderte Resistenzreaktionen nachgewiesen werden (Leonard et al., 1989). Die vier *Ht*-Gene (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN*) wurden insbesondere in den USA, aber auch in anderen Maisanbauregionen der Welt in Maiszuchtprogrammen genutzt, um die Resistenz der Sorten zu erhöhen. Die *Ht*-Gene wurden in mehrere Linien über Rückkreuzungsschritte eingebracht, um mit Hilfe von isogenen Differentialsortiments Virulenzuntersuchungen durchführen zu können (Welz & Geiger, 2000). Die Kenntnis über das Auftreten von virulenten Rassen in einer Pathogenpopulation ist eine Voraussetzung für die effektive Nutzung von entsprechenden Resistenzgenen in der Resistenzzüchtung. Umfangreiche Untersuchungen zu Virulenzspektralen von *E. turcicum* in den Maisanbauregionen konnten zeigen, dass heute für jedes der Resistenzgene virulente Rassen in vielen Anbaugebieten bekannt sind und die Resistenzgene damit regional deutlich an Wirkung verloren haben (Bigirwa et al., 1993; Welz & Geiger, 1995; Ferguson & Carson, 2007). Eine flächendeckende Untersuchung zum Virulenzspektrum von *E. turcicum* in den wichtigen Maisanbauregionen in Zentral- und Westeuropa wurde bisher nicht durchgeführt. Es liegen also bisher in Bezug auf das Auftreten von Virulenzen gegenüber den genannten *Ht*-Genen in Europa keine Erkenntnisse vor.

### 1.3 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Wissenslücke in Bezug auf das Auftreten von virulenten Rassen von *E. turcicum* in den wichtigen europäischen Maisanbaugebieten zu schließen. Durch die Zusammenarbeit mit der Abteilung Mais der *Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e. V. (GFPI)* sollte zunächst die Erstellung einer umfangreichen, repräsentativen Isolatsammlung realisiert werden. Das Hauptziel bestand darin, durch Virulenzanalysen auf der Erregerseite konkrete Aussagen

über die Wirksamkeit der *Ht*-Gene an den verschiedenen Standorten zu treffen und dadurch Impulse für eine gezielte und effektive Resistenzzüchtung im Mais gegen die Turcicum-Blattdürre zu geben. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse dazu dienen, standortangepasste Anbauempfehlungen für Sorten mit entsprechenden *Ht*-Genen aussprechen zu können. Die Virulenzanalysen sollten mit Hilfe eines Differentialsortiments aus nah-isogenen Inzuchtlinien unter kontrollierten Bedingungen stattfinden. Durch den Anbau von Differentialsortimenten im Feld an verschiedenen Standorten der untersuchten Regionen sollten schließlich die Ergebnisse der Virulenzanalysen aus dem Gewächshaus validiert werden.

In einem weiteren Schwerpunkt sollte in Klimakammerversuchen überprüft werden, wie die untersuchten *Ht*-Gene in isogenen Maislinien durch verschiedene Temperaturen in ihrer Wirksamkeit beeinflusst werden. Aufgrund des bekannten Temperatureinflusses auf die Wirksamkeit sollte insbesondere das Resistenzgen *Ht2* Gegenstand vertiefender Untersuchungen sein. Vor dem Hintergrund der sehr unterschiedlichen Temperaturbedingungen in den europäischen Maisanbaugebieten können diese Ergebnisse zu einer effektiveren standortangepassten Nutzung der entsprechenden *Ht*-Gene beitragen.

Zudem sollte anhand mikroskopischer Studien die Pathogenese von *E. turcicum* in Maisblättern verfolgt und die Wirkung der untersuchten Resistenzgene zytologisch analysiert werden. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der genetischen Interaktion zwischen *E. turcicum* und Mais im Kontext von kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Medien und Lösungen

#### Chemikalien

Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Chlorazol Black E (CBE)	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Czapek Dox	Duchefa Biochemie, Haarlem NL
Essigsäure >99%	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Ethanol >96%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung 36%	Merck, Darmstadt
Gemüsesaft	Granini Deutschland, Nieder-Olm
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin 97%	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem, Darmstadt
Kaliumnitrat (KNO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Midori Green	Nippon Genetics, Düren
Milchsäure 80%	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorit (NaOCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Polyethermodifiziertes Trisiloxan (Silwet Gold®)	Spiess Urania, Hamburg
Rifampicin	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit,	Bioline Reagents, UK
Streptomycinsulfat	Duchefa Biochemie, Haarlem NL

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	AppliChem, Darmstadt
Trishydroxyaminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt

### Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Antibiotika wurden ggf. nach Abkühlung auf 55°C zugesetzt und die Festmedien in Polystyrol Petrischalen (Fa. Sarstedt) mit 9 cm Durchmesser ausplattiert.

Festmedien:

#### Synthetischer nährstoffarmer Agar SNA

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCL	0,5 g
Glucose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
Agar-Agar	15 g
Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest.	Ad 1000 ml

#### V8 Gemüsesaftagar

CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar-Agar	15 g
Gemüsesaft V8	100 ml
Aqua bidest.	900 ml
Streptomycinsulfat	0,2 g
Rifampicin	0,04 g

Flüssigmedium:

Czapek Dox

Czapek Dox	33,4 g
Aqua bidest	Ad 1000 ml

**Puffer und Lösungen**

TBE-Puffer (10x)

TBE-Puffer (10x)	100 ml
Aqua bidest	Ad 1900 ml

TE-Puffer, pH: 8

TRIS	0,1 M
EDTA	10 mM

AFE-Fixierungslösung (100 ml)

Ethanol (70%)	90 ml
Formaldehyd-Lösung (36%)	5 ml
Essigsäure (99%)	5 ml

2M Kaliumhydroxid Lauge

Kaliumhydroxid KOH	56,2 g
Aqua bidest.	Ad 500 ml

Chlorazol Black E (CBE) – Färbelösung (100 ml)

Chlorazol Black E	0,03 g (0,03% [w/v])
Aqua bidest.	33,3 ml
Milchsäure (80%)	33,3 ml

Glycerin (97%)	33,3 ml
----------------	---------

Beim Ansetzen der Färbelösung ist es vorteilhaft, das Chlorazol Black E (CBE) Pulver zunächst in Wasser aufzulösen und dann die beiden weiteren Komponenten hinzuzufügen. Beim Umgang mit CBE sollten aufgrund der Toxizität unbedingt Schutzmaßnahmen, wie Laborhandschuhe, Kittel und Schutzbrille beachtet werden.

### **Trenngel**

#### Agarosegel (1%)

Agarose	1 g
TBE Puffer (0,5x)	100 ml
Midori Green	5 µl

## **2.2 *Exserohilum turcicum* Isolate**

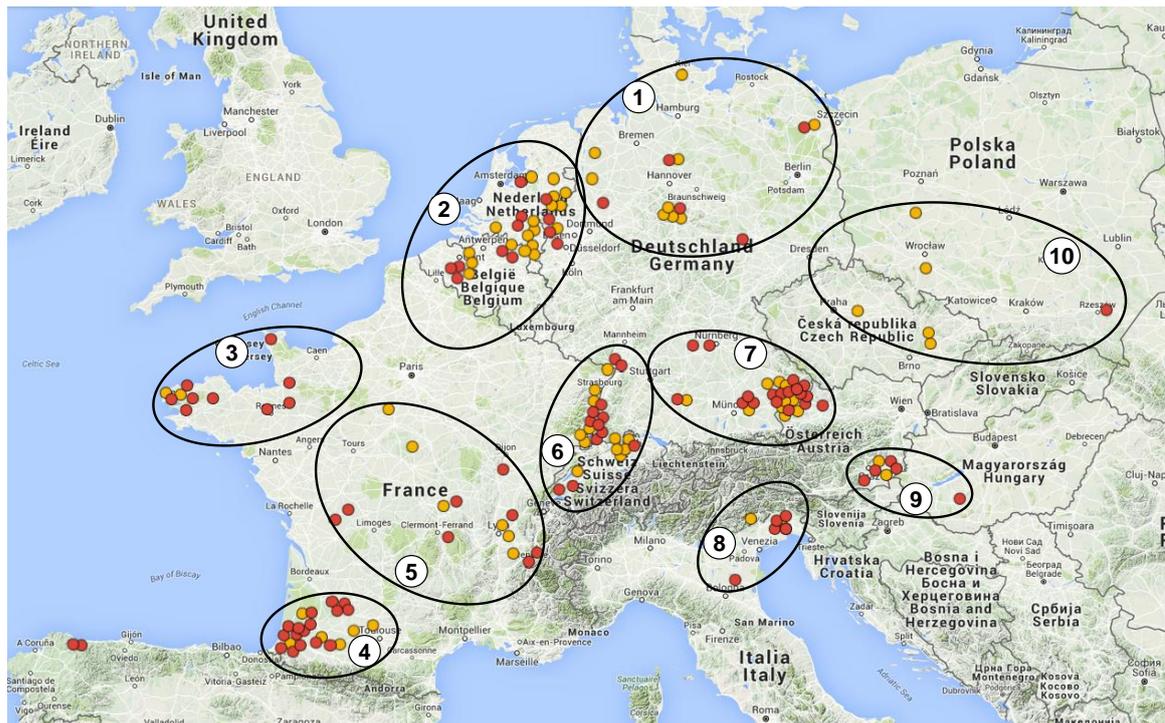
### **2.2.1 Herkunft der Pilzisolate**

In den Jahren 2011 und 2012 wurden mit *Exserohilum turcicum* befallene Mais-Blattproben gesammelt. Die Blattproben wurden durch Mitarbeiter der kooperierenden Zuchtfirmen auf dem Postweg versandt. An den Zuchtstandorten der beteiligten Firmen wurden Fangpflanzen angebaut. Diese Fangpflanzen verfügten über keine bekannten monogenen Resistenzen und waren darüber hinaus durch die Zuchtfirmen als anfällige Genotypen gegenüber *E. turcicum* eingestuft. Von diesen Pflanzen erfolgte die Probenahme. Die befallenen Blätter wurden getrocknet und in Papierumschlägen versandt. Nach Abstimmung unter den Zuchtfirmen wurde die Standortauswahl entsprechend des Befallsauftretens in den verschiedenen Regionen der beiden Jahre vorgenommen. Durch die Verteilung der Zuchtstandorte in den bedeutenden europäischen Maisanbaugebieten sollte eine möglichst repräsentative Sammlung an *E. turcicum*-Isolaten als Grundlage für die Untersuchungen in dieser Arbeit erstellt werden. Insgesamt wurden in den Jahren 2011 und 2012 Blattproben von 168 Standorten aus zwölf verschiedenen europäischen Ländern eingesandt. Das Probenahmegebiet wurde über Ländergrenzen hinweg in zehn geographische Regionen aufgeteilt. In Tabelle 1 sind die Regionen und die Standorte mit den zugehörigen Ländern für beide Jahre dargestellt.

**Tab. 1: Regionen und Länder mit der Anzahl und dem Anteil aufgenommener Standorte in den Jahren 2011 und 2012. Die Standorte in der Türkei bzw. Spanien wurden gesondert betrachtet. Die Regionen sind absteigend sortiert nach der Gesamtanzahl der Standorte.**

Nr.	Region	Land	Anzahl/Anteil Standorte			
			2011	2012	Gesamt	%
1	Niederlande/Belgien	D/NL/B	12	18	30	17,9
2	Süddeutschland/Österreich (Inntal)	D/A	19	10	29	17,3
3	Südwest Frankreich	F	18	6	23	13,7
4	Oberrheinregion	D/F/CH	11	12	23	13,7
5	Norddeutschland	D	5	9	14	8,3
6	Zentralfrankreich	F	7	6	14	8,3
7	Bretagne/Normandie	F	9	2	11	6,5
8	Norditalien	I	6	1	7	4,2
9	Österreich (Steiermark)/Ungarn	A/HU	4	2	6	3,6
10	Tschechien/Polen	PL/CZ	1	5	6	3,6
	<i>Türkei (Adana)</i>	TR		3	3	1,8
	<i>Spanien (Galicien)</i>	ES	2		2	1,2
	<b>Summe</b>		<b>94</b>	<b>74</b>	<b>168</b>	<b>100</b>

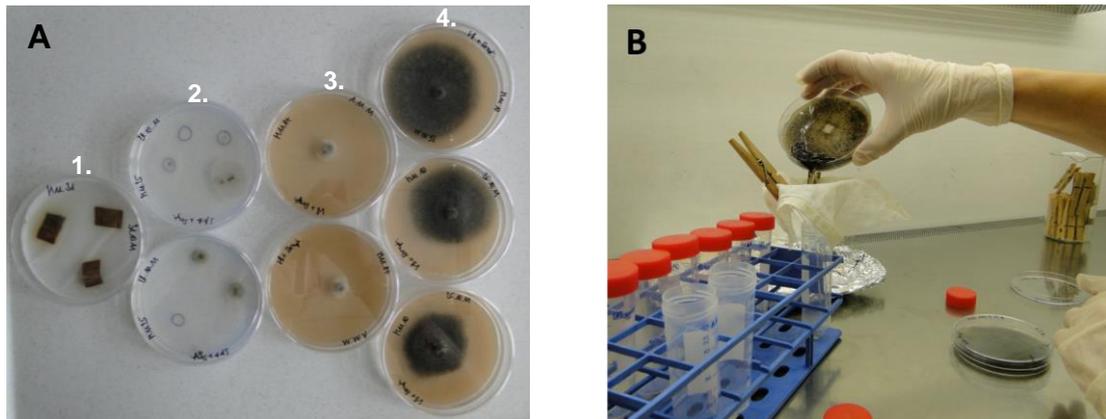
Für die Gesamtheit an Isolaten aus beiden Jahren, die aus einer der geographisch definierten Regionen stammt, wird im Folgenden der Begriff „Population“ verwendet. Die Einteilung des gesamten Herkunftsgebietes in zehn Regionen erfolgte auf Basis der Standorte der eingesandten Isolate, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die Standorte der Länder Türkei und Spanien wurden gesondert betrachtet. Aufgrund der geringen Anzahl der Standorte in diesen beiden Ländern wäre es wenig sinnvoll gewesen, für die Isolate dieser beiden Länder eigene Regionen zu bilden. Für eine Zuordnung zu bestehenden Regionen war die Distanz zu groß.



**Abb. 3: Standorte der Probenahme von *E. turcicum* befallenem Blattmaterial in den Jahren 2011 (●) und 2012 (●) eingeteilt in zehn Regionen auf Basis der Isolatherkünfte: 1 Norddeutschland, 2 Niederlande/Belgien, 3 Bretagne/Normandie, 4 Südwestfrankreich, 5 Zentralfrankreich, 6 Oberrheinregion, 7 Niederbayern/Österreich (Inntal), 8 Norditalien, 9 Österreich (Steiermark)/Ungarn, 10 Tschechien/Polen; Kartendaten: Google 2015, INEGI, ORION-ME**

### 2.2.2 Gewinnung und Lagerung der Einsporisolate

Zunächst wurden die Blattproben unter trockenen Bedingungen dunkel bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Aus jeder Blattprobe wurden kleine Blattsegmente mit einzelnen, abgegrenzten *E. turcicum* Läsionen herausgeschnitten. Nach einer Oberflächensterilisation für 30 s. in 2% NaOCl und zwei Waschrufen in autoklaviertem Leitungswasser für je 30 s. wurden die Blattsegmente in einer Petrischale auf feuchtem Filterpapier bei Raumtemperatur und Tageslicht für 48 Stunden zur Sporenbildung inkubiert. Sobald Sporenbildung auf den Blattsegmenten (grau-schwarze Bereiche) zu erkennen war, wurden mit Hilfe einer Impfnadel unter dem Stereomikroskop wenige Sporen abgenommen und auf synthetischem nährstoffarmem Agar (SNA) ausgestrichen. Im nächsten Schritt wurden von den ausgestrichenen Sporen drei einzelne Sporen auf markierte Bereiche derselben Petrischale vereinzelt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur ( $\approx 20 - 22^\circ\text{C}$ ) und Tageslicht für ca. sieben Tage, bis an den markierten Stellen graue Pilzkolonien gewachsen waren.



**Abb. 4: (A) Schritte der Erstellung der Einsporisolate, 1. Blattsegmente auf feuchtem Filterpapier, 2. Kolonien von einzelnen Sporen auf SNA, 3. und 4. Subkultivierung auf V8-Agar. (B) Gewinnung von Sporensuspensionen durch Abschwämmen der Sporen und Filtern mit Hilfe einer Nylon Gaze.**

Aus einer einzelnen Kolonie wurden kleine Bereiche mit einer Lanzettnadel ausgeschnitten und auf V8-Nährmedium übertragen. Um eine Bakterienkontamination zu vermeiden, wurden den Medien Antibiotika (Rifampicin & Streptomycin) beigemischt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und Tageslicht für ca. zehn Tage, bis die Petrischalen vollständig bis an den Rand mit typischen grau-schwarz erscheinenden Konidiophoren bewachsen waren. Im nächsten Schritt wurden die Sporen unter sterilen Bedingungen durch Zugabe von 15 ml autoklaviertem 25% Glycerin mit Hilfe eines Objektträgers abgewaschen, durch Nylon-Gaze gefiltert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt (siehe Abbildung 4). Nachdem die Isolation und Herstellung der Sporensuspension abgeschlossen waren, erfolgte die abschließende Identifizierung von *E. turcicum* anhand der Sporenmorphologie. Die Konidiosporen von *E. turcicum* sind unter dem Mikroskop anhand ihrer länglich ovalen Form mit einer Größe von ca. 20 x 120 µm, der oliv-grauen Farbe und den drei bis acht Septen leicht zu erkennen. Die eindeutige Bestimmung als *E. turcicum* erfolgte letztlich anhand des charakteristisch herausragenden Hilums (Abb. 2). Dadurch lässt sich *E. turcicum* eindeutig von den anderen Arten des *Helminthosporium*-Blattflecken-Erreger-Komplexes unterscheiden.

Für die mittelfristige Lagerung wurden von jedem Einsporisolat zehn Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit je einem Milliliter der Suspension befüllt und anschließend bei -23°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren gelagert. Zum Zweck der Lagerung wurde keine Bestimmung der Sporenkonzentration vorgenommen.

## 2.3 Untersuchungen zu Kultureigenschaften von *E. turcicum*

### Optimaltemperatur

Zunächst wurde untersucht, welche Temperatur für ein optimales Wachstum von *E. turcicum* benötigt wird. Dazu wurden folgende fünf Isolate aus verschiedenen Regionen Europas ausgewählt: M11.11 (Südwest Frankreich), M11.13 (Niederbayern/Österreich), M11.91 (Norddeutschland), M11.99 (Oberrheinregion) und M11.113 (Bretagne/Normandie). Im ersten Schritt wurden je 150 µl der Sporensuspension von jedem der Isolate auf V8 Nährmedium mit Hilfe eines Drigalskispatel in Petrischalen ausplattiert. Nach ca. zehn Tagen wurden kreisrunde bewachsene Agarstücke aus dem bewachsenen Nährmedium mit Hilfe eines Korkbohrers (Durchmesser: 5 mm) ausgeschnitten. Diese wurden anschließend mittig auf V8 Nährmedium in Kunststoff-Petrischalen platziert. Insgesamt wurden vier Platten je Isolat, bei zweifacher Durchführung des gesamten Versuchs, beimpft. Die Platten wurden bei fünf verschiedenen Temperaturstufen (16°, 20°, 24°, 28° und 32°C) ohne Licht inkubiert. Die Durchmesser der Kolonien wurden jeden zweiten Tag mit Hilfe eines Lineals in mm erfasst, bis in einer Variante die Petrischalen vollständig bis an den Rand bewachsen waren. Für jedes Isolat und jede Temperatur wurde der Koloniewuchs in mm pro Tag berechnet.

### Lagerfähigkeit

Zunächst wurden Sporensuspensionen, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, hergestellt. Die Konzentration der Suspension wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt und auf 1.000 Sporen/ml eingestellt. Es wurden sechs Isolate unterschiedlicher geografischer Herkunft verwendet: M11.24 (Italien, Po-Ebene), M11.28 (Südwestfrankreich), M11.38 (Süddeutschland), M11.91 (Norddeutschland), M11.96 (Niederlande/Belgien). Die Basis für die Sporensuspension bildete autoklaviertes 25%iges Glycerin mit 125 ppm Silwet Gold®. Die Suspensionen wurden bei -23°C gelagert. Für die Bestimmung der Lagerfähigkeit diente das Merkmal Keimfähigkeit der Sporen auf Nährmedium. Um dieses Merkmals zu bestimmen, wurden 100 µl der Sporensuspension mit einer Konzentration von 1.000 Sporen/ml auf V8 Nährmedium ausplattiert (=100 Sporen je Petrischale). Dieser Vorgang wurde in vierfacher Wiederholung für jedes Isolat durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem Klimaschrank (WB 750 KFL, Fa. Mytron, Heiligenstadt) bei 24°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit und einem Tag/Nachtrhythmus von 12 Stunden. Nach fünf Tagen wurde die Anzahl entstandener Kolonien je Petrischale gezählt. Die Bestimmung der Keimfähigkeit erfolgte an fünf Zeitpunkten. Zunächst wurde die Keimfähigkeit direkt nach der Herstellung der Suspensionen ohne Einfluss von Frost bestimmt. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Keimfähigkeit nach einer, zehn, 50 und 100 Wochen.

## 2.4 Rassenbestimmung

### 2.4.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Im Rahmen der Rassenbestimmung wurden vier dominant vererbte Resistenzgene untersucht. Dabei handelt es sich um die Resistenzgene *Ht1* (Hooker, 1963), *Ht2* (Hooker, 1977), *Ht3* (Hooker, 1981) und *Htn1/HtN* (Gevers, 1975). Die Resistenzgene wurden in den genetischen Hintergrund der Inzuchtlinie B37 eingebracht, die aus der sogenannten „Iowa Stiff Stalk Synthetic“ (ISSS) Population der 1930er Jahre in den USA hervorgegangen ist (Hallauer, 2008). Über klassische Rückkreuzungsschritte wurden die einzelnen Resistenzgene eingekreuzt, sodass ein Differentialsortiment aus nah-isogenen Inzuchtlinien zur Verfügung stand. Das Differentialsortiment bestand mit der Linie B37 als Ausganglinie (*Ht0*) und B37-*Ht1*, B37-*Ht2*, B37-*Ht3* und B37-*HtN* aus fünf Linien. Die Vermehrung und Bereitstellung des Saatguts wurde während der gesamten Projektphase durch die kooperierenden Zuchtfirmen der GFPI-Abteilung Mais gewährleistet. Weitere Informationen zu den untersuchten Resistenzgenen sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2: Untersuchte Resistenzgene, ihre Quellen und die Art der Vererbung.**

Resistenzgen	Quelle	Resistenzreaktion	Referenz	Vererbung
<i>Ht1</i>	"Ladyfinger" GE440	Chlorose	Hooker 1963	dominant
<i>Ht2</i>	NN14B	Chlorose	Hooker 1977	dominant
<i>Ht3</i>	<i>Tripsacum floridanum</i>	Chlorose	Hooker 1981	dominant
<i>Htn1/HtN</i>	"Pepitilla"	Verlängerte Latenzzeit	Gevers 1975	dominant

Die Aussaat erfolgte in Multitopfplatten in einer Mischung von Einheitserde (T25) und Sand (1:1). Bei der Einheitserde handelt es sich um handelsübliche Blumenerde auf Torfbasis mit einem Anteil von 25% Ton. Nachdem das zweite Laubblatt sichtbar war, wurden je zwei Pflanzen in einen Plastikpflanztopf (11 cm x 11 cm) pikiert. Das verwendete Substrat bestand aus gedämpfter Komposterde, Einheitserde (T25) und Sand im Verhältnis 3:3:1. Nach dem Pikieren wurde auf die Oberfläche des Substrats eine dünne Sandschicht aufgebracht, was sich zuvor als effektiver Schutz gegen Trauermückenbefall herausgestellt hatte. Die Bewässerung erfolgte zurückhaltend, da Maispflanzen besonders empfindlich auf Staunässe reagieren. Die Düngung wurde wöchentlich entsprechend des Bedarfs der Pflanzen mit dem Ammonium betonten Universaldünger Hakaphos® Blau (Fa. Compo, Deutschland) mit allen notwendigen Makro- und Mikronährstoffen durchgeführt. Die Temperaturbedingungen während der Anzuchtphase lagen zwischen 19° und 28°C. Da die Anzucht in einem Glasgewächshaus durchgeführt wurde, entsprachen die Lichtbedingungen

in den Sommermonaten dem Tagesrhythmus. In den Wintermonaten wurden zusätzliche Lichtquellen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14h/10h zugeschaltet (Natriumdampflampen, Typ: HPS400 SON-T Agro, Fa. Philips, Niederlande). Zum Zeitpunkt der vollen Ausbildung des fünften Blattes wurde die Inokulation durchgeführt. Dieses Pflanzenstadium war in der Regel nach fünf bis sechs Wochen erreicht. Für jedes zu testende Isolat wurden pro Durchgang vier Pflanzen von jeder der fünf Linien des Differentialsortiments verwendet. Bei einem wöchentlichen Durchsatz von 13 bis 15 Isolaten wurden 260 bis 300 Pflanzen pro Woche für die Inokulation benötigt. Um genügend Pflanzen zum Zeitpunkt der Inokulation bereit zu haben, war es sehr wichtig, bereits bei der Aussaat die zum Teil unterschiedlichen Keimfähigkeiten der Linien des Differentialsortiments zu berücksichtigen.

#### **2.4.2 Inokulation**

Zur Herstellung der Sporensuspensionen für die Inokulation wurde ein Teil der tiefgefrorenen Suspensionen der Einsporisolate zunächst zur Vermehrung auf V8-Nährmedien ausplattiert. Dazu wurde von drei Reaktionsgefäßen eines Isolates der Wasserüberstand verworfen und die verbleibenden Reste gemischt. Dadurch wurde eine höhere Sporenkonzentration erreicht, wodurch die Wahrscheinlichkeit reduziert wurde, dass keine oder nur wenige keimfähige Sporen in der Suspension vorhanden waren. Je Isolat wurden drei Petrischalen mit je ca. 150 µl aufkonzentrierter Sporensuspension mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Nach zehn Tagen Inkubation waren die Petrischalen vollständig mit grau-schwarzen Strukturen, bestehend aus Hyphen, Sporenträgern und Sporen bewachsen. Die Temperatur- und Lichtbedingungen während der Inkubation entsprachen Raumtemperatur ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) und Tageslichtrhythmus im Labor. Im nächsten Schritt wurden die Sporen je Petrischale zweimal mit jeweils 10 ml Leitungswasser mit Hilfe eines Objektträgers abgewaschen und durch Nylon Gaze gefiltert. Durch das Filtern sollten Agar- und Myzelreste von der Sporensuspension getrennt werden. Das Wasser war mit 125 ppm des Benetzungsmittels Silwet Gold<sup>®</sup> versetzt. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Sporenkonzentration wurde durch Zugabe von Wasser mit 125 ppm Silwet Gold<sup>®</sup> auf 3.000 Sporen/ml eingestellt. Von jedem Isolat wurden 150 ml Sporensuspension hergestellt. Bei 20 Pflanzen je Isolat entspricht das einer Suspensionsmenge von ca. 7,5 ml je Isolat und Pflanze. Es wurde eine Ganzpflanzeninokulation durchgeführt, bei der mindestens die oberen beiden voll ausgebildeten Blätter (4. und 5. Blatt) gleichmäßig mit Sporensuspension bis kurz vor der Tropfenbildung benetzt wurden. Die Inokulation erfolgte mit Hilfe eines Druckluftzerstäubers aus Glas (Handanfertigung, Fa. Ochs, Bovenden). Für jedes Isolat wurden die benötigten 20 Pflanzen (5 Genotypen x 4 Pflanzen) vor der Inokulation in Gruppen bereitgestellt. Jede

Gruppe wurde abgeschirmt von den anderen Pflanzen mit einem neuen Zerstäuber und unter Verwendung neuer Einweghandschuhe inokuliert. Um eine Mischinfektion zwischen den Isolaten zu verhindern, wurden die einzelnen Gruppen separat mit Abstand zueinander unter einem Folienzelt zur Inkubation aufgestellt.

### **2.4.3 Klimabedingungen ab Inokulation**

Durch Befeuchtung der im Folienzelt befindlichen Vliesunterlage und Beleuchtung des geschlossenen Zeltes mittels darüber angebrachten Lichtquellen wurde bereits vor dem Zeitpunkt der Inokulation eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit auf über 90% sowie eine gleichzeitige Erwärmung der Luft im Folienzelt realisiert. Ab dem Zeitpunkt der Inokulation wurden die Pflanzen in das Folienzelt gestellt. Die Beleuchtung wurde abgeschaltet und zudem durch Sonnenschutztücher für eine Beschattung des Zeltes gesorgt. Die inokulierten Pflanzen wurden im Folienzelt für 24 Stunden bei 17 bis 25°C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von mind. 90% inkubiert. Die Pflanzen wurden ca. zwei Stunden nach der Inokulation mit Hilfe eines Handzerstäubers zusätzlich mit einem feinen Wassernebel befeuchtet. Nach 24 Stunden im Folienzelt wurden die Pflanzen, in den separierten Gruppen verbleibend, in einen vollklimatisierten Raum gebracht. In diesem Raum betragen die Tag/Nacht-Temperaturen 24°C/19°C und die rel. Luftfeuchtigkeit 75%. Der Tag/Nacht-Rhythmus lag bei 14h/10h mit einer Beleuchtungsintensität von 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Natriumdampflampen, Typ: HPS400 SON-T Agro, Fa. Philips, Niederlande). Bis zum Zeitpunkt der Bonitur wurden die Pflanzen unter diesen Bedingungen für 14 Tage inkubiert.

### **2.4.4 Bonitur**

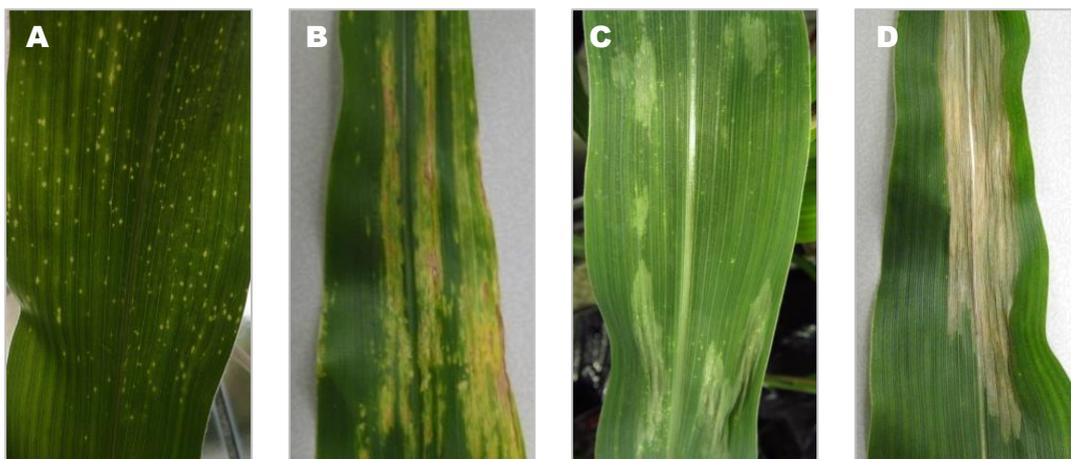
Die Bonitur erfolgte 14 Tage nach Inokulation. Zunächst wurden die Befallsreaktionen auf den Blättern der Maispflanzen nach einer definierten Boniturskala eingestuft. In Tabelle 3 ist die veränderte Boniturskala nach Bigirwa et al. (1993) dargestellt. Die Note 0 wurde vergeben, wenn keine Reaktionen auf der Pflanze sichtbar waren. In diesem Fall wurde für das betreffende Isolat der gesamte Inokulationsprozess wiederholt. Die Noten 1 bis 3 wurden vergeben, wenn chlorotische Reaktionen mit zunehmendem Anteil nekrotisierter Blattfläche sichtbar waren. Chlorotische Reaktionen in Verbindung mit nekrotischen Bereichen sind als klassische Resistenzreaktionen in diesem Pathosystem bekannt. Die Noten 4 bis 6 wurden mit zunehmender Befallsstärke vergeben, wenn grau-grünliche, welkeähnliche Symptome ohne chlorotische Bereiche auftraten. Diese Art von Läsionen ist für die unter-

**Tab. 3: Boniturskala zur phänotypischen Einstufung von Befallsreaktionen auf Mais gegen *E. turcicum*, verändert nach Bigirwa et al. (1993).**

Befallsreaktion	Note	Phänotyp
resistent	0	keine Symptome
resistent	1	Chlorosen ohne nekrotische Läsionen, chlorotische Punkte
resistent	2	Chlorosen mit wenigen, begrenzten Nekrosen
resistent	3	beträchtliche Nekrosen mit Chlorosen
anfällig	4	grau/grünliche Welkesymptome ohne Chlorosen
anfällig	5	Nekrosen mit deutlichen Welkesymptomen ohne Chlorosen
anfällig	6	alle inokulierten Blattbereiche abgestorben, Welkesymptome

suchten Resistenzgene als Anfälligkeitsreaktion im Mais gegen *E. turcicum* definiert. In Abbildung 5 sind ausgewählte Symptombilder nach Gewächshausinokulation dargestellt. Bei unklarem Befund zur Einstufung der Befallsreaktionen zum Zeitpunkt 14 dpi bei mindestens einer der vier Pflanzen auf einer Linie des Differentialsortiments wurde die Bonitur dieses Isolates nach einer Woche (21 dpi) wiederholt. Wenn der Befund auch zu diesem Zeitpunkt unklar blieb, wurde der gesamte Inokulationsprozess für das betreffende Isolat wiederholt.

Die finale Rassencharakterisierung erfolgte nach der beschriebenen Nomenklatur auf Basis der phänotypischen Einstufung der Befallsreaktionen (Leonard et al., 1989). Die verwendete Rassenomenklatur ist in Tabelle 4 dargestellt.



**Abb. 5: Befallsreaktionen an Mais nach *E. turcicum* Inokulation im Gewächshaus. (A) Penetrationsstellen als chlorotische Punkte sichtbar, Note 1 (12 hpi); (B) Chlorosen mit begrenzten Nekrosen, Note 2 (14 dpi); (C) grau-grünliche Welkesymptome ohne Chlorosen, Note 4 (14 dpi); (D) Nekrosen ohne Chlorosen, Note 5 (14 dpi).**

**Tab. 4: Rassenomenklatur für *E. turcicum* an Mais auf Basis der Befallsreaktion auf den getesteten Differentiallinien B37, B37-Ht1, B37-Ht2, B37-Ht3 und B37-HtN, nach Leonard et al. (1989) (\* R = resistent, A = anfällig).**

Rasse	Befallsreaktion*				
	B37	B37-Ht1	B37-Ht2	B37-Ht3	B37-HtN
0	A	R	R	R	R
1	A	A	R	R	R
2	A	R	A	R	R
13	A	A	R	A	R
23	A	R	A	A	R
23N	A	R	A	A	A

#### 2.4.5 Regionale Diversität und Komplexität der *E. turcicum* Sammlungen

Um die Diversität der Rassenspektren zu beschreiben, wurden die Verteilung, der Anteil, die Diversität und die Komplexität der vorkommenden Rassen in den einzelnen Regionen berechnet. In diesen Berechnungen wurden die Jahre 2011 und 2012 zusammen betrachtet. Zunächst wurden die Rassenverteilung bzw. die unterschiedlichen Rassenanteile beschrieben. Das Merkmal „Anzahl Rassen“ ( $N_i$ ) beschreibt die Anzahl verschiedener Rassen in der jeweiligen Region. Die Merkmale  $R_1$  bzw.  $R_2$  beschreiben den Anteil der häufigsten Rasse ( $R_1$ ) bzw. den kumulierten Anteil der zwei häufigsten Rassen ( $R_2$ ) in der jeweiligen Region. Mit Hilfe der Indizes  $V_i$  und  $V_v$  wurde die Anzahl an Virulenzen je Isolat (Virulenzkomplexität) beschrieben. Der Index  $V_i$  beschreibt die Anzahl an Virulenzen als Mittelwert aller in der Region untersuchten Isolate. Der Index  $V_v$  beschreibt die Virulenzkomplexität als Mittel aller als virulent eingestuftten Isolate, das heißt ohne die Isolate der Rasse 0. Die Indizes zur Virulenzkomplexität wurden wie folgt berechnet:

$$V_i = \frac{\sum_j (p_j * v_j)}{N_i} \quad \text{und} \quad V_v = \frac{\sum_j (p_j * v_j)}{N_{vi}}$$

wobei  $p_j$  der Anteil der j-ten Rasse in der jeweiligen Region und  $v_j$  die Virulenzkomplexität der j-ten Rasse beschreibt.  $N_i$  ist die Gesamtzahl an Isolaten in der i-ten Region und  $N_{vi}$  beschreibt die Anzahl virulenter Isolate in der i-ten Region.

Zur Erfassung der Rassendiversität innerhalb der Regionen wurden zwei weitere Indizes verwendet: Der Gleason Index  $H_G$  und der Shannon Index  $H_S$  wurden wie folgt berechnet:

$$H_G = \frac{(Nr-1)}{\ln Ni} \text{ und } H_S = \sum_j [p_j * \ln(p_j)]$$

wobei  $N_r$  und  $N_i$  bzw.  $p_j$  wie bereits oben beschrieben verwendet wurden. Der Gleason Index ist für seine Anfälligkeit gegenüber einer hohen Anzahl an verschiedenen Rassen bekannt, wohingegen der Shannon Index sowohl die Anzahl als auch die Verteilung, also den Anteil der jeweiligen Rassen berücksichtigt (Andrivon & Vallavieille-Pope, 1995). Um eine Verzerrung aufgrund unterschiedlicher Anzahlen an Isolaten zwischen den Regionen zu vermeiden, wurden ebenfalls der relative Gleason Index ( $H_{GR}$ ) und der relative Shannon Index ( $H_{SR}$ ) berechnet. Die Berechnungen erfolgten nach den untenstehenden Formeln:

$$H_{GR} = \frac{(Nr-1)}{(Ni-1)} \text{ und } H_{SR} = \frac{\sum_j [p_j * \ln(p_j)]}{\ln Ni}$$

#### 2.4.6 Regionale Virulenzhäufigkeiten von *E. turcicum* in Europa

Zur Beurteilung der regionalen Wirksamkeit der einzelnen Resistenzgene wurden die Virulenzfrequenzen für jedes der Resistenzgene in den untersuchten Regionen bestimmt. Die Virulenzfrequenz beschreibt den Anteil virulenter Isolate für ein bestimmtes Resistenzgen in einer definierten Region oder Population. Mit Hilfe dieses Merkmals lässt sich die Wirksamkeit der Resistenzgene in den untersuchten Regionen beschreiben. Die Berechnung der Virulenzfrequenzen erfolgte nach der Formel:

$$\text{Virulenzfrequenz für } Ht1 \text{ in der } i\text{-ten Region } (V_{Ht1i}) = \frac{\sum_i n_{Ht1i}}{N_i}$$

wobei  $n_{Ht1i}$  die Summe der Isolate mit einer Virulenz für *Ht1* in der *i*-ten Region beschreibt.  $N_i$  ist die Gesamtanzahl an Isolaten in der *i*-ten Region.

#### 2.4.7 Anbau und Bonitur verschiedener *Ht*-Differentialsortimente im Feld

Um die Ergebnisse der Rassenbestimmung an Ganzpflanzen im Gewächshaus mit den bonitierten Virulenzeigenschaften von *E. turcicum* im Feld zu vergleichen, wurden an sechs Standorten in Europa Differentialsortimente angebaut.

**Tab. 5: Standorte, Jahre und Genotypen der im Feld angebauten Differentialsortimente mit den verwendeten Resistenzgenen.**

Region (Standort)	Anbaujahr	Genotyp (rekurrenter Elter)	Differentialsortimente mit verwendeten <i>Ht</i> -Resistenzgenen
<b>Österreich/Ungarn</b> (Graz)	2012	B37, Pa91, W22	B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i> Pa91- <i>Ht1</i> , W22- <i>HtN</i>
<b>Oberrheinregion</b> (Rheinfelderhof)	2011	B37, A619	B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i> A619- <i>Ht1</i> , A619- <i>Ht2</i> , A619- <i>Ht3</i>
<b>Südwestfrankreich</b> (Meilhan)	2012	B37	B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i>
<b>Süddeutshl./Österreich</b> (Pocking)	2011 & 2012	B37, H4460	B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i> H4460- <i>Ht1</i> , H4460- <i>Ht2</i> , H4460- <i>Ht3</i>
<b>Norddeutschland</b> (Borken)	2011	B37, A619	B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i> A619- <i>Ht1</i> , A619- <i>Ht2</i> , A619- <i>Ht3</i>
<b>Niederlande/Belgien</b> (Wilbertoord)	2011 & 2012	A619, H4460	A619- <i>Ht1</i> , A619- <i>Ht2</i> , A619- <i>Ht3</i> H4460- <i>Ht1</i> , H4460- <i>Ht2</i> , H4460- <i>Ht3</i>

Der Anbau, die Versuchsbetreuung und die Bonitur erfolgten vollständig durch die beteiligten Züchterfirmen der Abteilung Mais der GFPI. Nach Abschluss der Bonitur wurden die Rohdaten zur Auswertung bereitgestellt. Die Auswahl der Standorte erfolgte nach Absprache unter den Züchtern. Durch die weiträumige Ausdehnung des untersuchten Gebietes in Nord-Süd-Richtung war es erforderlich, Genotypen für die Differentialsortimente zu verwenden, deren Reifezeit an den jeweiligen Standort angepasst war. Eine vollständige Auflistung der berücksichtigten Regionen mit den genauen Standorten, dem Anbaujahr und den verwendeten Genotypen für das jeweilige Differentialsortiment ist in Tabelle 5 dargestellt. Jeder Genotyp des Differentialsortiments wurde an den jeweiligen Standorten in zweifacher Wiederholung angebaut. Eine Reihe mit ca. 20 Pflanzen und drei Metern Länge stellte eine Wiederholung dar. Im Rahmen der Bonitur wurde für jede dieser Reihen eine Note vergeben. Die Boniturskala ist in Tabelle 6 dargestellt. Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel der Boniturnoten für einzelnen Resistenzgene bzw. der rekurrenten Eltern ohne *Ht*-Resistenzgen gebildet. Es wurden jeweils die Daten des Boniturzeitpunktes verwendet, an dem eine maximale Differenzierung zwischen den einzelnen Linien des Differentialsortiments erreicht wurde. Aufgrund der variierenden Anzahl an Genotypen je Resistenzgen und Standort und den unterschiedlichen Boniturzeitpunkten erfolgte die Ergebnisdarstellung ausschließlich als Mittelwertvergleich in Tabellenform.

**Tab. 6: Boniturskala für die phänotypische Beurteilung der Turcicum-Blattdürre an Mais im Feldversuch nach Infektion durch *E. turcicum*.**

Note	Phänotyp
1	Pflanzen zeigen keine Symptome, Befallsstärke: 0%
2	Wenige Pflanzen in einer Reihe zeigen kleine Läsionen (< 2 cm), Befallsstärke: < 5%
3	Einige Läsionen auf unteren Blattetagen auf mehreren Pflanzen je Reihe sichtbar, Befallsstärke: 5-10%
4	Eindeutige länglich ovale Turcicum-Läsionen auf mehreren Blattetagen Befallsstärke: 10-20%
5	Läsionen schmelzen zusammen, Befallsstärke: 20-40%
6	Ausgedehnter Befall auf den Blättern sichtbar, Befallsstärke: 40-60%
7	Hälfte der Blattfläche ist abgestorben bzw. ausgetrocknet durch Turcicum-Befall, Befallsstärke: 60-80%
8	Mehr als die Hälfte der Blattfläche ist abgestorben bzw. ausgetrocknet durch Turcicum-Befall, Befallsstärke: 80-90%
9	Nahezu die gesamte Blattfläche ist abgestorben bzw. ausgetrocknet durch Turcicum-Befall, Befallsstärke: 90-100%

## 2.5 Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der untersuchten Resistenzgene

### 2.5.1 Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit von *Ht*-Genen

#### 2.5.1.1 Versuchsaufbau

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte bis zum Zeitpunkt der Inokulation, wie bereits unter Punkt 2.4.1 beschrieben. Jedoch wurde in diesem Versuch nur eine Pflanze je Topf pikiert. Die verwendeten Genotypen waren die nah-isogenen Inzuchtlinien des Differentialsortiments, die bereits unter Punkt 2.4.1 beschrieben wurden. Die Herstellung der Sporensuspension und die Inokulation erfolgten wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben. Anstatt mit 3.000 Sporen/ml wurden die Pflanzen in diesem Versuch mit 1.500 Sporen/ml inokuliert. Aufgrund der größeren Pflanzenzahl je Isolat wurden 900 ml Sporensuspension von jedem Isolat hergestellt. In Tabelle 7 sind die verwendeten Isolate mit ihrer Herkunft und ihren Virulenzeigenschaften aufgelistet.

**Tab. 7: Bezeichnung, Herkunft und Virulenzgenausstattung der verwendeten Isolate im Temperaturversuch ohne Temperaturvorbehandlung (\* V = virulent; A = avirulent).**

Bezeichnung	Rasse	Herkunft	Resistenzgene/Virulenzeigenschaften*			
			<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
76-4	0	Frankreich, Normandie	A	A	A	A
48-1	123	Österreich, Steiermark	V	V	V	A
25-3	3N	Frankreich, Südwest	A	A	V	V

Die Virulenzeigenschaften der ausgewählten Isolate ermöglichten die Untersuchung von kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen für jedes der Resistenzgene. Die Pflanzen wurden im Alter von 36 Tagen bei vollständiger Entwicklung des fünften Blattes inokuliert. Direkt nach der Inokulation wurden die Pflanzen für 24 Stunden im Folienzelt bei einer Temperatur von 19° bis 24°C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von über 90% inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Pflanzen in RUMED® Klimakammern (Fa. Rubarth Apparate GmbH, Deutschland) mit vier verschiedenen Temperaturregimen gebracht. Der Tag/Nacht-Rhythmus lag bei 12 Stunden mit einer Beleuchtungsintensität von 155  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die vier Temperaturregime mit folgenden Tag/Nacht-Temperaturen betragen: 15/10°C; 20/15°C; 25/20°C und 30/25°C. Die Temperaturvariante 25/20°C entsprach den Bedingungen des Rassenscreenings und diente deshalb als Kontrollvariante. Die rel. Luftfeuchtigkeit in den Klimakammern lag konstant bei 75%. Je Klimakammer wurden 90 Pflanzen (5 Genotypen x 3 Isolate x 6 Wiederholungen) vollrandomisiert angeordnet. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Für den gesamten Versuch wurden 720 Pflanzen benötigt. Die Pflanzen wurden 21 Tage unter den beschriebenen Temperaturregimen bis zur Endbonitur beobachtet. Eine Übersicht des Versuchs ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tab. 8: Genotypen, Isolate und Temperaturen im Versuch zur Allgemeinen Temperaturstabilität der Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN* gegen die *E. turcicum* in Mais.**

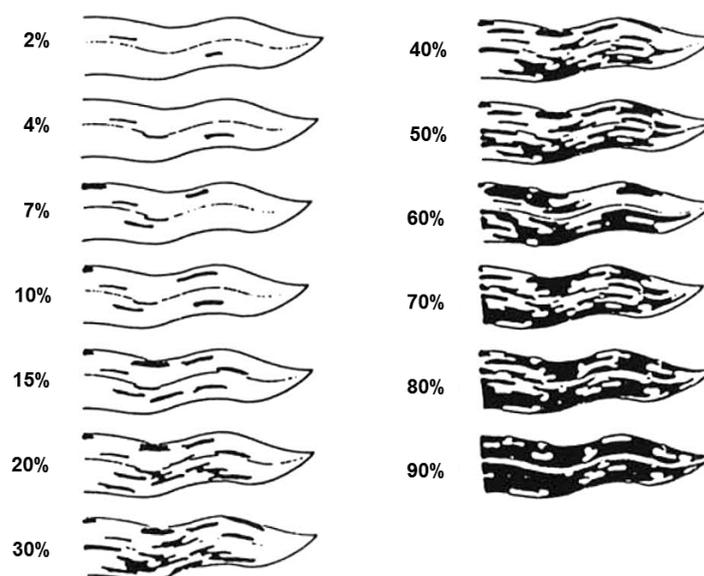
Faktor	Anzahl	Beschreibung
Genotyp	5	B37, B37- <i>Ht1</i> , B37- <i>Ht2</i> , B37- <i>Ht3</i> , B37- <i>HtN</i>
Isolat	3	76-4 (Rasse 0), 48-1 (Rasse 123), 25-3 (Rasse 3N)
Temperatur (Tag/Nacht)	4	15/10°C, 20/15°C, 25/20°C, 30/25°C
Wiederholungen	6	Pflanze = Wiederholung
Wiederholung des gesamten Versuchs	2	

### 2.5.1.2 Bonitur

Die Bonitur wurde zu sieben Zeitpunkten im Zweitagesrhythmus durchgeführt: 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Tage nach Inokulation (dpi). Die erfassten Merkmale waren Befallsstärke in Prozent der befallenen Blattfläche, die Läsionsqualität und die Inkubationszeit. Die Grafik in Abbildung 6 diente als Hilfsmittel zur Bestimmung des Merkmals Befallsstärke auf einzelnen Blättern. Als Läsionsfläche wurden grau-grünliche Welkesymptome und nekrotische Bereiche ohne Chlorosen gewertet. Die Befallsstärke wurde lediglich für den Genotyp B37 (ohne *Ht* Resistenzgen) erfasst. An jedem Boniturzeitpunkt wurde die Befallsstärke für das vierte und fünfte Blatt einzeln erfasst. Aus diesen beiden Werten wurde ein Mittelwert gebildet, sodass für weitere Berechnungen ein Mittelwert je Pflanze bzw. Wiederholung aus zwei Einzelwerten genutzt werden konnte. Auf Basis der Werte für das Merkmal Befallsstärke wurde der AUDPC Wert berechnet. Für die Berechnung des AUDPC-Wertes wurde folgende Formel verwendet (Leath & Pedersen, 1986):

$$\text{AUDPC} = \frac{y_i + y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

wobei  $y_i$  die Befallsstärke zum Zeitpunkt  $i$  und  $t_i$  die Anzahl der Tage nach der Inokulation bezeichnet.



**Abb. 6: Boniturskala zur Beurteilung der Befallsstärke für die Turcicum-Blattdürre an Mais auf einzelnen Blättern nach Gewächshausinokulation (Pataky, 1992).**

An allen Pflanzen wurde zu jedem Boniturzeitpunkt die Qualität der Läsionen durch die Vergabe von Boniturnoten mit Hilfe der unter Punkt 2.4.4 beschriebenen Boniturskala erfasst. Für dieses Merkmal wurde eine Note je Pflanze bzw. Wiederholung vergeben. Entsprechend der Boniturskala (Punkt 2.4.4, Tab. 3) wurden die Isolate bei Befallsreaktionen der Noten 0 bis 3 als avirulent und bei den Noten 4 bis 6 als virulent bezeichnet. Anhand des Zeitpunktes des Erstauftretens von Symptomen im Verlauf der Bonitur wurde die Inkubationszeit in Tagen als Mittelwert über die Wiederholungen berechnet. Sobald eine Pflanze eine Boniturnote von größer/gleich zwei erhalten hat, wurde dieser Tag als Inkubationszeit gewertet.

## 2.5.2 Spezifischer Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit von *Ht2*

### 2.5.2.1 Versuchsaufbau

In diesem Versuch wurden die nah-isogenen Inzuchtlinien B37 und B37-*Ht2* verwendet. Die Anzucht erfolgte wie bereits unter Punkt 2.5.1.1 beschrieben. Die Pflanzen wurden zehn Tage vor dem Inokulationstermin aus dem Gewächshaus in RUMED® Klimakammern (Fa. Rubarth Apparate GmbH, Deutschland) mit zwei unterschiedlichen Temperaturregimen gebracht. Jeweils die Hälfte der Pflanzen eines jeden Genotyps wurde für die Dauer von zehn Tagen mit Tag/Nacht-Temperaturen von 30/25°C bzw. 20/15°C inkubiert. Alle anderen Umweltbedingungen waren mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 Stunden, einer Lichtintensität von 155  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und einer rel. Luftfeuchtigkeit von 75% für alle Pflanzen identisch. Zum Zeitpunkt der Inokulation wurden die Temperaturen für alle Pflanzen auf Tag/Nacht-Temperaturen von 25/20°C eingestellt. Dadurch war gewährleistet, dass lediglich die Maispflanzen und nicht der Pilz *E. turcicum* dem Einfluss der unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt war. Die Inokulation erfolgte bei einem Pflanzenalter von 31 Tagen, nachdem das fünfte Blatt in beiden Temperaturvarianten vollständig entwickelt war. Die Inokulation wurde, wie bereits unter Punkt 2.5.1.2 erläutert, mit einer Sporenkonzentration von 1.500 Sporen/ml, durchgeführt. Es wurde das avirulente Isolat 76-4 (Rasse 0) und das für das Resistenzgen *Ht2* virulente Isolat 48-1 (Rasse 123) verwendet. Weitere Informationen zu den beiden Isolaten sind in Tabelle 7 beschrieben. Ab dem Zeitpunkt der Inokulation wurden die Pflanzen zunächst für 24 Stunden bei einer rel. Luftfeuchtigkeit von über 95%, einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 Stunden und einer Tag/Nacht-Temperatur von 25/20°C in den Klimakammern inkubiert, wobei hier die Inkubation nach der Inokulation mit der Nachtphase begonnen wurde. Im Anschluss an die 24 Stunden andauernde Inkubationsphase wurde für den weiteren Versuchsverlauf die rel. Luftfeuchtigkeit auf 75% eingestellt.

**Tab. 9: Genotypen, Isolate und Temperaturen im Versuch zur Temperaturstabilität des Resistenzgens *Ht2* gegen *E. turcicum* in Mais mit vorkonditionierten Pflanzen.**

Faktor	Anzahl	Beschreibung
Genotypen (nah-isogone Inzuchtlinien)	2	B37, B37- <i>Ht2</i>
Isolate	2	<b>76-4</b> (Rasse 0, <b>avr</b> ), <b>48-1</b> (Rasse 123, <b>vir</b> )
Temperaturen zur Vorkonditionierung (Tag/Nacht)	2	30/25°C und 20/15°C
Kontrolle	1	Mock-Variante
Wiederholungen	8	Pflanze = Wiederholung
Wiederholungen des gesamten Versuchs	2	

In jedem der zwei unabhängigen Durchgänge des Versuchs wurden insgesamt 96 Pflanzen untersucht. Die Pflanzen wurden ab Inokulation 21 Tage unter den beschriebenen Bedingungen beobachtet. Eine Übersicht des Versuchs ist in Tabelle 9 dargestellt.

### 2.5.2.2 Bonitur und Probenahme zur DNA Quantifizierung

Die Bonitur wurde an vier Zeitpunkten im Vier-Tage-Rhythmus an folgenden Tagen nach der Inokulation vorgenommen: 9, 13, 17, 21 dpi. Es wurden die gleichen Merkmale erhoben, wie bereits unter Punkt 2.5.1.2 beschrieben, jedoch wurde in diesem Versuch ebenfalls die Befallsstärke für die Genotypen mit Resistenzgen erfasst. Als Läsionsfläche wurden sowohl grau-grünliche Welkesymptome und nekrotische Bereiche ohne Chlorosen als auch nekrotische Bereiche mit Chlorosen gewertet.

Um die erfassten phänotypischen Boniturdaten zu den Merkmalen Befallsstärke und Befallsqualität durch ein weiteres Merkmal zu ergänzen bzw. zu bestätigen, wurden die Mengen an DNA des Pilzes *E. turcicum* in den bonitierten Blattbereichen bestimmt. Dazu wurden im Anschluss an die letzte Bonitur zum Termin 21 dpi das vierte und fünfte Blatt je Pflanze unmittelbar am Stängel mit einer Schere abgetrennt und zunächst gemeinsam in Papiertüten tiefgefroren. Nach dem Gefriertrocknen wurden die Proben mit Hilfe einer Kugel-Schwingmühle (Model MM 400, Fa. Retsch) feinst vermahlen und homogenisiert. Bis zur folgenden DNA-Extraktion und abschließenden quantitativen Real Time PCR (qPCR) wurden die Proben trocken, bei 4°C und dunkel gelagert.

### 2.5.2.3 DNA – Quantifizierung durch Real-Time-PCR

Alle in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Extraktionen basieren auf der CTAB-Methode nach (Brandfass & Karlovsky, 2008). Für die Erstellung der Standardreihen wurde zunächst reine Pilz-DNA von *E. turcicum* gewonnen. Für die Myzelgewinnung wurden 2 ml der tiefgefrorenen Suspensionen eines Einsporisolats in Czapek Dox Medium (200 ml) gegeben

**Tab. 10: Real-Time PCR-Programm zur Quantifizierung von *E. turcicum* in Maisblattgewebe**

PCR-Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur [°C]
1	Initiale Denaturierung	3 min	94
2	Denaturierung	5 s	94
3	Primer-Hybridisierung (Annealing)	15 s	63,5
4	Amplifikation (Elongation) (Wiederholung der Schritte 2-4 40x)	15 s	72
5	Abschließende Elongation	5 min	72

und 14 Tage bei 22°C als Schüttelkultur (100 RPM) ohne Licht inkubiert. Nachdem ausreichend Myzel in der Flüssigkultur gewachsen war, wurde diese mittels Saugfiltration in einer Nutsche auf Filterpapier vom Pilzmyzel getrennt. Das Myzel wurde tiefgefroren, um es im Anschluss einer Gefriertrocknung zu unterziehen. Die Extraktion der Pilz-DNA von *E. turcicum* erfolgte aus 50 mg in flüssigem Stickstoff fein vermahlenem Myzelpulver. Um die Konzentration der Pilz-DNA zu bestimmen, wurden Standardreihen erstellt. Dafür wurde die gewonnene Pilz-DNA mittels Agarosegel (1%) aufgetrennt und auf Basis der Densitometrie mit bekannter DNA-Konzentration des Bakteriophagen Lambda verglichen (MBI, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Auf diesem Weg wurden über Verdünnungsschritte Standardreihen reiner *E. turcicum* DNA mit den Konzentrationen 0,01 pg/µl, 0,1 pg/µl, 1 pg/µl, 10 pg/µl, 100 pg/µl und 1.000 pg/µl erstellt. Die densitometrische Bestimmung der DNA Konzentrationen erfolgte mit der Software Multi-Analyst (Bio-Rad, Hercules, USA). Für die Extraktion von Gesamt-DNA aus den Blattproben wurden 50 mg des gefriergetrockneten und fein vermahlenen Blattpulvers verwendet. Die gewonnenen DNA-Proben wurden nach der Extraktion auf einem Agarosegel (1%) mittels Elektrophorese aufgetrennt, um ihre Qualität zu beurteilen. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert.

Die PCR-Analyse basierte auf *E. turcicum* spezifischen Primern, die von ITS-Sequenzen ribosomaler DNA abgeleitet sind. Das Primerpaar JB 586 (5'-TGGCAATCA-GTGCTCTGCTG-3') und JB 595 (5'-TCCGAGGTCAAATGTGAGAG-3') amplifiziert ein *E. turcicum* spezifisches DNA-Fragment mit einer Größe von 485 Basenpaaren (Beck, 1998). Für die PCR-Reaktion wurde der Premix SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit (Fa. Bioneer Reagents Ltd, UK) mit allen für die Reaktion notwendigen Bestandteilen verwendet. Die beiden spezifischen Primer wurden mit einer Konzentration von 0,4 µM zugegeben. Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 9 µl aufgefüllt. Von der DNA-Probe wurde 1 µl je Reaktion dazugegeben, sodass das Endvolumen des Reaktionsansatzes 10 µl betrug. Der Ablauf des PCR-Programms ist in Tabelle 10 dargestellt.

Die Filtereinstellungen für die Anregung und Emission des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen wurden auf  $490\pm 10$  nm und  $530\pm 15$  nm eingestellt. Der Farbstoff SybrGreen lagert sich in doppelsträngige DNA ein und entfaltet dadurch die Absorptions- und Emissionseigenschaften für die genannten Wellenlängenbereiche. Mit jedem Schritt der PCR steigt der Anteil doppelsträngiger DNA und dadurch auch das emittierte Fluoreszenzsignal. Als Bezugsgröße diente die erstellte Standardreihe. Für die Amplifikation und die ersten Auswertungsschritte wurde das Real-Time PCR System CFX 384 Touch™ C1000 Detection System (Fa. Bio-Rad, USA) verwendet. Weiterführende Auswertungen und grafische Darstellungen erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2013.

## **2.6 Symptomausprägung an Genotypen mit dem Resistenzgen *Ht2***

Linien mit dem Resistenzgen *Ht2* zeigten heterogene Befallsreaktionen gegenüber gleichen Isolaten. Zudem war auf der Linie B37-*Ht2* in einigen Fällen eine klare Abgrenzung der Befallsreaktion in resistent bzw. anfällig nicht möglich. Durch Untersuchungen des Resistenzgens *Ht2* mit verschiedenen Isolaten und mit verschiedenen genetischen Hintergründen sollte dieses Phänomen näher untersucht werden.

### **2.6.1 *Exserohilum turcicum* Isolate**

Die Auswahl der Isolate erfolgte auf Grundlage der Virulenzeigenschaften gegenüber dem Resistenzgen *Ht2* anhand der Ergebnisse des Rassenscreenings. Es wurden insgesamt sechs Isolate verwendet. Dabei handelte es sich um drei avirulente (*avr*) und drei virulente (*vir*) Isolate. Neben den Virulenzeigenschaften wurde bei der Auswahl darauf geachtet, möglichst heterogene Boniturergebnisse innerhalb der beiden Virulenzgruppen zu berücksichtigen. Dadurch sollte ein möglichst breites Spektrum in Bezug auf die Symptomausprägung und deren Beurteilung abgedeckt werden. Neben den sechs eigenen Isolaten aus dem Rassenscreening wurden zwei weitere als virulent auf *Ht2* charakterisierte Isolate als Referenzisolate verwendet. Die Referenzisolate stammen aus den USA und wurden von Prof. Balint-Kurti von der North Carolina State University bereitgestellt. In Tabelle 11 sind die verwendeten Isolate mit Herkunft, Rasse und Informationen zu den Virulenzeigenschaften bzw. Boniturergebnissen aufgelistet.

**Tab. 11: Bezeichnung, Herkunft und Virulenzeigenschaften ausgewählter Isolate für Untersuchungen zur Befallssymptomatik auf Genotypen mit dem Resistenzgen *Ht2*.**

Isolat	Herkunft		Rasse	Virulenzeigenschaft	∅ Boniturnote
	Land	Region		gegenüber <i>Ht2</i>	Rassenscreening
130-2	Frankreich	Südwest-Frankreich	0	avr	1
186-1	Frankreich	Zentralfrankreich	1	avr	1,8
161-1	Niederlande	Niederlande/Belgien	0	avr	3
122-2	Türkei	Türkei (Adana)	23N	vir	4
127-2	Frankreich	Südwest-Frankreich	23N	vir	4,3
159-4	Belgien	Niederlande/Belgien	23N	vir	4
28A	USA	Kentucky (KY)	23N	vir	/
257A	USA	Illinois (IL)	23	vir	/

### 2.6.2 Pflanzenmaterial

Der Versuch wurde mit den zwei nah-isogenen Inzuchtlinien B37 und B37-*Ht2* des Differentialsortiments durchgeführt. Darüber hinaus wurden im zweiten Durchgang zusätzlich zum eigentlichen Experiment die Inzuchtlinien Pa91 und Pa91-*Ht2* und die Linien 9V-90112 und 9V-90112-*Ht2* als weitere Genotypen in den Versuch aufgenommen. Dabei handelt es sich jeweils um nah-isogene Inzuchtlinien, die sich lediglich in dem Resistenzgen *Ht2* unterscheiden. Sowohl die Linie Pa91 (Ogliari et al., 2005) als auch die Linie 9V-90112 (B. Kessel, KWS, pers. Mitteilung 18.01.2012) sind als hochanfällige Linien gegenüber *E. turcicum* bekannt. Das Saatgut der Linien 9V-90112 und 9V-90112-*Ht2* wurde von der KWS Saat SE aus Einbeck durch Dr. Bettina Kessel zur Verfügung gestellt. Diese beiden Linien werden im weiteren Verlauf der Arbeit zur Vereinfachung als KWS und KWS-*Ht2* bezeichnet. Das Saatgut der Linien Pa91 und Pa91-*Ht2* war als Lagerbestand der Abteilung Allgemeine Phytopathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen aus abgeschlossenen Projekten vorhanden und wurde ursprünglich ebenfalls durch die Firma KWS Saat SE vermehrt und bereitgestellt. Die Anzucht und Behandlung der Pflanzen bis zum Zeitpunkt der Inokulation erfolgte wie bereits unter Punkt 2.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass in diesem Versuch je Topf eine Pflanze pikiert wurde und die Pflanzen zum Zeitpunkt der Inokulation das 5. und 6. Blatt voll ausgebildet hatten. Der Hauptversuch wurde in zwei voneinander unabhängigen Durchgängen wiederholt. Jeder Versuch wurde mit neun biologischen Wiederholungen durchgeführt, wobei jede Pflanze eine Wiederholung darstellte. Bei zwei Genotypen, mit sechs Isolaten und einer Kontrollvariante in neunfacher Wiederholung wurden je Durchgang 252 Pflanzen benötigt.

### 2.6.3 Inokulation und Bonitur

Die Inokulation erfolgte mit wenigen Änderungen, wie bereits unter Punkt 2.2.2 beschrieben. Die Vermehrung der Sporen wurde mit befallenem Blattmaterial durchgeführt. Um befallenes Blattmaterial mit den entsprechenden *E. turcicum* Isolat zu erhalten, wurden zunächst Pflanzen der Linie B37 inokuliert, um von ihnen infiziertes Blattmaterial zu gewinnen. Das trockene Blattmaterial wurde dunkel und bei 4°C gelagert. Eine Woche vor der Inokulation wurden Segmente des befallenen Blattmaterials ausgeschnitten, für 30 s. in 2% NaOCl oberflächensterilisiert und anschließend in zwei Waschschritten für je 30 s. in sterilem Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Blattsegmente in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier bei Raumtemperatur und Tageslicht für sieben Tage inkubiert. Das Abwaschen der Sporen von der Blattoberfläche und alle weiteren Schritte erfolgten wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben. Die Sporenkonzentration wurde in diesem Versuch auf 3.000 Sporen/ml eingestellt. Bei der Inokulation wurde darauf geachtet, dass das 5. und 6. Blatt ganzflächig und gleichmäßig mit der Sporensuspension bis kurz vor der Tropfenbildung benetzt wurden. Als Kontrolle wurde eine Mockvariante bestehend aus Wasser mit 125 ppm Silwet Gold® im Versuch verwendet. Nach erfolgter Inokulation und 24 h Inkubation im Folienzelt bei 90% rel. Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen in einen Klimaraum mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 Stunden mit einer Temperatur von 24/20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit 75% gebracht.

Die Bonitur erfolgte an fünf Zeitpunkten jeweils im Abstand von zwei Tagen (8, 10, 12, 14, und 16 dpi). Es wurden die Merkmale Befallsstärke in Prozent befallene bzw. nekrotisierter Blattfläche und die Läsionsqualität in Form von Noten aufgenommen. Die Merkmale wurden entsprechend der Methoden, wie sie unter Punkt 2.5.2.2 beschrieben sind, aufgenommen. Bei der Bonitur wurden das 5. und 6. Blatt von jeder Pflanze berücksichtigt.

### 2.6.4 Erfassung der Sporulation

Zur Erfassung der Sporulation wurde aus jeder Variante von mehreren Pflanzen das vierte Blatt genutzt. Die Blätter wurden zunächst am 17. Tag nach der Inokulation in Papiertüten gesammelt und bei 4°C in einem Kühlraum dunkel und trocken gelagert. Für die weitere Verarbeitung wurden 20 Blattsegmente von ca. 1 x 3 cm Größe aus den nekrotisierten Bereichen der Blätter ausgeschnitten. Die Segmente wurden 1 min in 2% NaOCl oberflächensterilisiert und in zwei Waschschritten je 1 min lang in sterilem Leitungswasser gewaschen. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurden die Blattsegmente in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Knopfschale mit der Blattoberseite nach oben platziert. Es wurden insgesamt 20 Blattsegmente ausgelegt, wobei immer zwei Segmente zusammen eine Wiederholung

darstellten. Die Inkubation erfolgte für 72 Stunden bei Raumtemperatur und Tageslicht. Während der Inkubation wurde darauf geachtet, dass keines der Fächer austrocknete.



**Abb. 7: Maisblattsegmente in einer Knopfschale zur Bestimmung der Sporulation von *E. turcicum* mit zehn Wiederholungen. Je zwei Blattsegmente wurden zu einer Wiederholung zusammengefasst. Dunkle Bereiche sind ein Indikator für Sporenbildung.**

Gegebenenfalls wurde das entsprechende Fach mit sterilem Leitungswasser erneut befeuchtet. Im Anschluss an die 72 Stunden Inkubation wurden die Knopfschalen zunächst bei  $-23^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, um durch die niedrigen Temperaturen die Sporenbildung direkt nach Inkubationsende zu unterbinden. Für die Berechnung der Läsionsfläche wurde vor der weiteren Verarbeitung ein Digitalfoto von den Knopfschalen mit den Blattsegmenten aufgenommen. Dies erfolgte für alle Varianten mit der gleichen Kamera mit gleichen Kameraeinstellungen. Zudem wurde ein Foto unter gleichen Einstellungen von einer definierten Referenzfläche (Millimeterpapier) aufgenommen. Durch das Bild-Analyseprogramm für Pflanzenkrankheiten Assess 2.0 (Lakhdar Lamari, 2008, APS, USA) wurde anhand der unterschiedlichen Farbgebung von nekrotisierten und gesunden Blattbereichen die Läsionsfläche in Pixel bestimmt. Auf Basis der Pixelzahl der Referenzfläche wurde die Läsionsfläche je Blattsegment in die Einheit  $\text{cm}^2$  umgerechnet.

Zunächst wurde jede Kammer der Knopfschale mit 10 ml Wasser (Leitungswasser + 125 ppm Silwet Gold<sup>®</sup>) gefüllt. Mit Hilfe eines Gummiwischers wurden die Sporen vorsichtig durch Aufwirbeln des Wassers von der Blattoberfläche gelöst. Aus jeder Kammer wurden dann mit Hilfe einer Pipette 0,5 ml Sporensuspension entnommen und je zwei übereinander liegende Kammern zu einer Probe von einem ml zusammengeführt. Auf diese Weise wurden pro Variante zehn Suspensionen erstellt, wobei jede Suspension eine Wiederholung darstellte. Die Sporensuspensionen wurden bis zur Bestimmung der Konzentration einge-

fröhen. Die Bestimmung der Sporenzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs Rosenthal Zählkammer unter dem Mikroskop. Nachdem die Sporenkonzentrationen für alle Varianten bestimmt und die Flächen der dazugehörigen Läsionen berechnet waren, wurden diese ins Verhältnis gesetzt, um die Werte für das Merkmal Sporulation mit der Einheit Sporen je cm<sup>2</sup> zu erhalten. Für die Darstellung wurden die Werte der Sporulation der einzelnen Isolate als relative Sporulation auf dem Genotypen B37-*Ht2* zur Sporulation des Genotypen B37 ins Verhältnis gesetzt, wobei die Sporulation des anfälligen Genotypen B37 mit 100 gleichgesetzt wurde.

### **2.6.5 DNA Quantifizierung durch Real-Time-PCR**

Die Probenahme für die DNA-Mengenbestimmung erfolgte am 17. Tag nach der Inokulation. Für jede Variante wurden drei Mischproben gewonnen. Eine Mischprobe bestand aus dem Material von sechs Blättern, jeweils das fünfte und sechste Blatt von drei Pflanzen (=Wiederholung). Das Blattmaterial wurde direkt nach der Probenahme bei -20°C tiefgefroren. Die weiteren Schritte der Probenaufbereitung, der DNA-Extraktion und der Durchführung der Real-Time-PCR erfolgten wie bereits unter Punkt 2.5.2.3 beschrieben.

## **2.7 Histologische Untersuchungen zur Pathogenese von *E. turcicum***

### **2.7.1 *E. turcicum* Isolate und Pflanzenmaterial**

In diesem Versuch wurde die Pathogenese von *E. turcicum* in Mais vor dem Hintergrund verschiedener monogener Resistenzen untersucht. Dazu wurden drei Isolate ausgewählt, deren Virulenzeigenschaften gegenüber den Resistenzgenen *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN* so beschaffen sind, dass sich für jedes der Resistenzgene je eine kompatible und eine inkompatible Interaktion ergibt. Die verwendeten Isolate und ihre Virulenzeigenschaften sowie die Herkunftsangabe sind in Tabelle 12 gelistet. Es wurden dieselben Genotypen des Differentialsortiments verwendet, wie bereits unter Punkt 2.4.1 in den Versuchen zum Rassenscreening beschrieben. Die Anzucht der Pflanzen bis zum Zeitpunkt der Inokulation erfolgte ebenfalls entsprechend den Ausführungen unter Punkt 2.4.1. Die Sporengewinnung und die Inokulation wurden in diesem Versuch nach den gleichen Vorgaben durchgeführt, wie unter Punkt 2.6.3 dargelegt. Für die Inokulation wurde eine Sporenkonzentration von 5.000 Sporen/ml verwendet. Die Wachstumsbedingungen nach der Inkubation (24 h) im Folienzelt waren 14/10 Stunden und 24/20°C Tag/Nacht mit einer rel. Luftfeuchtigkeit von 80%.

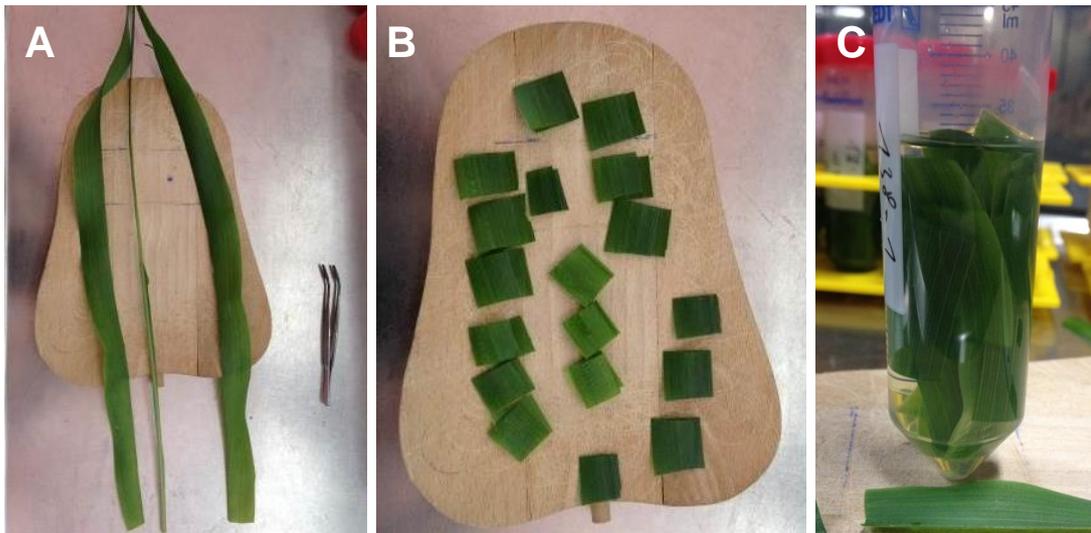
**Tab.12: Bezeichnung, Herkunft und Virulenzeigenschaften der verwendeten Isolate im Rahmen der histologischen Untersuchung zur Interaktion von *E. turcicum* und Mais. (\* V = virulent; A = avirulent)**

Bezeichnung	Rasse	Herkunft		Resistenzgene/Virulenzeigenschaften*			
		Land	Region	<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
172-4	0	Niederlande	Niederlande/Belgien	A	A	A	A
138-1	1	Frankreich	Oberrheinregion	V	A	A	A
123-3	23N	Türkei	Türkei (Adana)	A	V	V	V

### 2.7.2 Versuchsaufbau und Probenahme

Eine Einstufung der Befallsreaktionen erfolgte zu den Zeitpunkten 12 und 18 dpi an jeweils drei gleichen Genotypen jeder Variante nach der in Tabelle 3 beschriebenen Notenskala. Die Einstufung der Virulenzeigenschaften wurde auf Basis der Rassennomenklatur aus Tabelle 4 vorgenommen. Anhand dieser Sichtbonitur sollten die Virulenzeigenschaften der ausgewählten Isolate im Rahmen dieses Versuchs überprüft werden.

Die Pflanzen wurden in Gruppen entsprechend ihrer Variante (Genotyp x Isolat) im Klimaraum angeordnet, um die Probenahme im Verlauf des Versuchs möglichst unkompliziert zu gestalten. Die Hauptschritte der Probenahme sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Probenahme erfolgte zu sechs Zeitpunkten: 1, 3, 6, 12 und 18 dpi. An jedem Probenahmezeitpunkt wurden von je zwei Pflanzen jeder Variante das vierte und fünfte Blatt verwendet. Die Blätter wurden zunächst nah am Stängel abgeschnitten. Im weiteren Schritt wurde mittels Skalpell die Mittelrippe des Blattes entfernt. Die verbleibenden Blattspreiten wurden mit Hilfe einer Schere in kleine Segmente einer Größe von ca. 2 bis 3 cm<sup>2</sup> geschnitten. Je Variante wurden 20 Blattsegmente zur Fixierung direkt in ein mit AFE Fixierungslösung gefülltes 50ml Reaktionsgefäß gegeben. In dieser Fixierungslösung konnten die Blattsegmente für einen langen Zeitraum bei Raumtemperatur bis zum Zeitpunkt weiterer Schritte für die Mikroskopie aufbewahrt werden.



**Abb. 8:** A: Von der Mittelrippe abgetrennte Blattspreiten, B: 2 bis 3 cm<sup>2</sup> große Blattsegmente, C: Blattsegmente in AFE Fixierlösung.

### 2.7.3 Färbung mit Chlorazol Black E (CBE)

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Pilzstrukturen von *E. turicum* im Blattgewebe mit Hilfe des Farbstoffs CBE nach vorheriger Behandlung mit Kaliumhydroxid (KOH) gefärbt. Durch die schwarze Färbung der Pilzstrukturen kontrastieren diese vor dem helleren Hintergrund des Pflanzengewebes. Für die Verarbeitung im Färbeprozess wurden die Blattsegmente einzeln behandelt. Die Färbung erfolgte nach einem Färbeprotokoll verändert nach (Wilcox & Marsh, 2009). Die Veränderung bestand in der deutlich verringerten Inkubationsdauer der Blattsegmente in KOH.

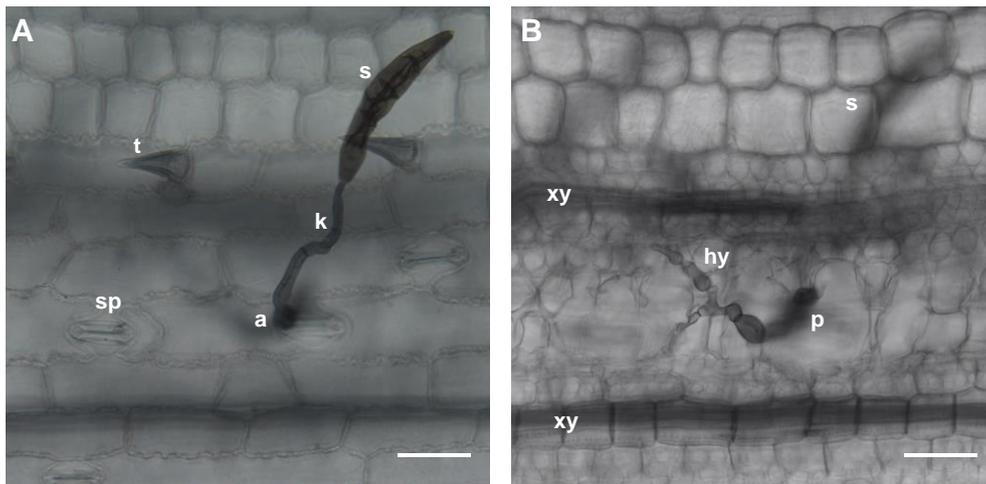
Alle im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten in Reaktionsgefäßen (5 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland) mit je einem Blattsegment. Zunächst wurden die in AFE fixierten Blattsegmente für zwei Stunden in Ethanol eingelegt. Danach folgte ein Waschschrift in Leitungswasser. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß mit dem Blattsegment mit 2 M KOH gefüllt und in geschlossenem Zustand für zweieinhalb Stunden bei 90°C im Wasserbad erhitzt. Mit diesem Schritt wurde eine vollständige Entfärbung des Blattsegments erreicht. Nach der Entfärbung war es unbedingt erforderlich, äußerst vorsichtig mit dem Blattsegment im Reaktionsgefäß umzugehen, damit die Blattstrukturen für die abschließende Mikroskopie erhalten blieben. Nach zweieinhalb Stunden Inkubation wurde die Kalilauge dekantiert und die Probe zwecks Waschens mit Leitungswasser versetzt. Beim Entleeren des

Reaktionsgefäßes war es sinnvoll, darauf zu achten, dass das Blattsegment an der Innenwand des Gefäßes anliegt, sodass ein Entleeren des Gefäßes möglich wurde, ohne das Blattsegment zu beschädigen. Danach wurde das Reaktionsgefäß mit der CBE-Färbelösung gefüllt und über Nacht bei 60°C im Wasserbad inkubiert. In diesem Schritt wurden sowohl die Blatt- als auch die Pilzstrukturen schwarz gefärbt. Am nächsten Tag wurde die gebrauchte CBE-Färbelösung mit einer Pipette entnommen und zur Wiederverwendung aufbewahrt. Die nun schwarz erscheinenden Blattsegmente wurden mindestens 48 Stunden in 50% Glycerin entfärbt und darin bis zur Mikroskopie aufbewahrt. Durch einen längeren Entfärbungsprozess wurden die Blattstrukturen deutlich stärker entfärbt als die Pilzstrukturen. Dadurch wurde der Kontrast zwischen Blattzellen und Pilz verstärkt.

#### **2.7.4 Mikroskopische Untersuchungen**

Für die Mikroskopie wurden die Blattsegmente zunächst auf Objektträger übertragen. Dazu wurde das Glycerin abgegossen und mögliche abgesetzte CBE Rückstände am Boden des Reaktionsgefäßes durch Zugabe von Wasser mit Hilfe einer Pipette entnommen. Durch Zugabe von Wasser und leichten Bewegungen des Reaktionsgefäßes wurde das Blattsegment vorsichtig von der Innenwand des Gefäßes gelöst, um es dann mit dem Wasser vorsichtig auf den Objektträger zu überführen. Das überflüssige Wasser wurde mit Hilfe einer Pipette oder durch Aufsaugen mit Papiertüchern vom Objektträger entfernt. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Durchlichtmikroskop (Leitz DMRBE, Fa. Leica).

Bei den mikroskopischen Untersuchungen zur Pathogenese wurden ausschließlich die Postpenetrationsabläufe im Pflanzengewebe berücksichtigt. Es wurden systematisch drei Parameter erfasst. Die „Xylem-Penetrations-Effizienz“ beschreibt den Anteil der Penetrationsstellen der Epidermis, denen ein Eindringen in das Xylem folgte. Es ist ein qualitativer Parameter, da nicht bewertet wurde, wie stark das jeweilige Xylemgefäß besiedelt war. Als Penetrationsstellen wurden die Bereiche definiert, an denen eine erfolgreiche Penetration der Epidermiszellen unter dem gebildeten Appressorium erfolgt ist. In Abbildung 9 ist eine Penetrationsstelle als Draufsicht in zwei Fokusebenen dargestellt: Zunächst links die Fokusebene (A) der Blattoberfläche mit einer gekeimten Konidiospore und rechts die darunter liegende Fokusebene (B) der Epidermiszellen, in denen nach erfolgreicher Penetration Pilzhypen zu sehen sind.



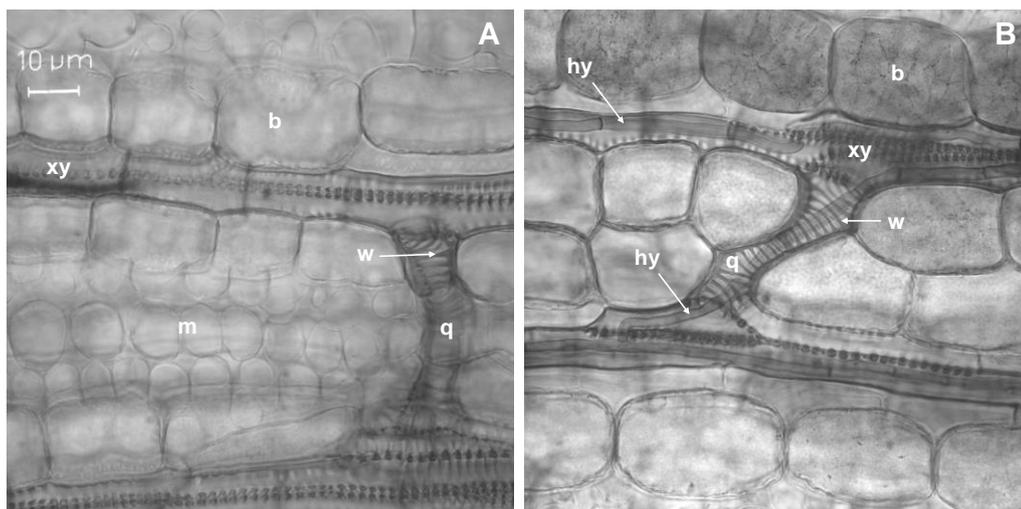
**Abb. 9:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer *E. turcicum* Penetrationsstelle an Mais (3 dpi) auf zwei Fokusebenen nach CBE-Färbung. A: Konidiospore (s) mit Keimschlauch (k) und Appressorium (a) auf der Blattoberfläche mit Spaltöffnungen (sp) und Trichomen (t) (40x); B: Penetrationsstelle (p) mit septierten Hyphenstrukturen (hy) in den Epidermiszellen zwischen zwei Xylemgefäßen (xy), (s) = durscheinende Konidiospore auf der Blattoberfläche, Maßstab = 50 µm.

Parameter 1: Xylem-Penetrations-Effizienz (Abbildung 10)

0 = keine Hyphen im Xylem sichtbar

1 = ein Xylemgefäß besiedelt

In diesem Fall bedeutet besiedelt, dass Hyphen im Xylem sichtbar sind.



**Abb. 10:** Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Maisblattes auf der Fokusebene der Xylem Leitgefäße nach CBE Färbung (6 dpi), A: Parallel verlaufende Xylemgefäße (xy) mit einer Querverbindung (q) ohne Hyphenbesiedlung umgeben von Bündelscheidenzellen (b) und Mesophyllzellen (m) (100x); B: Parallel verlaufende Xylemgefäße (xy) mit Besiedlung durch *E. turcicum* mit einer oder mehreren Hyphen (hy) mit einer Querverbindung (q) (100x); Zellwände der Xylemgefäße sind durch spiralförmige Wandverstärkungen (w) charakterisiert.

Mit einem weiteren Parameter wurde die Besiedlung der Xylemgefäße quantitativ bewertet. Dabei wurde die jeweilige Note vergeben sobald ein Xylemgefäß je Penetrationstelle die Anforderungen erfüllte.

Parameter 2: Xylem-Besiedlungs-Effizienz

1 = maximal eine Hyphe im Xylem sichtbar

2 = zwei oder mehr Hyphen im Xylem sichtbar

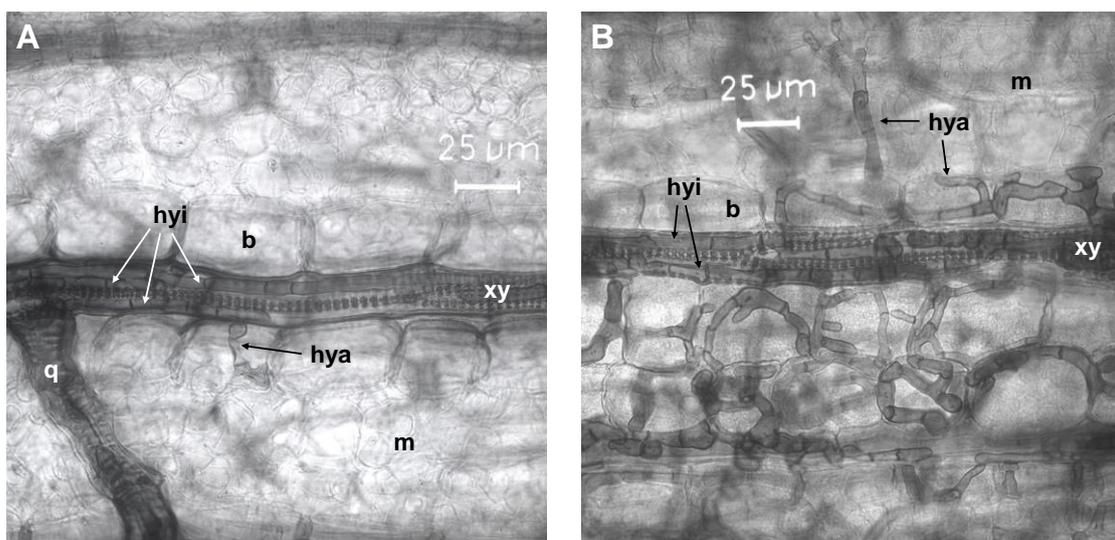
Als dritter Parameter wurde die Besiedlung des Mesophylls durch Pilzhyphen qualitativ bewertet.

Parameter 3: Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz

0 = keine Hyphen außerhalb des Xylems sichtbar

1 = Hyphen im Mesophyll sichtbar

Für die Veranschaulichung der erhobenen Parameter zur Xylem-Besiedlungs-Effizienz bzw. der Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz sind in Abbildung 11 jeweils eine starke Xylem Besiedlung und eine starke Kolonisation des Mesophylls dargestellt.



**Abb. 11:** Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Maisblattes auf der Fokusebene der Xylem Leitgefäße nach CBE-Färbung (12 dpi), A: Xylemgefäß (xy) mit mehreren Pilzhyphen innerhalb des Xylems (hyi) und außerhalb (hya) in den Bündelscheidenzellen (b) mit einer Quer-Verbindung (q) (40x); B: Xylemgefäß mit starker Hyphenkolonisation innerhalb (hyi) und deutlichem Hyphenwachstum außerhalb (hya) im Mesophyll (m) und den Bündelscheidenzellen (b).

Auf Basis dieser Parameter wurden 40 Penetrationsstellen je Variante untersucht und ausgewertet. Eine Variante entspricht die Bewertung der Parameter an einem Genotyp mit entsprechender Resistenzgenausstattung mit einer bestimmten Interaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es wurden 48 verschiedene Varianten für die Genotypen untersucht: Vier Genotypen mit unterschiedlicher Resistenzgenausstattung an fünf Zeitpunkten mit zwei möglichen Interaktionen (kompatibel und inkompatibel). Zudem wurden für die anfällige Linie B37 zehn Varianten untersucht, d. h. zwei Isolate zu fünf Zeitpunkten. Insgesamt wurden 58 Varianten mit je 40 Penetrationsstellen ausgewertet.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Versuche wurde mit der Software Statistica (Version 9, Fa. StatSoft, Tulsa, USA) durchgeführt. Die varianzanalytischen Verrechnungen der intervallskalierten Daten wurden auf Basis multipler Mittelwertvergleiche unter der Annahme einer Normalverteilung vorgenommen. Signifikante Mittelwert-Unterschiede zwischen den Varianten wurden mit Hilfe des Post-hoc Tukey-Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p \leq 0,05$ ) überprüft. Ordinalskalierte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test (Median-Test) auf signifikante Unterschiede überprüft. Signifikante Unterschiede sind in den grafischen Darstellungen durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

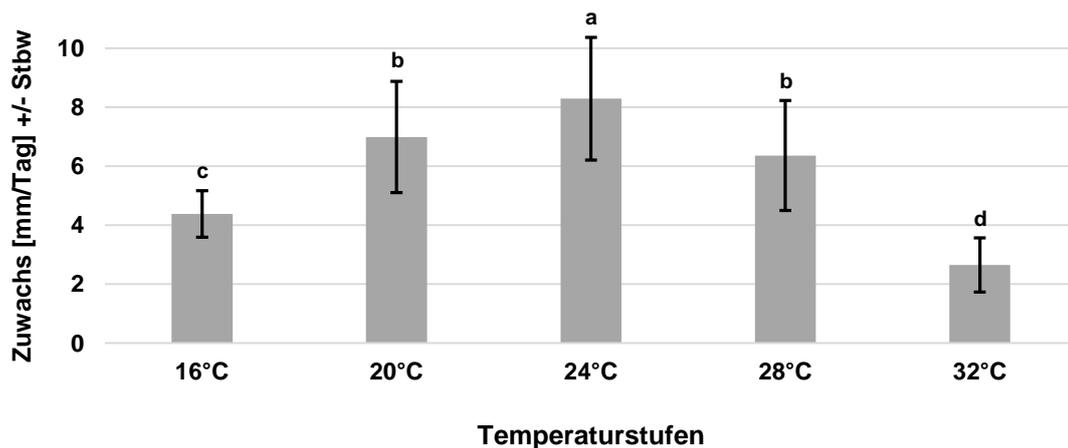
Korrelationsanalysen erfolgen nach dem Pearson-Korrelationskoeffizienten. In der tabellarischen Darstellung der Korrelationskoeffizienten wurden signifikante Unterschiede mit unterschiedlicher Anzahl an Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . Nicht gekennzeichnete Koeffizienten wiesen keine signifikanten Korrelationen auf.

Die statistische Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Homogenitätstests mit dem Programm Microsoft Excel 2013. Es wurden die Häufigkeitsverteilungen für jedes Merkmal und Resistenzgen auf Basis von  $n = 40$  Penetrationsstellen jeweils mit der anfälligen Linie B37 verglichen. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlicher Anzahl an Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$

### 3 Ergebnisse

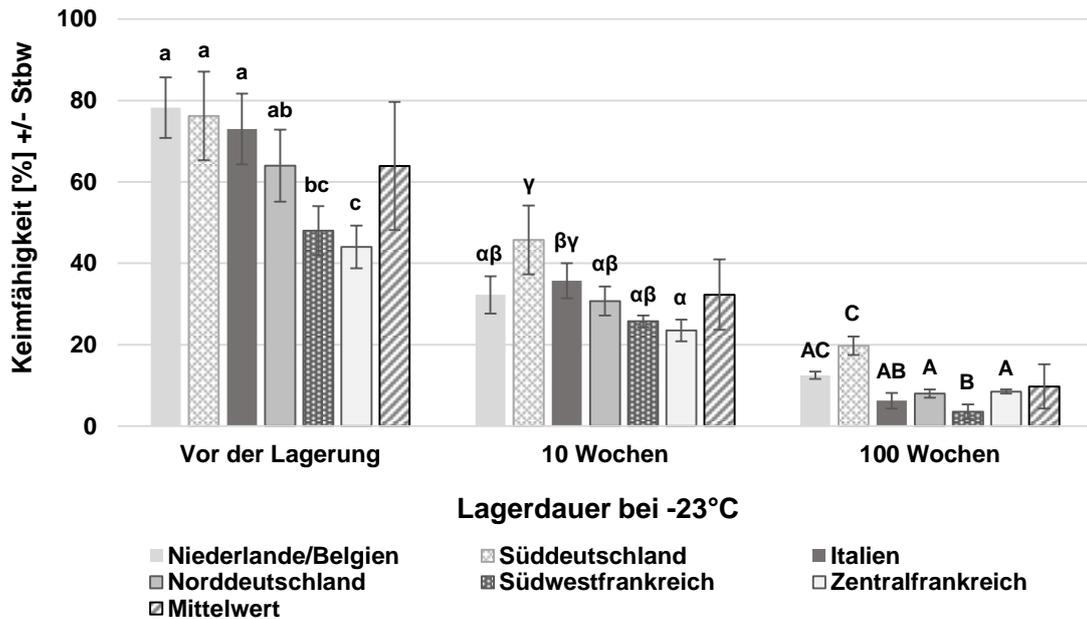
#### 3.1 Kultur- und Lagereigenschaften von *E. turcicum*

Die optimale Temperatur für das *in vitro* Wachstum von *E. turcicum* auf V8-Nährmedium liegt bei 24°C (Abb. 12). Mit 8,3 mm Zuwachs des Koloniedurchmessers je Tag unterscheidet sich die 24°C Variante signifikant sowohl von der höheren (28°C) als auch von der niedrigeren (20°C) Temperaturvariante mit Werten von 6,4 bzw. 7,0 mm Zuwachs. Darüber hinaus weist *E. turcicum* ein signifikant schnelleres Wachstum bei 16°C mit 4,4 mm im Vergleich zur 32°C Variante mit 2,7 mm auf. Ausgehend von 24°C reagiert *E. turcicum* stärker mit reduzierten Wachstumsraten auf höhere als auf niedrigere Temperaturen. Der optimale Temperaturbereich für die Anzucht und Kultur von *E. turcicum* unter *in vitro* Bedingungen im Labor wurde für den Bereich 20 bis 24°C definiert.



**Abb. 12:** Einfluss verschiedener Temperaturen auf den Zuwachs des Koloniedurchmessers von *E. turcicum* auf V8 Nährmedium in mm je Tag, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Tukey Test  $p \leq 0,05$ ),  $n=40$

Die Lagerfähigkeit der Konidiosporen von *E. turcicum* wurde anhand des Anteils keimfähiger Sporen nach Lagerung bei -23°C in 25% Glycerin bestimmt. In Abbildung 13 sind die Anteile gekeimter Sporen der sechs untersuchten Isolate in Abhängigkeit von der Lagerdauer dargestellt. Die Keimfähigkeit betrug im Mittel der sechs untersuchten Isolate unmittelbar nach dem Erstellen der Sporensuspension ohne Einfluss von Frost 63,9%. Bereits vor dem Einfrieren der Sporensuspensionen waren demnach 36,1% der Sporen nicht in der Lage, unter den *in vitro* Versuchsbedingungen zu keimen. Die höchste Keimfähigkeit weist das Isolat Niederlande/Belgien mit 78,3% auf.



**Abb. 13: Keimfähigkeit von *E. turcicum* Sporen verschiedener Isolatherkünfte vor und nach der Lagerung in 25% Glycerin bei -23°C, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der drei dargestellten Varianten, (Tukey Test  $p \leq 0,05$ , nach Log Transformation),  $n=4$ .**

Den niedrigsten Wert mit 44,0% zeigte das Isolat aus Zentralfrankreich. Diese beiden Werte verdeutlichen die enorme Variation innerhalb der untersuchten Isolate ohne Frosteinfluss. Nach einer Woche Lagerung bei -23°C lag die Keimfähigkeit mit 42,1% signifikant unter dem Ausgangswert. Die Werte vor der Lagerung zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten unmittelbar nach der Erstellung der Sporensuspensionen. Diese Unterschiede verringern sich nach zehn Wochen Lagerung bei -23°C. Zu diesem Zeitpunkt unterscheidet sich lediglich das Isolat aus Süddeutschland durch eine hohe Keimfähigkeit signifikant von den anderen Isolaten. Nach 100 Wochen Lagerdauer grenzt sich wiederum das Isolat aus Süddeutschland mit der höchsten Keimfähigkeit (19,8%) von den anderen Isolaten ab. Zudem weist das Isolat aus der Region Niederlande/Belgien im Vergleich eine signifikant höhere Keimfähigkeit auf. Das Isolat aus Südwestfrankreich ist als einziges durch eine sehr geringe Keimfähigkeit (3,5%) signifikant von den anderen Isolaten verschieden. Diese Werte verdeutlichen, dass eine Lagerung von *E. turcicum* Sporen in 25% Glycerin bei -23°C über einen Zeitraum von 100 Wochen möglich ist, aber mit einem deutlichen Verlust an keimfähigen Sporen verbunden ist.

### 3.2 Rassencharakterisierung europäischer *E. turcicum* Isolate

#### 3.2.1 Isolatsammlung von *E. turcicum* der Jahre 2011 und 2012

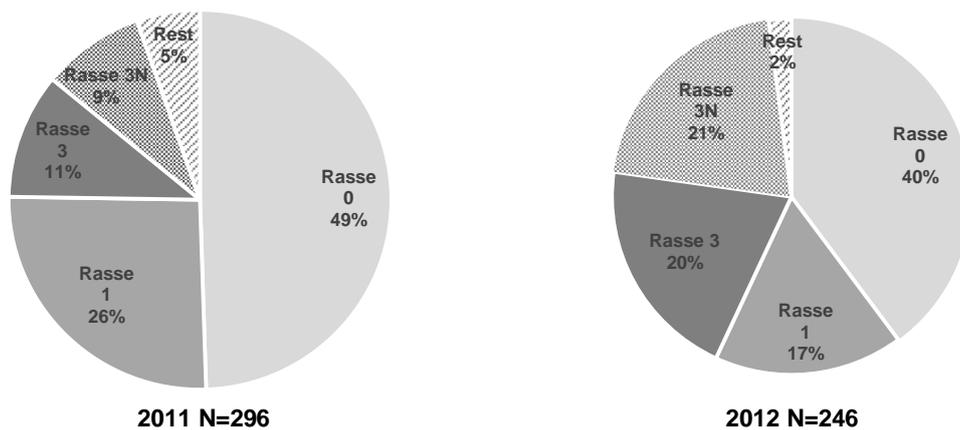
Von den eingesandten Blattproben aus den Jahren 2011 und 2012 wurde eine Isolatsammlung mit insgesamt 559 *E. turcicum* Isolaten von 168 verschiedenen Standorten erstellt. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die gewonnenen Isolate hinsichtlich Herkunftsregion und Jahr. Aus dem Jahr 2011 stammen 54% der Isolate (N = 302) und aus 2012 46% (N = 257). Die vier Regionen *Niederlande/Belgien*, *Süddeutschland/Österreich*, *Oberrheinregion* und *Südwestfrankreich* mit der höchsten Anzahl an Isolaten decken zusammen 63% (N = 352) aller Isolate ab. Die Regionen *Österreich/Ungarn*, *Norditalien* und *Tschechien/Polen* sind mit einem geringen Anteil von jeweils unter 5% gekennzeichnet. Der kumulierte Anteil dieser drei Regionen liegt bei 11,3%. Insbesondere in den Regionen mit geringem Gesamtanteil an Isolaten sind die Anteile der beiden Jahre zum Teil sehr unterschiedlich. Für die Region *Tschechien/Polen* (N = 19) stammen 84% der Isolate aus 2012. Die Isolate der Regionen *Norditalien* (N = 20) bzw. *Bretagne/Normandie* (N = 34) stammen zu 80 bzw. 85% aus dem Jahr 2011. Die Anzahl der gewonnenen Isolate je Standort (N/S) variiert von 2,9 bis 4,0 und liegt im Durchschnitt bei 3,3 Isolaten je Standort. Für die Regionen *Türkei (Adana)* und *Spanien (Galicien)* konnten jeweils nur aus einem Jahr Isolate gewonnen werden. Darüber hinaus ist die Anzahl der Isolate für diese Regionen aufgrund der geringen Anzahl eingegangener Proben mit N = 11 für die *Türkei* bzw. N = 6 für *Spanien* sehr gering.

**Tab. 13: Anzahl (N) und Anteil (%) der untersuchten *E. turcicum* Isolate aus den Jahren 2011 und 2012 nach Regionen; Anzahl Standorte (S) je Region und Anzahl untersuchter Isolate je Standort (N/S), absteigend sortiert nach Gesamtanzahl untersuchter Isolate.**

Region	2011		2012		Gesamt		S	N/S
	N	%	N	%	N	%		
Niederlande/Belgien	45	14,9	62	24,1	107	19,1	30	3,6
Süddeutschland/Österreich (Inntal)	56	18,5	36	14,0	92	16,5	29	3,2
Oberrheinregion	33	10,9	44	17,1	77	13,8	23	3,3
Südwestfrankreich	53	17,5	23	8,9	76	13,6	23	3,3
Norddeutschland	16	5,3	31	12,1	47	8,4	14	3,4
Zentralfrankreich	29	9,6	17	6,6	46	8,2	14	3,2
Bretagne/Normandie	29	9,6	5	1,9	34	6,1	11	3,1
Österreich (Steiermark)/Ungarn	16	5,3	8	3,1	24	4,3	6	4,0
Norditalien	16	5,3	4	1,6	20	3,6	7	2,9
Tschechien/Polen	3	1,0	16	6,2	19	3,4	6	3,2
<i>Türkei (Adana)</i>	-	-	11	4,3	11	2,0	3	3,7
<i>Spanien (Galicien)</i>	6	2,0	-	-	6	1,1	2	3,0
<b>Summe</b>	<b>302</b>	<b>100</b>	<b>257</b>	<b>100</b>	<b>559</b>	<b>100</b>	<b>168</b>	<b>Ø 3,3</b>

### 3.2.2 Regionale Rassenspektren der Jahre 2011 und 2012

Es wurden insgesamt 559 Isolate aus den Jahren 2011 und 2012 auf ihre Virulenzeigenschaften untersucht. In Abbildung 14 ist das zusammengefasste Rassenspektrum der beiden Untersuchungsjahre dargestellt. Mit einem kumulierten Anteil der Rassen 0, 1, 3 und 3N decken diese vier Rassen in den Jahren 2011 und 2012 mit 95% und 98% nahezu das gesamte Rassenspektrum von *E. turcicum* in Europa ab. Die Anteile der dominierenden Rassen haben sich zwischen den Jahren leicht verändert. Am deutlichsten sichtbar wird dies am Beispiel der Rassen 3N und 3. Beide Rassen haben ihren Anteil in 2012 im Vergleich zu 2011 in etwa verdoppelt. Gleichzeitig ist der Anteil der Rasse 1 von gut einem Viertel (26%) auf 17% gesunken. Der Anteil der Rasse 0 ist ebenfalls um neun Prozentpunkte auf 40% im Jahr 2011 zurückgegangen.



**Abb. 14:** Anteile der häufigsten Rassen innerhalb der gesamten untersuchten europäischen *E. turcicum* Isolate der Jahre 2011 und 2012; unter „Rest“ sind die weniger bedeutenden Rassen zusammengefasst, 2011: 13, 23, 123, 2 und 12; 2012: 2, 13, 13N und 1N (ohne Türkei und Spanien).

Aus der Region *Spanien (Galicien)* sind lediglich sechs Isolate aus dem Jahr 2011 in die Untersuchungen eingeflossen. Alle Isolate dieser Region waren avirulent gegenüber den getesteten Resistenzgenen und wurden demnach als Rasse 0 beschrieben. Aus der Region *Türkei (Adana)* wurden insgesamt 11 Isolate aus dem Jahr 2012 untersucht. In dieser Region dominierten die Rasse 3N mit 73% und die Rasse 23N mit 18% das Rassenspektrum. Ein Isolat (9%) wurde als Rasse 0 eingestuft. Diese beiden Regionen werden aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten und der geographischen Abgrenzung zu den anderen Regionen in der folgenden Ergebnisbesprechung nicht weiter berücksichtigt.

**Tab.14: Gesamtes Rassenspektrum der Jahre 2011 und 2012 nach Regionen, absteigend sortiert nach Anzahl Isolaten.**

Region	Rassenspektrum											Anzahl Isolate	
	0	1	3	3N	13	23	123	2	12	13N	1N		
Niederlande/Belgien	81		9	13		1		3					107
Süddeutschland/Österreich	38	14	25	10	2	2	1						92
Oberrheinregion	21	36	9	10						1			77
Südwestfrankreich	24	18	5	29									76
Norddeutschland	17	6	16	6	2								47
Zentralfrankreich	12	23	6	3				1	1				46
Bretagne/Normandie	30		2	2									34
Österreich/Ungarn	3	15	1		2		2					1	24
Norditalien	8		9	1	1	1							20
Tschechien/Polen	9	7		3									19
Summe	243	119	82	77	7	4	3	4	1	1	1	1	542

Das gesamte Rassenspektrum in den untersuchten Regionen über beide Jahre ist in Tabelle 14 in absoluten Zahlen zusammengefasst und in Tabelle 15 als relative Anteile der verschiedenen Rassen dargestellt. Die beiden Regionen *Niederlande/Belgien* und *Bretagne/Normandie* grenzen sich durch ihre sehr hohen Anteile avirulenter Isolate der Rasse 0 von allen anderen Regionen ab. Der Anteil der Rasse 0 liegt in der Region *Niederlande/Belgien* bei 75,7% (N=81) und in der Region *Bretagne/Normandie* bei 88,2% (N=30). Die Rasse 3N hat mit 12,1% (N=13) in der Region *Niederlande/Belgien* die zweithöchste Bedeutung. Die verbleibenden Rassen sind in diesen beiden Regionen von untergeordneter Bedeutung. In der Region *Süddeutschland/Österreich* dominieren die vier Rassen 0 (41,3%), 3 (27,2%), 1 (15,2%) und 3N (10,9%) mit zusammen 94,6%. Die Rassen 13, 23 und 123 haben mit maximal 2,2% in dieser Region eine sehr geringe Bedeutung. Ein Merkmal der *Oberrheinregion* ist der hohe Anteil der Rasse 1 (46,8%), gefolgt von der Rasse 0 mit 27,3%. Zwei weitere Rassen von Bedeutung in dieser Region sind die Rassen 3N (13%) und die Rasse 3 mit 11,7%. Die Rasse 13N wurde ausschließlich in dieser Region beschrieben, hat allerdings mit einem Isolat (1,3%) kaum Bedeutung. Das Alleinstellungsmerkmal der Region *Südwestfrankreich* ist der höchste Anteil der Rasse 3N (38,2%). Zwei weitere bedeutende Rassen dieser Region sind die Rassen 0 (31,6%) und 1 (23,7%). Das Gebiet *Norddeutschland* wird vor allem durch die zwei Rassen 0 (36,2%) und 3 (34,0%) dominiert. Die zwei weiteren Rassen 1 und 3N haben jeweils einen Anteil von 12,8%. Die fünfte vorkommende Rasse in *Norddeutschland* (Rasse 13) ist mit einem Anteil von 4,3% weniger bedeutend. In der Region *Zentralfrankreich* dominiert die Rasse 1 mit einem Anteil von 50% deutlich das Rassenspektrum. Daneben sind die Rassen 0 (26,1%) und 3 (13%) von Bedeutung. Zudem konnten für diese Region die Rassen 3N mit 6,5% und die Rassen 2 und 12 mit jeweils 2,2% nachgewiesen werden.

**Tab.15: Anteile der Rassen von *E. turcicum* in Prozent in den untersuchten Regionen der Jahre 2011 und 2012.**

Region	Rassenanteile in %											Anzahl Isolate
	0	1	3	3N	13	23	123	2	12	13N	1N	
Niederlande/Belgien	75,7	-	8,4	12,1	-	0,9	-	2,8	-	-	-	107
Süddeutschland/Österreich	41,3	15,2	27,2	10,9	2,2	2,2	1,1	-	-	-	-	92
Oberrheinregion	27,3	46,8	11,7	13,0	-	-	-	-	-	1,3	-	77
Südwestfrankreich	31,6	23,7	6,6	38,2	-	-	-	-	-	-	-	76
Norddeutschland	36,2	12,8	34,0	12,8	4,3	-	-	-	-	-	-	47
Zentralfrankreich	26,1	50,0	13,0	6,5	-	-	-	2,2	2,2	-	-	46
Bretagne/Normandie	88,2	-	5,9	5,9	-	-	-	-	-	-	-	34
Österreich/Ungarn	12,5	62,5	4,2	-	8,3	-	8,3	-	-	-	4,2	24
Norditalien	40,0	-	45,0	5,0	5,0	5,0	-	-	-	-	-	20
Tschechien/Polen	47,4	36,8	0,0	15,8	-	-	-	-	-	-	-	19
Alle Regionen	44,8	22,0	15,1	14,2	1,3	0,7	0,6	0,7	0,2	0,2	0,2	542

Die Region mit dem höchsten Anteil der Rasse 1 mit 62,5% ist *Österreich/Ungarn*. Neben der Rasse 1 hat noch die Rasse 0 mit 12,5% eine nennenswerte Bedeutung. Weitere Rassen der Region sind die Rassen 13 und 123 mit je 8,3% und 3 bzw. 1N mit je 4,2%. Ähnlich wie in *Norddeutschland* dominieren auch in *Norditalien* die Rassen 3 (45%) und 0 (40%) das Rassenspektrum deutlich. Weitere Rassen mit je 5% Anteil sind die Rassen 3N, 13 und 23. In *Tschechien/Polen* dominiert die Rasse 0 mit 47,4% das Rassenspektrum, gefolgt von Rasse 1 mit 36,8% und Rasse 3N mit einem Anteil von 15,8%. Die Summe der untersuchten Isolate ist für die Regionen *Norditalien* (N=20) und *Tschechien/Polen* (N=19) am geringsten.

### 3.2.3 Regionale Diversität und Komplexität der Rassen

#### Rassendiversität

In Tabelle 16 sind Parameter zur Beschreibung der Diversität der Rassenzusammensetzung zwischen den Regionen und innerhalb der Regionen dargestellt. Der erste Parameter beschreibt den Umfang der Isolatsammlung für jede Region. Anhand dieses Parameters wird deutlich, dass die Größen der Isolat-Sammlungen zwischen den Regionen stark variieren. Die Region mit der größten Anzahl an Isolaten ist die Region *Niederlande/Belgien* (N=107) und die mit der geringsten Anzahl ist *Tschechien/Polen* (N=19).

**Tab.16: Anzahl Isolate und Rassen von *E. turcicum* nach Regionen mit Parametern\* zur Beschreibung der Rassenverteilung und Diversität in den untersuchten Regionen, Datengrundlage der Jahre 2011 und 2012**

Region	Isolate	Rassen	$V_i$	$V_v$	$R_1$	$R_2$	$H_G$	$H_{GR}$	$H_S$	$H_{SR}$
Niederlande/Belgien	<b>107</b>	5	0,37	1,54	0,77	0,88	0,86	<u>0,04</u>	0,82	0,18
Süddeutschland/Österreich	92	<b>7</b>	0,76	1,30	0,41	0,68	1,33	0,07	<b>1,46</b>	0,32
Oberrheinregion	77	4	0,88	1,21	0,47	0,74	0,69	0,04	1,28	0,30
Südwestfrankreich	76	4	1,07	<b>1,56</b>	0,37	<u>0,68</u>	0,69	0,04	1,25	0,29
Norddeutschland	47	5	0,81	1,27	<u>0,36</u>	0,70	1,04	0,09	1,39	0,36
Zentralfrankreich	46	6	0,83	<u>1,12</u>	0,50	0,76	1,31	0,11	1,31	0,34
Bretagne/Normandie	34	<u>3</u>	<u>0,18</u>	1,50	<b>0,88</b>	<b>0,94</b>	<u>0,57</u>	0,06	<u>0,44</u>	<u>0,13</u>
Österreich/Ungarn	24	6	<b>1,17</b>	1,33	0,63	0,75	<b>1,57</b>	<b>0,22</b>	1,23	0,39
Norditalien	20	5	0,75	1,25	0,45	0,85	1,34	0,21	1,18	<b>0,39</b>
Tschechien/Polen	<u>19</u>	<u>3</u>	0,68	1,30	0,47	0,84	0,68	0,11	1,01	0,34
Alle Regionen	542	11	0,73	1,33	0,45	0,67	1,59	0,02	1,44	0,23

\*  $V_i$  = Mittel der Virulenzkomplexität aller Isolate;  $V_v$  = Mittel der Virulenzkomplexität bezogen auf virulente Isolate (ohne Rasse 0);  $R_1$  = Anteil der häufigsten Rasse;  $R_2$  = Kumulierter Anteil der zwei häufigsten Rassen;  $H_G$  = Gleason Index;  $H_{GR}$  = relativer Gleason Index;  $H_S$  = Shannon Index;  $H_{SR}$  = relativer Shannon Index

Der Parameter „Rassen“ beschreibt die Anzahl verschiedener Rassen innerhalb der Regionen. Die höchste Anzahl unterschiedlicher Rassen ist für die Region *Süddeutschland/Österreich* mit sieben beschrieben. Jeweils sechs verschiedene Rassen treten in den Regionen *Zentralfrankreich* und *Österreich/Ungarn* auf. Für die Regionen *Tschechien/Polen* und *Bretagne/Normandie* sind die geringsten Anzahlen verschiedener Rassen beschrieben worden. Die Virulenzkomplexität aller Isolate ( $V_i$ ) ist am geringsten in der Region *Bretagne/Normandie* (0,18) und *Niederlande/Belgien* (0,37) und am höchsten in *Österreich/Ungarn* (1,17) bzw. in *Südwestfrankreich* (1,07). Dieses Ergebnis verschiebt sich bei der Berechnung der Virulenzkomplexität bezogen auf virulente Isolate ( $V_v$ ). Hier weisen die Regionen *Südwestfrankreich* (1,56) und *Niederlande/Belgien* (1,54) die höchsten Werte auf. Die Regionen *Zentralfrankreich* (1,12) und die *Oberrheinregion* (1,21) weisen in diesem Merkmal die geringsten Werte auf. Die Werte der Anteile der häufigsten Rasse ( $R_1$ ) reichen von 88% in der Region *Bretagne/Normandie* bis zu 36% in *Norddeutschland*. Der kumulierte Anteil der zwei häufigsten Rassen ( $R_2$ ) liegt im Durchschnitt aller untersuchten Regionen bei 67%. Die höchsten Werte liegen bei 94% bzw. 88% für die Regionen *Bretagne/Normandie* bzw. *Niederlande/Belgien*. Die Regionen mit den geringsten kumulierten Anteilen sind *Südwestfrankreich* und *Süddeutschland/Österreich* mit je 68%.

Der Gleason-Index ( $H_G$ ) ist relativ anfällig gegenüber der Anzahl verschiedener Rassen, ohne deren Anteile zu berücksichtigen. Dementsprechend entfallen die niedrigsten Index-

Werte auf die Regionen *Bretagne/Normandie* (0,57) bzw. *Tschechien/Polen* (0,68), die jeweils lediglich drei verschiedene Rassen aufweisen. Die höchsten Werte des Gleason-Index entfallen auf die Regionen *Österreich/Ungarn* (1,57) und *Norditalien* (1,34) mit hohen Anzahlen an verschiedenen Rassen. Die zwei höchsten Werte für den relativen Gleason-Index ( $H_{GR}$ ) entfallen ebenfalls auf die Regionen *Österreich/Ungarn* (0,22) und *Norditalien* (0,21). Die niedrigsten Werte entfallen auf die *Oberrheinregion*, *Niederlande/Belgien* und *Südwestfrankreich* mit je 0,04. Gegenüber dem Gleason-Index berücksichtigt der Shannon-Index neben der Anzahl der verschiedenen Rassen auch deren Anteil in der untersuchten Population. Die geringsten Werte des Shannon-Index entfallen auf die Regionen *Bretagne/Normandie* (0,44) und *Niederlande/Belgien* (0,82). Die Regionen *Süddeutschland/Österreich* (1,46) und *Norddeutschland* (1,39) erreichen die höchsten Werte. Für den relativen Shannon-Index entfallen die niedrigsten Werte ebenfalls auf die beiden Regionen *Bretagne/Normandie* (0,13) und *Niederlande/Belgien* (0,18). Die höchsten Werte entfallen, anders als beim Shannon-Index, auf die Regionen *Norditalien* (0,39) und *Österreich/Ungarn* (0,39).

Lineare Korrelationskoeffizienten zu den beschriebenen Diversitätsparametern sind in Tabelle 17 aufgelistet. Der Parameter „Isolate“ zeigte eine signifikante negative Korrelation mit den relativen Gleason Index ( $H_{GR}$ ). Das Merkmal „Rassen“ korrelierte signifikant mit beiden Diversitätsindizes. Aufgrund der Berechnung des Gleason-Index war die deutlich höhere Korrelation in diesem Fall zu erwarten. Die Virulenzkomplexität aller Isolate korrelierte signifikant mit den Anteilen der häufigsten Rassen. Darüber hinaus wies das Merkmal

**Tab.17: Korrelationskoeffizienten der Parameter<sup>a</sup> zur Beschreibung der Rassenverteilung und Diversität von *E. turcicum*, N = 542 Isolate aus 10 Regionen**

	Isolate	Rassen	$V_i$	$V_v$	$R_1$	$R_2$	$H_G$	$H_s$	$H_{GR}$
<b>Rassen</b>	0,275								
$V_i$	-0,110	0,386							
$V_v$	0,346	-0,375	-0,351						
$R_1$	-0,014	-0,260	-0,698*	0,474					
$R_2$	-0,299	-0,515	-0,801**	0,298	0,796**				
$H_G$	-0,202	0,869**	0,481	-0,492	-0,226	-0,336			
$H_s$	0,140	0,632*	0,807**	-0,586	-0,879***	-0,905***	0,551		
$H_{GR}$	-0,743*	0,295	0,379	-0,400	-0,072	0,087	0,627*	0,179	
$H_{SR}$	-0,423	0,439	0,786	-0,682*	-0,759*	-0,572	0,663*	0,804**	0,668*

<sup>a</sup> Beschreibung der Parameter: Isolate = Anzahl Isolate je Region, Rassen = Anzahl verschiedener Rassen je Region,  $V_i$  = Mittel der Virulenzkomplexität aller Isolate,  $V_v$  = Mittel der Virulenzkomplexität bezogen auf virulente Isolate (ohne Rasse 0),  $R_1$  = Anteil der häufigsten Rasse,  $R_2$  = Kumulierter Anteil der zwei häufigsten Rassen,  $H_G$  = Gleason Index;  $H_s$  = Shannon Index,  $H_{GR}$  = relativer Gleason Index,  $H_{SR}$  = relativer Shannon Index; Signifikante Koeffizienten sind gekennzeichnet mit \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Virulenzkomplexität einen starken Zusammenhang ( $p \leq 0,01$ ) zum Shannon-Diversitätsindex auf. Die Virulenzkomplexität der virulenten Isolate korrelierte mit dem relativen Shannon-Index ( $H_{SR}$ ). Das Merkmal  $R_1$  weist sehr starke negative Korrelationen zu den Parametern  $R_2$ , und  $H_S$  auf. Darüber hinaus weist  $R_1$  einen negativen Zusammenhang zum Merkmal  $H_{SR}$  auf. Der Zusammenhang zwischen dem kumulierten Anteil der zwei häufigsten Rassen ( $R_2$ ) und dem Shannon-Diversitäts-Index ist mit  $-0,905$  der höchste Korrelationskoeffizient unter den untersuchten Merkmalen. Er ist signifikant bei  $p \leq 0,001$ . Der lineare Zusammenhang dieser beiden Merkmale ist grafisch in Abbildung 15 dargestellt. Sowohl der Gleason ( $H_G$ ) als auch der Shannon-Diversitäts-Index ( $H_S$ ) weisen erwartungsgemäß hohe und signifikante Korrelationen mit ihren jeweils auf relativer Basis umgerechneten Indizes  $H_{GR}$  und  $H_{SR}$  auf. Zwischen den beiden relativen Indizes besteht ebenfalls ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Zusammenhang. Es besteht hingegen kein Zusammenhang zwischen den beiden normalen Gleason ( $H_G$ ) und Shannon Diversitäts-Indizes ( $H_S$ ).

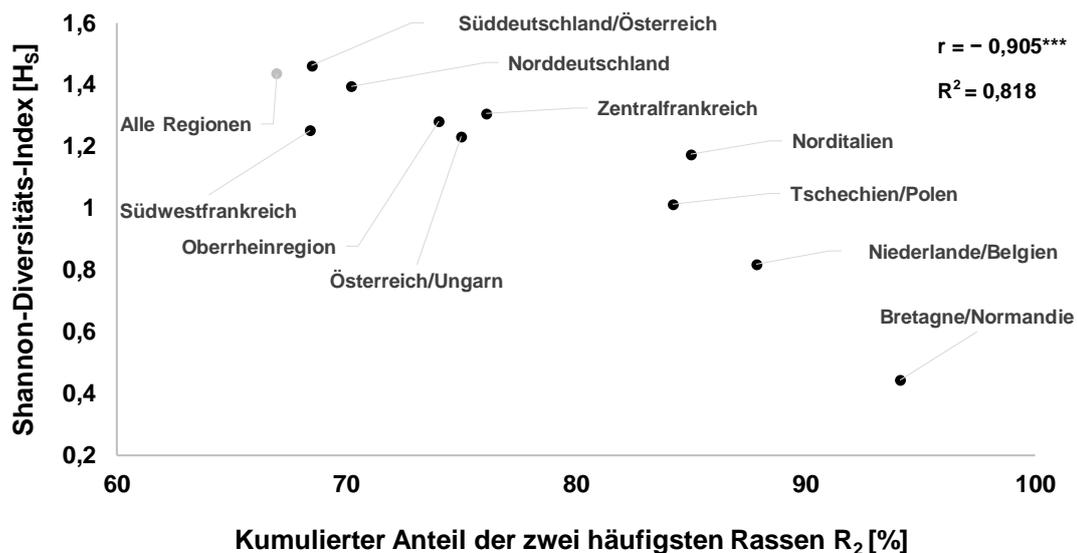


Abb. 15: Korrelation des Shannon-Diversitäts-Index [ $H_S$ ] mit dem kumulierten Anteil der zwei häufigsten Rassen [ $R_2$ ],  $N = 542$  Isolate aus den Jahren 2011 und 2012, \*\*\* = Korrelationskoeffizient signifikant bei  $p \leq 0,001$ .

### Virulenzkomplexität

Die Virulenzkomplexität (Vk) beschreibt die Anzahl an Virulenzen je Isolat. In Abbildung 16 sind die Anteile der unterschiedlichen Vk in den untersuchten Regionen dargestellt. In den beiden Regionen *Bretagne/Normandie* und *Niederlande/Belgien* dominieren avirulente Iso-

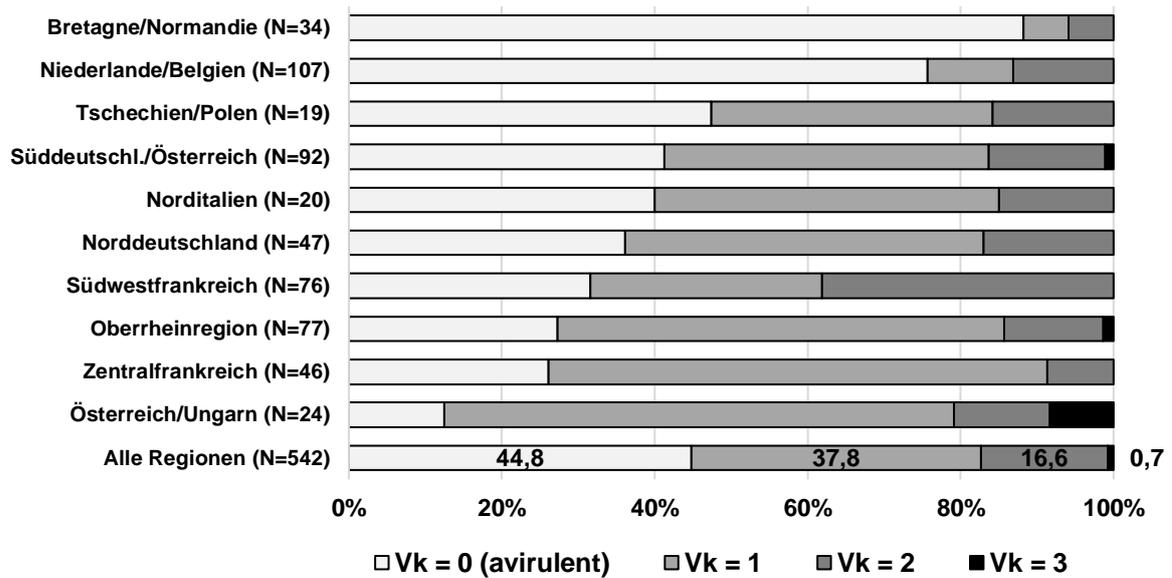


Abb. 16: Anteil verschiedener Virulenzkomplexitäten (Vk) von *E. turcicum* Isolaten nach Regionen, Daten aus den Jahren 2011 und 2012, absteigend sortiert nach dem Anteil an Isolaten mit der Virulenzkomplexität Vk = 0.

late mit einer Vk = 0. Die folgenden vier Regionen (*Tschechien/Polen*, *Süddeutschland/Österreich*, *Norditalien*, *Norddeutschland*) weisen alle sehr ähnliche Anteile der Vk auf. In dieser Gruppe reichen die Anteile der Isolate mit einer Vk=1 von 37 bis 47% und die Anteile der Isolate mit einer Vk = 2 von 15 bis 17%. Einzig die Region *Süddeutschland/Österreich* weist zudem etwa 1% Isolate auf mit einer Vk = 3. Die Region *Südwestfrankreich* hat mit 38,2% den höchsten Anteil an Isolaten, die zwei Virulenzen in sich tragen. Die Gruppe der letzten drei Regionen (*Oberrheinregion*, *Zentralfrankreich*, *Österreich/Ungarn*) haben die Gemeinsamkeit, dass dort sehr hohe Anteile von Isolaten mit einer einzigen Virulenz (Vk = 1) zu finden sind. Den höchsten Anteil dieser Kategorie weist die Region *Österreich/Ungarn* mit einem Anteil von 66,7% auf. Zudem tragen in dieser Region 8,3% der Isolate 3 Virulenzen. Auch dieser Wert ist der höchste unter allen untersuchten Regionen. Lediglich 12,5% der Isolate in der Region *Österreich/Ungarn* sind nicht in der Lage, eines der getesteten Resistenzgene zu überwinden.

### 3.2.4 Regionale Wirksamkeit der Resistenzgene

Die Virulenzfrequenz beschreibt die Häufigkeit, mit der ein Resistenzgen in einer geographisch definierten Region von einem Isolat überwunden wird. Mit Hilfe dieses Merkmals können konkrete Aussagen über die regionale Wirksamkeit eines Resistenzgens getätigt werden. Die Virulenzfrequenzen für die Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN* in den untersuchten Regionen sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tab. 18: Virulenzfrequenzen (%) von *E. turcicum* Isolaten nach Regionen für die Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN*, Mittelwerte der Jahre 2011 und 2012, absteigend sortiert nach *Ht1*.**

Region	Anzahl Isolate	Resistenzgene			
		<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
Österreich/Ungarn	24	83,3	8,3	20,8	4,2
Zentralfrankreich	46	52,2	4,3	19,6	6,5
Oberrheinregion	77	48,1	0,0	26,0	14,3
Tschechien/Polen	19	36,8	0,0	15,8	15,8
Südwestfrankreich	76	23,7	0,0	44,7	38,2
Süddeutschland/Österreich	92	18,5	3,3	43,5	10,9
Norddeutschland	47	17,0	0,0	51,1	12,8
Norditalien	20	5,0	5,0	60,0	5,0
Bretagne/Normandie	34	0,0	0,0	11,8	5,9
Niederlande/Belgien	107	0,0	3,7	21,5	12,1
Alle Regionen	542	24,4	2,2	32,1	14,6

51 – 100%
25 – 50%

Alle Werte über 50% sind dunkelgrau und alle Werte zwischen 25% und 50% sind hellgrau hervorgehoben. Für das Resistenzgen *Ht1* konnten die höchsten Wirksamkeitsverluste in den Regionen *Österreich/Ungarn* (83,3%) und *Zentralfrankreich* mit 52,2% nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen die *Oberrheinregion* mit 48,1% und *Tschechien/Polen* mit 36,8% hohe Virulenzfrequenzen für das Resistenzgen *Ht1*. In allen anderen Regionen zeigte das Resistenzgen *Ht1* in den Jahren 2011 und 2012 eine Wirksamkeit gegenüber wenigstens 75% der untersuchten Isolate. In den nördlichen Küstenregionen *Bretagne/Normandie* und *Niederlande/Belgien* erwies sich das Resistenzgen *Ht1* als wirksam gegenüber 100% der untersuchten Isolate. Das Resistenzgen *Ht2* zeigt mit einer Virulenzfrequenz von 2,2% als Mittelwert über alle Regionen und beide Jahre die höchste Wirksamkeit unter den getesteten Resistenzgenen. Die höchste Virulenzfrequenz für *Ht2* wurde für die Region *Österreich/Ungarn* mit 8,3% beschrieben. In allen anderen Regionen war *Ht2* gegenüber mindestens 95% der Isolate wirksam. Das Resistenzgen *Ht3* weist im Durchschnitt mit 32,1% die höchste Virulenzfrequenz auf. Insbesondere für die Regionen *Norditalien* (60%) und *Norddeutschland* (51,1%) wird für *Ht3* ein deutlicher Wirksamkeitsverlust festgestellt. Die Regionen *Südwestfrankreich* (44,7%), *Süddeutschland/Österreich* (43,5%) und die *Oberrheinregion* (26%) sind ebenfalls durch erhöhte Virulenzfrequenzen gegenüber *Ht3* gekennzeichnet. Die höchste Wirksamkeit von *Ht3* wurde für die Region *Bretagne/Normandie* mit lediglich 11,8% virulenten Isolaten festgestellt. Für das Resistenzgen *HtN* wurden genau wie für *Ht3* in allen Regionen virulente Isolate nachgewiesen. Die höchste Virulenzfrequenz

für *HtN* erreicht mit Abstand die Region *Südwestfrankreich* mit 38,2%. Alle anderen Regionen weisen Werte von unter 16% für *HtN* auf. Die höchste Wirksamkeit zeigt *HtN* in der Region *Österreich/Ungarn* mit einer Virulenzfrequenz von 4,2%.

### 3.2.5 Feldbonitur verschiedener *Ht*-Differentialsortimente

Durch Anbau und Bonitur von Differentialsortimenten im Feld ist es möglich, die gewonnenen Ergebnisse aus dem Gewächshausscreening auf ihre Übertragbarkeit für das Feld zu beurteilen. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse von Feldbonituren verschiedener Differentialsortimente aus sechs verschiedenen Regionen dargestellt. Je dunkler die Zellen schattiert sind, desto höher lag die Befallsstärke in der Region für die jeweilige Differentiallinie. Die Werte über alle Regionen weisen für die Linien mit den Resistenzgenen *Ht1* und *Ht3* mit Noten von 4,0 und 3,8 den höchsten Befall auf. Diese Werte variieren zwischen den Regionen deutlich. So weisen die Regionen *Österreich/Ungarn* und die *Oberrheinregion* jeweils den höchsten Befall auf Linien mit den Resistenzgenen *Ht1* und *Ht3* auf. Den höchsten Befallswert auf einer Linie mit *Ht*-Gen für alle Regionen erreicht die Region *Österreich/Ungarn* mit der Note 6,0 für das Resistenzgen *Ht1*. In dieser Region wurde ebenfalls auf den Linien ohne Resistenzgen der höchste Befall bonitiert. Einen ebenfalls hohen Befall für *Ht1* wies die *Oberrheinregion* mit 4,9 auf. In *Südwestfrankreich* zeigten alle Linien sowohl mit als auch ohne Resistenzgen einen wenig differenzierenden Befall zwischen 3,5 und 5,0. Der höchste Befall wurde in dieser Region für die Linien mit dem Resistenzgen *Ht3* festgestellt. Die südwestfranzösische Region ist durch die höchsten Werte für die Resistenzgene *Ht3* und *HtN* mit 5,0 und 4,0 gekennzeichnet. Für die Grenzregion zwischen Deutschland

**Tab. 19: Boniturergebnisse des regionalen Anbaus der Differentiallinien mit den *Ht*-Resistenzgenen *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN* und der rekurrenten Eltern ohne *Ht*-Gen, nach Regionen, ± Standardabweichung, Boniturskala 1 -9, dunklere Schattierungen kennzeichnen höheren Befall.**

Region	Resistenzgene der Differentiallinien				
	ohne <i>Ht</i> -Gen	<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
Österreich/Ungarn	7,3 ±1,2	6,0 ±0,7	2,0 ±0,0	3,8 ±0,4	1,5 ±0,8
Oberrheinregion	4,7 ±0,8	4,9 ±0,7	3,3 ±1,1	4,3 ±0,6	1,0 ±0,0
Südwestfrankreich	4,0 ±0,0	3,5 ±0,5	3,5 ±0,5	5,0 ±0,0	4,0 ±0,0
Süddeutshl./Österreich	5,6 ±1,4	4,0 ±1,0	2,3 ±0,9	3,6 ±1,0	2,3 ±0,7
Norddeutschland	3,3 ±2,3	2,5 ±1,1	4,0 ±2,3	2,8 ±1,1	2,5 ±1,5
Niederlande/Belgien	2,7 ±0,9	3,2 ±1,3	3,2 ±1,1	3,7 ±0,9	-
Alle Regionen	4,6 ±2,1	4,0 ±1,4	3,0 ±1,4	3,8 ±1,0	2,3 ±1,1

Kategorien Befallsstärke: 

1 – 3,4	3,5 – 4,4	4,5 – 5,4	5,5 - 9
---------	-----------	-----------	---------

und Österreich im Inntal wurde erhöhter Befall für die Linien mit den Resistenzgenen *Ht1* und *Ht3* festgestellt. Die beiden nördlichen Regionen *Norddeutschland* und *Niederlande/Belgien* fallen durch vergleichsweise geringen Befall auf den Linien ohne Resistenzgen auf. Dennoch wurde in der Region *Norddeutschland* der höchste Befall auf den Linien mit dem Resistenzgen *Ht2* festgestellt. Die Region *Niederlande/Belgien* weist einen leicht erhöhten Befall für das Resistenzgen *Ht3* auf.

**3.3 Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Resistenzgene gegen *E. turcicum***

**3.3.1 Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Gene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN***

In Klimakammerversuchen wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Wirksamkeit der Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN* im genetischen Hintergrund der Maislinie B37 an Ganzpflanzen untersucht. Der untersuchte Temperaturbereich reichte in 5°C-Schritten von 15°C bis 30°C. Die Ergebnisse der qualitativen Virulenzeinstufungen der untersuchten Isolate sind in Tabelle 20 zusammengefasst. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse des Rassenscreenings der Isolate dargestellt. In den Spalten links davon sind die Virulenzeinstufungen für jede Temperatur dargestellt. Grau hinterlegte Felder signalisieren Abweichungen zwischen der Einstufung im Rassenscreening und den untersuchten Temperaturvarianten. Für die Resistenzgene *Ht1* und *HtN* wurde eine sehr stabile Wirkung ohne Abweichungen über den gesamten Temperaturbereich für alle Isolate festgestellt. Für das Resistenzgen *Ht3* wurde im niedrigen Temperaturbereich von 15/10°C ein heterogener Wirksamkeitsverlust festgestellt. In diesem Fall wurde das eigentlich avirulente Isolat 76-4 auf sieben der 12 Wiederholungen als virulent eingestuft. Demgegenüber wurde das virulente Isolat 48-1 in der hohen Temperaturvariante 30/25°C in allen 12 Wiederholungen als avirulent eingestuft. Bei *Ht3* führten in diesem Versuch sehr niedrige Temperaturen zu einem

**Tab. 20: Einstufung der Virulenzeigenschaften verschiedener Isolate auf dem Differentialsortiment bei unterschiedlichen Temperaturen; A = avirulent, V = virulent, A/V = heterogene Symptomausprägung zwischen den Wiederholungen (n=12).**

Isolat	Linie	Temperatur in °C (Tag/Nacht) 12h				Ergebnis Rassenscreening
		30/25	25/20	20/15	15/10	24/20°C
76-4 Rasse 0 avirulent	B37 <i>Ht1</i>	A	A	A	A	A
	B37 <i>Ht2</i>	A	A	V	V	A
	B37 <i>Ht3</i>	A	A	A	A/V	A
	B37 <i>HtN</i>	A	A	A	A	A
48-1 Rasse 123	B37 <i>Ht1</i>	V	V	V	V	V
	B37 <i>Ht2</i>	A	A/V	V	V	V
	B37 <i>Ht3</i>	A	V	V	V	V
	B37 <i>HtN</i>	A	A	A	A	A
25-3 Rasse 3N	B37 <i>Ht1</i>	A	A	A	A	A
	B37 <i>Ht2</i>	A	A	A/V	V	A
	B37 <i>Ht3</i>	V	V	V	V	V
	B37 <i>HtN</i>	V	V	V	V	V

■ = Abweichung von Virulenzeigenschaften unter Standardbedingungen 24/20°C

geringfügigen Wirksamkeitsverlust und hohe Temperaturen zu einer Steigerung der Wirksamkeit. Ein Verlust der Virulenz wurde auch für das virulente Isolat 48-1 gegenüber dem Resistenzgen *Ht2* bei hohen (25/20°C) und sehr hohen (30/25°C) Temperaturen festgestellt. In der 25/20°C Variante wurde das Isolat 48-1 in sieben der zwölf Wiederholungen auf *Ht2* als avirulent eingestuft. In der höchsten Temperaturvariante wurden einheitlich alle zwölf Wiederholungen als avirulent bewertet. Diese Ergebnisse belegen einen Verlust der Virulenz gegenüber *Ht2* bei Temperaturen über 25°C. Die Ergebnisse zeigen, dass *Ht2* insbesondere in den niedrigen Temperaturvarianten durch Wirksamkeitsverluste gekennzeichnet ist. Das avirulente Isolat 76-4 wurde in den beiden niedrigen Temperaturvarianten 20/15°C und 15/10°C auf *Ht2* einheitlich als virulent beurteilt. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch das avirulente Isolat 25-3 für *Ht2*, das in der niedrigsten Temperaturvariante einheitlich als virulent und in der Variante 20/15°C in acht von zwölf Wiederholungen als virulent bewertet wurde. Diese Ergebnisse weisen auf einen deutlichen Wirksamkeitsverlust des Resistenzgens *Ht2* bei Temperaturen unter 20°C hin.

Durch die Bewertung der Befallsstärke von *E. turcicum* auf der anfälligen Maislinie B37 wurde in diesem Klimakammerversuch ebenfalls die Wirkung der Temperatur auf den quantitativen Befall bestimmt. Die Boniturergebnisse dazu sind in Abbildung 17 als Befallsstärke und als Befallsverlauf über den Versuchszeitraum mit Hilfe von AUDPC Werten dargestellt. Die Befallsstärke lag 16 Tage nach Inokulation in der 15/10°C Variante bei 12,5% und in allen wärmeren Varianten ohne signifikante Unterschiede zwischen 57% und 47%. Bereits vier Tage später zum Zeitpunkt 20dpi lag die Befallsstärke in der niedrigsten Temperaturvariante bereits bei 42%. Die Werte für die zwei Temperaturvarianten 20/15 und 25/20°C

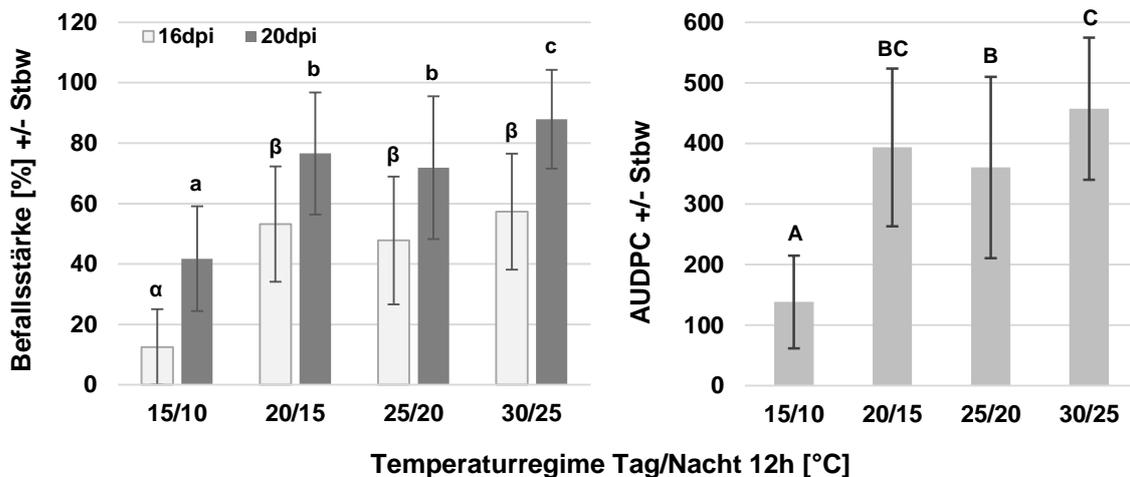


Abb. 17: Temperatureinfluss auf die Aggressivität von *E. turcicum* am Genotyp B37, Mittelwert aus drei Isolaten, links: Befallsstärke in Prozent an den Zeitpunkten 16 und 20 dpi; rechts: AUDPC Werte nach 20 dpi; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturen (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ),  $n=36$ .

lagen bei 77% und 72% und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In der Variante mit der höchsten Temperatur (30/25°C) reagierte *E. turcicum* zum Zeitpunkt 20 dpi mit signifikant höheren Befallswerten (88%) verglichen mit den geringeren Temperaturen. Der gesamte Befallsverlauf bis zum Zeitpunkt 20 dpi als AUDPC Werte zeigt ein ähnliches Bild. Die Werte der 15/10°C Variante unterscheiden sich signifikant von allen anderen Temperaturen. Die höchste Temperaturvariante zeigt auch den höchsten AUDPC-Wert, aber grenzt sich lediglich von der Variante 25/20°C signifikant ab. Die AUDPC-Werte in den Varianten 30/25°C und 20/15°C unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. In Abbildung 12 wurde die optimale *in vitro* Wachstumstemperatur von *E. turcicum* für den Bereich 20° bis 24°C definiert. Die optimale *in planta* Besiedlungstemperatur von *E. turcicum* lässt sich auf Basis dieses Versuchs lediglich für den Bereich über 20°C festlegen, wobei tendenziell höhere Temperaturen über 25°C förderlich für den Befallsverlauf sind. Eine Eingrenzung auf einen schmalen optimalen Temperaturbereich ist auf Basis dieser Ergebnisse nicht eindeutig möglich.

**3.3.2 Spezifischer Temperatureinfluss auf das Resistenzgen *Ht2***

In einem weiteren Klimakammerversuch wurden nur die Pflanzen vor der Inokulation für eine Dauer von zehn Tagen den unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Ab dem Zeitpunkt der Inokulation herrschten einheitlich für den gesamten Versuch und die gesamte Versuchsdauer 25/20°C Tag/Nacht in einem 12 h Rhythmus. Die Ergebnisse der qualitativen Virulenzeinstufung und der nekrotisierten Blattfläche (Befallsstärke) auf dem Genotyp B37-*Ht2* sind in Tabelle 21 dargestellt. Das avirulente Isolat 76-4 wurde an beiden Boniturterminen 17 und 21 dpi in der hohen Temperaturvariante 30/25°C als avirulent eingestuft. In der niedrigen Variante 20/15°C zum Zeitpunkt 17dpi wurde das Isolat ebenfalls einheitlich als avirulent eingestuft. Nach weiteren vier Tagen zum Zeitpunkt 21 dpi wurde das Isolat aufgrund der Befallsreaktion in elf von 16 Wiederholungen als virulent eingestuft.

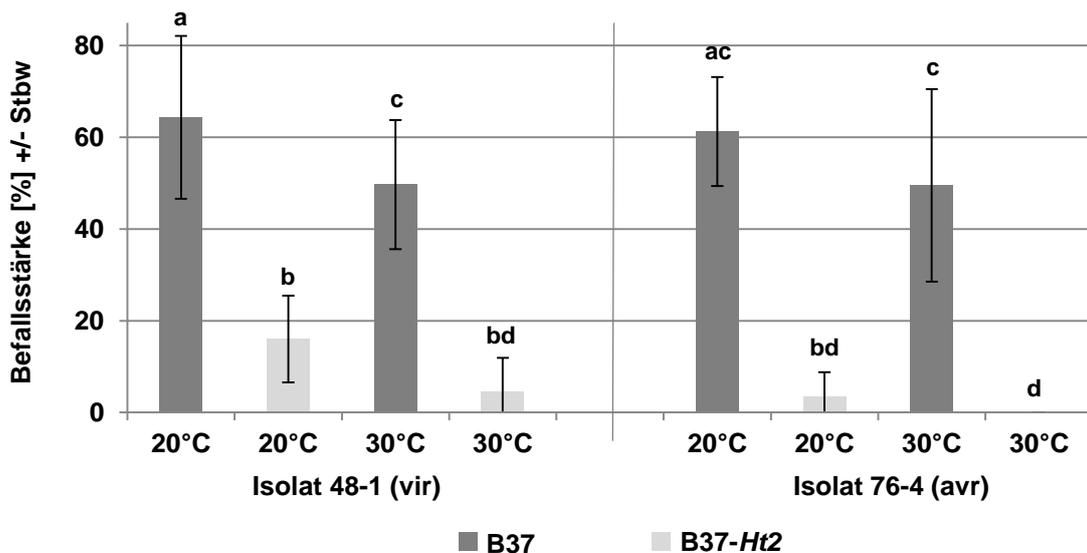
**Tab. 21: Virulenzeigenschaften von zwei *E. turcicum* Isolaten auf der Maislinie B37-*Ht2*, Behandlung der Maispflanzen für 10 Tage vor der Inokulation mit hohen (30/25°C) und niedrigen (20/15°C) Temperaturen (Tag/Nacht, 12h), n=16.**

Isolat	Temperatur	Virulenzeinstufung*		Befallsstärke %	
		17 dpi	21 dpi	17 dpi	21 dpi
Isolat 76-4 (avr)	20/15°C	avr	avr/vir	1,3	3,3
	30/25°C	avr	avr	0,0	0,0
Isolat 48-1 (vir)	20/15°C	vir	vir	7,9	16,0
	30/25°C	avr	avr/vir	0,4	4,4

\* avr=avirulent, vir=virulent, avr/vir=heterogene Virulenzeinstufung zwischen den Wiederholungen

Die qualitative Bewertung der Befallsreaktionen für das Isolat 76-4 bei niedrigen Temperaturen war demnach in diesem Versuch weniger eindeutig als im vorherigen Klimakammerversuch (siehe Tabelle 20), in dem sowohl die Pflanze als auch der Pilz den unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren. Die Werte der Befallsstärke mit 3,3% zum Zeitpunkt 21dpi verdeutlichen den sehr geringen Befall durch das Isolat 76-4 selbst in der niedrigen Temperaturvariante, in der das Resistenzgen *Ht2* an Wirksamkeit verloren hat. Die Virulenzeinstufungen für das virulente Isolat 48-1 wurden in der niedrigen Temperaturvariante an beiden Zeitpunkten als virulent bestätigt. In der wärmeren 30/25°C Variante hingegen wurde das Isolat zum Zeitpunkt 17 dpi einheitlich als avirulent eingestuft. Zum Zeitpunkt 21 dpi hingegen fiel diese Einstufung nicht einheitlich aus. In diesem Fall wurde das Isolat 48-1 in zehn der 16 Wiederholungen als avirulent eingestuft. Die Befallsstärke wurde für das virulente Isolat 48-1 zum Zeitpunkt 21 dpi durch die erhöhte Temperatur von 16% auf 4,4% reduziert. Der Wirksamkeitsverlust bei niedrigen Temperaturen bzw. die Steigerung der Wirksamkeit bei höheren Temperaturen konnte in diesem Versuch bestätigt werden, wenngleich der Wirksamkeitsverlust bei niedrigen Temperaturen in diesem Fall weniger deutlich ausfällt, verglichen mit den Versuchsergebnissen des vorherigen Versuchs (siehe Tabelle 20).

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der quantitativen Befallserfassung als Befallsstärke in Prozent nekrotisierter Blattfläche zum Zeitpunkt 21 dpi dargestellt. Sowohl für das virulente



**Abb. 18: Befallsstärke von *E. turcicum* an Mais nach Behandlung von nah-isogenen Maislinien für 10 Tage vor der Inokulation mit hohen (30°C) und niedrigen (20°C) Tagestemperaturen, Bonitur 21 dpi, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Tukey-Test  $p \leq 0,05$ ),  $n=16$ .**

Isolat 48-1 als auch für das avirulente Isolat 76-4 hat das Resistenzgen *Ht2* in beiden Temperaturvarianten zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Reduktion der Befallsstärke gegenüber der anfälligen nah-isogenen Maislinie B37 geführt. In der 20°C Variante ist der Befall durch das virulente Isolat um 75% gegenüber der Linie B37 auf 16% auf der Linie B37-*Ht2* verringert worden. In der wärmeren 30°C Variante ist der Befall durch *Ht2* verhältnismäßig stärker um 91% auf 4,4% reduziert worden. Für das avirulente Isolat wurde lediglich in der 20°C-Variante ein Befall von 3,3% auf der Linie B37-*Ht2* festgestellt, was einer Reduktion von 95% entspricht. In diesem Versuch ist der quantitative Befall nach Vorbehandlung der Pflanzen mit hohen und niedrigen Temperaturen in der höheren (30°C) Temperaturvariante für das Isolat 48-1 signifikant geringer, verglichen mit der niedrigeren (20°C) Variante. Dieser Trend trifft auch für das Isolat 76-4 zu, ist aber für keines der beiden Isolate statistisch signifikant.

Um die Ausbreitung des Pilzes im Blattgewebe genauer beurteilen zu können, wurde mit Hilfe der quantitativen PCR die DNA-Menge von *E. turcicum* im Blattmaterial bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 19 zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen dem virulenten und avirulenten Isolat auf dem Genotyp B37-*Ht2*. Ebenso ist der Abbildung zu entnehmen, dass das Resistenzgen *Ht2* für beide Isolate in beiden Temperaturvarianten eine signifikante Reduktion der Besiedlung des Pilzes bewirkte. Im Gegensatz zu den Boniturergebnissen der Befallsstärke in Abbildung 18 zeigt sich im Pilz-DNA-Gehalt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Isolaten auf der anfälligen Linie B37, wobei es zwischen den Temperaturvarianten innerhalb der Isolate keine signifikanten Unterschiede gibt.

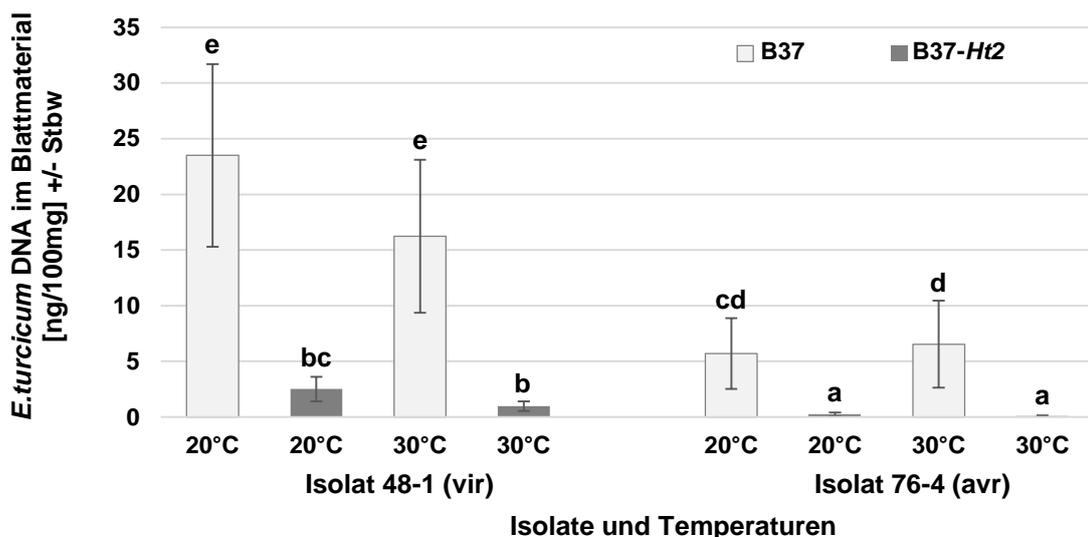


Abb. 19: DNA-Menge von *E. turcicum* in Maisblattmaterial (ng/100mg) nach Behandlung von nah-isogenen Maislinien für 10 Tage vor der Inokulation mit hohen (30°C) und niedrigen (20°C) Tagestemperaturen, Bonitur 21 dpi, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, Tukey-Test,  $p \leq 0,05$  nach Log Transformation,  $n=8$ .

In Abbildung 20 sind die Merkmale Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt gesondert für den Genotyp B37 (links) und B37-*Ht2* (rechts) miteinander korreliert. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesem Experiment für die anfällige Linie B37 kein Zusammenhang ( $r = 0,199$ ) zwischen dem bonitierten Befall an der Ganzpflanze (Befallsstärke) und dem gemessenen DNA-Gehalt von *E. turcicum* im Blattmaterial besteht. Für den Genotyp B37-*Ht2* konnte ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt im Blatt und der erhobenen Befallsstärke an der Ganzpflanze mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,82$  nachgewiesen werden. Sowohl auf der anfälligen Linie B37 als auch auf der Linie B37-*Ht2* erreicht das als virulent für *Ht2* eingestufte Isolat 48-1 höhere Pilz-DNA-Konzentrationen im Blatt, verglichen mit dem avirulenten Isolat 76-4 (siehe Abbildung 19).

Um den Effekt des Resistenzgens *Ht2* vor dem Hintergrund der beiden Temperaturvarianten zu verdeutlichen, sind in Abbildung 21 die relativen Befallswerte und die relativen *E. turcicum* DNA-Mengen der Linie B37-*Ht2* im Verhältnis zur anfälligen Linie B37 (=100) dargestellt. In der 20°C Variante zeigt B37-*Ht2* die sichtbaren Krankheitssymptome von *E. turcicum* auf 25% für das Isolat 48-1, auf 5% für das Isolat 76-4 reduziert. Die erhöhte Temperatur hat für das Isolat 48-1 zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Befallssymptome um 64% auf letztlich 9% geführt. Ausgehend von einem sehr geringen Befallsniveau in der 20°C Variante, trat in der höheren Temperaturvariante für das Isolat 76-4 kein Befall auf. Mit Hilfe der bestimmten *E. turcicum* DNA Mengen ist es möglich, die Ausbreitung des Pilzes im Pflanzengewebe zu bewerten.

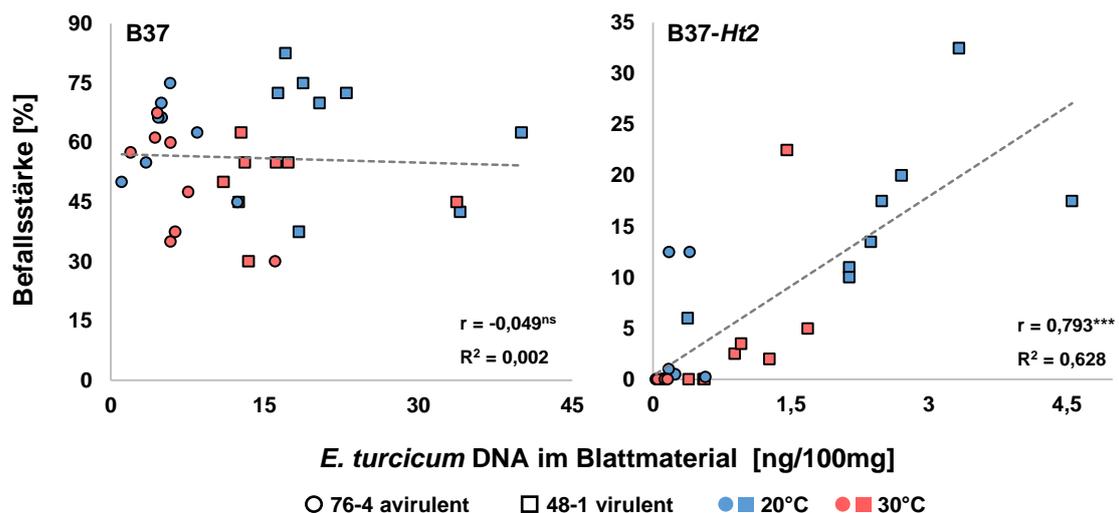
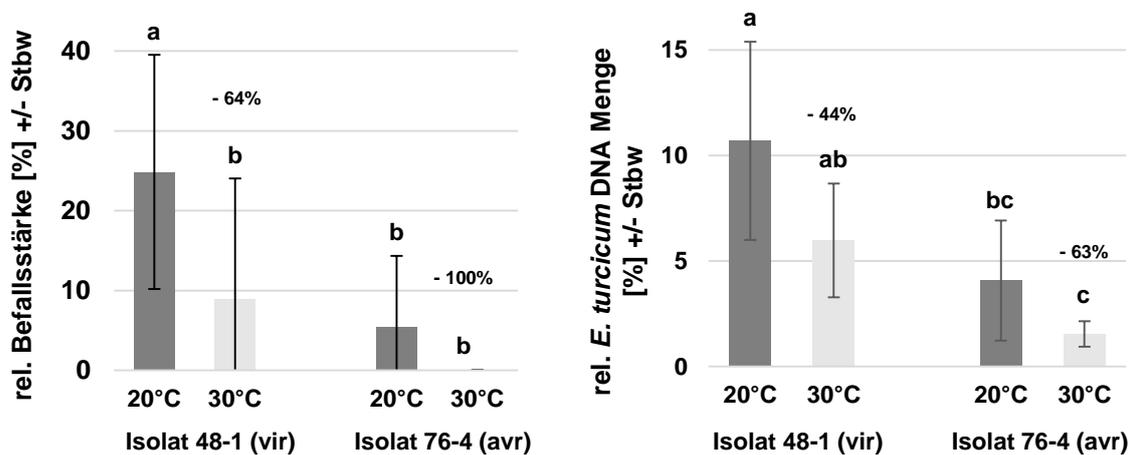


Abb. 20: Korrelation der Befallsstärke [%] und DNA-Gehalt [ng/100 mg] von *E. turcicum* an Mais nach Behandlung der Maislinien B37 & B37-*Ht2* mit hohen (30/25°C) und niedrigen (20/15°C) Temperaturen für 10 Tage (Tag/Nacht, 12h) vor der Inokulation mit zwei Isolaten: 76-4 avirulent und 48-1 virulent für *Ht2*, Bonitur und Probenahmezeitpunkt: 21 dpi, Korrelationskoeffizienten: ns = nicht signifikant; \*\*\* = signifikant bei  $p \leq 0,001$  (t-Test), N=32.

Die relativen Pilz-DNA-Gehalte zeigen in der 20°C Variante eine Reduktion der Besiedlung auf der Linie B37-Ht2 auf 11% für das Isolat 48-1, auf 4% für das Isolat 76-4, verglichen mit den Werten auf der Linie B37. Durch die erhöhte Temperatur wurde die DNA-Menge für das Isolat 48-1 um weitere 44% auf 6% reduziert. Für das Isolat 76-4 führte die erhöhte Temperatur zu einer Reduktion der DNA-Menge um 63% auf 1,5% im Vergleich zur Linie B37.

Die Ergebnisse in den Abbildungen 20 und 21 zeigen eine tendenziell höhere Besiedlung (DNA-Gehalt) der Maispflanzen in der 20°C Variante im Vergleich zur 30°C Variante. Diese Tendenz ist unabhängig vom Isolat zu beobachten, aber in keinem der Fälle statistisch signifikant.



Temperaturen und Isolate

Abb. 21: Relativwerte der Befallsstärke (links) und der DNA-Menge im Blattmaterial (rechts) von *E. turcicum* im Blatt der Maislinie B37-Ht2 gegenüber B37 (B37 = 100) nach Behandlung der Maispflanzen für 10 Tage bis zur Inokulation mit hohen (30/25°C) und niedrigen (20/15°C) Temperaturen (Tag/Nacht, 12h), Zeitpunkt: 21 dpi, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ), Befallsstärke  $n=16$ , DNA-Menge  $n=8$ .

### 3.4 Symptomausprägung von *E. turcicum* an Genotypen mit dem Resistenzgen *Ht2*

#### 3.4.1 Symptomausprägungen verschiedener *E. turcicum* Isolate auf den nah-isogenen Inzuchtlinien B37 und B37-*Ht2*

In Gewächshausversuchen wurden unter kontrollierten klimatischen Bedingungen sechs verschiedene *E. turcicum*-Isolate gegenüber dem Resistenzgen *Ht2* an den nah-isogenen Maisinzuchtlinien B37 und B37-*Ht2* untersucht. Auf Basis der Virulenzeinstufungen des Rassenscreenings wurden drei virulente (vir) und drei avirulente (avr) Isolate untersucht. Wie in Abbildung 22 dargestellt, traten auf der anfälligen Linie B37 bereits nach 8,1 Tagen erste Symptome durch das Isolat 122-2 auf. Die längste Inkubationszeit auf der Linie B37 wurde für das Isolat 159-4 mit 9,4 Tagen beobachtet. Die Inkubationszeiten wiesen auf B37 keine signifikanten Unterschiede auf. Die ersten Symptome traten auf B37 im Durchschnitt bereits nach 8,9 Tagen auf. Die Inkubationszeit war mit 13 Tagen für die Linie B37-*Ht2* um 4,1 Tage länger. Für jedes der Isolate führte das Resistenzgen *Ht2* zu einer signifikanten Verzögerung des Erstauftretens von Symptomen. Die längste Verzögerung wurde für das Isolat 130-2 mit 5,6 Tagen beobachtet. In diesem Fall traten die ersten Symptome auf B37-*Ht2* nach 14,7 Tagen auf. Die geringste Verzögerung des ersten Symptomauftritts wurde für das Isolat 122-2 mit 3,4 Tagen beschrieben. Für die sechs untersuchten Isolate besteht kein Zusammenhang zwischen den Virulenzeigenschaften und der Inkubationszeit. So wiesen die beiden avirulenten Isolate 186-1 und 161-1 signifikant niedrigere Werte im Vergleich

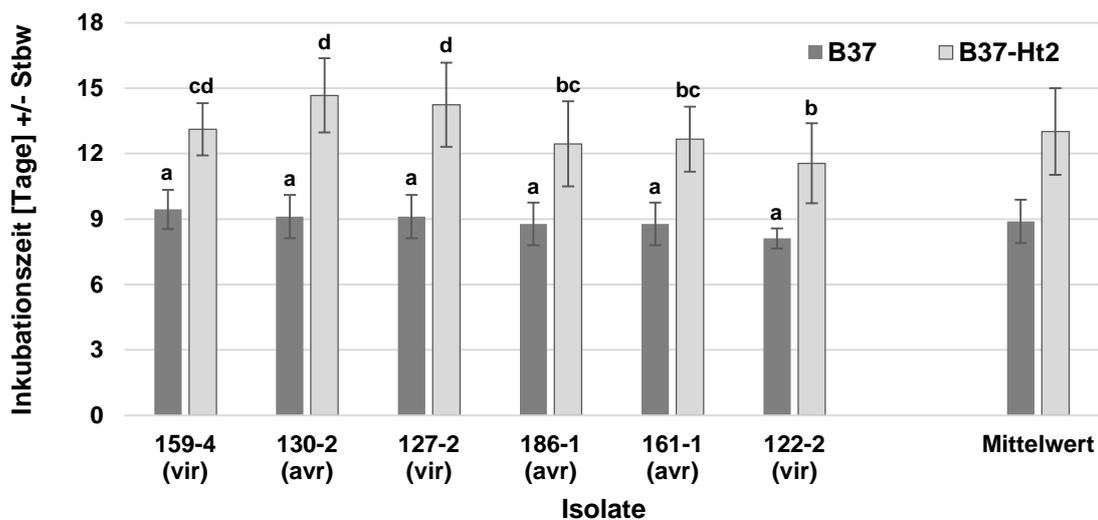


Abb. 22: Inkubationszeit von *E. turcicum* Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften gegenüber *Ht2* auf nah-isogenen Mais-Inzuchtlinien (B37 und B37-*Ht2*), unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Tukey Test,  $p \leq 0,05$ ),  $n=18$ .

zum virulenten Isolat 127-2 auf. Im umgekehrten Fall wurden für das avirulente Isolat 130-2 signifikant höhere Werte im Vergleich zum virulenten Isolat 122-2 beobachtet.

Neben der quantitativen Befallserhebung erfolgte auch eine qualitative Beurteilung der Symptomausprägungen auf Basis der Boniturskala in Tabelle 3 unter Punkt 2.2.4. Die anfällig bzw. resistent eingestuft Befallsreaktionen der Pflanzen entsprechen den jeweiligen Isolaten zugeordneten Virulenzeinstufungen virulent bzw. avirulent. Die Virulenzeinstufung „intermediär“ beschreibt eine Befallsreaktion der Pflanze, die nicht eindeutig als anfällig bzw. resistent angesprochen werden konnte und somit keine eindeutige Virulenzeinstufung für das jeweilige Isolat zuließ. Wie in Tabelle 22 dargestellt, wurden die Isolate 130-2 und 186-1 entsprechend der Einstufung aus dem Rassenscreening eindeutig als avirulent beurteilt. Das Isolat 161-1 wurde lediglich in 61% der Wiederholungen eindeutig als avirulent eingestuft. In 17% der Fälle fand eine Einstufung als virulent statt, und bei 22% war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Das als virulent eingestufte Isolat 122-2 wurde in 50% der Fälle auch als solches eingestuft. Allerdings fand in 39% der Wiederholungen eine Beurteilung als avirulent statt und 11% konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Das Isolat 122-2 weist mit 38,2% die höchste Befallsstärke vor dem Isolat 161-1 mit 19,6% auf. Die beiden als virulent eingestuften Isolate 127-2 und 159-4 wurden im Rahmen dieses Versuchs nicht eindeutig als solche identifiziert. In 61% (127-2) bzw. 50% (159-4) der Fälle wurden die Isolate als avirulent eingestuft. Eine Einstufung als virulent erfolgte in 28% bzw. 22% der Fälle. Die höchste Einstufung als intermediär erreichte das Isolat 159-4 mit 28%. Für das als virulent bekannte Isolat 28A aus den USA erfolgte eine Einstufung in

**Tab. 22: Virulenzeinstufungen von *E. turcicum* Isolaten gegenüber dem Resistenzgen *Ht2* auf der Linie B37-*Ht2*, Befallsstärke als nekrotisierte Blattfläche in % zum Zeitpunkt 16 dpi, Anzahl berücksichtigter Pflanzen (N), \*Virulenzeinstufung aus dem Rassenscreening, Isolat 28A (Rasse 23N) diente als Referenzisolat aus den USA (Condon et al., 2013).**

Isolat	Rasse	Virulenz-einstufung* auf <i>Ht2</i>	Virulenzeinstufung (Anteile in %)			Befallsstärke 16 dpi [%]	N
			virulent	avirulent	intermediär		
130-2	0	avirulent	-	100	-	4,0	18
186-1	1	avirulent	-	100	-	12,2	18
161-1	0	avirulent	17	61	22	19,6	18
122-2	23N	virulent	50	39	11	38,2	18
127-2	23N	virulent	28	61	11	11,3	18
159-4	23N	virulent	22	50	28	10,8	18
28A	23N	virulent	33	11	56	11,2	9

 = 40 - 60%

 = 61 - 100%

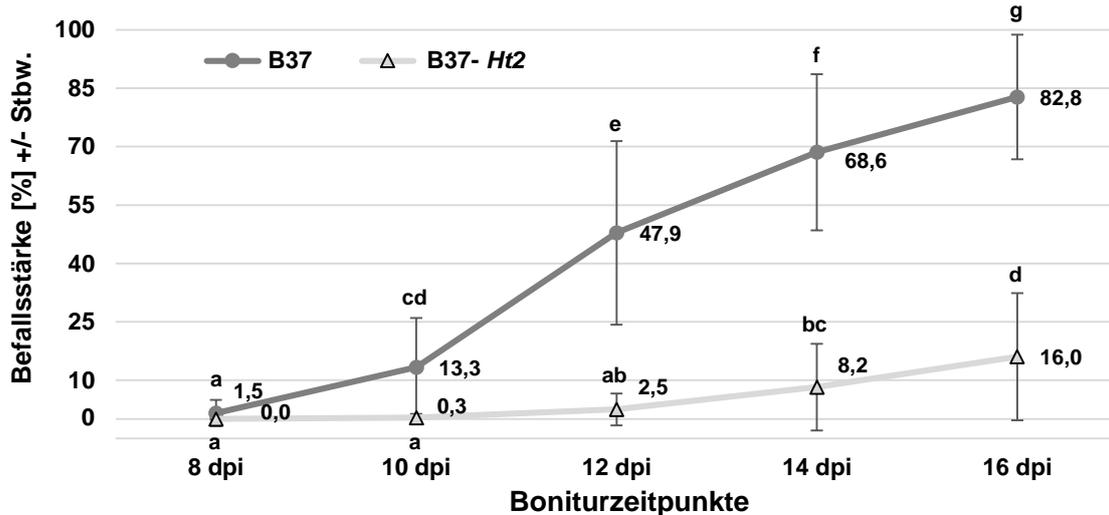
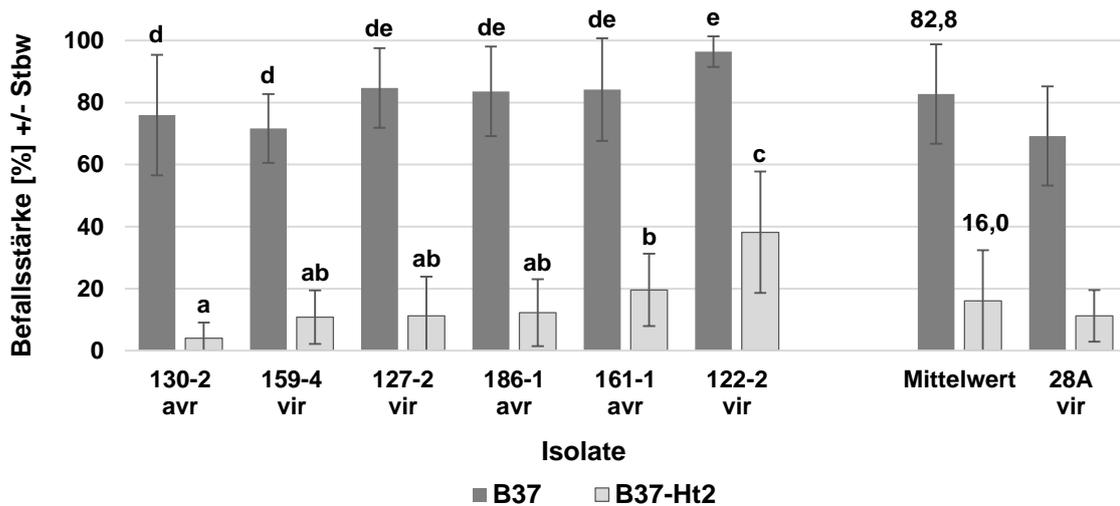


Abb. 23: Entwicklung der Befallsstärke von *E. turcicum* auf zwei Maisinzuchtlinien (B37 & B37-Ht2) zu den Boniturzeitpunkten 8, 10, 12, 14 und 16 Tagen nach Inokulation (dpi), Mittelwerte von sechs Isolaten, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Turkey-Test  $p \leq 0,05$ ),  $n = 108$

die entsprechende Kategorie virulent bei lediglich einem Drittel der Fälle. Der überwiegende Teil (56%) konnte nicht eindeutig zugeordnet werden und erhielt demnach die Einstufung intermediär.

Die quantitative Befallsstärke im Zeitverlauf ist in Abbildung 23 von 8 bis 16 dpi als Befallsstärke dargestellt. Bereits zum Zeitpunkt 10 dpi besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Linie B37 und B37-Ht2. Mit einem durchschnittlichen täglichen Zuwachs in der Befallsstärke von über 10 Prozentpunkten ab dem achten Tag nach Inokulation erreicht der Wert zum Zeitpunkt 16 dpi 82,8%. Der Wert der Linie B37-Ht2 liegt zum Zeitpunkt 16 dpi mit 16,0% signifikant niedriger. Der durchschnittliche tägliche Zuwachs für die Linie B37-Ht2 liegt bei zwei Prozentpunkten ab dem achten Tag nach Inokulation. In Abbildung 24 sind die Befallsstärken für alle untersuchten Isolate zum Zeitpunkt 16 dpi für die Linien B37 und B37-Ht2 dargestellt. Auf dem Genotyp B37 setzt sich lediglich das Isolat 122-2 mit einem Wert von 96,4% signifikant von den beiden Isolaten 130-2 (75,9%) und 159-4 (71,6%) ab. Zwischen allen anderen Isolaten waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Auf der Linie B37-Ht2 setzt sich das Isolat 122-2 als einziges Isolat mit einer Befallsstärke von 38,2% signifikant von allen anderen Isolaten ab. Zudem ist das Isolat 161-1 mit einem Wert von 19,6% signifikant von dem Isolat 130-2 mit dem geringsten Wert von 4% verschieden. Die Befallsstärken der anderen Isolate liegen im Bereich zwischen 4 und 12,2% und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.



**Abb. 24:** Befallsstärke von sechs *E. turcicum* Isolaten auf den Maisinzuchtlinien B37 & B37-Ht2 zum Boniturzeitpunkt 16 Tage nach Inokulation (dpi), Virulenzeinstufungen gegenüber Ht2 vorläufig aus eigenen Versuchen; als Referenz diente das virulente Isolat 28A (Condon et al., 2013); Mittelwerte aus 9 Wiederholungen und zwei Durchgängen, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Turkey-Test  $p \leq 0,05$ ),  $n=18$ .

Das virulente Referenzisolat 28A weist mit 11,2% einen vergleichsweise geringen Wert auf. Da das Isolat 28A lediglich mit neun Wiederholungen im Versuch berücksichtigt wurde, war keine statistische Verrechnung für dieses Isolat für das Merkmal Befallsstärke möglich. Die Mock inokulierte Kontrollvariante war in beiden Durchgängen frei von Symptomen.

Neben der Befallsstärke wurde der DNA-Gehalt von *E. turcicum* in den Maisblättern der verschiedenen Varianten bestimmt. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten auf der anfälligen Linie B37 gemessen wurden. Das Isolat 186-1 hebt sich durch einen sehr geringen DNA-Gehalt signifikant von den drei Isolaten mit den höchsten Gehalten ab. Zwischen allen anderen Isolaten sind die Unterschiede im DNA-Gehalt in der Abbildung 25 deutlich sichtbar, aber aufgrund der hohen Variation in keinem Fall statistisch signifikant. Die Mittelwerte der Gehalte für die Maisgenotypen B37 und B37-Ht2 unterscheiden sich mit 7,56 ng/mg TM und 0,31 ng/mg TM deutlich. Übereinstimmend mit den Werten der Befallsstärke heben sich die beiden Isolate 122-2 und 161-1 durch vergleichsweise hohe DNA-Gehalte auf der Linie B37-Ht2 von den Isolaten 186-1, 130-2 und 159-4 signifikant ab. Das virulente Referenzisolat 28A ist ebenfalls durch einen deutlichen Unterschied im DNA-Gehalt zwischen den beiden Maisgenotypen gekennzeichnet. Die Werte liegen für den Genotyp B37 bei 13,08 ng/mg TM und für den Genotyp B37-Ht2 bei 0,54 ng/mg TM.

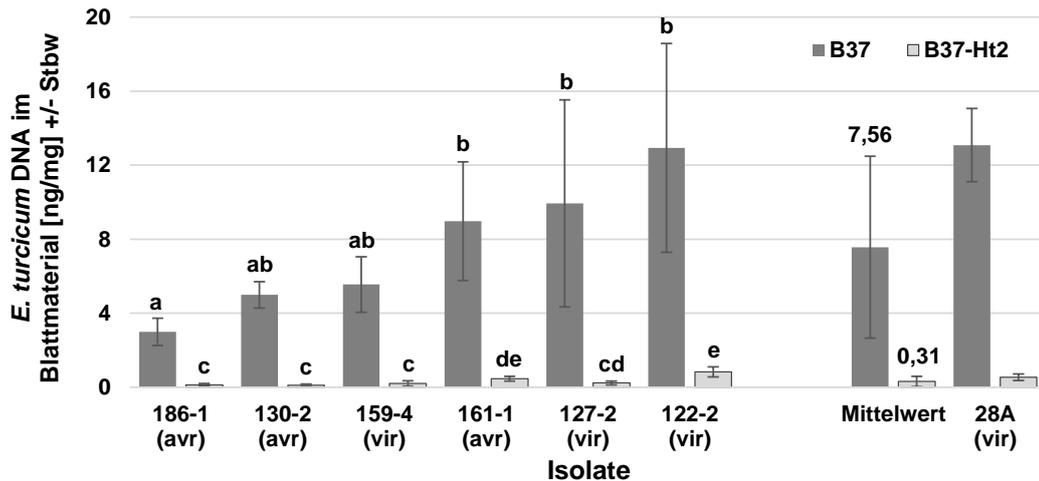


Abb. 25: DNA Menge [ng/mg TM] von sechs europäischen *E. turcicum* Isolaten in befallenem Blattmaterial der nah-isogenen Maisinzuchtlinien B37 und B37-Ht2, Virulenzeinstufungen gegenüber Ht2 vorläufig aus eigenen Versuchen; als Referenz diente das virulente Isolat 28A (Condon et al., 2013); Probenahme 16 Tage nach Inokulation, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, (Tukey Test,  $p \leq 0,05$ ) nach Log-Transformation,  $n=6$ .

Der DNA-Gehalt des Isolates 28A liegt damit zwischen den beiden Werten der Isolate 122-2 und 161-1 mit 0,83 und 0,46 ng/mg TM. In den Kontrollvarianten wurden sehr geringe Mengen an DNA von *E. turcicum* nachgewiesen. Die Größenordnung der DNA-Mengen in den Kontrollvarianten lag um den Faktor 13 unterhalb der Menge, die für das Isolat 186-1 auf der Linie B37-Ht2 ermittelt wurde. Neben den Merkmalen zur Charakterisierung der Infektion und Besiedlung des Blattgewebes durch *E. turcicum* wurde das Potential der Vermehrung durch Sporulation der sechs Isolate auf den beiden Maislinien untersucht. Abbildung 26 zeigt die Sporulation in [Sporen/cm<sup>2</sup>] auf befallenem Blattmaterial der Linien B37 und B37-Ht2. Die durchschnittliche Sporulation war auf der Linie B37 mit 16.300 Sporen/cm<sup>2</sup> um den Faktor 7 höher als auf der Linie B37-Ht2 mit 2.300 Sporen/cm<sup>2</sup>. Auf der Linie B37 war die Sporulation des Isolates 130-2 mit 10.300 Sporen/cm<sup>2</sup> signifikant geringer im Vergleich zu den Isolaten 186-1, 159-4 und 122-2 mit einer Sporulation von 18.900 bis 20.500 Sporen/cm<sup>2</sup>. Abgesehen vom Isolat 130-2 zeigten alle anderen Isolate keine signifikanten Unterschiede auf der Linie B37. Die drei Isolate 159-4, 122-2 und 161-1 setzen sich auf der Linie B37-Ht2 durch eine relativ hohe Anzahl gebildeter Sporen von 3.200 bis 4.500 Sporen/cm<sup>2</sup> signifikant von dem Isolat 130-2 mit der geringsten Sporenmenge von 300 Sporen/cm<sup>2</sup> ab. Das Isolat 161-1 ist durch die höchste Sporulation gekennzeichnet, die sich signifikant von den beiden Isolaten 130-2 und 127-2 absetzt. Das virulente Referenzisolat verzeichnet die höchste Sporenmenge mit 5.100 Sporen je cm<sup>2</sup> auf der Linie B37-Ht2.

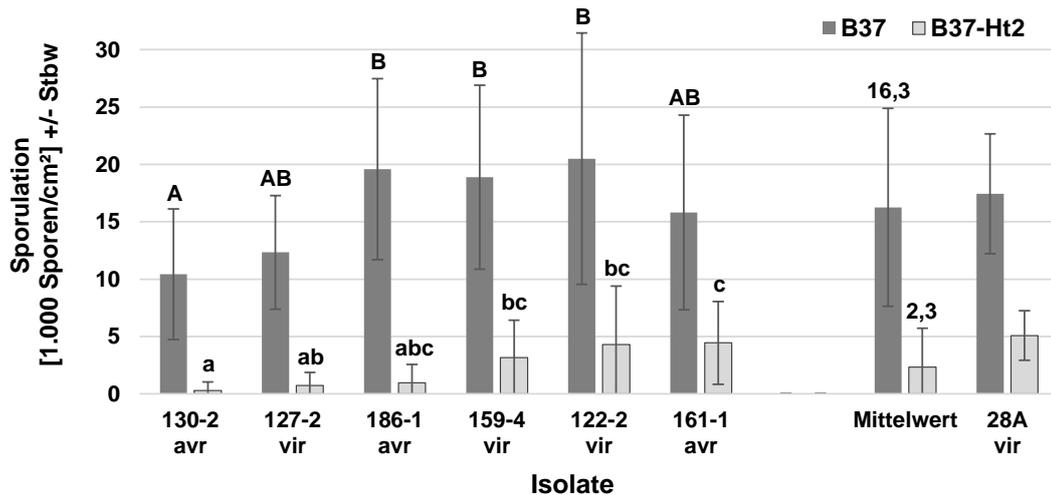
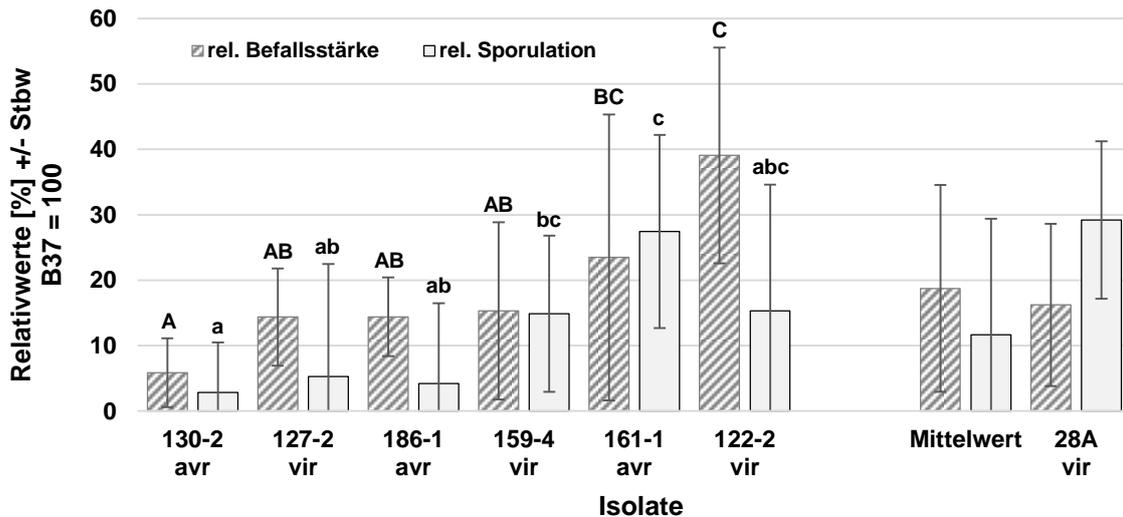


Abb. 26: Anzahl gebildeter Sporen je cm<sup>2</sup> Läsionsfläche von *E. turcicum* an Mais bezogen auf sechs europäische Isolate auf zwei nah-isogenen Maisinzuchtlinien (B37 und B37-Ht2). Virulenzeinstufungen gegenüber *Ht2* vorläufig aus eigenen Versuchen; als Referenz diente das virulente Isolat 28A (Condon et al., 2013), unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ,  $n=20$ ).

### 3.4.2 Epidemiepotential als Grundlage der Symptombeurteilung von *E. turcicum* am Genotyp B37-Ht2

Um die Isolate anhand der Merkmale Befallsstärke [%] und Sporulation [Sporen/cm<sup>2</sup>] vergleichen zu können, wurden die relativen Werte dieser beiden Merkmale berechnet. Dazu wurde der jeweilige Wert auf der Linie B37 gleich 100 gesetzt und der Wert der Linie B37-Ht2 relativ dazu berechnet. Die Relativwerte zu den Merkmalen Befallsstärke und Sporulation sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Mittelwerte für die Befallsstärke bzw. Sporulation liegen bei 18,7% bzw. 11,7%. Demnach hat das Resistenzgen *Ht2* für die sechs untersuchten Isolate den Befall im Durchschnitt um 81,3% und die Sporulation um 88,3% reduziert. Das virulente Referenzisolat 28A weist für die Sporulation mit 29,2% den höchsten ermittelten Wert auf. Der Relativwert für die Befallsstärke liegt mit 16,2% für das Isolat 28A im Bereich der sechs untersuchten Isolate. Von den sechs europäischen Isolaten hebt sich das Isolat 122-2 mit 39,1% relativer Befallsstärke am deutlichsten von den anderen Isolaten ab. Es weist einen signifikant höheren Wert auf im Vergleich zu den Isolaten 130-2, 127-2, 186-2 und 159-4. Den zweithöchsten Wert für die relative Befallsstärke verzeichnet mit 23,5% das Isolat 161-1, das sich statistisch signifikant lediglich vom Isolat 130-2 mit dem geringsten Wert von 5,8% unterscheidet. Die höchste relative Sporulation, unter den europäischen Isolaten, weist das Isolat 161-1 mit 27,4% auf. Mit diesem Wert grenzt es sich signifikant zu den drei Isolaten 130-2, 127-2 und 186-1 mit den geringsten Werten ab.



**Abb. 27: Relative Befallsstärke und Sporulationsintensität sechs europäischer *E. turcicum* Isolate auf Maisblättern der Inzuchtlinie B37-*Ht2* in Relation zu B37 = 100. Virulenzeinstufungen gegenüber *Ht2* vorläufig aus eigenen Versuchen; als Referenz diente das virulente Isolate 28A (Condon et al., 2013), unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ), Befallsstärke  $n = 18$ , Sporulation  $n = 20$ .**

Nach dem Isolat 161-1 stehen die Isolate 122-2 und 159-4 mit Werten von 15,3 und 14,9% an zweiter und dritter Stelle der relativen Sporulationsintensität. Ein signifikanter Unterschied besteht lediglich zum Isolat 130-2.

In Abbildung 28 ist das Merkmal Epidemiepotential zu den sechs europäischen Isolaten und dem virulenten Referenzisolat aus den USA dargestellt. Dieses Merkmal beschreibt das relative Potential des jeweiligen Isolates, sich auf der Linie B37-*Ht2* im Vergleich zur Linie B37 auszubreiten und zu vermehren. Im Mittel liegt dieser Wert für alle europäischen Isolate bei 2,9%. Das bedeutet, dass das Resistenzgen *Ht2* für die sechs untersuchten Isolate im genetischen Hintergrund der Linie B37 eine Reduktion des Epidemiepotentials um 97,1% bewirkt hat. Das Epidemiepotential für das virulente Referenzisolat liegt mit 4,7% an dritter Stelle im Vergleich zu den europäischen Isolaten. Eine statistische Verrechnung war aufgrund unterschiedlicher Wiederholungszahlen für dieses Isolat nicht möglich. Am deutlichsten heben sich die beiden Isolate 122-2 und 161-1 mit 7,8% und 6,4% von den anderen Isolaten ab. Sie zeigen signifikante Unterschiede zu den Isolaten 130-2, 127-2 und 186-1, die durch sehr geringe Epidemiepotentiale zwischen 0,2 und 0,5% gekennzeichnet sind. Das Isolat 159-4 liegt mit 2,5% im Mittelfeld der sechs Isolate und weist einen signifikanten Unterschied lediglich zum Isolat 130-2 mit 0,2% auf.

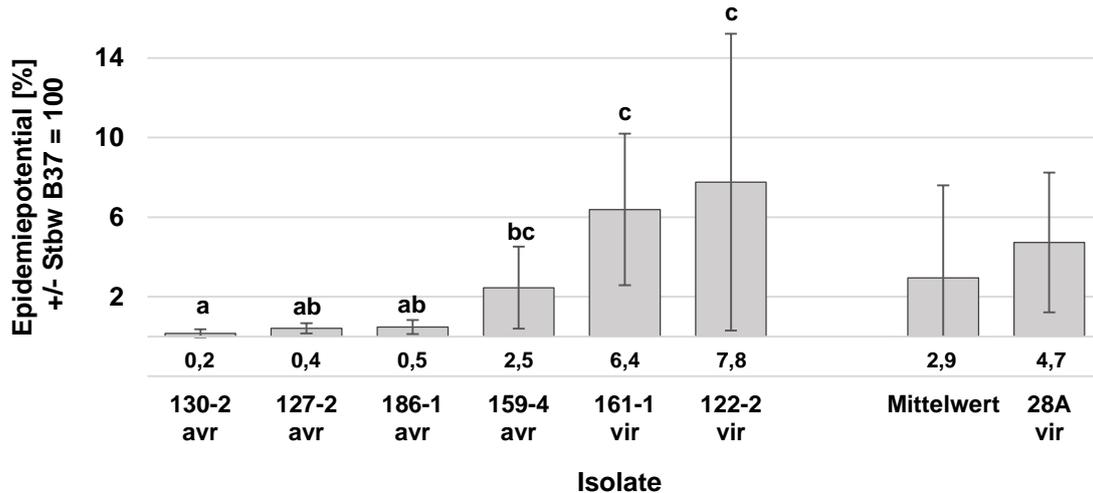


Abb. 28: Epidemiepotential von *E. turcicum* Isolaten auf der Maisinzuchtlinie B37-Ht2 relativ zur nah-isogenen Linie B37, Virulenzeinstufungen gegenüber Ht2 auf Basis des Epidemiepotentials; als Referenz diente das virulente Isolat 28A (Condon et al., 2013), unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ),  $n = 18$ .

### 3.4.3 Korrelation der Merkmale zur Ht2-Symptomatik am Genotyp B37

Für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen den erhobenen und berechneten Parametern wurden Korrelationsanalysen zwischen allen Parametern vorgenommen. Eine Übersicht über die Korrelationskoeffizienten zwischen allen Parametern ist in Tabelle 23 dargestellt. Das Merkmal Befallsstärke der Linie B37 (% B37) wies lediglich mit dem Merkmal *E. turcicum*-DNA-Gehalt (DNA in B37) eine positiv signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Korrelation ( $r = 0,689$ ) auf. Mit keinem der anderen Parameter konnte ein signifikanter Zusammenhang zum Merkmal Befallsstärke der Linie B37 nachgewiesen werden. Für das Merkmal Befallsstärke der Linie B37-Ht2 konnten hoch signifikante Zusammenhänge zu drei anderen Merkmalen nachgewiesen werden. Die engen positiven Zusammenhänge zu den beiden Merkmalen relative Befallsstärke der Linie B37-Ht2 (*rel. % B37-Ht2*) und Epidemiepotential ist durch die gemeinsame Berechnungsgrundlage zu erklären. Der enge positive Zusammenhang des Merkmals Befallsstärke auf B37-Ht2 (*% B37-Ht2*) zum *E. turcicum*-DNA-Gehalt in der Linie B37-Ht2 (*DNA in B37-Ht2*) von  $r = 0,853$  ist signifikant bei  $p \leq 0,001$ . Das Sporulationsvermögen der Isolate auf der Linie B37 (Sporen B37) wies einen engen positiven Zusammenhang ( $0,783$ ) zur Sporulationsintensität auf der Linie B37-Ht2 (*Sporen B37-Ht2*) auf ( $p \leq 0,01$ ). Die ebenfalls positive signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Korrelation zum Merkmal

relative Sporulation auf B37-*Ht2* ist durch den bereits beschriebenen engen Zusammenhang zur Sporulationsintensität auf der Linie B37-*Ht2* zu erklären. Die sehr engen Zusammenhänge des Merkmals Sporulation auf B37-*Ht2* mit den beiden Merkmalen relative Sporulation auf B37-*Ht2* und dem Epidemiepotential ist durch die gemeinsame Berechnungsgrundlage zu erklären. Der DNA-Gehalt von *E. turcicum* in der Linie B37-*Ht2* korreliert sehr eng ( $r = 0,833$ ;  $p \leq 0,001$ ) mit dem Merkmal relative Befallsstärke auf der Linie B37-*Ht2*. Eine ebenfalls signifikante ( $p \leq 0,05$ ), aber weniger enge Korrelation ( $r = 0,684$ ) besteht ebenfalls zum Merkmal Epidemiepotential. Der Zusammenhang der beiden Merkmale relative Befallsstärke auf B37-*Ht2* (*rel. % B37-Ht2*) und der relativen Sporulation auf B37-*Ht2* (*Sporen % B37-Ht2*) mit dem Epidemiepotential ist durch die gemeinsame Berechnungsgrundlage zu erklären.

**Tab. 23: Korrelationskoeffizienten der Parameter<sup>a</sup> zur Untersuchung der Symptomausprägung von *E. turcicum* auf den nah-isogenen Maisinzuchtlinien B37 und B37-*Ht2*, Daten von Inokulationsversuchen mit sechs Isolaten.**

	% B37	% B37- <i>Ht2</i>	Sporen B37	Sporen B37- <i>Ht2</i>	DNA in B37	DNA in B37- <i>Ht2</i>	rel. % B37- <i>Ht2</i>	% Sporen B37- <i>Ht2</i>
% B37- <i>Ht2</i>	0,282							
Sporen B37	0,337	0,313						
Sporen B37- <i>Ht2</i>	0,277	0,356	0,783**					
DNA in B37	0,689*	0,423	0,259	0,458				
DNA in B37- <i>Ht2</i>	0,435	0,853***	0,136	0,342	0,707			
rel. % B37- <i>Ht2</i>	0,346	0,930***	0,393	0,403	0,532	0,833***		
Sporen % B37- <i>Ht2</i>	0,177	0,347	0,591*	0,962***	0,481	0,395	0,386	
Epidemiepotential	0,178	0,738**	0,556	0,850***	0,502	0,684*	0,726**	0,883***

<sup>a</sup> Parameter: % B37 = Befallsstärke in Prozent auf der Linie B37; % B37-*Ht2* = Befallsstärke in % auf der Linie B37-*Ht2*; *rel. % B37-Ht2* = relative Befallsstärke in % auf der Linie B37-*Ht2* im Verhältnis zur Linie B37; Sporen B37 = Sporen/cm<sup>2</sup> Läsionsfläche auf der Linie B37; Sporen B37-*Ht2* = Sporen/cm<sup>2</sup> Läsionsfläche auf der Linie B37-*Ht2*; Sporen % B37-*Ht2* = relative Sporenbildung auf der Linie B37-*Ht2* im Verhältnis zur Linie B37; DNA in B37 = DNA Menge von *E. turcicum* im Blattmaterial der Linie B37; DNA in B37-*Ht2* = DNA Menge von *E. turcicum* im Blattmaterial der Linie B37-*Ht2*; Epidemiepotential = relatives Epidemiepotential von *E. turcicum* auf dem Genotyp B37-*Ht2* gegenüber dem Genotyp B37, Signifikante Koeffizienten sind gekennzeichnet mit \* =  $p \leq 0,05$ , \*\*= $p \leq 0,01$ , \*\*\*= $p \leq 0,001$

In Abbildung 29 sind die Daten des Merkmals Befallsstärke auf B37 (Abszisse) gegenüber den Merkmalen *E. turcicum* DNA-Menge in B37 (linke Ordinate) und der Sporulationsintensität auf B37 (rechte Ordinate) zum Zeitpunkt 16 dpi in Form eines Streudiagramms dargestellt. Für das Merkmal DNA-Menge im Blattmaterial ist für den Genotyp B37 in der Grafik zu erkennen, dass bis zu einer Befallsstärke von 80% der DNA-Gehalt den Wert von 7 ng/mg TM nicht wesentlich überschreitet. Ab einer Befallsstärke von 90% nimmt der DNA-Gehalt von *E. turcicum* deutlich zu und erreicht Werte von bis zu 16 ng/mg TM. Die Korrelation der beiden Merkmale ( $r = 0,689$ ) ist signifikant bei  $p \leq 0,05$ . Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2 = 0,664$ ) bestätigt auf Basis einer polynomischen Regression einen engen Zusammenhang zwischen der Befallsstärke und dem DNA-Gehalt von *E. turcicum* auf der Linie B37. Im Gegensatz zum Merkmal DNA-Gehalt besteht zwischen dem Merkmal Befallsstärke und Sporulation auf dem Genotyp B37 kein signifikanter Zusammenhang.

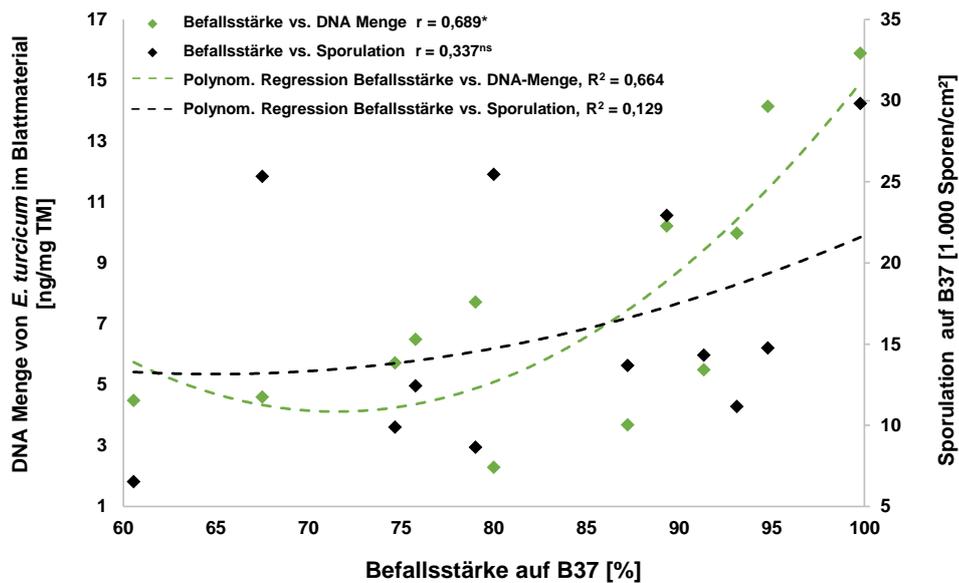


Abb. 29: Korrelation der DNA-Menge von *E. turcicum* im Blattmaterial (DNA in B37) und der Sporulation auf der Maislinie B37 (Sporen B37) mit der Befallsstärke auf B37 (% B37); Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r): \* = signifikant, <sup>ns</sup> = nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ),  $n=12$ .

Ein Streudiagramm derselben Art zur Darstellung der Daten für das Merkmal Befallsstärke auf B37-Ht2 gegenüber den Merkmalen *E. turcicum* DNA-Menge in B37-Ht2 und der Sporulation auf B37-Ht2 ist in Abbildung 30 gezeigt. In diesem Fall besteht ein enger, statistisch signifikanter ( $p \leq 0,001$ ) Zusammenhang ( $r = 0,853$ ) zwischen der Befallsstärke und dem DNA-Gehalt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression liegt bei  $R^2 = 0,728$ . Insgesamt liegen die Werte der Befallsstärke und des DNA-Gehaltes mit Höchstwerten von 55% und 1,0 ng/mg TM deutlich unter den Höchstwerten für die Maislinie B37. Der Zusammenhang zwischen der Befallsstärke und der Sporulation ist mit  $r = 0,356$  als positiv beschrieben, aber nicht statistisch abgesichert. Dies wird deutlich durch die gleichzeitig sehr hohen (6.700 Sporen/cm<sup>2</sup>) und sehr niedrigen (100 Sporen/cm<sup>2</sup>) Sporulationsintensitäten für verschiedene Isolate, für Befallsstärken im Bereich um 20%.

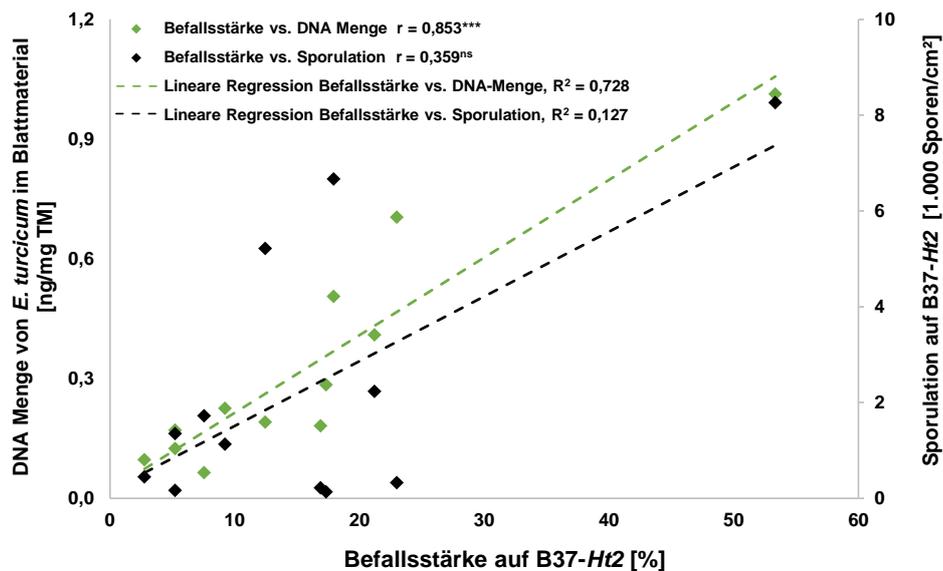


Abb. 30: Korrelation der DNA-Menge von *E. turcicum* im Blattmaterial (DNA in B37-Ht2) und der Sporulation auf der Maislinie B37-Ht2 (Sporen B37-Ht2) mit der Befallsstärke auf B37-Ht2 (% B37-Ht2), Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r): \* = signifikant, <sup>ns</sup> = nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ),  $n=12$ .

#### 3.4.4 Symptome von *E. turcicum* auf den nah-isogenen Inzuchtlinien Pa91 und Pa91-*Ht2* bzw. KWS und KWS-*Ht2*

Neben den sechs europäischen Isolaten und den zwei nah-isogenen Linien B37 und B37-*Ht2* wurden zwei als virulent für *Ht2* beschriebene Referenzisolate und zwei der europäischen Isolate auf weiteren Paaren nah-isogener Maislinien untersucht. Bei den nah-isogenen Linien handelt es sich um die Paare Pa91 mit Pa91-*Ht2* und KWS mit KWS-*Ht2*. Die Symptome auf den jeweils nah-isogenen Linien ohne Resistenzgen konnten alle als klassische grau-grüne bis braune Welkesymptome ohne chlorotische Resistenzreaktionen der Pflanze angesprochen werden. Zum Zeitpunkt 16 dpi lagen die Befallsstärken auf den Linien ohne *Ht2* Resistenzgen für alle untersuchten Isolate im sehr hohen Bereich zwischen 70% und 100%. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der qualitativen Virulenzeinstufung und der quantitativen Befallserhebung der vier Isolate auf den Maislinien B37-*Ht2*, Pa91-*Ht2* und KWS-*Ht2* dargestellt. Auf dem Genotyp B37-*Ht2* wurde das Isolat 130-2 einheitlich als avirulent bestätigt. Auch die geringe Befallsstärke von 5,2% unterstützt diese Einstufung. Das virulente Isolat 122-2 wurde auf B37-*Ht2* in 77% der Fälle als avirulent bewertet und in 23% der Fälle intermediär eingestuft. Dennoch war die Befallsstärke mit 23% für dieses Isolat relativ hoch. Das Isolat 28A wurde von Prof. Balint-Kurti von der North Carolina State University (USA) als Rasse 23N bereitgestellt. Darüber hinaus ist dieses Isolat auch von anderen Autoren als virulent auf *Ht2* beschrieben (Condon et al., 2013). Das Isolat 28A zeigte im Rahmen der eigenen Virulenzeinstufungen auf B37-*Ht2* allerdings heterogene Ergebnisse. Ein Drittel wurde als virulent eingestuft, 11% als avirulent und mit 56% der größte Teil als intermediär. Die Befallsstärke lag mit 11,2% für das Isolat 28A zwischen den Werten der anderen Isolate auf dem Genotyp B37-*Ht2*. Auf dem Genotyp KWS-*Ht2* wurde das avirulente Isolat 130-2 mit 78% als avirulent beschrieben. Ein Unterschied zum Genotyp B37-*Ht2* liegt in der deutlich höher ausfallenden Befallsstärke mit 32,9%. Für das Isolat 122-2 war in zwei Drittel der Fälle keine eindeutige Virulenzeinstufung möglich, der Rest wurde als avirulent bewertet. Die Befallsstärke fällt für das Isolat 122-2 mit 50,6% auf dem Genotyp KWS-*Ht2* doppelt so hoch aus verglichen mit dem Genotyp B37-*Ht2*. Die Virulenzeinstufungen des Isolates 28A sind wie auf dem Genotyp B37-*Ht2* auch auf dem Genotyp KWS-*Ht2* mit 56% virulent und 44% intermediär sehr heterogen. Im Vergleich zum Genotyp B37-*Ht2* hat sich die Befallsstärke auf dem Genotyp KWS-*Ht2* mit 51,7% signifikant ( $p \leq 0,05$ ) erhöht. Das als virulent beschriebene Isolat 257A wurde auf dem Genotyp KWS-*Ht2* in allen Fällen als avirulent eingestuft. Dennoch erreicht es mit 50,6% Befallsstärke zusammen mit dem Isolat 122-2 den zweithöchsten Wert. Das avirulente Isolat 130-2 wurde auch auf dem Genotyp Pa91-*Ht2* trotz einer Befallsstärke von 42,5% in allen Fällen als avirulent

**Tab. 24: Virulenzeinstufungen von *E. turcicum* Isolaten gegenüber dem Resistenzgen *Ht2* in verschiedenen genetischen Hintergründen, Befallsstärke als nekrotisierte Blattfläche in % zum Zeitpunkt 16 dpi, Anzahl berücksichtigter Pflanzen (N), \*Virulenzeinstufungen aus dem Rassenscreening bzw. nach, Isolat 28A, Rasse 23N (Condon et al., 2013) und 257A, Rasse 23 (Balint-Kurti P, pers. Mitteilung 04.04.2014) dienen als Referenzisolate aus den USA, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ).**

Isolat	Virulenz- einstufung* auf <i>Ht2</i>	Genotyp	Virulenzeinstufung (Anteile in %)			Befallsstärke 16 dpi [%]	N
			virulent	avirulent	intermediär		
130-2	avirulent	B37- <i>Ht2</i>	-	100	-	5,2 a	9
122-2	virulent	B37- <i>Ht2</i>	-	77	23	23,0 ab	9
28A	virulent	B37- <i>Ht2</i>	33	11	56	11,2 a	9
130-2	avirulent	KWS- <i>Ht2</i>	-	78	22	32,9 ab	9
122-2	virulent	KWS- <i>Ht2</i>	-	33	67	50,6 b	9
28A	virulent	KWS- <i>Ht2</i>	56	-	44	51,7 b	9
257A	virulent	KWS- <i>Ht2</i>	-	100	-	50,6 b	9
130-2	avirulent	Pa91- <i>Ht2</i>	-	100	-	42,5	2
122-2	virulent	Pa91- <i>Ht2</i>	-	100	-	64,0	2
28A	virulent	Pa91- <i>Ht2</i>	100	-	-	90,5	2
257A	virulent	Pa91- <i>Ht2</i>	-	100	-	60,0	2

Anteile der Virulenzeinstufungen: = 40 - 60% = 61 - 100%

eingestuft. Eine einheitliche Einstufung als avirulent erhielten auch die als virulent beschriebenen Isolate 122-2 und 257A. Dennoch lag für diese beiden Isolate die Befallsstärke mit 64% und 60% sehr hoch. Das virulente Isolat 28A wurde auf der Linie Pa91-*Ht2* einheitlich als virulent beschrieben und verzeichnete auf diesem Genotyp mit 90,5% den höchsten Befallswert auf einem Genotyp mit dem *Ht2* Resistenzgen.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Sporulation der verschiedenen Isolate auf den unterschiedlichen nah-isogenen Maisinzuchtlinien jeweils mit und ohne Resistenzgen *Ht2* dargestellt. Für die Linie KWS ohne *Ht2* war nicht ausreichend Saatgut vorhanden. Grundsätzlich zeigen die Daten, dass die Sporulation auf den Linien ohne Resistenzgen *Ht2* zumindest für die Genotypen B37 und KWS deutlich höher ausfallen im Vergleich zu den Linien mit *Ht2*. Für den Genotyp Pa91 ist dieser Unterschied nicht eindeutig zu erkennen. Auf den Linien mit *Ht2* Resistenzgen hebt sich vor allem das virulente Isolat 28A mit zum Teil sehr hohen Sporulationsraten von den anderen Isolaten ab. Auf dem Genotyp B37-*Ht2* ist die Sporulation signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höher im Vergleich zu den Isolaten 130-2 und 122-2.

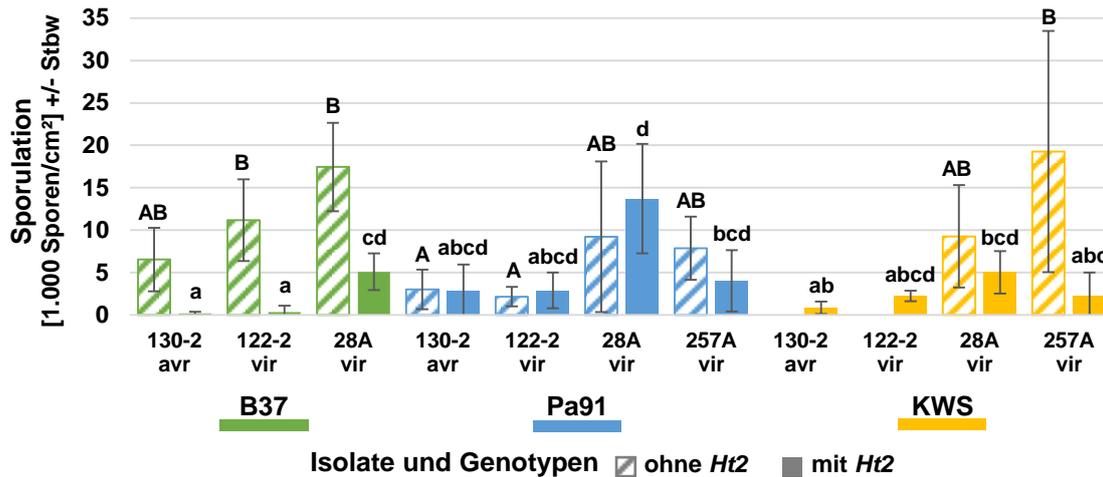


Abb. 31: Sporulation von *E. turcicum* Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften für *Ht2* auf verschiedenen nah-isogenen Maisinzuchtlinien jeweils mit und ohne Resistenzgen *Ht2*. Isolate 28A und 257A dienten als virulente Referenzisolate, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ),  $n = 10$ .

Für die beiden Genotypen Pa91-*Ht2* und KWS-*Ht2* weist das Isolat 28A ebenfalls die höchsten Sporulationsraten auf, allerdings ohne signifikanten Unterschied zu den anderen Isolaten auf der jeweiligen Linie. Auf dem Genotyp Pa91 liegt die Sporulationsintensität des Isolates 28A auf der Linie mit Resistenzgen höher als auf der nah-isogenen Linie ohne *Ht2*. Die beiden europäischen Isolate weisen auf allen drei Maislinien mit *Ht2* Resistenzgen die geringsten Sporulationsraten im Vergleich zu den virulenten Isolaten aus den USA auf.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Isolate untereinander wurden die absoluten Werte der Merkmale Befallsstärke und Sporulation auf den Maislinien mit *Ht2* Resistenzgen jeweils in Relation zu den Werten auf der entsprechenden nah-isogenen Linie ohne Resistenzgen gesetzt, wobei die Werte auf den Linien ohne Resistenzgen gleich 100 gesetzt wurden. In Abbildung 32 sind die Relativwerte für die Befallsstärke und die Sporulation abgebildet. Die Relativwerte beschreiben die Wirksamkeit des Resistenzgens *Ht2* in Bezug auf die beiden Merkmale für jedes der Isolate. Je höher der Wert liegt, desto geringer ist die Wirkung von *Ht2* für das entsprechende Isolat. Bei einem Wert von 100 zeigte das Resistenzgen keine Wirkung. Für Befallsstärke war auf der Linie B37-*Ht2* am niedrigsten. Den höchsten Wert auf B37-*Ht2* verzeichnete das Isolat 122-2 mit 24,7%, dieser lag auf der Linie Pa91-*Ht2* bei 73,7%. Den insgesamt geringsten Relativwert für das Merkmal Befallsstärke verzeichnete das Isolat 130-2 mit 5,6% auf B37-*Ht2*. Auf der Linie Pa-91-*Ht2* lag der Wert hingegen mit 55,6%. zehnfach höher.

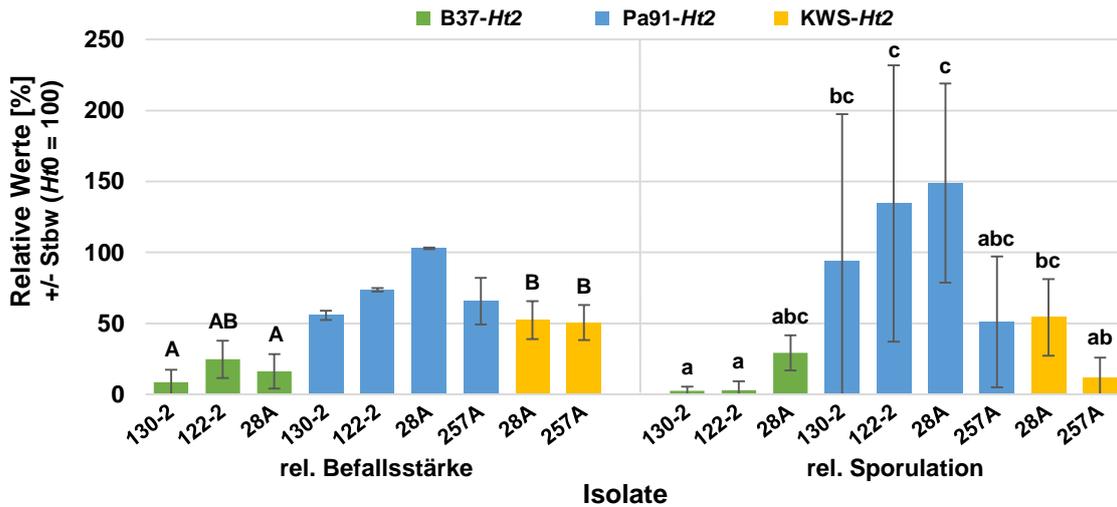


Abb. 32: Relative Befallsstärke und relative Sporulation von *E. turcicum* Isolaten auf Maisinzuchtlinien mit dem Resistenzgen *Ht2*, Werte berechnet relativ zum Befall bzw. zur Sporulation auf der nah-isogenen Inzuchtlinie ohne *Ht* Resistenzgen (*Ht0* = 100), Isolate 28A und 257A dienten als virulente Referenzisolate, Boniturzeitpunkt: 16 dpi; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ), Befallsstärke:  $n = 9$ , Sporulation:  $n = 10$ .

Für das Isolat 28A lag der Wert auf der Linie B37-*Ht2* mit 16,2% ebenfalls deutlich unter dem Wert auf der Linie Pa91-*Ht2* mit 102,8% und unterschied sich zudem signifikant ( $p \leq 0,05$ ) von dem Wert auf der Linie KWS-*Ht2* mit 52,3%. Die Tendenz zu höheren Befallswerten auf der Linie Pa91-*Ht2* wird auch durch das virulente Isolat 257A bestätigt. Für dieses Isolat lag der Wert auf der Linie Pa91-*Ht2* mit 65,5% um ca. 15 Prozentpunkte höher im Vergleich zur Linie KWS-*Ht2*.

Insgesamt beschreiben die Relativwerte der Befallsstärke in Abbildung 32 für das Resistenzgen *Ht2* eine abnehmende Wirkung in den genetischen Hintergründen in folgender Reihenfolge: B37 < KWS < Pa91. Für das Merkmal Sporulation konnten sehr ähnliche Effekte beobachtet werden. Für dieses Merkmal wies der Genotyp B37-*Ht2* ebenfalls die geringsten Werte im Vergleich zu den Genotypen Pa91-*Ht2* und KWS-*Ht2* auf. Bei Werten von 2,5 und 2,9% für die Isolate 130-2 und 122-2 bewirkte das Resistenzgen *Ht2* im genetischen Hintergrund der Linie B37 eine fast vollständige Reduktion der Sporulation. Die Werte für die entsprechenden Isolate lagen auf der Linie Pa91-*Ht2* signifikant höher bei 94 und 134,5%. Auf dieser Linie zeigte das Resistenzgen *Ht2* gegenüber diesen beiden Isolaten für das Merkmal Sporulation keine Wirkung. Gegenüber dem Isolat 28A zeigte *Ht2* in der Linie B37 mit 29,2% eine vergleichsweise deutliche Wirkung. Diese verringerte sich in der

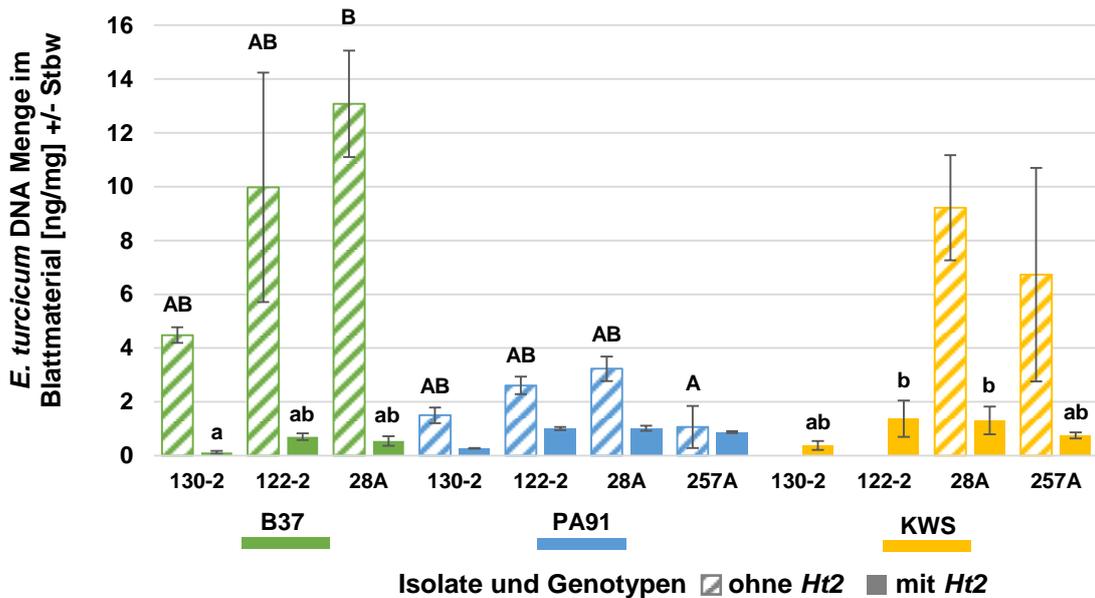


Abb. 33: DNA Menge von *E. turcicum* Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften gegenüber *Ht2* in befallenem Blattmaterial nah-isogener Maisinzuchtlinien. Isolate 122-2 (virulent) und 130-2 (avirulent) stammen aus Europa und die Isolate 28A und 257A (beide virulent auf *Ht2*) aus den USA, Probenahmezeitpunkt 16 dpi.

Linie KWS-*Ht2* mit einem Wert von 54,2 noch einmal deutlich. Im Genotyp Pa91 war in Bezug auf die Sporulation mit einem relativen Wert von 148,9% für das Isolat 28A keine Wirkung des Resistenzgens *Ht2* zu beobachten. Für das Isolat 257A ist für die Linie Pa91 ebenfalls eine deutlich geringere Wirkung durch das Resistenzgen *Ht2* in Bezug auf die Sporulation zu beobachten. Auf Basis der Versuchsergebnisse zu den Merkmalen Befallsstärke und Sporulation wurden signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit des Resistenzgens *Ht2* in den verwendeten Maisinzuchtlinien festgestellt. Die höchste Wirksamkeit wurde für die Linie B37 beschrieben. In der Linie Pa91 wies *Ht2* für alle getesteten Isolate und beide erhobenen Merkmale die geringste Wirksamkeit auf.

Das Blattmaterial aller Versuchsvarianten wurde auf den Gehalt an pilzlicher DNA von *E. turcicum* untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Alle Maislinien ohne *Ht2* Resistenzgen wiesen für die jeweiligen Isolate einen meist deutlich höheren Pilz-DNA-Gehalt auf im Vergleich zu ihren nah-isogenen Inzuchtlinien mit dem Resistenzgen *Ht2*. Für die Linie KWS ohne *Ht2* war nicht ausreichend Saatgut vorhanden. Der Gehalt an *E. turcicum*-DNA lag für den Genotyp Pa91 ohne *Ht2* im Vergleich zu den Genotypen B37 und KWS jeweils ohne *Ht2* auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau. Allen Maislinien mit *Ht2*-Resistenzgen waren durch die geringsten DNA-Gehalte des Isolates 130-2 gekennzeichnet. Den insgesamt geringsten Gehalt für das Isolat 130-2 verzeichnete die Linie B37-

*Ht2* mit 0,1 ng/mg TM. Die Gehalte an *E. turcicum*-DNA der anderen Isolate über alle Genotypen mit *Ht2* lagen im Bereich zwischen 0,5 und 1,4 ng/mg TM. Tendenziell lagen die Werte der Linien Pa91-*Ht2* und KWS-*Ht2* höher als die Werte auf der Linie B37-*Ht2*. Diese Unterschiede waren aber zu gering, um einen statistisch signifikanten Unterschied belegen zu können.

### 3.5 Histologische Untersuchungen zur Pathogenese von *E. turcicum* an Mais

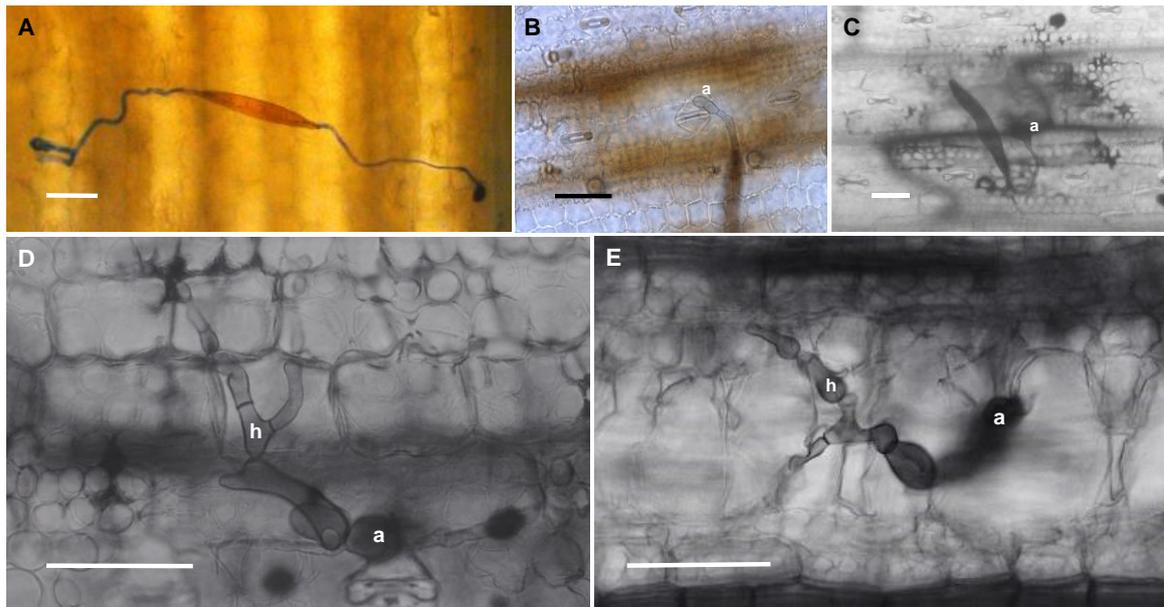
Für den Versuch zu den histologischen Untersuchungen wurden getrennt vom Versuch zum Rassenscreening Pflanzen neu angezogen und inokuliert. Um die Virulenzeigenschaften der verwendeten Isolate für diesen Versuch zu bestätigen, wurde eine Bonitur der Befalls-symptome zu den Zeitpunkten 12 und 18 Tage nach Inokulation vorgenommen. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse dieser beiden Boniturertermine neben den Ergebnissen aus dem Rassenscreening dargestellt. Die bonitierten Virulenzeigenschaften stimmten zum Zeitpunkt 18 dpi vollkommen mit den Ergebnissen aus dem Rassenscreening überein. Dadurch konnte für jedes der Resistenzgene mindestens eine kompatible und eine inkompatible Interaktion in den histologischen Untersuchungen abgebildet werden. Zum Zeitpunkt 12 dpi gab es für das Isolat 123-3 eine Abweichung für das Resistenzgen *Ht2*. In diesem Fall wurde das Isolat im Rassenscreening als virulent eingestuft und im aktuellen Versuch als avirulent. Nach weiteren vier Tagen (18 dpi) wurde das gleiche Isolat auf der Linie *Ht2* als virulent eingestuft.

**Tab. 25: Boniturergebnisse der Virulenzeigenschaften der für die histologischen Untersuchungen verwendeten Isolate auf dem Differentialsortiment der Linie B37 mit den Resistenz-genen *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN*, Ergebnisse aus dem Rassenscreening und Ergebnisse der Isolate im Versuch zu den histologischen Untersuchungen (12 & 18 dpi), \*: A = avirulent, V = virulent (grau hervorgehoben).**

Isolat	Rasse	Virulenzeigenschaften*											
		Rassenscreening				12 dpi				18 dpi			
		<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>	<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>	<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
172-4	0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
138-1	1	V	A	A	A	V	A	A	A	V	A	A	A
123-3	23N	A	V	V	V	A	A	V	V	A	V	V	V

#### 3.5.1 Infektionsprozess von *E. turcicum* an Mais

Für die histologischen Studien zur Interaktion von *E. turcicum* und Mais in tieferen Blatt-schichten wurde als Färbesubstanz Chlorazol Black E (CBE) verwendet. Lediglich für die initialen Schritte des Infektionsprozesses, wie die Sporenkeimung und Appressorienbildung auf der Blattoberfläche wurden weitere Färbesubstanzen verwendet. In Abbildung 34 sind die initialen Schritte des Infektionsprozesses in Form von lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. In Bild A ist eine bipolar gekeimte dunkel-braun erscheinende Konidiospore auf der Blattoberfläche zu erkennen.

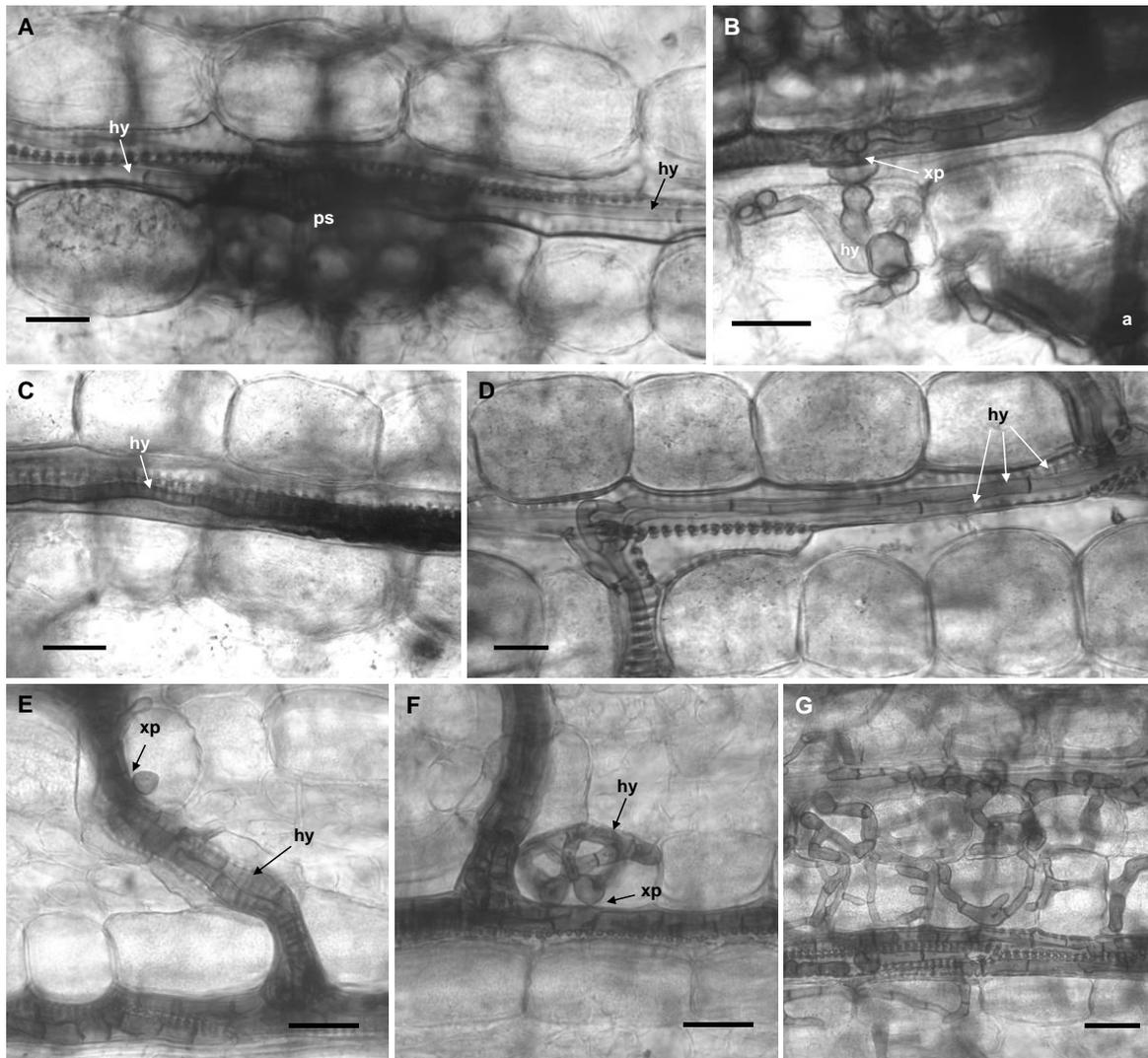


**Abb. 34:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Anfangsstadien der Pathogenese von *E. turcicum* an Mais einen Tag nach Inokulation; (A) Bipolar gekeimte Konidiospore mit Keimschläuchen und Appressorien nach Trypan-Blau Färbung in der Blattaufsicht; (B) Konidiospore mit Keimschlauch und Appressorium 3 dpi (a) mit bräunlich erscheinenden Bereichen entlang der Leitbündelgefäße nahe der Penetrationsstelle nach Entfärbung durch Ethanol in der Blattaufsicht; (C) dunkel erscheinender Bereich unter der Penetrationsstelle mit Konidiospore, Keimschlauch und Appressorium (a) nach Chlorazol Black E Färbung in der Blattaufsicht; (D und E) Intrazelluläres Hyphenwachstum (h) in den Epidermiszellen ausgehend vom Appressorium (a); verwendete Genotypen: A bis D: B37, E: B37-*Ht2* inkompatibel; Maßstab: 50 µm.

An beiden Polen der Spore entspringt ein bläulich eingefärbter Keimschlauch, an dessen Enden jeweils ein Appressorium in Form einer dunkelblauen kreisförmigen Struktur zu erkennen ist. Die Färbung erfolgte in diesem Fall mit Trypan-Blau. Im Bild B ist eine gekeimte Konidiospore mit transparentem mehrfach septiertem Keimschlauch zu erkennen. Am Ende des Keimschlauches ist ein rundliches Appressorium (a) unmittelbar neben einer Spaltöffnung platziert. Entlang der Leitbündelgefäße erscheint eine bräunliche Verfärbung unter der Penetrationsstelle. Die Färbung der in den Bildern C bis E dargestellten Strukturen erfolgte mit CBE. Dieser Farbstoff lässt die Zellwände von Pilzen unter dem Lichtmikroskop schwarz erscheinen. Bild C zeigt eine gekeimte Spore mit Keimschlauch und Appressorium (a) auf der Blattoberfläche. Der Bereich der dunkel gefärbten Zellstrukturen mit den sich abgrenzenden schwarz/grau gefärbten Leitbahnen unterhalb des Appressoriums wird im Folgenden als Penetrationsstelle bezeichnet. Bild D ist fokussiert auf die in der epidermalen Zellschicht intrazellulär wachsenden Hyphen, ausgehend vom Appressorium (a) auf der anfälligen Linie B37 einen Tag nach der Inokulation. Zu erkennen ist ein verzweigtes

Wachstum septierter Hyphen mit rundlichen aufgetriebenen Hyphen an den Stellen, an denen eine Zellwandpenetration stattfindet. Im Bild E sind ebenfalls die ersten Schritte der Besiedlung der Epidermiszellen durch *E. turcicum* zu sehen. In diesem Fall handelt es sich um ein avirulentes Isolat auf dem Genotyp B37-*Ht2* einen Tag nach Inokulation. Hier ist ähnlich wie auf dem anfälligen Genotyp B37 (Bild D) zu erkennen, wie die septierten Hyphen (h) intrazellulär die Epidermiszellen des Maisblattes vom Appressorium (a) ausgehend besiedeln. Auch in diesem Fall sind rundlich aufgetriebene Hyphen an den Stellen der Zellwandpenetrationen zu beobachten, die sich zum Penetrationsort hin verzüngen, um nach der Passage durch die Zellwand wieder aufzutreiben. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass in den ersten Stunden des Infektionsprozesses in Bezug auf die Faktoren Sporenkeimung, Appressorienbildung, Penetration und Besiedlung der Epidermiszellen keine Unterschiede zwischen den Maislinien mit den verschiedenen Resistenzgenen und den Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften festgestellt werden konnten.

In Abbildung 35 sind die Stadien des Infektionsprozesses nach der Epidermispenetration dargestellt. Diese Stadien sind durch die Xylem-Besiedlung bis hin zu einer intensiven Kolonisation des Mesophylls charakterisiert. Bild A zeigt eine Penetrationsstelle (ps) mit einem darunter verlaufenden Xylemgefäß. In diesem Xylemgefäß verläuft eine septierte Hyphe (hy) in beide Richtungen. Ausgehend von der Penetrationsstelle hat eine erfolgreiche Penetration der Xylemwand und folgendem Hyphenwachstum im Xylem stattgefunden. Bild B zeigt intrazelluläres Hyphenwachstum (hy), ausgehend vom Appressorium (a) in einer kompatiblen Interaktion auf der Linie B37-*Ht3* einen Tag nach der Inokulation. Darüber hinaus ist die Stelle der Penetration der Xylemwand (xp) mit den typischen rundlichen Strukturen an beiden Seiten der Penetrationsstelle zu erkennen. Im Xylemgefäß ist ein Wachstum septierter Hyphen in beide Richtungen sichtbar.



**Abb. 35: Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Stadien der Pathogenese von *E. turcicum* an Mais; (A) Erfolgreich penetriertes und durch Hyphen (hy) besiedeltes Xylemgefäß unterhalb einer Penetrationsstelle (ps), (B) Hyphenwachstum (hy) im Mesophyll ausgehend vom Appressorium (a) in Richtung Xylem, Xylempenetrationsstelle (xp) als rundliche Pilzstrukturen außen und innen an der Xylemwand; (C) Hyphenwachstum (hy) im Xylem gestoppt durch Abwehrreaktion (ar) im Xylem; (D) Starkes Hyphenwachstum mehrerer Einzelhyphen (hy) im quervernetztem Xylem; (E) Vollständig durch Hyphen (hy) gefülltes Xylem mit rundlicher Pilzstruktur als Austrittsstelle an der äußeren Xylemwand, Xylempenetrationsstelle (xp); (F) Austritt von Pilzhypen in das Mesophyll an der Xylempenetrationsstelle (xp) mit rundlicher Pilzstruktur an der äußeren Xylemwand; (G) Intensive Kolonisation der Bündelscheidenzellen und des Mesophylls durch Pilzhypen ausgehend vom stark besiedelten Xylem; Genotyp, Zeitpunkt, Interaktion: A: B37 6dpi, B: B37-*Ht3* 1dpi kompatibel, C: B37-*Ht1* 6dpi inkompatibel, D: B37 6dpi, E bis G: B37 12dpi, Längenmaßstab: 50 µm.**

In Bild C ist ein horizontal verlaufendes Xylemgefäß mit einer von links nach rechts gewachsenen Hyphe (hy) zu sehen. Es handelt sich in diesem Fall um eine inkompatible Interaktion auf der Maislinie B37-*Ht1* sechs Tage nach Inokulation. Im rechten Teil des Xylems ist deutlich ein dunkel erscheinender Bereich zu sehen. Das Hyphenwachstum ist innerhalb

dieses dunklen Bereiches stark reduziert bzw. unterbunden. Der dunkel erscheinende Teil des Xylems könnte auf Substanzen zurückgehen, die als Abwehrreaktion (ar) der Pflanze auf die Xylem-Besiedlung gebildet wurden. In Bild D ist ein horizontal verlaufendes Xylemgefäß mit Querverbindungen der Linie B37 sechs Tage nach Inokulation zu sehen. Im Xylemgefäß sind mehrere septierte Hyphen (hy) nebeneinander und übereinander verlaufend sichtbar. Zudem ist deutlich zu erkennen, wie sich die Hyphen über die Querverbindungen in alle Richtungen in den Xylemgefäßen ausbreiten. Die Aufnahmen E bis G stammen von der Linie B37 12 Tage nach Inokulation. Zu diesem Zeitpunkt traten bereits sichtbare welkeähnliche Symptome an der Pflanze auf. Eine vollständig mit Pilzhypen (hy) besiedelte Xylem Querverbindung ist in Bild E zu sehen. Im Xylem sind einzelne Hyphen anhand ihrer Septierungen zu erkennen. Im oberen Bereich der Querverbindung ist eine rundliche abgeschnürte pilzliche Struktur an der Außenwand des Xylems sichtbar. An dieser Stelle (xp) hat der Pilz die Xylemwand penetriert und ist in die anliegenden Bündelscheidenzellen eingedrungen. Im Bild F ist ebenfalls ein sehr stark durch Pilzhypen kolonisiertes Xylemgefäß mit einer Querverbindung zu sehen. Wie in Bild E ist es dem Pilz an einer Stelle gelungen, die Xylemwand zu penetrieren (xp). Nach der Xylempenetration (xp) ist ausgehend von der rundlichen abgeschnürten Struktur deutliches Hyphenwachstum (hy) innerhalb der penetrierten Bündelscheidenzelle sichtbar. In der Aufnahme G ist ein stark mit Hyphen besiedeltes horizontal verlaufendes Xylemgefäß zu sehen. Darüber hinaus ist die Besiedlung durch die Pilzhypen bis weit in die Mesophyllzellen fortgeschritten. Deutlich zu erkennen sind die septierten Hyphen, die sich zunächst in der nächsten penetrierten Zelle ausbreiten, um dann direkt eine weitere benachbarte Zelle zu penetrieren und zu besiedeln. Zu diesem Zeitpunkt ist das pflanzliche Gewebe bereits vollständig kollabiert und abgestorben. Die Symptome auf den Blättern erscheinen zunächst wie grau-grünliche Welkesymptome nach Wassermangel. Das Unterbinden des Wassertransports durch die mit Pilzhypen verstopften Xylemgefäße führt zum Austrocknen der befallenen Blattbereiche und letztlich zum Absterben des besiedelten Gewebes.

### 3.5.2 Vergleichende Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen

In Gewächshausversuchen wurden die nah-isogenen Maislinien B37, B37-Ht1, B37-Ht2, B37-Ht3 und B37-HtN jeweils mit virulenten bzw. avirulenten Isolaten inokuliert. Dadurch war es möglich, die Pathogenese von *E. turcicum* in einer inkompatiblen und kompatiblen Interaktion für jedes der Resistenzgene zu untersuchen. Nach der Probenahme zu den Zeitpunkten 1, 3, 6, 12 und 18 dpi wurden für jede Variante 40 Penetrationsstellen mikroskopisch nach Chlorazol Black E Färbung ausgewertet. Mit Hilfe des Merkmals „Xylem-

Penetrations-Effizienz“ ist es möglich, eine qualitative Aussage über die Effizienz der Xylempenetration zu treffen. Ein Wert von 20% bedeutet für dieses Merkmal, dass ausgehend von 40 Sporen, die erfolgreich die Epidermis penetriert haben (= Penetrationsstelle), 20% erfolgreich das Xylem penetriert haben. Dies ist eine rein qualitative Bewertung, da dieser Wert noch keine Aussage darüber trifft, wie intensiv die Xylem-Besiedlung stattgefunden hat.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse zum Merkmal Xylem-Penetrations-Effizienz für alle untersuchten Resistenzgene zu allen erhobenen Zeitpunkten jeweils in der inkompatiblen (A) und kompatiblen (B) Interaktion dargestellt. Die gekennzeichneten signifikanten Unterschiede beziehen sich immer auf einen Zeitpunkt und auf die Linie B37 ohne *Ht* Resistenzgen. Einen Tag nach Inokulation zeigten alle Linien in der inkompatiblen Interaktion sehr geringe Werte zwischen 2,5 und 5% ohne signifikante Unterschiede zu B37. Bereits zwei Tage später (3 dpi) erreichten die Linien B37 und B37-*Ht2* den Wert 20%.

Den geringsten und signifikant reduzierten Wert verzeichnete die Linie B37-*HtN* mit 5%. Alle anderen Linien zeigten zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied zur Linie B37. Bereits sechs Tage nach Inokulation war *E. turcicum* an 50% der Penetrationsstellen der Linie B37 erfolgreich in das Xylem eingedrungen. Den höchsten Wert unter den Linien mit Resistenzgen erreichte B37-*Ht2* mit 35% und unterschied sich als einzige Linie zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant von B37. Alle anderen Resistenzgene zeigten mit Werten zwischen 25 und 17,5% zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Reduktion in der Penetrationsrate des Xylems. Weitere sechs Tage später (12 dpi) ging mit einem Wert von 98,8% auf der Linie B37 von fast jeder Penetrationsstelle eine erfolgreiche Besiedlung des Xylems aus. Alle Resistenzgene bewirkten zu diesem Zeitpunkt eine deutliche und signifikante ( $p \leq 0,001$ ) Reduktion der Xylem Penetration. Die stärkste Reduktion erreichte *HtN* mit einem Wert von 7,5%. Die geringste Reduktion verzeichnete *Ht3* mit 35%. Zum Zeitpunkt 18 dpi erreichten alle Resistenzgene mit Werten zwischen 37,5 und 20% ebenfalls eine signifikante ( $p \leq 0,001$ ) Reduktion der Xylem-Besiedlung gegenüber der Linie B37 mit einem Wert von 97,5%. Trotz der inkompatiblen Interaktion lagen die Werte sechs Tage nach Inokulation für die Resistenzgene *Ht1*, *Ht2* und *Ht3* bereits bei 20% oder höher. Spätestens zum Zeitpunkt 18 dpi verzeichneten alle avirulenten Isolate Werte von über 20%. Der Wert für *Ht1* lag am letzten Zeitpunkt bei 37,5%.

Im unteren Teil der Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Xylem-Penetrations-Effizienz der kompatiblen Interaktionen dargestellt. Im Vergleich zu den inkompatiblen Interaktionen traten hier bereits am ersten Tag nach der Inokulation signifikante Unterschiede zur Linie B37 auf. Die Linien B37-*Ht1* und B37-*HtN* wiesen zum Zeitpunkt 1dpi mit 22,5% und 20% als einzige Linien signifikant ( $p \leq 0,01$ ) höhere Werte im Vergleich zur Linie B37 mit 5% auf.

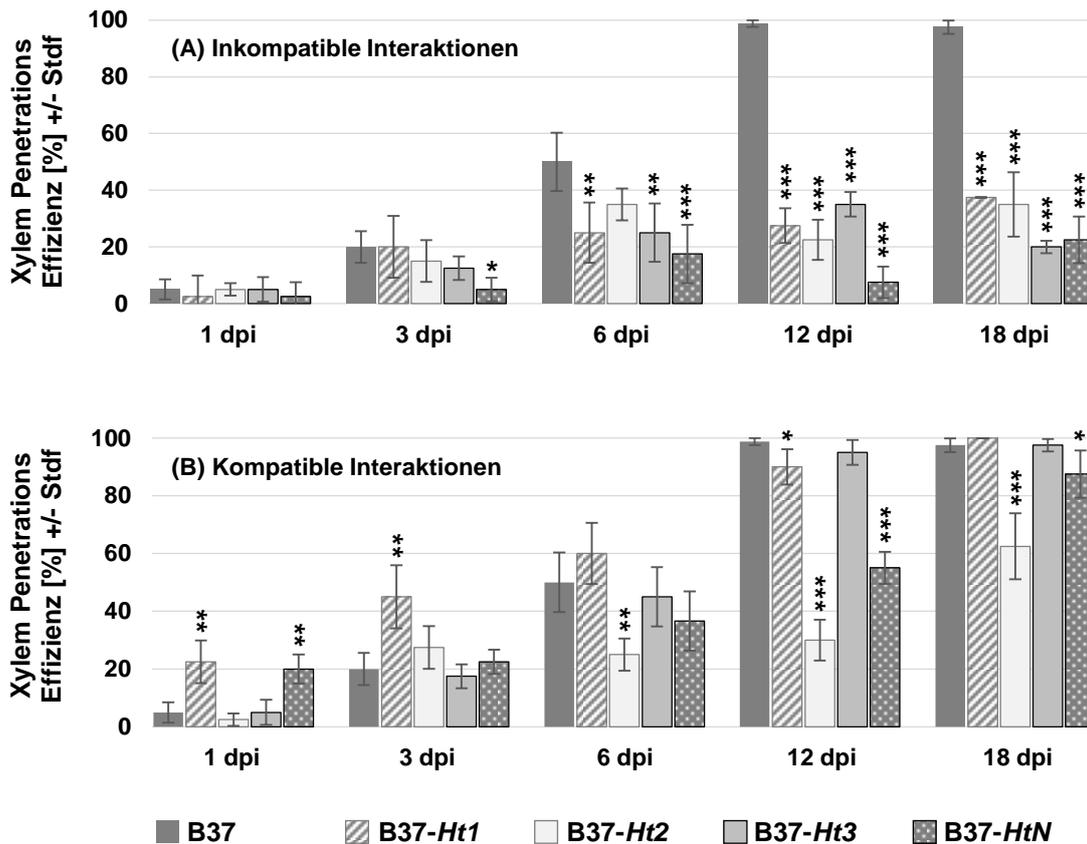


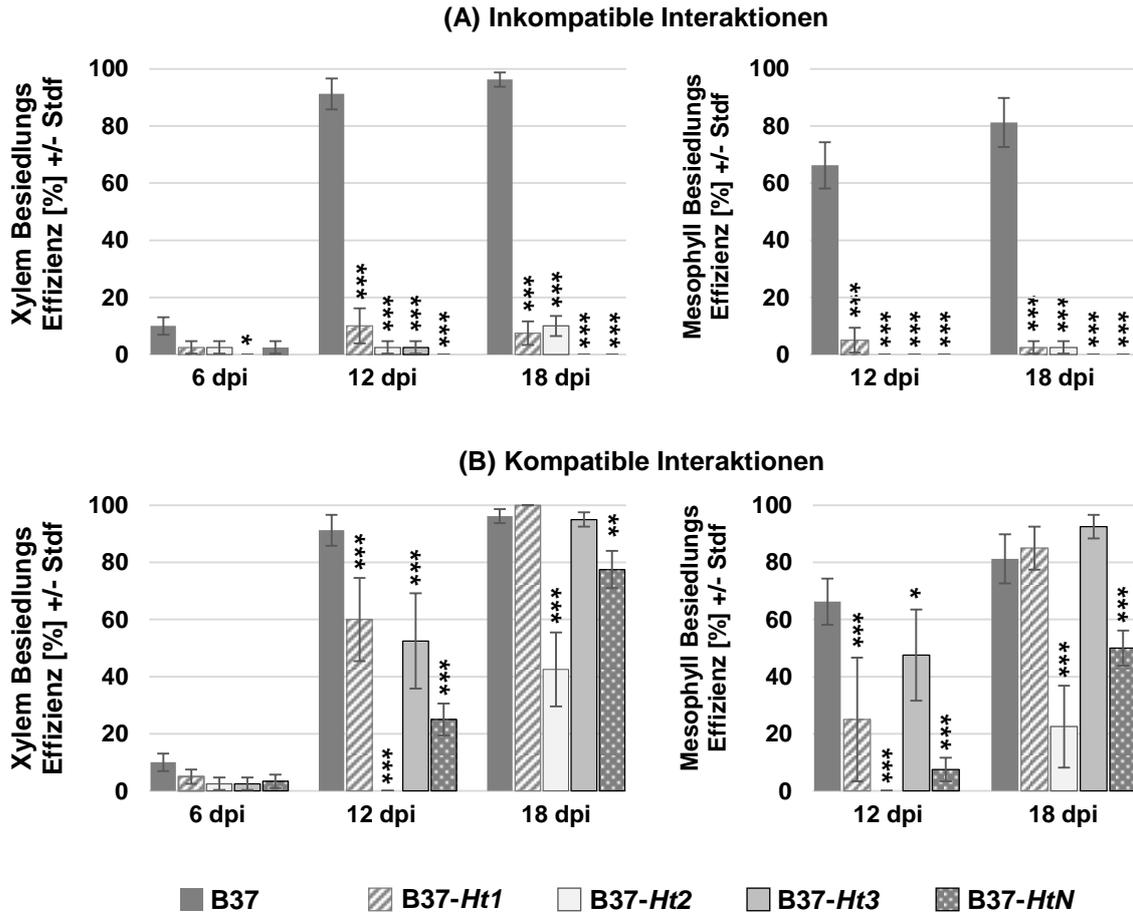
Abb. 36: Effekte der Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, und *HtN* in der Maislinie B37 auf die Xylem-Penetrations-Effizienz von *E. turcicum* an sechs verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs jeweils in inkompatiblen und kompatiblen Interaktionen, d. h. je einem avirulenten und virulenten Isolat. Ausgehend von 40 Penetrationsstellen der Epidermis beschreibt jeder Wert den Anteil der Stellen, denen eine erfolgreiche Penetration des Xylems (= Hyphen im Xylem sichtbar) folgte, signifikante Unterschiede gegenüber der nah-isogenen Linie B37 sind wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; Chi-Quadrat Test, Standardfehler ist aus dem Mittelwert von vier Wiederholungen berechnet: 4 Blattsegmente x 10 Penetrationsstellen,  $n = 40$ .

Zwei Tage später (3dpi) erreichte die Linie B37-*Ht1* den höchsten Wert von 45% und zeigte damit als einzige Linie einen signifikant verschiedenen Wert von der Linie B37 mit 20%. Die Werte der anderen drei Linien B37-*Ht2*, B37-*Ht3* und B37-*HtN* lagen im Bereich zwischen 17,5 und 27,5% ohne signifikante Abweichung vom Wert der Linie B37. Sechs Tage nach Inokulation wiesen 60% der untersuchten Penetrationsstellen auf der Linie B37-*Ht1* eine erfolgreiche Besiedlung des Xylems auf. Dieser Wert stellte gefolgt von der Linie B37 mit 50% den höchsten Wert zu dem Zeitpunkt dar. Die Werte der Linien B37-*Ht3* und B37-*HtN* lagen mit 45% und 36,7% unter 50%, aber nicht statistisch signifikant niedriger zur Linie B37. Als einzige Linie wies B37-*Ht2* mit einem Wert von 25% einen statistisch signifikant ( $p \leq 0,01$ ) geringeren Wert auf. Bei den inkompatiblen Interaktionen wiesen alle Linien bis auf B37-*Ht2* zum Zeitpunkt 6 dpi eine signifikante Reduktion der Xylem-Penetrations-Effizienz

auf. In der kompatiblen Interaktion ist dies genau umgekehrt lediglich für die Linie B37-*Ht2* zu beobachten. Alle anderen Linien mit Resistenzgenen weisen Werte auf, die sich nicht signifikant von der Linie B37 unterscheiden. Sechs Tage später (12dpi) erreichen die Linien B37, B37-*Ht1* und B37-*Ht3* sehr hohe Werte von 90% oder höher. Einzig die Linie B37-*Ht1* unterscheidet sich trotz des sehr hohen Wertes von 90% signifikant ( $p \leq 0,05$ ) von der Linie B37. Die Linie B37-*HtN* weist mit 55% einen relativ hohen, aber dennoch genau wie die Linie B37-*Ht2* mit 30% einen signifikant geringeren Wert im Vergleich zur Linie B37 auf. Am letzten Boniturtermin 18 dpi lagen die Werte für die Linien B37, B37-*Ht1* und B37-*Ht3* ohne signifikante Unterschiede bei nahezu 100%. Der Wert der Linie B37-*HtN* lag mit 87,5% sehr hoch, dennoch unterschied er sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ) von der Linie B37 (97,5%). Mit 62,5% wies die Linie B37-*Ht2* den geringsten Wert für eine kompatible Interaktion zum Zeitpunkt 18 dpi auf.

Zusammenfassend konnte für die inkompatiblen Interaktionen für alle Resistenzgene eine deutliche und signifikante, wenn auch nicht vollständige, Reduktion der Xylem Penetration ab dem Zeitpunkt 12 dpi nachgewiesen werden. Für die kompatiblen Interaktionen konnte für die Resistenzgene *Ht1* und *Ht3* ein nahezu vollständiger Wirksamkeitsverlust über den gesamten Boniturzeitraum nachgewiesen werden. Für die Resistenzgene *Ht2* und *HtN* lagen die Werte für die Xylem-Penetration in der kompatiblen Interaktion zwar deutlich höher als in der inkompatiblen Interaktion, aber dennoch spätestens ab dem Zeitpunkt 12 dpi signifikant unter dem der nah-isogenen Linie B37.

Anhand des Merkmals Xylem-Penetration-Effizienz wurde eine Einstufung vorgenommen, um die Xylem-Penetration in der inkompatiblen und kompatiblen Interaktion zwischen den resistenzgentragenden isogenen Linien auf eine qualitative Weise zu vergleichen. Um darüber hinaus die Wirksamkeit der Resistenzgene auf die quantitative Besiedlung des Pflanzengewebes durch *E. turcicum* beschreiben zu können, wurden die Merkmale Xylem-Besiedlungs-Effizienz und Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz verwendet. Das Merkmal Xylem-Besiedlungs-Effizienz beschreibt den Anteil der Penetrationstellen, von denen eine Besiedlung des Xylems mit zwei oder mehr Hyphen je Xylem Gefäß ausging. Durch das Merkmal Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz wurde der Anteil der Penetrationstellen beschrieben, von denen eine erfolgreiche Besiedlung des Mesophylls ausging. Die erfolgreiche Besiedlung des Mesophylls setzte in diesem Fall einen Austritt der Pilzhyphen aus dem Xylem durch Penetration der Xylemwand von innen nach außen voraus. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Merkmale Xylem- und Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils für inkompatible (A) und kompatible (B) Interaktionen dargestellt.



**Abb. 37: Effekte der Resistenzgene *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, und *HtN* im genetischen Hintergrund der Maislinie auf die Effizienz der Xylem- und Mesophyll-Besiedlung durch *E. turcicum* an drei bzw. zwei verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs in inkompatiblen und kompatiblen Interaktionen, d. h. je einem avirulenten und virulenten Isolat. Ausgehend von 40 Penetrationsstellen der Epidermis beschreibt jeder Wert den Anteil der Stellen, denen eine erfolgreiche Besiedlung des Xylems (= mehr als 2 Hyphen im Xylem sichtbar) bzw. des Mesophylls folgte, signifikante Unterschiede gegenüber der nah-isogenen Linie B37 sind wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; Chi-Quadrat Test, Standardfehler ist aus dem Mittelwert von vier Wiederholungen berechnet: 4 Blattsegmente x 10 Penetrationsstellen,  $n = 40$ .**

Zunächst soll nun näher auf das Merkmal Xylem-Besiedlungs-Effizienz eingegangen werden. Bei diesem Merkmal zeigten sich bis einschließlich sechs Tage nach Inokulation sowohl in der inkompatiblen als auch in der kompatiblen Interaktion kaum signifikante Unterschiede zu B37. Den höchsten Wert verzeichnete zu diesem Zeitpunkt die Linie B37 mit 10%. Alle anderen Linien mit Resistenzgenen lagen unterhalb von 5%. Bereits sechs Tage später (12 dpi) lag der Wert für B37 bei 91,3%. In den inkompatiblen Interaktionen waren alle resistenzgentragenden Linien in der Lage, die Xylem-Besiedlung deutlich und signifikant ( $p \leq 0,001$ ) zu reduzieren. Den höchsten Wert verzeichnete B37-*Ht1* mit 10%. Alle anderen Werte lagen bei 2,5% oder niedriger. Im Gegensatz dazu wiesen die Linien mit

Resistenzgenen in der kompatiblen Interaktion sehr heterogene und zudem deutlich höhere Werte auf. Den höchsten Wert verzeichnete B37-*Ht1* mit 60% gefolgt von B37-*Ht3* und B37-*HtN* mit 52,5% und 25%. Auf der Linie B37-*Ht2* wurde zum Zeitpunkt 12 dpi kein Xylemgefäß beobachtet, das durch mehr als eine Pilzhyphe besiedelt worden war.

Alle Werte der Linien mit Resistenzgenen lagen signifikant ( $p \leq 0,001$ ) unter dem Wert der Linie B37 mit 91,3%. Weitere sechs Tage später zum Boniturzeitpunkt 18 dpi betrug der Wert für B37 96,3%. In den inkompatiblen Interaktionen zeigten auch an diesem Zeitpunkt die Linien mit Resistenzgenen signifikant ( $p \leq 0,001$ ) reduzierte Werte. Den höchsten, aber dennoch relativ niedrigen, Wert verzeichnete B37-*Ht2* mit 10%. In den kompatiblen Interaktionen lagen die Werte der Linien B37-*Ht1* und B37-*Ht3* zum Zeitpunkt 18 dpi mit 100% und 95% auf sehr hohem Niveau ohne signifikanten Unterschied zu B37 mit 96,3%. Die Linie B37-*HtN* wies mit 77,5% einen ebenfalls hohen Wert auf. Dieser lag aber signifikant unter dem der Linie B37. Den geringsten Wert verzeichnete die Linie B37-*Ht2* mit einem signifikant niedrigeren Wert von 42,5%.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass für die Besiedlung des Xylems erst ab 12 Tage nach der Inokulation ein deutlicher Anstieg in der Xylem-Besiedlung beobachtet werden konnte. In den inkompatiblen Interaktionen waren alle Resistenzgene in der Lage, die Xylem-Besiedlung durch zwei oder mehr Hyphen je Xylem-Gefäß auf maximal 10% zu begrenzen. In den kompatiblen Interaktionen konnte für die Resistenzgene *Ht2* und *HtN* zum Zeitpunkt 18 dpi noch eine Wirkung nachgewiesen werden. Diese Reduktion lag für *Ht2* mit knapp 60% relativ hoch. Die Resistenzgene *Ht1* und *Ht3* waren zu diesem Zeitpunkt wirkungslos.

In Abbildung 37 ist auf der rechten Seite das Merkmal Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz abgebildet. Für dieses Merkmal waren generell erst ab dem zwölften Tag nach Inokulation Effekte zu beobachten. Die Werte für die Linie B37 lagen zwölf Tage nach Inokulation bei 66,3% und weitere sechs Tage später bei 81,3%. In den inkompatiblen Interaktionen waren alle Resistenzgene sehr effektiv in der Lage, die Besiedlung des Mesophylls durch *E. turcicum* zu verhindern. Den höchsten Wert an den Zeitpunkten 12 und 18 dpi verzeichnete B37-*H1* mit einem sehr geringen Wert von 5%. Die Resistenzgene *Ht3* und *HtN* konnten eine Mesophyll-Besiedlung in den inkompatiblen Interaktionen vollständig verhindern. Bei den kompatiblen Interaktionen zeigten die unterschiedlichen Resistenzgene sehr heterogene Ergebnisse in Bezug auf die Mesophyll-Besiedlung. Das Resistenzgen *Ht2* verhinderte zum Zeitpunkt 12 dpi die Mesophyll-Besiedlung noch vollständig. Für die Linien mit den Resistenzgenen *Ht1* und *HtN* wurden Werte in Höhe von 25% und 7,5% festgestellt. Diese Werte stellen nach wie vor eine signifikante Reduktion gegenüber der Linie B37 dar. Die geringste Wirksamkeit zeigte das Resistenzgen *Ht3* mit einem Wert von 47,5%. Dieser

Wert lag dennoch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) unter dem der Linie B37. Am letzten Boniturtermin 18 Tage nach der Inokulation zeigten die beiden Resistenzgene *Ht1* und *Ht3* in der kompatiblen Interaktion keine Wirkung gegen die Besiedlung des Mesophylls durch *E. turcicum*. Ihre Werte lagen mit 85% und 92,5% sogar leicht über dem Wert der Linie B37 mit 81,3%. Die beiden Linien mit den Resistenzgenen *Ht2* und *HtN* waren in der Lage, die Besiedlung des Mesophylls gegenüber der Linie B37 signifikant ( $p \leq 0,001$ ) zu reduzieren. Mit 22,5% war die Wirksamkeit des Resistenzgens *Ht2* gegen die Mesophyll-Besiedlung am höchsten. Der Wert für *HtN* lag zum Zeitpunkt 18 dpi in der kompatiblen Interaktion bei 50%.

## 4 Diskussion

In der folgenden Diskussion sollen zunächst die verwendeten Methoden zur Handhabung umfangreicher Isolatmengen von *E. turcicum* im Labor behandelt werden (4.1). Im Kapitel 4.2 folgt die ausführliche Ergebnisbesprechung zum Rassenaufkommen und der Verteilung regionaler Virulenzfrequenzen von *E. turcicum*. Im Rahmen der Besprechung der Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit der Resistenzgene in Kapitel 4.3 wird die besondere Stellung des Resistenzgens *Ht2* herausgearbeitet. Eine tiefergehende Diskussion zur Wirksamkeit und Symptomatik des Resistenzgens *Ht2* folgt in Kapitel 4.4. Zum Abschluss der Diskussion werden in Kapitel 4.5 die Erkenntnisse der mikroskopischen Untersuchungen zur Interaktion von *E. turcicum* mit Mais beleuchtet. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse soll möglichst für jedes Resistenzgen der Ort beschrieben werden, an dem durch Abwehrmechanismen in der inkompatiblen Interaktion die Ausbreitung des Pilzes im Blattgewebe effektiv unterbunden wird.

### 4.1 Kultur- und Lagereigenschaften von *E. turcicum*

Die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum europäischen Rassenspektrum von *E. turcicum* bildeten 559 Einsporisolate (Tab. 13). Um einen reibungslosen und vor allem zügigen Ablauf des gesamten Prozesses von der Isolatgewinnung über die Einlagerung bis hin zur Inokulumherstellung zu gewährleisten, waren Kenntnisse über grundlegende Kultur- und Lageranforderungen von *E. turcicum* erforderlich. Dazu zählten insbesondere die Ansprüche an ein optimales Wachstum bzw. eine hohe *in vitro* Sporulationsrate. Aufgrund der großen Anzahl zu bearbeitender Isolate war es erforderlich, die Einsporisolate für den Zeitraum zwischen der Isolatgewinnung und Inokulumherstellung für mehrere Wochen einzulagern. Um diesen Schritt möglichst einfach zu gestalten, wurde die Einlagerung der Isolate als Sporensuspension in 25% Glycerin bei -23°C gewählt. Das Glycerin diente dazu, die für die Sporen schädigende Kristallbildung während des Gefrierens zu reduzieren.

Durch *in vitro* Versuche auf V8-Nährmedium wurde eine optimale Wachstumstemperatur von 22° bis 24°C ermittelt (Abb.12). Alle notwendigen Inkubations- und Subkultivierungsschritte im Rahmen der Isolatgewinnung und Inokulumherstellung wurden bei einer im Optimalbereich liegenden Raumtemperatur von 22°C ± 2°C durchgeführt. Die Sporenbildung durch Inkubation von *E. turcicum* auf V8 Nährmedium bei Tageslicht im Labor hat sich im Rahmen dieser Arbeit als schnelle und zuverlässige Methode der Sporengewinnung erwiesen. Die Dauer vom Ausplattieren der eingelagerten Sporensuspension auf V8-Nährmedium bis zur Herstellung des Inokulums mit bis zu 5.000 Sporen/ml betrug mit dieser Methode ca. zehn Tage.

Um die Vitalität der gewonnenen Einsporisolate nach Lagerung bei  $-23^{\circ}\text{C}$  zu gewährleisten, wurde die Keimfähigkeit der Konidiosporen nach unterschiedlicher Lagerdauer untersucht. In diesem Versuch ging es nicht darum, die optimalen Lagerbedingungen für Konidiosporen von *E. turcicum* zu bestimmen. Es sollte vielmehr geklärt werden, ob mit der genannten Lagermethode eine mittelfristige Lagerung über mehrere Wochen möglich ist. Unter den getesteten *in vitro* Bedingungen lag die Keimfähigkeit vor der Lagerung direkt im Anschluss an die Sporengewinnung bei 63,9%. Dieser Wert erscheint zunächst relativ gering, denn Levy & Cohen (1983) haben gezeigt, dass bei optimalen Bedingungen und einer Temperatur von  $20^{\circ}$  bis  $25^{\circ}\text{C}$  nahezu 100% der Sporen nach Inokulation auf der Blattoberfläche keimen. Zwei grundsätzliche Unterschiede in der Versuchsdurchführung könnten für diese Differenz verantwortlich sein. Levy und Cohen haben in ihren Versuchen die Sporen direkt vom Blattmaterial gewonnen. Die in dieser Arbeit vorangegangenen Subkultivierungsschritte und die fehlende Pflanzenpassage können zu einem Fitnessverlust geführt haben und somit ein Grund für die geringere Keimfähigkeit sein. Darüber hinaus wurde die Keimfähigkeit in dieser Arbeit *in vitro* auf V8-Nährmedium bestimmt. Levy und Cohen haben die Werte hingegen unter natürlicheren Bedingungen auf der Oberfläche von Maisblattsegmenten untersucht. Diese artifiziellen Keimbedingungen könnten ein weiterer Grund für die geringere Keimfähigkeit der Konidiosporen in den durchgeführten Versuchen sein. Nach einer Lagerdauer von zehn Wochen bei  $-23^{\circ}\text{C}$  in 25% Glycerin lag die Keimfähigkeit bei 32,3% und nach 100 Wochen noch bei 9,8% (Abb.13). Stichprobenartige Bestimmungen der gewonnenen und zur Einlagerung vorbereiteten Einsporisolate ergaben Sporenkonzentrationen im Bereich von 7 bis  $10 \times 10^4$  Sporen/ml. Obwohl eines der untersuchten Isolate nach 100 Wochen Lagerung lediglich 3,5% keimfähige Sporen aufwies, waren aufgrund der hohen Sporenkonzentration genügend keimfähige Sporen für weitere Schritte in der Suspension vorhanden. Im normalen Ablauf des Rassenscreening war eine Lagerung für maximal 50 Wochen notwendig. Somit war die gewählte Methode eine einfache und praktikable Lösung, um eine größere Anzahl an Isolaten mittelfristig bis zur weiteren Verarbeitung zu lagern.

#### **4.2 Rassencharakterisierung europäischer *E. turcicum* Isolate**

Untersuchungen zum Auftreten von Virulenzen in rassenbildenden Erregerpopulationen stellen die Grundlage für eine effiziente und erfolgreiche Nutzung monogener Resistenzen dar. Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine umfangreiche Virulenzanalyse für die europäische *E. turcicum* Population in den intensiven Maisanbaugebieten. Diese Ergebnisse schaffen zwei konkrete Voraussetzungen für die Nutzung monogener Resistenzen gegen die Turcicum-Blattdürre. Einerseits ermöglichen sie direkte Schlussfolgerungen

über die Wirksamkeit der getesteten Resistenzgene, wodurch die Züchtung in der Lage ist, gezielt auf Veränderungen im Virulenzspektrum reagieren zu können. Andererseits ist es möglich, auf Basis dieser Erkenntnisse regionale Sortenempfehlungen für den praktischen Anbau in Bezug auf die Resistenzeigenschaften gegenüber *E. turcicum* geben zu können.

Die Voraussetzung für die Durchführung von Virulenzanalysen ist die Probenahme im Feld. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Probenahme durch Mitarbeiter der kooperierenden Züchtungsfirmen. Als Schwerpunktregionen der Beprobung kristallisierten sich schnell die intensiven Maisanbaugebiete in Europa heraus (Abb.3). Mit einem Anteil von 62,6% entfällt der überwiegende Teil der beprobten Standorte auf die vier Regionen Niederlande/Belgien, Süddeutschland/Österreich, Südwestfrankreich und die Oberrheinregion. Insbesondere die Regionen Südwestfrankreich und die Oberrheinregion sind durch traditionellen langjährigen Maisanbau gekennzeichnet (Borchardt et al., 1998b; Eder et al., 2015). Darüber hinaus sind die Regionen Österreich (Steiermark)/Ungarn und Norditalien ebenfalls nach jahrzehntelangem Maisanbau als intensive Maisanbauregionen bekannt (Eder et al., 2015). Dennoch entfallen insgesamt lediglich 7,8% der Standorte auf diese Regionen. Die Ursache für diese Verschiebung der Standortanteile ist durch die unterschiedlich intensiven Aktivitäten der beteiligten Züchter in den jeweiligen Regionen zu erklären.

Neben der Anzahl der Standorte in den Regionen stellen die Genotypen der Fangpflanzen eine ebenso wichtige Voraussetzung für die Erstellung einer repräsentativen Isolat-Sammlung dar. Um eine Vorselektion auf bestimmte Virulenzen auszuschließen, sollte es vermieden werden, Isolate von Maisgenotypen mit *Ht*-Resistenzgenen zu sammeln. Dieser Zusammenhang wurde im Vorfeld der Probenahme mit den Projektbeteiligten diskutiert. Auf Basis von Informationen zum Genotyp der Fangpflanze im Rahmen des Probenversands kann für den überwiegenden Teil der Fangpflanzen eine selektive Eigenschaft ausgeschlossen werden. Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit Proben berücksichtigt, die von Blattmaterial kommerzieller Sorten gewonnen wurden. Über die Ausstattung dieser Maissorten mit *Ht*-Resistenzgenen stehen allerdings keine Informationen zur Verfügung. Deshalb kann es nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass es in wenigen Einzelfällen zu einer Vorselektion von Virulenzen gekommen ist. Um für zukünftige Virulenzanalysen eine gleichmäßigere Anzahl der Probenahmestandorte zwischen und eine möglichst einheitliche Verteilung innerhalb der Regionen zu erreichen, wäre ein systematisch räumlich geplanter Anbau anfälliger Genotypen sinnvoll. Durch den Anbau nicht selektiv wirkender anfälliger Fang-Genotypen könnte eine unerwünschte Vorselektion vollständig ausgeschlossen werden.

Von den insgesamt 559 untersuchten *E. turcicum* Isolaten stammte jeweils rund die Hälfte aus den Jahren 2011 bzw. 2012. Für Regionen mit einer insgesamt geringeren Zahl an

Isolaten war dieses Verhältnis deutlich verschoben. Die untersuchten Isolate aus der Region Bretagne/Normandie stammten zu 85% aus 2011 und zu 15% aus 2012. Für die Region Tschechien/Polen hingegen ist das Verhältnis mit 16% aus 2011 und 84% aus 2012 nahezu umgekehrt. Eine naheliegende Erklärung dieser Verhältnisverschiebung zwischen den Jahren kann in dem deutlich ausgeprägteren Turcicum-Befall in 2011 gegenüber 2012 gesehen werden (B. Kessel, KWS, pers. Mitteilung, 25.10.2013). Demnach war das Auffinden von befallenen Maispflanzen 2012 in einigen Regionen deutlich erschwert. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede können neu aufgenommene Zuchtstandorte der Kooperationspartner in den entsprechenden Regionen sein. Dadurch könnte die räumliche Veränderung des Einzugsgebiets der Probenahme zwischen den Jahren erklärt werden.

Grundsätzlich ist *E. turcicum* in der Lage, sich unter tropischen Bedingungen durch sexuelle Rekombination und hohe asexuelle Vermehrungsraten schnell anzupassen und bei entsprechend hohem Selektionsdruck innerhalb weniger Jahre Virulenzen gegenüber monogenen Resistenzen auszubilden (Bergquist & Masias, 1974; Borchardt et al., 1998a). Molekulargenetische Diversitätsuntersuchungen haben allerdings gezeigt, dass *E. turcicum* unter dem gemäßigten Klima in Mitteleuropa bisher vermutlich keinen sexuellen Vermehrungszyklus vollzieht und im Vergleich zu tropischen Bedingungen geringere Vermehrungsraten und damit auch geringere Mutationsraten aufweist (Borchardt et al., 1998b). Diese Faktoren sprechen prinzipiell für ein geringeres Anpassungspotential von *E. turcicum* in Mitteleuropa verglichen mit tropischen Regionen. Somit ist das Anpassungspotential von *E. turcicum* unter europäischen Bedingungen im Vergleich zu anderen rassenbildenden Erregern als deutlich geringer einzuschätzen. Die in Europa verbreiteten Getreidepathogene Gelbrost im Weizen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) und Mehltau in der Gerste (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) sind beispielsweise in der Lage, bei entsprechendem Selektionsdruck bereits nach zwei bis drei Jahren monogene Resistenzen vollständig zu überwinden (Vallavieille-Pope et al., 2012; Wolfe & McDermott, 1994; Hovmøller et al., 2015). Anpassungspotentiale in diesen kurzen Zeiträumen in klimatisch gemäßigten Breiten sind für das Pathosystem Mais - *E. turcicum* bisher nicht belegt.

Vor diesem Hintergrund und den genannten Unterschieden in der Anzahl der Isolate zwischen den Jahren einzelner Regionen erscheint es wenig sinnvoll, im Verlauf der Diskussion Jahreseffekte innerhalb des Erhebungszeitraums von zwei Jahren zu diskutieren. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet, die Ergebnisse zum Rassenaufkommen und zu den Virulenzfrequenzen für die beiden Jahre einzeln darzustellen. Für die Darstellung dynamischer Prozesse in der Entstehung virulenter Rassen von *E. turcicum* in Europa wäre ein längerer Erhebungszeitraum notwendig.

Die Bezeichnung der Rassen von *E. turcicum* erfolgt seit 1989 als Auflistung der Resistenzgene, gegenüber denen das jeweilige Isolat virulent ist. Die Rasse 3N ist beispielsweise virulent gegen *Ht3* und *HtN*. Isolate mit der Rassenbezeichnung 0 sind avirulent gegenüber den getesteten Resistenzgenen. Mit dieser systematischen Rassenbenennung haben Leonard et al. (1989) eine einfache und international einheitliche Nomenklatur etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden vier Resistenzgene untersucht, demnach besteht theoretisch die Möglichkeit,  $2^4 = 16$  verschiedene Rassen bzw. Pathotypen zu beschreiben.

Für die Jahre 2011 und 2012 wurden insgesamt zwölf verschiedene Rassen in der europäischen *E. turcicum* Population beschrieben. Diese Zahl deutet zunächst auf eine hohe Diversität in der Population hin. Auffällig ist allerdings, dass im Mittel der beiden Jahre 96% der Isolate in lediglich vier Rassen eingeteilt werden können, wobei der Gesamtanteil der avirulenten Isolate (Rasse 0) bei 45% lag.

Die mit Abstand höchsten Anteile der Rasse 0 wurden in den nordwestlichen Küstenregionen Bretagne/Normandie und Niederlande/Belgien mit 88% und 76% nachgewiesen. Diese beiden Küstenregionen haben sich seit Anfang der 1970er Jahre zu aktuell sehr intensiven Maisanbauregionen entwickelt (AGPM, 2016; Baufeld, 2004). Eine plausible Erklärung für die hohen Anteile avirulenter Isolate in diesen Regionen könnte ein fehlender Selektionsdruck durch den Anbau von Sorten ohne die untersuchten *Ht*-Resistenzgene sein. Rasse 1 wurde in diesen Regionen bisher nicht nachgewiesen. Das Vorkommen der Rassen 3 und 3N in den beiden Regionen, wenn auch in geringen Anteilen, spricht hingegen grundsätzlich dafür, dass Sorten mit den Resistenzgenen *Ht3* und *HtN* eine gewisse Bedeutung im Anbau haben. Ein Grund für den geringen Anteil der Rassen 3 und 3N könnte auch darin begründet sein, dass der Anbau von Sorten mit den entsprechenden Resistenzgenen erst seit einem kurzen Zeitraum oder in sehr geringem Umfang in diesen Regionen stattfindet. Darüber hinaus sind diese Regionen durch maritimes Seeklima gekennzeichnet, das sich durch milde bis kühle Fröhsommermonate auszeichnet (Schuhmann, 1986). Diese klimatischen Bedingungen tragen vermutlich, im Vergleich zu den wärmeren südlicheren Regionen des Untersuchungsgebietes, bei vorhandenem Selektionsdruck zu einem verringerten Anpassungspotential von *E. turcicum* bei.

Untersuchungen mit Isolaten aus den Jahren 1991 und 1992 aus den Regionen Südwestfrankreich, Österreich (Steiermark) und der Schweiz ergaben einen Anteil der Rasse 0 von 95% (Welz & Geiger, 1995). Legt man den Untersuchungen von Welz & Geiger (1995) vergleichend die entsprechenden Regionen Südwestfrankreich, Österreich (Steiermark)/Ungarn und die Oberrheinregion der vorliegenden Arbeit zu Grunde, so ist der Anteil der Rasse 0 in diesem 20-jährigen Zeitraum von 95% auf 24% zurückgegangen. In den USA wurde ein ähnlicher Rückgang des Anteils der Rasse 0 von 83% auf 49% über einen

20-jährigen Zeitraum von 1974 bis 1994 beobachtet. Im gleichen Zeitraum stieg dort der Anteil der Rasse 1 von 2% auf 36% an (Ferguson & Carson, 2007). Im Norden Chinas dominierten in den Jahren 2000 bis 2002 ebenfalls die Rasse 0 und Rasse 1 mit Anteilen von 41% und 18% (Dong et al., 2008). In Israel (Abadi et al., 1989) und Uganda (Bigirwa et al., 1993) wurde ausschließlich Rasse 0 beschrieben. In Kenia stellte die Rasse 0 ebenfalls den größten Anteil mit 29%, gefolgt von Rasse 2 mit 20% (Muiru et al., 2010).

Sowohl in den USA als auch in China wird der Rückgang der Rasse 0 mit einem einhergehenden Anstieg der Rasse 1 durch die Nutzung des Resistenzgens *Ht1* in kommerziellen Sorten und dem dadurch gestiegenen Selektionsdruck erklärt (Ferguson & Carson, 2007; Dong et al., 2008). Nachdem Welz & Geiger (1995) für die oben genannten europäischen Regionen fast ausschließlich Rasse 0 beschrieben hatten, gaben sie Mitte der 1990er Jahre zu Recht die Empfehlung, dass die Verwendung von *Ht1* in europäischen Maissorten zumindest kurzfristigen Schutz vor der Turicum-Blattdürre bieten würde. Die seit Anfang der 1990er Jahre deutlich angestiegenen Anteile der Rasse 1, von 0% auf aktuell 44%, deuten stark darauf hin, dass europäische Maiszüchter dieser Empfehlung gefolgt sind. Über die tatsächliche Ausstattung aktueller europäischer Maissorten mit *Ht*-Resistenzgenen sind allerdings keine Informationen öffentlich verfügbar.

Hohe Anteile der Rasse 1 wurden vor allem in den wärmeren, südlicher gelegenen Regionen beschrieben. Hier sind insbesondere die Regionen Österreich (Steiermark)/Ungarn mit 63%, Zentralfrankreich mit 50% und die Oberrheinregion mit einem Anteil von 47% der Rasse 1 zu nennen. Von diesen Regionen sind die Steiermark und die Oberrheinregion durch traditionell intensiven Maisanbau mit aktuell regionalen Maisanteilen von über 50% der Ackerfläche geprägt (Eder et al., 2015; WIFO, 2015). Die hohen Anteile der Rasse 1 sprechen sehr für eine bereits langjährige Nutzung von Sorten mit dem Resistenzgen *Ht1*. Da die jährlichen Wärmesummen aufgrund der klimatischen Gegebenheiten in den drei Regionen zum Teil den Ansprüchen der in den USA angebauten Sorten entsprechen (Schmidt, 2003), liegt die Vermutung nahe, dass nordamerikanisches Sortenmaterial für die Einkreuzung von *Ht1* in europäische Sorten genutzt wurde. Diese Vorgehensweise ist ebenfalls für klimatisch ähnliche Regionen, wie Nordchina (Welz & Geiger, 2000) und Serbien (Levic et al., 2007) beschrieben. Erwartungsgemäß ist in diesen Regionen daraufhin der Anteil der Rasse 1 durch den erzeugten Selektionsdruck deutlich angestiegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Europa erstmals die Rasse 3 nachgewiesen. Die höchsten Anteile dieses Pathotyps verzeichnen die Regionen Norditalien mit 45% und Norddeutschland mit 34%. Diese Anteile liegen im weltweiten Vergleich auffallend hoch. In Kenia wurde ein Anteil von 10% beschrieben (Muiru et al., 2010), wohingegen die Anteile in Nord-

China mit 3,9% (Dong et al., 2008) deutlich geringer ausfielen. Im Rahmen von Virulenzuntersuchungen an Isolaten, die Mitte der 1990er Jahre gesammelt wurden, konnte die Rasse 3 weder in Kenia, China noch Europa nachgewiesen werden (Welz, 1998). Ferguson & Carson (2007) konnten in ihren Untersuchungen für die USA in einer Sammlung von 242 Isolaten lediglich ein Isolat der Rasse 3 zuordnen. Unter den virulenten Isolaten in Norditalien wiesen alle mindestens eine Virulenz für *Ht3* auf. Die Rasse 1 wurde in dieser Region nicht nachgewiesen. Die Situation in Norditalien deutet also stark darauf hin, dass dort seit mehreren Jahren flächendeckend Sorten angebaut wurden, die neben *Ht3* keine der weiteren der untersuchten *Ht*-Resistenzgene trugen oder nur in sehr geringem Umfang. Für diese Schlussfolgerung sprechen der geringe Anteil weiterer virulenter Rassen und darüber hinaus der sehr geringe Anteil komplexer Rassen. Komplexe Rassen erreichen vor allem dann hohe Anteile in einer Pathogenpopulation, wenn über einen längeren Zeitraum gleichzeitig ein Selektionsdruck durch mehrere Resistenzgene besteht, insbesondere dann, wenn diese Resistenzgene in flächenmäßig stark angebauten Genotypen pyramidiert genutzt wurden. Aufgrund der Dominanz von Isolaten mit der alleinigen Virulenz für *Ht3* scheint dies für die Region Norditalien nicht der Fall zu sein. Ähnliche Schlussfolgerungen können auch für das Resistenzgen *Ht1* in der Region Österreich (Steiermark)/Ungarn getroffen werden. Dort wurden neben der Rasse 1 mit einem Anteil von 63% auch weitere komplexere Rassen beschrieben. Der Anteil der komplexeren Rassen fiel allerdings vergleichsweise gering aus und lässt dadurch ebenfalls den Schluss zu, dass in dieser Region kein langjähriger flächendeckender Selektionsdruck auf die *E. turcicum* Population durch die parallele Verwendung mehrerer *Ht*-Resistenzgene bestand.

Die Rasse 3N wurde in dieser Arbeit ebenfalls erstmals und zugleich flächendeckend mit Ausnahme der Region Österreich/Ungarn in Europa nachgewiesen. Den höchsten Anteil erreicht die Rasse 3N in Südwestfrankreich mit 38% und stellt damit in der Region vor der Rasse 0 die dominierende Rasse dar. Südwestfrankreich ist durch hohe Temperaturen und langjährigen, intensiven mit zum Teil unter Beregnung stattfindendem Maisanbau gekennzeichnet (Meissle et al., 2010). Der hohe Anteil der Rasse 3N legt die Vermutung nahe, dass in dieser Region seit mehreren Jahren ein relativ hoher Selektionsdruck durch die Verwendung der Resistenzgene *Ht3* und *HtN* in den dort angebauten Sorten besteht. Aufgrund des relativ geringen Anteils der Rasse 3 von 7% liegt es darüber hinaus nahe, dass die angebauten Maisgenotypen häufig beide Resistenzgene gleichzeitig tragen. Nur in diesem Fall bewirkt eine kombinierte Virulenz gegenüber *Ht3* und *HtN* einen Fitnessvorteil für Isolate der Rasse 3N und lässt dessen Frequenz in der Population signifikant ansteigen. Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Rasse 3N in den Regionen Norddeutschland,

Niederlande/Belgien, Süddeutschland/Österreich, Tschechien/Polen und der Oberrheinregion mit Anteilen zwischen 10% und 16% ist es wahrscheinlich, dass auch in diesen Regionen zumindest zu einem gewissen Anteil die angebauten Sorten mit den Resistenzgenen *HtN* und/oder *Ht3* ausgestattet sind.

Die Kombination der Virulenzen für *Ht3* und *HtN*, als Rasse 3N, stellt in der vorliegenden Arbeit keine Besonderheit dar. Insgesamt treten 95% der Virulenzen für *HtN* in Kombination mit *Ht3* auf. Lediglich in der Region Österreich/Ungarn konnte eine Virulenz gegenüber *HtN* unabhängig von *Ht3* in einem Isolat der Rasse 1N nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen zunächst eine enge Kopplung der Virulenzen für *HtN* und *Ht3* vermuten. In Kreuzungsversuchen zwischen *E. turcicum* Isolaten der Rassen 0 und 23N mit anschließender Bestimmung der Aufspaltungsverhältnisse der Virulenzen konnten Welz & Geiger (1995) zeigen, dass die Virulenzen für *HtN* und *Ht3* unabhängig voneinander vererbt werden. Für eine unabhängige Vererbung sprechen ebenfalls Ergebnisse zu Untersuchungen des Rassenspektrums aus China und Kenia, in denen lediglich 28% und 38% der *HtN* Virulenzen in Kombination mit einer Virulenz für *Ht3* auftraten (Dong et al., 2008; Welz & Geiger, 1995). Im Rahmen von Untersuchungen zum Rassenaufreten aus den USA wurden Virulenzen gegen *HtN* hingegen ausschließlich in Kombination mit *Ht3* nachgewiesen (Ferguson & Carson, 2007).

Der insgesamt hohe und in den nordwestlichen Küstenregionen sehr hohe Anteil der Rasse 0 deutet darauf hin, dass nach wie vor ein großer Anteil der im Anbau befindlichen Sorten keines der untersuchten *Ht*-Resistenzgene trägt. Über die Hintergründe der Entstehung der komplexeren Rassen 123 und 13N bzw. der Rassen mit sehr geringen Anteilen, wie 2, 23, 12 und 1N kann aufgrund der fehlenden Informationen zur Resistenzgenausstattung der angebauten Sorten nur spekuliert werden. Grundsätzlich sind nennenswerte Anteile von virulenten Isolaten in Pathogenpopulation erst nach entsprechendem Selektionsdruck und darauf folgenden koevolutionären Anpassungen in der Pathogenpopulation zu erwarten (Wolfe & McDermott, 1994). Dennoch ist es möglich, dass bereits vor dem Aufbau eines Selektionsdrucks durch die Verwendung von Resistenzgenen, virulente Pathotypen gegen eben diese Resistenzgene in sehr geringer Frequenz in der Population vorhanden sind. So wurden zum Beispiel die Rassen 23 und 23N in den USA erstmals für Isolate beschrieben, die 1957 gesammelt wurden. Darüber hinaus erreichte die Rasse 23N in den Jahren 1974 bis 1977 in den USA einen Anteil von 14% (Ferguson & Carson, 2007). Dies ist bemerkenswert, denn die Resistenzgene *Ht2* (Hooker, 1977), *Ht3* (Hooker, 1981) und *HtN* (Gevers, 1975) wurden alle erst Ende der 1970er Jahre entdeckt und systematisch beschrieben. Bis Ende der 1980er Jahre beschränkte sich die Nutzung der drei Resistenz-

gene in den USA auf Experimentalhybriden auf sehr begrenzter Fläche in Zuchtgärten (Leonard et al., 1989). Diese Beispiele verdeutlichen, dass es nicht nur möglich ist, sondern dass man grundsätzlich davon ausgehen muss, Virulenzen für die untersuchten *Ht*-Resistenzgene auch ohne vorhandenen Selektionsdruck in der *E. turcicum* Population zu finden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass vor allem Virulenzen für *Ht2* und *HtN* in Rassen vorkommen, die vielfach einen sehr geringen Anteil in der Population abbilden. Dazu zählen sowohl hochkomplexe Rassen, wie 123 und 13N, aber auch weniger komplexe Rassen, wie 2, 23, 12 oder 1N. Aufgrund der bereits vorhandenen Virulenzen in der *E. turcicum* Population würde die flächendeckende Nutzung der Resistenzgene *Ht2* und *HtN* in den untersuchten Regionen wahrscheinlich zu einem schnellen Anstieg der entsprechenden Virulenzen führen.

Ein weiterer Grund für die geringen Anteile von Pathotypen mit kombinierten Virulenzen kann in dem bekannten Phänomen des Fitnessverlustes durch das Tragen mehrerer kombinierter Virulenzen begründet liegen (Agrios, 2008). Die Anteile der genannten Rassen fallen trotz offensichtlich vorhandenem Selektionsdruck für wenigstens eine der Virulenzen in den jeweiligen Pathotypen sehr gering aus. In der vorliegenden Arbeit trifft dies auf die Rassen 123 und 1N in der Region Österreich/Ungarn und auf die Rasse 13N in der Oberrheinregion zu. Anhand von Aggressivitätsbestimmungen an hochanfälligen Maisinzuchtlinien gegenüber *E. turcicum* konnte Brandt (2014) eine negative Korrelation zwischen Virulenz und Aggressivität aufzeigen. Als Teil der Fitness eines Isolates lag die Fähigkeit, Blattgewebe zu besiedeln, bei avirulenten Isolaten höher als bei virulenten. Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung für den sehr geringen Anteil der Rasse 13N in der Oberrheinregion sein. Aufgrund der hohen Anteile der Rassen 1, 3 und 3N ist ein vorhandener Selektionsdruck vor allem durch die Resistenzgene *Ht1* und *Ht3* sehr wahrscheinlich. Dennoch liegt der Anteil der Isolate, die alle Virulenzen kombiniert tragen, bei gerade einmal 1,3%. Die kombinierte Virulenz gegen drei *Ht*-Gene in der Rasse 13N bewirkt in diesem Fall möglicherweise einen Fitnessverlust, wodurch der Anteil der Rasse in der Region auf einem geringen Niveau verbleibt. Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringen Anteile der komplexen Rassen kann darin gesehen werden, dass die Virulenzen bzw. Virulenzkombinationen erst seit einem kurzen Zeitraum in den jeweiligen Regionen auftreten und sich aufgrund des Zeitfaktors noch keine höheren Anteile etablieren konnten. Als grundsätzliche Voraussetzung für das Auftreten hochkomplexer Rassen mit hohen Anteilen ist der flächendeckende Anbau von Maissorten mit einer möglichst breiten Ausstattung an Resistenzgenen in einem Genotyp zu sehen. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist diese Bedingung in den untersuchten Regionen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit nicht erfüllt.

Im Folgenden sollen weniger einzelne Rassen als vielmehr die Rassendiversität innerhalb und zwischen den untersuchten Regionen im Mittelpunkt stehen. Die Vorgehensweise der Probensammlung und die daraus resultierende Sammlung an *E. turcicum* Isolatens als Grundlage der vorliegenden Arbeit wurden bereits diskutiert. Insbesondere die stark variierende Anzahl an Isolatens zwischen den Regionen stellt einen Nachteil für die vergleichende Bewertung der regionalen Diversitäten dar. Aufgrund der hohen Anzahl an Isolatens ermöglichen die vorliegenden Daten dennoch eine solide vergleichende Aussage zu den regionalen Rassendiversitäten von *E. turcicum*. Die Entwicklung der genetischen Diversität von Pathogenpopulationen wird durch mehrere Faktoren beeinflusst und stellt in jedem Fall einen Blick in die Vergangenheit der jeweiligen Population dar. Der bedeutendste Faktor, der zur Veränderung der Diversität beiträgt, ist die Selektion. Der Anteil einer in der Pathogenpopulation vorkommenden Virulenz wird sich nur dann erhöhen, wenn das korrespondierende Resistenzgen in den angebauten Sorten verwendet wird. Der Selektionsdruck wirkt umso stärker, je größer die Fläche und je länger der Zeitraum ist, in dem das Resistenzgen verwendet wird. In Folge dessen kommt es zu einem Anstieg der Virulenz in der Population und das Resistenzgen wird unwirksam (McDonald & Linde, 2002). Die drei wichtigsten Faktoren, die auf der Pathogenseite für ein Auftreten von Virulenzen sorgen, sind Mutation, Rekombination und Migration. Es wurde bereits erläutert, dass Rekombination bei *E. turcicum* unter mitteleuropäischen Bedingungen als sehr unwahrscheinlich zu erachten ist (Borchardt et al., 1998b). Darüber hinaus sprechen die sehr geringen Anteile von hochkomplexen Rassen grundsätzlich ebenfalls gegen das Vorkommen von sexueller Rekombination von *E. turcicum* in Europa. Durch Rekombination wird die Wahrscheinlichkeit, dass Virulenzen in einem Pathotyp kombiniert bzw. pyramidiert vorkommen, deutlich erhöht. (Andrivoon & Vallavieille-Pope, 1995; Miedaner, 2011). In vorwiegend klonalen Erregerpopulationen, wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *E. turcicum* Population, dominieren hingegen wenige Pathotypen mit einer geringen Virulenzkomplexität. Vergleicht man die Rassespektren aller zehn Regionen miteinander, so fällt auf, dass mit Ausnahme der Regionen Österreich/Ungarn und Norditalien die Unterschiede fast ausschließlich auf der unterschiedlichen Verteilung der vier dominierenden Rassen 0, 1, 3 und 3N beruhen. Dieser Sachverhalt spricht wiederum für eine klonale Vermehrung innerhalb der regionalen Populationen und darüber hinaus für eine stattfindende Migration von Pathotypen zwischen den Regionen. Eine Migration von *E. turcicum* Pathotypen in Form von Sporenflug über größere Distanzen wurde bereits in den USA nachgewiesen (Ferguson & Carson, 2004)). Für Europa konnten Borchardt et al. (1998b) die Alpen als natürliche Barriere für die Migration von *E. turcicum* in Nord-Süd Richtung beschreiben. Für die zwei Regionen Norditalien und Österreich/Ungarn, die durch die Alpen nach Norden von allen anderen Regionen abgegrenzt sind, zeigen sich im Vergleich zu den Regionen nördlich der Alpen deutliche Unterschiede

im Rassenspektrum. Die Region Österreich/Ungarn grenzt sich vor allem durch den höchsten Anteil der Rasse 1 und gleichzeitig einen sehr geringen Anteil der Rasse 3 bzw. der nicht vorhandenen Rasse 3N von den Regionen nördlich der Alpen ab. In Norditalien konnte zum Beispiel die Rasse 1 gar nicht, dafür aber die Rasse 3 mit dem höchsten Anteil aller Regionen nachgewiesen werden. Die durch Borchardt et al. (1998b) aufgestellte Hypothese der Trennung der europäischen *E. turcicum* Populationen durch die Alpen wird demnach durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Offensichtlich stellen nicht nur die Alpen eine Migrationsbarriere für *E. turcicum* dar, denn auch die nordwestlichen Küstenregionen Bretagne/Normandie und Niederlande/Belgien grenzen sich durch ihr Rassenmuster relativ klar von den südlicheren Regionen ab. Beide Regionen weisen die mit Abstand höchsten Anteile für die Rasse 0 auf und darüber hinaus wurde in keiner der Regionen die Rasse 1 identifiziert. Dieses Rassenmuster stellt ein Alleinstellungsmerkmal dieser beiden Regionen dar. Als Barriere für die Migration ist in diesem Fall die große räumliche Distanz zu den südlicheren Regionen zu sehen. Eine weitere Erklärung dafür, dass Isolate der Rasse 1 in den beiden Regionen nicht gefunden wurden, kann ebenfalls ein fehlender Selektionsdruck durch *Ht1* in den dort angebauten frühreifen Sortentypen sein. Vor dem Hintergrund des fehlenden Auftretens der Rasse 1 bei einem Umfang von 141 untersuchten Isolaten in den beiden Regionen erscheint eine Migration über Sporenflug beispielsweise aus der Oberrheinregion in diese Regionen als sehr unwahrscheinlich.

Eine bedeutende Quelle für Variation innerhalb einer Pathogenpopulation stellt die Mutation dar. Kommt es in einem Avirulenzgen zu einer Defektmutation, so ist die Synthese des mit dem Resistenzgen korrespondierenden Effektors unterbunden und das betreffende Isolat wird virulent. Die Wirtspflanze ist dann nicht mehr in der Lage, den Erreger zu erkennen und abzuwehren. Mutationen in Pathogenpopulationen treten allerdings sehr selten auf. Je größer eine Population ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Mutation (Wolfe & McDermott, 1994). Bezogen auf die *E. turcicum* Populationen sind hohe Vermehrungsraten mit folglich extrem hohen Anzahlen vitaler Sporen mit steigenden absoluten Anzahlen an Mutationen verbunden. Hohe Vermehrungsraten bei *E. turcicum* treten vor allem bei starkem Befall in den wärmeren südlicheren Maisanbaugebieten auf, da diese Regionen durch optimale Bedingungen für *E. turcicum* gekennzeichnet sind. In Europa treffen diese Bedingungen insbesondere für die Regionen Südwestfrankreich, Oberrheinregion, Süddeutschland/Österreich, Österreich/Ungarn und Norditalien zu (Meissle et al., 2010) Im Folgenden werden die genannten Regionen deshalb als Regionen mit hohem Turcicum-Risiko bezeichnet. Optimale klimatische Bedingungen in Kombination mit anfälligen Wirtspflanzen führen generell zu einer erhöhten Diversität in der jeweiligen Pathogenpopulation.

Ein Selektionsdruck, hervorgerufen durch Resistenzgene hingegen, hat generell eine Reduktion der Rassendiversität zur Folge (Miedaner, 2011). Vor diesem Hintergrund wird in den Regionen mit hohem Turcicum-Risiko tendenziell eine höhere Diversität an virulenten Rassen erwartet. Unter Betrachtung des rel. Gleason Index ( $H_{GR}$ ) und des rel. Shannon Index ( $H_{SR}$ ) als Maß für die Rassendiversität weisen die Regionen Norditalien und Österreich/Ungarn für beide Indizes die höchsten Werte ( $H_{GR} > 0,21$ ;  $H_{SR} > 0,39$ ) auf, während die beiden nördlichen Küstenregionen Bretagne/Normandie und Niederlande/Belgien für beide Indizes sehr geringe Werte zeigen. Dieser Sachverhalt kann lediglich ein Hinweis darauf sein, dass in den Regionen Norditalien und Österreich/Ungarn häufiger Mutationen auftreten als in den anderen Regionen. Die geringe Rassendiversität in den nördlichen Regionen ist vermutlich nicht das Ergebnis einer angepassten Population an einen vorhandenen Selektionsdruck. Dies zeigt sich anhand der kumulierten Anteile der zwei häufigsten Rassen. Die Regionen Tschechien/Polen, Bretagne/Normandie und Niederlande/Belgien weisen für diesen Parameter Werte von 84% bis 94% auf. Der weitaus größte Teil dieses kumulierten Wertes wird durch die Rasse 0, also durch avirulente Isolate, abgedeckt. Der hohe Anteil der Rasse 0 kann kein Ergebnis einer Anpassung an einen Selektionsdruck sein. Ganz im Gegenteil müssen diese hohen Anteile der Rasse 0 als Hinweis auf einen fehlenden Selektionsdruck und darüber hinaus für eine klonale Vermehrung innerhalb der Population gedeutet werden.

Unter den fünf Regionen mit den geringsten Anteilen der zwei häufigsten Rassen befinden sich vier Regionen mit hohem Turcicum-Risiko. Darüber hinaus weist der Shannon-Diversitäts-Index für diese Regionen die höchsten Werte auf (Abb. 15). Es konnte generell eine signifikant ( $p \leq 0,001$ ) negative Korrelation für den Shannon-Index und dem kumulierten Anteil der zwei häufigsten Rassen festgestellt werden. Der gemeinsame Anteil der zwei häufigsten Rassen in einer Region kann demnach als einfacher Indikator zur Einschätzung der regionalen Rassendiversität herangezogen werden. Die höheren Werte der Rassendiversität in den Turcicum-Risikoregionen waren zu erwarten. Denn in diesen Regionen ist *E. turcicum* schon seit Mitte der 1990er Jahre etabliert (Borchardt et al., 1998b) und war in den folgenden Jahren bei einer ausgedehnt vorhandenen Wirtspopulation in Form von intensivem Maisanbau unter optimalen Wachstumsbedingungen keinem Selektionsdruck ausgesetzt. Ein nennenswerter Selektionsdruck durch die Verwendung von *Ht*-Resistenzgenen in europäischen Maiszuchtprogrammen setzte vermutlich frühestens in den 2000er Jahren ein, nachdem Welz & Geiger (1995) die Verwendung von *Ht*-Resistenzgenen für die Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre empfahlen. Bis zum Einsetzen des Selektionsdrucks als reduzierender Faktor für die Rassendiversität konnten sich die Populationen also durch

unbeeinflusste Mutationen und Migration vorwiegend durch klonale Vermehrung frei entwickeln. Wenn sich eine *E. turcicum* Population über mehrere Jahre auf anfälligen Genotypen unter günstigen klimatischen Bedingungen entwickeln kann, besteht auch bei überwiegend klonaler Vermehrung die Möglichkeit die Diversität innerhalb der Population signifikant zu erhöhen (Borchardt et al., 1998b); (Ferguson & Carson, 2004; Borchardt et al., 1998b). Diese Gegebenheiten sind für die südeuropäischen Maisanbauregionen zutreffend. Die Bedeutung des genetischen Austausches zwischen den Regionen durch Migration als Beitrag zur Steigerung der Diversität ist zwischen den Regionen nördlich der Alpen sehr wahrscheinlich. Dies legen Untersuchungen zur genetischen Verwandtschaft europäischer *E. turcicum* Isolate durch Borchardt et al. (1998b) nahe. Darüber hinaus wird diese Aussage durch die sehr ähnlichen Rassenspektren zwischen den Regionen nördlich der Alpen untermauert.

Die Virulenzkomplexität beschreibt die Anzahl der Virulenzen, die in einem Isolat vereint sind. Um Isolate mit mehreren Virulenzen hervorzubringen, ist entweder der eher unwahrscheinliche Fall einer Defektmutation mehrerer Avirulenzgene in ein und demselben Isolat notwendig oder die Virulenzgene müssen über Rekombination zwischen den Isolaten ausgetauscht und so kombiniert werden (Andrison & Vallavieille-Pope, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnten Isolate mit bis zu drei kombinierten Virulenzen beschrieben werden. Allerdings liegt der Anteil der Isolate mit drei Virulenzen insgesamt bei lediglich 0,7%. Im weltweiten Vergleich fallen die Anteile hochkomplexer Rassen in der europäischen *E. turcicum* Population vergleichsweise gering aus. Für die Regionen China und Mexiko lagen die Anteile von Isolaten mit drei kombinierten Virulenzen in den 1990er Jahren bei 22% und 36%. In Kenia hingegen lediglich bei 4% (Welz, 1998). Umfangreiche Untersuchungen an Isolaten, die über zwei Jahrzehnte insbesondere im Osten der USA ab 1975 gesammelt wurden, weisen im Mittel einen Anteil von 12% hochkomplexer Rassen auf. Für einzelne Regionen erreichen die Werte bis zu 31% (Ferguson & Carson, 2004). Aktuellere Untersuchungen aus China mit Isolaten aus den Jahren 2000 bis 2002 ergaben Werte von 8% hochkomplexer Rassen, wobei hier ebenfalls die Rasse 123N mit vier Virulenzen enthalten ist (Dong et al., 2008). In Europa weist die Region Österreich/Ungarn mit 8,3% den höchsten Anteil einer hochkomplexen Rasse mit drei Virulenzen auf. In den Regionen Süddeutschland/Österreich und der Oberrheinregion konnten ebenfalls Isolate mit Kombinationen von drei Virulenzen nachgewiesen werden, wobei es sich bei den Funden jeweils um ein einziges Isolat handelt. Die Rasse 123 wurde lediglich in Süddeutschland und in der Region Österreich/Ungarn nachgewiesen. Eine Möglichkeit für die Kombination von Virulenzen in einem Isolat kann der Austausch durch sexuelle Rekombination sein. Diese ist für *E. turcicum* bisher lediglich unter günstigen tropischen Bedingungen nachgewiesen

(Borchardt et al., 1998a; Bunkoed et al., 2014). Da die klimatischen Bedingungen in der Region Österreich/Ungarn für *E. turcicum* als sehr gut beschrieben werden können, kann die Entstehung der Rasse 123 durchaus in dieser Region vermutet werden. Da in beiden Regionen Zuchtstandorte von Maiszuchtfirmen angesiedelt sind, liegt die Vermutung nahe, dass Mitarbeiter insbesondere in der Befallsphase von *E. turcicum* zwischen diesen Regionen pendeln. Dies könnte als ein möglicher Migrationsweg der Rasse 123 aus der Region Österreich/Ungarn über die Alpen-Barriere in die Süddeutsche Region in Betracht gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wiesen 16,6% der untersuchten Isolate eine Kombination von zwei Virulenzen auf. Dieser Anteil wird fast ausschließlich durch die Rasse 3N abgedeckt. Das flächendeckende Auftreten dieser Rasse in allen Regionen, abgesehen von der Region Österreich/Ungarn, lässt die Kombination der Resistenzgene *Hß* und *HtN* als wenig aussichtsreich zur Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre erscheinen.

Es bestand ein signifikanter ( $p \leq 0,01$ ) Zusammenhang zwischen den Merkmalen Virulenzkomplexität und dem Shannon-Diversitätsindex ( $r = 0,807$ ). Da die Werte für diese beiden Indizes zwischen den Regionen sehr stark schwanken, müssen die Ursachen für diese Schwankungen in den unterschiedlichen regionalen Bedingungen für *E. turcicum* vermutet werden. Den höchsten Shannon-Indexwert weist die Region Österreich/Ungarn auf. Darüber hinaus wies die Region mit 8,3% den höchsten Anteil hochkomplexer Rassen auf. Neben der Region Österreich/Ungarn wurden lediglich in Süddeutschland/Österreich und der Oberrheinregion hochkomplexe Rassen mit drei Virulenzen gefunden. Diese drei Regionen sind anders als die nördlicheren Regionen durch ein hohes Turcicum-Risiko gekennzeichnet (Meissle et al., 2010). Die beiden nördlichen Küstenregionen sind durch die geringsten Werte der Virulenzkomplexität und der Rassendiversität charakterisiert. Eine Erklärung für diesen Zusammenhang kann in der möglicherweise stattfindenden Rekombination von *E. turcicum* in den klimatisch günstigen Regionen vermutet werden. Die vorliegenden Daten zeigen mit wenigen Ausnahmen den Trend, dass je südlicher die untersuchte Region in Europa liegt, desto höher die Rassendiversität und Komplexität ist. Die sexuelle Rekombination stellt grundsätzlich einen wichtigen Faktor im Austausch von Virulenzen zwischen Pathotypen dar. Für *E. turcicum* sind bisher lediglich für China anhand zwei voneinander unabhängigen Funden Isolate bekannt, die gleichzeitig vier Virulenzen in einem Pathotyp als Rasse 123N vereinen (Welz, 1998; Dong et al., 2008). Genetische Populationsanalysen für die Region im Süden Chinas haben ergeben, dass sexuelle Rekombination in der *E. turcicum* Population dort sehr wahrscheinlich ist (Borchardt et al., 1998a; Fan et al., 2007). Im Jahr 2014 wurden zudem in einer nahe gelegenen und klimatisch ähnlichen Region in Thailand erstmalig Pseudothezieren von *Setosphaeria turcica*, der teleomorphen

Form von *E. turcicum*, unter natürlichen Feldbedingungen nachgewiesen (Bunkoed et al., 2014).

Der hier aufgezeigte Zusammenhang zwischen der Rassendiversität und Komplexität kann anhand anderer Pathosysteme mit rassenbildenden Erregern insbesondere im Getreide nicht bestätigt werden (Andrivon & Vallavieille-Pope, 1995). Eine Erklärung dafür kann in der verschiedenen Biologie der Erreger vermutet werden. Beispielsweise sind im Vergleich zum Pathosystem Mehltau in der Gerste (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) die Vermehrungsraten bei *E. turcicum* deutlich geringer. Die Sporen legen über Windverbreitung geringere Distanzen zurück und es findet fast ausschließlich asexuelle Vermehrung im Feld statt (McDonald & Linde, 2002; Borchardt et al., 1998b). Darüber hinaus ist eine deutlich geringere Anzahl an monogenen Resistenzen im Mais gegen *E. turcicum* bekannt. All diese Faktoren führen dazu, dass das Potential, hochkomplexe Rassen auszubilden und diese schnell über große Distanzen zu verbreiten, im Vergleich zu den dominierenden rassenbildenden Erregern im Getreide, wie beispielsweise Roste und Mehltau, geringer einzuschätzen ist. Die Kenntnis über das Vorhandensein hochkomplexer Rassen ist vor allem für die Frage wichtig, ob ein Pyramidisieren von Resistenzgenen in Maissorten sinnvoll ist. Aufgrund der Biologie von *E. turcicum* in den untersuchten europäischen Regionen und dem damit einhergehenden geringen Risiko zur Ausbildung hochkomplexer Rassen erscheint ein Pyramidisieren der Resistenzgene in den Sorten empfehlenswert.

Bisher waren die regionalen Rassenspektren und die möglichen Hintergründe zur Entstehung und Verbreitung bestimmter Rassen innerhalb und zwischen den Regionen Gegenstand der Diskussion. Diese Zusammenhänge sind vor allem für das Verständnis der Populations- und Virulenzentwicklung von Bedeutung. Um hingegen eine konkrete Aussage über die Wirksamkeit eines Resistenzgens in einer definierten Region machen zu können, ist weniger die Rassenzusammensetzung oder Komplexität von Bedeutung, sondern viel mehr die Information darüber, welche Virulenz in welcher Häufigkeit in der jeweiligen Region vorkommt. Die Virulenzfrequenz gibt also Auskunft über die Wirksamkeit des jeweiligen Resistenzgens in einer bestimmten Region.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Virulenzfrequenzen deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Regionen als auch zwischen den Resistenzgenen festgestellt. Insgesamt stellte sich *Ht2* als das wirksamste der vier untersuchten Resistenzgene heraus. Über alle Regionen gesehen waren lediglich 2,2% der Isolate virulent gegen *Ht2*. Die höchsten Anteile von *Ht2*-Virulenzen verzeichneten die beiden Regionen südlich der Alpen mit maximal 8,3% in der Region Österreich/Ungarn. Untersuchungen Mitte der 1990er Jahre ergaben Werte von 12% für *Ht2* in den südlichen Maisanbauregionen Europas (Welz, 1998). Aufgrund der aktuell geringen Werte ist es sehr unwahrscheinlich, dass

*Ht2* bis zum Jahr 2012 in europäischen Maissorten enthalten war. Wie bereits durch Welz et al. (1997) und Ferguson & Carson (2007) für die USA beschrieben, ist es möglich, dass die in sehr geringem Umfang in einzelnen Regionen vorkommenden Virulenzfrequenzen für *Ht2* auch ohne vorhandenen Selektionsdruck als natürlich auftretende Anteile in den Populationen zu erklären sind. In anderen Maisanbauregionen der Welt wurden hingegen deutlich höhere Virulenzfrequenzen für *Ht2* beschrieben. So lagen die Werte nach Welz (1998) Mitte der 1990er Jahre in Kenia bei 18%, im nördlichen China bei 35% und in Mexiko bei 55%. Für Anfang der 2000er Jahre lagen die Werte in China bei 19% (Dong et al., 2008). Die hier genannten Regionen sind im Gegensatz zu Europa durch tropisches Klima gekennzeichnet und bieten somit optimale Entwicklungsvoraussetzungen für Virulenzen (Borchardt et al., 1998a; Fan et al., 2007). Vor dem Hintergrund der sehr geringen Virulenzfrequenzen stellt das Resistenzgen *Ht2* unter den vier *Ht*-Resistenzgenen das größte Potential zur Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre in europäischen Sorten dar.

Die im Mittel über alle Regionen höchste Virulenzfrequenz wurde für das Resistenzgen *Ht3* mit 32% gefolgt von *Ht1* mit 24% nachgewiesen. Die regionalen Werte dieser beiden Resistenzgene zeigen im Vergleich zu *Ht2* deutliche Unterschiede. In der Region Österreich/Ungarn ist das Resistenzgen *Ht1* beispielsweise gegen 83% der Isolate unwirksam. In diesem Fall ist *Ht1* in der Region zur Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre wertlos. In den Regionen Zentralfrankreich und der Oberrheinregion ist jedes zweite Isolat virulent gegenüber *Ht1*. Die hohen Werte für diese drei Regionen sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass dort über einen längeren Zeitraum relativ stark Sorten mit dem Resistenzgen *Ht1* angebaut wurden. Mitte der 1990er Jahre konnten für *Ht1* noch keine Virulenzen in Europa nachgewiesen werden (Welz, 1998). Seitdem ist die Virulenzfrequenz für *Ht1* innerhalb von ca. 20 Jahren in der Region Österreich/Ungarn von 0% auf über 80% und in den Regionen Zentralfrankreich und der Oberrheinregion von 0% auf rund 50% angestiegen. Mitte der 1990er Jahre wurden für *Ht1* in Europa, Kenia und Mexiko keine Virulenzen gefunden. Im Norden Chinas und in Teilen der USA hingegen lagen die Virulenzfrequenzen für *Ht1* zu der Zeit bereits bei 80% bis 85% (Moghaddam & Pataky, 1994; Welz, 1998). In den USA wurden seit Ende der 1960er Jahre vermehrt Sorten mit dem Resistenzgen *Ht1* angebaut. Erste Virulenzen traten in den USA 1972 auf und hatten sich bereits 1980 in allen Maisanbaugebieten der USA ausgebreitet (Jordan et al., 1983; Pedersen et al., 1986). Aufgrund der ähnlichen klimatischen Bedingungen wurden Sorten mit dem Resistenzgen *Ht1* aus den USA ebenfalls flächendeckend in China angebaut (Dong et al., 2008). Diese beiden Beispiele zeigen, dass eine intensive flächendeckende Nutzung von *Ht1* den Anstieg von Virulenzfrequenzen für *Ht1* innerhalb eines Zeitraums von zehn Jahren auf über 80% zur

Folge haben kann. Offensichtlich wurde *Ht1* bisher weniger intensiv in frühreifen Sortentypen eingesetzt, die vor allem in den nördlichen Maisanbaugebieten von Bedeutung sind. Denn die Regionen Bretagne/Normandie und Niederlande/Belgien weisen keine Virulenzen für *Ht1* auf. Die Region Norddeutschland weist mit 17% einen ebenfalls vergleichsweise geringen Wert auf. In diesem Fall besteht bei flächendeckender Nutzung von *Ht1* das Risiko, dass durch den Selektionsdruck die Virulenzfrequenzen schnell ansteigen und *Ht1* somit auch hier deutlich an Wirkung verliert. Neben den nördlichen Regionen ist interessanterweise auch die südlich der Alpen gelegene Region Norditalien durch eine sehr geringe Virulenzfrequenz für *Ht1* gekennzeichnet. Norditalien grenzt sich in diesem Punkt stark von der ebenfalls südlich der Alpen gelegenen Region Österreich/Ungarn ab. Aufgrund der Überschneidung der klimatischen Bedingungen in Norditalien mit Teilen der USA (Schmidt, 2003) wäre gerade in dieser Region eine intensive züchterische Nutzung des amerikanischen Sortenmaterials mit *Ht1* zu erwarten gewesen. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse war dies offensichtlich nicht der Fall und somit kann die Verwendung von *Ht1* in dieser Region aktuell als effektive Maßnahme gegen die Turicum-Blattdürre empfohlen werden. Jedoch besteht insbesondere für Norditalien aufgrund der klimatischen Bedingungen eine größere Gefahr des schnellen Anstiegs der Virulenzfrequenzen als in der kühleren Region Norddeutschland.

Im Gegensatz zu *Ht1* ist die Virulenzfrequenz für *Ht3* in Norditalien mit 60% am höchsten, gefolgt von Norddeutschland mit 51%. Die Regionen Bretagne/Normandie (12%) und Tschechien/Polen (16%) weisen die geringsten Werte für *Ht3* auf. Abgesehen von diesen beiden Regionen liegt die Virulenzfrequenz für *Ht3* in allen anderen Regionen bei 20% oder höher. Diese Werte unterstützen die Hypothese, dass in Europa der Anbau von Sorten mit dem Resistenzgen *Ht3* stattfindet, wenn auch nicht flächendeckend. Ein flächendeckender Anbau von Sorten mit *Ht3* ist vor allem für die Regionen Norditalien sehr wahrscheinlich. In dieser Region zeigt *Ht3* deutliche Wirksamkeitsverluste. Mitte der 1990er Jahre lag die Virulenzfrequenz für *Ht3* in den südlich gelegenen Anbaugebieten Europas bereits bei 11% (Welz, 1998). Da es nicht dokumentiert ist, ob *Ht3* zu dieser Zeit bereits flächendeckend im europäischen Sortenmaterial vorhanden war, kann der Wert von 11% als natürlich vorkommender Anteil der Virulenz in der Population zu bewerten sein. Über die Frage, ob diese durch Mutation oder Migration entstanden ist, kann aktuell lediglich spekuliert werden. Anteile von 11% einer Virulenz in einer Population ohne korrespondierenden Selektionsdruck setzen voraus, dass die Virulenz nicht mit einem Fitnessverlust des jeweiligen Isolates verbunden ist, denn in dem Fall würden die Anteile der Isolate mit geringerer Fitness schnell und deutlich sinken (Agrios, 2008). In den USA wurde erstmals 1979 eine Virulenz für *Ht3* nachgewiesen (Smith & Kinsey, 1980), obgleich in den USA zu diesem Zeitpunkt laut Welz et

al. (1997) noch keine Sorten mit *Ht3* angebaut wurden. Anfang der 1990er Jahre betrug der Anteil virulenter Isolate für *Ht3* 15% (Ferguson & Carson, 2007). Es wird für die USA vermutet, dass die Virulenz für *Ht3* aus Mexiko in die USA migriert ist (Welz et al., 1997). Die Virulenzfrequenz für *Ht3* lag Mitte der 1990er Jahre in Mexiko bei 47% (Welz, 1998). Aufgrund des in den europäischen Maisanbauregionen flächendeckenden Auftretens von Virulenzen für *Ht3* erscheint die züchterische Nutzung dieses Resistenzgens für die untersuchten Regionen als wenig erfolversprechend.

Für *HtN* wurden wie für *Ht3* in jeder der untersuchten Regionen Virulenzen gefunden, wobei die Werte auch zwischen den Regionen deutliche Unterschiede aufweisen. Insgesamt lag die Virulenzfrequenz im Mittel über alle Regionen für *HtN* bei 14,6%. Würde man die Region Südwestfrankreich mit dem höchsten Wert von 38,2% aus der Betrachtung herausnehmen, läge der Mittelwert der restlichen Regionen bei 9,7% und damit auf einem relativ geringen Niveau. Der hohe Wert für Südwestfrankreich ist ein Alleinstellungsmerkmal unter den europäischen Regionen und kann als Beleg für eine langjährige und flächendeckende Nutzung von *HtN* in den dort angebauten Sorten gesehen werden. Untersuchungen Anfang der 1990er Jahre konnten keine Virulenz für *HtN* in Europa feststellen (Welz, 1998). Ebenso wie für das Resistenzgen *Ht1* beschrieben, muss es im Zeitraum zwischen 1990 und 2010 zu einer verbreiteten Nutzung von *HtN* in europäischen Sorten gekommen sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen Schwerpunkt dieser Nutzung in Südwestfrankreich hin. In anderen Maisanbauregionen der Welt lagen die Virulenzfrequenzen für *HtN* bereits in den 1990er Jahren ähnlich hoch oder zum Teil noch deutlich höher als in Südwestfrankreich. Dazu zählen zum Beispiel Regionen wie Nord-China mit 41,7%, Mexiko mit 55,5% und Kenia mit 28,2%. In den USA hingegen wurden Anfang der 1990er Jahre Virulenzfrequenzen für *HtN* von 12% festgestellt (Welz, 1998; Ferguson & Carson, 2007). Abgesehen von den sehr hohen Werten aus den eher tropischen Regionen liegt der Wert in den USA aus den 1990er Jahren auf demselben Niveau wie der aktuell festgestellte Wert für die europäischen Regionen. Der älteste Nachweis einer Virulenz für *HtN* in den USA erfolgte an einem Isolat aus dem Jahr 1957. Im Rahmen von Virulenzuntersuchungen wurde an Isolaten Anfang der 1970er Jahre bereits eine Virulenzfrequenz von 14% für *HtN* beschrieben (Ferguson & Carson, 2007). Da zu der Zeit das Resistenzgen *HtN* noch nicht beschrieben war (Gevers, 1975), müssen andere Faktoren als ein vorhandener Selektionsdruck zu diesen relativ hohen Anteilen geführt haben. Ebenso wie für *Ht3* liegt hier die Vermutung nahe, dass Virulenzen für *HtN* aus Mexiko in die USA migriert sind und ohne Fitnessverlust über einen langen Zeitraum in der Population bestehen konnten. Vor dem Hintergrund des Anstiegs der Virulenzfrequenz für *HtN* in Europa von 0% auf aktuell 14,6% innerhalb eines Zeitraums von 20 Jahren bleibt die Herkunft bzw. Entstehung der Virulenz

ungeklärt. Dieser Frage könnte mit Hilfe von molekulargenetischen Verwandtschaftsanalysen der europäischen *E. turcicum* Population nachgegangen werden. Abgesehen von der Region Südwestfrankreich kann *HtN* in Regionen mit geringen Virulenzfrequenzen unter 10% mittelfristig durchaus einen Schutz vor der Turcicum-Blattdürre bieten. Dennoch muss auch hier aufgrund der flächendeckend vorhandenen Virulenzen mit einem schnellen Anstieg der Virulenzfrequenzen bei entsprechendem Selektionsdruck gerechnet werden.

Die in dieser Arbeit in Gewächshausversuchen gewonnenen Ergebnisse zur Virulenzverteilung gegenüber *Ht*-Resistenzgenen innerhalb Europas wurden durch den regionalen Anbau von Differentialsortimenten im Feld überprüft. Für *Ht1* werden die Ergebnisse anhand der im Feld angebauten Linien durch hohe Befallswerte in den Regionen Österreich/Ungarn und der Oberrheinregion bestätigt. Darüber hinaus zeigten die *Ht1*-Linien in den nördlichen Regionen die geringsten Befallswerte. Für *HtN* wurden die Ergebnisse der Gewächshausversuche ebenfalls durch die höchsten Befallswerte in der Region Südwestfrankreich auf den *HtN*-Linien bestätigt. Die Ergebnisse für die *Ht2*- und *Ht3*-Linien fielen hingegen uneinheitlicher aus. Die *Ht2*-Linien wiesen generell einen relativ geringen Befall auf, allerdings wurden insbesondere in der Region Norddeutschland und in Südwestfrankreich höhere Befallswerte bonitiert. Es wurde berichtet, dass für *Ht2*-Linien vor allem in den nördlichen Küstenregionen häufig höhere Befallswerte festgestellt wurden, als es die Ergebnisse aus den Gewächshausversuchen vermuten ließen (Kessel B, pers. Mitteilung). Ähnliche Beobachtungen zu unterschiedlichen Virulenzeigenschaften von Isolaten gegenüber *Ht2* und *Ht3* zwischen Gewächshausversuchen und Feldversuchen sind dokumentiert (Leath et al., 1990; Moghaddam & Pataky, 1994). Um diesen Sachverhalt genauer zu betrachten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit spezielle Versuche bezüglich des Temperatureinflusses auf die Wirksamkeit der Resistenzgene durchgeführt. Diese Versuche ergaben insbesondere für das Resistenzgen *Ht2* einen Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit. Vor diesem Hintergrund haben Leonard et al. (1989) darauf hingewiesen, dass Virulenzeinstufungen im Pathosystem Mais – *E. turcicum* generell unter kontrollierten und konstanten Temperaturbedingungen stattfinden sollten. Dieser Sachverhalt ist Gegenstand der Diskussion im nächsten Kapitel. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass Virulenzeinstufungen für *E. turcicum* immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind. Dies sollte auch für die Ergebnisse dieser Arbeit beachtet werden.

Zusammenfassend können auf Basis der gewonnenen Ergebnisse folgende regionale Empfehlungen für die Nutzung der untersuchten *Ht*-Resistenzgene gegeben werden:

In den Regionen Österreich/Ungarn, Zentralfrankreich, der Oberrheinregion und Tschechien/Polen zeigte *Ht1* zum Teil hohe Wirkungsverluste, wohingegen für die Regionen Niederlande/Belgien, Bretagne/Normandie und Norditalien die Nutzung von *Ht1* empfohlen werden kann.

Aufgrund der flächendeckend sehr geringen Virulenzfrequenzen stellt *Ht2* für alle Regionen eine gute Möglichkeit zur Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre dar. Allerdings sollte die Nutzung von *Ht2* vor dem Hintergrund der in den Kapiteln 4.3 und 4.4 diskutierten Sachverhalte abgewogen werden.

Für *Ht3* wurden in den Regionen Norditalien, Norddeutschland, Süddeutschland/Österreich und Südwestfrankreich die stärksten Wirkungsverluste aufgezeigt. Eine Empfehlung für die Nutzung von *Ht3* kann aufgrund der flächendeckend nachgewiesenen Virulenzen für keine der Regionen gegeben werden.

Für *HtN* wurde insbesondere in Südwestfrankreich ein deutlicher Wirkungsverlust nachgewiesen. In den Regionen Österreich/Ungarn, Norditalien, Bretagne/Normandie und Zentralfrankreich lagen die Virulenzfrequenzen auf einem so geringen Niveau, sodass dort eine Nutzung von *HtN* zumindest mittelfristig Schutz vor der Turcicum-Blattdürre bieten kann.

Um die Wirksamkeit monogener Resistenzen gegen die Turcicum-Blattdürre für einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten, sollte die Basis der Resistenzzüchtung immer eine Kombination von spezifischer qualitativer und breiter quantitativer Resistenz sein. Mehrere Autoren konnten bereits aufzeigen, dass sich die kombinierte Nutzung einzelner *Ht*-Gene in Genotypen mit breiter qualitativer Resistenz in der Wirkung ergänzt und somit einen besseren und längerfristigen Schutz gegen die Turcicum Blattdürre bietet (Lipps et al., 1997; Pataky & Ledencan, 2006).

In der praktischen Maiszüchtung werden unter dem Zuchtziel Resistenz neben der Turcicum-Blattdürre noch weitere Blattkrankheiten, wie u. a. die Augenfleckenkrankheit (*Kabatiella zaeae*) oder Maisrost (*Puccinia sorghi*), aber auch andere Erregergruppen, wie Insekten oder Viren berücksichtigt. Darüber hinaus ergeben sich aus den vielfältigen Nutzungsrichtungen des Maises verschiedene komplexe Zuchtziele, die einerseits auf einen hohen Korn-ertrag für Körnermaissorten und andererseits auf hohe Biomasseerträge für Energiemaissorten abzielen. Ein weiterer Aspekt, der die Vielfalt der Zuchtziele nochmals erweitert, ist die notwendige Anpassung der Maissorten an klimatisch unterschiedliche Bedingungen. Aufgrund der geringeren Wärmesummen werden in den nördlichen Anbaugebieten frühreife Sorten benötigt, wohingegen in den warmen Regionen im Süden spätreife Sorten bevorzugt werden. Diese vielfältigen Zuchtziele spiegeln sich in der hohen Zahl von aktuell über 430 in Deutschland zugelassenen Maissorten mit jährlich etwa 25 Neuzulassungen

wider (DMK, 2016). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie vielfältig die Zuchtziele in der Maiszüchtung sind und die Resistenzzüchtung lediglich einen Aspekt unter vielen darstellt. Deshalb sind die mit der vorliegenden Arbeit bereitgestellten Informationen über die regionale Wirksamkeit der Resistenzgene gegen die Turcicum-Blattdürre umso wichtiger, um eine gezielte und effiziente Resistenzzüchtung gegen *E. turcicum* im Mais zu ermöglichen.

### 4.3 Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit der Resistenzgene

In Klimakammerversuchen konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Resistenzgene im genetischen Hintergrund der Linie B37 bei einer Tag/Nacht-Temperatur von 25/20°C eine konstante Wirksamkeit zeigten. Die Ergebnisse bestätigen, dass die für die Virulenzanalyse gewählte Temperatur von 24/20°C ideal ist. Einzig die Linie B37-*Ht2* zeigte im gewählten Temperaturbereich, abhängig vom Isolat, vereinzelt eine widersprüchliche Resistenzreaktion. Die aufgetretenen Variationen unterstreichen die Notwendigkeit von kontrollierten, konstanten Temperaturen im Bereich von 20° bis 22°C für die Virulenzeinstufung von *E. turcicum* an Mais.

Insbesondere die Linie B37-*Ht2* zeigte bei Temperaturen unter 20°C unabhängig vom Isolat eine Verschiebung der Reaktion von resistent zu anfällig, wohingegen bei höheren Temperaturen für B37-*Ht2* eine Verschiebung von anfällig zu resistent festgestellt wurde. Im Temperaturbereich unter 15°C zeigte die Linie B37-*Ht3* ebenfalls eine anfällige Reaktion bei einem avirulenten Isolat. Die Linien B37-*Ht1* und B37-*HtN* wiesen über den gesamten Temperaturbereich keine Schwankungen bei den Resistenzreaktionen auf.

Von anderen Autoren wurde in Versuchen mit der Linie H4460-*Ht1* eine Verschiebung von anfälliger hin zu resistenter Reaktion bei Temperaturen über 26°C nachgewiesen. Im genetischen Hintergrund der Linie B37 zeigte *Ht1* dagegen über den gesamten Temperaturbereich eine konstante Wirkung (Thakur et al., 1989b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Aussage für B37. Dennoch zeigten die Ergebnisse von Thakur et al. (1989b), dass die Wirksamkeit von *Ht1* durch eine Interaktion zwischen dem Resistenzgen, dem genetischen Hintergrund und den Umweltbedingungen beeinflusst werden kann. In weiteren Temperaturversuchen konnten Leath et al. (1990) zeigen, dass vorhandene Virulenzen gegenüber *Ht2* und *Ht3* in Gewächshausversuchen bei Temperaturen über 26°C nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Sie sprechen speziell die im Sommer stark schwankenden Temperaturen in Gewächshäusern von zum Teil deutlich über 26°C als Ursache an. Die Verschiebung von anfälligen hin zu resistenten Reaktionen auf den Linien B37-*Ht2* und B37-*Ht3* bei Temperaturen über 25°C in eigenen Versuchen bestätigen diese Ergebnisse. Darüber hinaus beschrieben Leath et al. (1990) und Thakur et al. (1989a) einen

Wirkungsverlust für *Ht2* bei geringen Lichtintensitäten in den Linien B37 und H4460. Der Einfluss der Lichtintensität wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher behandelt.

Für das Resistenzgen *HtN* beschrieben Thakur et al. (1989a) ebenfalls einen Einfluss der Temperatur. Sie stellten fest, dass die Linie B37-*HtN* bei Temperaturen von 26°C in Kombination mit hohen Lichtintensitäten resistente Befallsreaktionen mit Chlorosen zeigte, wohingegen die Linie bei geringeren Temperaturen von 22°C unter Verwendung des gleichen Isolates anfällige Reaktionen ohne Chlorosen aufwies. Allerdings waren diese Befunde inkonsistent zwischen einzelnen Pflanzen bzw. Wiederholungen. Die Wirkung des Resistenzgens *HtN* zeigte sich in den eigenen Versuchen in der Linie B37 für alle Isolate im gesamten Temperaturbereich als konstant stabil. Die Ergebnisse zu *HtN* von Thakur et al. (1989a) können also nicht bestätigt werden. Allerdings wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit für das Resistenzgen *Ht2* in einigen Fällen inkonsistente Resistenzreaktionen zwischen einzelnen Pflanzen im Temperaturbereich 20/15°C und 25/20°C beobachtet. Aufgrund dieser heterogenen Reaktionen zwischen einzelnen Pflanzen ist ein genetischer Effekt wahrscheinlich. In anderen Arbeiten konnte in Rückkreuzungsversuchen gezeigt werden, dass insbesondere der genetische Hintergrund zu Komplikationen beim Transfer von *Ht2* führen kann (Ceballos & Gracen, 1989). Für das Resistenzgen *Ht2* wurde ein dominantes Inhibitor Gen (*Sht1*) beschrieben, das bei gemeinsamem Auftreten die phänotypische Ausprägung der durch *Ht2* bedingten Resistenz unterdrückt (Simcox & Bennetzen, 1993). Darüber hinaus sind Unstimmigkeiten bei Kartierungsexperimenten von *Ht2* in verschiedenen Kreuzungspopulationen von Mais beschrieben worden, die die Autoren zur Vermutung veranlassten, dass möglicherweise mehrere Gene für die dem Resistenzgen *Ht2* zugeordnete Wirkung verantwortlich ist (Wang et al., 2010).

Neben den klassischen Temperaturversuchen, in denen sowohl die Pflanzen als auch der Pilz während des gesamten Versuchszeitraums den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt waren, wurden weitere spezifische Temperaturversuche mit den Linien B37 und B37-*Ht2* durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche waren ausschließlich die Pflanzen, nicht aber der Pilz, den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Auf diese Weise sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob die Verschiebung in der Wirkung des Resistenzgens *Ht2* durch die Beeinflussung der Abläufe in der Pflanze oder im Pilz zu erklären ist. Das Virulenzverhalten des virulenten Isolates 48-1 (Rasse 123) unterschied sich nicht zwischen den beiden Versuchen. In beiden Fällen änderte sich die Befallsreaktion in der hohen Temperaturvariante (30/25°C) von anfällig zu resistent. Da der Pilz im zweiten Versuch zu keinem Zeitpunkt hohen Temperaturen ausgesetzt war, liegt es nahe, dass die Ursache des Virulenzverlustes in der Pflanze und nicht im Pilz zu suchen ist. Der Einfluss niedriger

Temperaturen ausschließlich auf die Pflanze führte hingegen bei dem avirulenten Isolat 76-4 (Rasse 0) nicht zu einer Veränderung der Reaktion von resistent zu anfällig.

Da ein vollständiger Virulenzverlust gegenüber *Ht2* ausschließlich in den Fällen nachgewiesen wurde, in denen sowohl der Pilz als auch die Pflanze den niedrigen Temperaturen ausgesetzt waren, könnte die Ursache dafür in der beeinträchtigten Expressierung des mit *Ht2* korrespondierenden Avirulenzgens vermutet werden. *E. turcicum* hat genau wie die Maispflanze ihren Ursprung in tropisch warmen Regionen und ist deshalb möglicherweise nicht optimal an kühlere klimatische Bedingungen angepasst.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Virulenz gegenüber *Ht2* zunahm, wenn Temperaturen unter 20°C sowohl auf die Pflanze als auch auf den Pilz wirken. Wenn allerdings ausschließlich die Pflanzen den geringen Temperaturen ausgesetzt waren, konnte keine Virulenzzunahme beobachtet werden.

Bei Temperaturen über 25°C war *Ht2* voll wirksam gegenüber Isolaten, die unter Standardbedingungen (24/20°C, Tag/Nacht) als virulent eingestuft sind und dies unabhängig davon, ob ausschließlich die Pflanze oder die Pflanze und der Pilz den hohen Temperaturen ausgesetzt waren. Die konstant stabile Wirksamkeit des Resistenzgens *Ht2* bei hohen Temperaturen in beiden Versuchsvarianten könnte dadurch erklärt werden, dass der optimale Temperaturbereich der aus den Tropen stammenden Maispflanze im Bereich von 25 bis 30°C liegt (Bennetzen & Hake, 2009). Aus diesem Grund könnten die physiologischen Prozesse in der Pflanze in jenem Temperaturbereich ohne Stress ablaufen und damit eine optimale Expressierung des *Ht2* Gens ermöglichen. Dieselben Gründe können für die in dieser Arbeit und von anderen Autoren nachgewiesenen Wirkungsverluste für *Ht2* und *Ht3* bei Temperaturen unter 20°C gesehen werden. Unter Annahme der Hypothese von Wang et al. (2010), wonach mehrere Gene für die als *Ht2* bezeichnete Resistenz verantwortlich sind, wäre es vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit aufgezeigten heterogenen Reaktionen auf B37-*Ht2* bei niedrigen Temperaturen denkbar, dass die beteiligten „*Ht2*-Gene“ unterschiedlich stark durch niedrige Temperaturen beeinflusst werden. Dadurch könnten letztlich die isolatabhängigen Unterschiede bei niedrigen Temperaturen erklärt werden.

Die hier diskutierten Herausforderungen bei der korrekten Einstufung der Befallsreaktionen auf Genotypen mit *Ht2* sind insbesondere für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Feldbedingungen von Bedeutung. Im Vergleich zwischen Feld- und Gewächshausversuchen konnten Moghaddam & Pataky (1994) deutliche Unterschiede in der Wirkung von *Ht2* feststellen. In diesem Fall wurden die unterschiedlichen Temperaturbedingungen als Hauptursache vermutet. Welz & Geiger (2000) sehen im Temperatureinfluss auf die Wirksamkeit

monogener Resistenzen gegen die Turcicum-Blattdürre eine Ursache dafür, dass Maiszüchter die Suche nach neuen qualitativen Resistenzen weniger intensiv betreiben.

Neben der qualitativen Beurteilung der Befallsreaktionen im Rahmen der Temperaturversuche wurden ebenfalls quantitative Merkmale als Befallsstärke und durch die Quantifizierung der Pilz-DNA aufgenommen. Diese Daten zeigen wie erwartet für die als virulent eingestuften Isolate im Vergleich zu avirulenten Isolaten die höchsten Befallsstärken auf der Linie B37-*Ht2*. Überraschend erscheint jedoch, dass sogar in den kompatiblen Interaktionen eine signifikante Reduktion der Befallsstärke durch das vermeintlich unwirksame Resistenzgen *Ht2* erreicht worden ist. Diese Aussagen werden durch die DNA-Gehalte von *E. turcicum* im Blattgewebe bestätigt. Dieser Zusammenhang der deutlichen Reduktion der Befallsstärke in kompatiblen Interaktionen untermauert die Notwendigkeit einer klaren Einteilung der Resistenzreaktionen auf *Ht2* in anfällig bzw. resistent, um aussagekräftige Ergebnisse für eine Rassencharakterisierung zu generieren.

Vor dem Hintergrund der bisher diskutierten Schwierigkeiten bei der VirulenzEinstufung von Isolaten gegenüber *Ht2* ist es für die Rassenbestimmung eine Voraussetzung, die Abgrenzung zwischen anfälligen und resistenten Reaktionen auf der Linie B37-*Ht2* unter den gewählten Bedingungen zu definieren. Aus diesem Grund wurden für das Resistenzgen *Ht2* in verschiedenen genetischen Hintergründen weiterführende Versuche zur Symptomausprägung durchgeführt. Diese sind Gegenstand der Diskussion im folgenden Kapitel.

#### 4.4 *Ht2* Symptomatik und Epidemiepotential

Das Resistenzgen *Ht2* wurde erstmals durch Hooker (1977) als „Chlorotic-Lesion Resistance“ benannt und die phänotypische Resistenzreaktion als Chlorosen mit beträchtlichen Nekrosen beschrieben. Die phänotypische Abgrenzung zu den Resistenzreaktionen der Gene *Ht1* und *Ht3* besteht demnach im Ausmaß der Nekrosen. Im Verlauf des Virulenzscreenings stellte sich heraus, dass die Einstufung der Symptomausprägung auf dem Genotyp B37-*Ht2* nicht immer eindeutig einer resistenten oder anfälligen Reaktion zuzuordnen war. Aus diesem Grund wurde das Merkmal Epidemiepotential entwickelt, um eine klare Abgrenzung zwischen den beiden Reaktionstypen auf B37-*Ht2* vornehmen zu können. Das Epidemiepotential ergibt sich aus dem relativen Befall multipliziert mit der relativen Sporulation auf der Linie B37-*Ht2* im Vergleich zur nah-isogenen Linie B37 (=100). Dieses Merkmal ist aufgrund der aufwändigen Bestimmung nicht dazu geeignet, eine hohe Anzahl an Maisgenotypen, beispielsweise im Rahmen von umfangreichen Resistenztestungen zu untersuchen. Es wurde ausschließlich dafür entwickelt, eine Entscheidungsgrundlage für die in dieser Arbeit genutzten Versuchsbedingungen zu erhalten.

Die zwei avirulenten Isolate (130-2 & 186-1) wurden im *Ht2*-Symptomversuch eindeutig anhand der Befallsreaktionen als avirulent eingestuft. Obwohl das Isolat 186-1 eine Befallsstärke von 12% aufwies, lag das Epidemiepotential für beide Isolate bei 0,5% oder geringer. Demnach trägt das *Ht2*-Gen trotz des hohen Anteils an Nekrosen für diese beiden Isolate zu einer Reduktion des Epidemiepotentials von über 99,5% bei. Diese Ergebnisse bestätigen die durch Hooker (1977) beschriebene Resistenzreaktion für *Ht2*. Eine so eindeutige Trennung zwischen anfälligen und resistenten Reaktionen ausschließlich anhand der Qualität der Blattläsionen traf auf weit über 90% der 559 untersuchten Isolate zu. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die Unstimmigkeiten bei der Symptombewertung auf *Ht2* zwar regelmäßig auftraten, aber beim Großteil der untersuchten Isolate nicht zu Problemen führten.

Vier der sechs im Rahmen des *Ht2*-Versuchs untersuchten Isolate riefen allerdings heterogene Befallsreaktionen hervor (Tab. 22). Das virulente Referenzisolat 28A konnte anhand der Befallsreaktionen nicht eindeutig als virulent eingestuft werden. Daran werden die Herausforderungen für die Virulenzeinstufung der Isolate auf der Linie B37-*Ht2* deutlich. Die höchsten Befallswerte zeigten die Isolate 161-1 und 122-2 mit bis zu 39% nekrotisierter Blattfläche. Trotz dieser beträchtlichen Befallswerte war es nicht möglich, die Qualität der Läsionen eindeutig einer resistenten oder anfälligen Reaktion zuzuordnen. In Kombination mit dem Vermehrungspotential wiesen die beiden Isolate mit 6,4 und 7,8% ebenfalls die höchsten Werte für das Merkmal Epidemiepotential auf. Im Vergleich dazu zeigte das virulente Isolat 28A ebenfalls ein relativ hohes Epidemiepotential von 4,7%. Dennoch würde man grundsätzlich für ein virulentes Isolat ein deutlich höheres Epidemiepotential erwarten. Denn im klassischen Sinne der qualitativen Resistenz wird in einer kompatiblen Interaktion ein vollständiger oder zumindest nahezu vollständiger Wirkungsverlust des betreffenden Resistenzgens erwartet (Agrios, 2008). Gegenüber dem virulenten Isolat 28A bewirkt das Resistenzgen *Ht2* hingegen eine sehr hohe Reduktion des Epidemiepotentials um 95,3%.

Vor dem Hintergrund der in Kapitel 4.3 diskutierten Interaktionen des Resistenzgens *Ht2* mit dem jeweiligen genetischen Hintergrund wurden die Versuche zur *Ht2*-Symptomatik neben dem Genotyp B37 ebenfalls mit den Genotypen Pa91 und KWS durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Wirkung von *Ht2*. Nur das als avirulent bekannte Isolat 130-2 rief auf allen Genotypen einheitlich resistente Befallsreaktionen hervor. Alle anderen Isolate verursachten je nach genetischem Hintergrund sehr heterogene Befallsreaktionen auf Linien mit *Ht2* (Tab. 24). Darüber hinaus wurde die unterschiedlich ausgeprägte Wirkung von *Ht2* in verschiedenen genetischen Hintergründen anhand der Merkmale Befallsstärke und Sporulation sehr deutlich. Das Isolat 28A erreichte auf der Linie Pa91-*Ht2* für beide Merkmale ebenso hohe Werte wie auf der

nah-isogenen Linie Pa91 ohne das Resistenzgen. Diese Werte bestätigen einen vollständigen Wirkungsverlust von *Ht2* im Hintergrund der Linie Pa91 gegenüber dem Isolat 28A. Ausgedrückt im Merkmal Epidemiepotential liegt der Wert für das Isolat 28A auf der Linie Pa91-*Ht2* bei 152%. Die Linie Pa91 weist generell für alle Isolate den höchsten Befall und die höchste Sporulation auf. Der Vergleich zwischen den getesteten Linien belegt eine vergleichsweise hohe Wirkung für das Resistenzgen *Ht2* im genetischen Hintergrund von B37.

Nach der Bestätigung der Virulenz von Isolat 28A auf der Linie Pa91-*Ht2* dienten die erhobenen Werte auf B37-*Ht2* als Richtwerte zur Abgrenzung zwischen anfälliger und resistenter Reaktion. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Befallsstärke einzelner Isolate und deren Sporulation, weder auf B37 noch auf B37-*Ht2*, nachgewiesen werden. Aufgrund der leicht zu erfassenden Befallsstärke und der signifikanten Korrelation dieses Merkmals mit den Werten des Epidemiepotentials wurde die Befallsstärke als Abgrenzungsmerkmal der Virulenzeigenschaften genutzt. Da ausschließlich die beiden Isolate 161-1 und 122-2 relative Befallsstärken von deutlich über 20% aufwiesen und sie sich dadurch von den anderen Isolaten absetzen, wurde 20% Befallsstärke als Abgrenzung zwischen einer anfälligen und resistenten Reaktion herangezogen. Auf dieser Grundlage wurden im Rahmen des *Ht2* Symptomversuchs die Isolate 161-1 und 122-2 als virulent gegenüber *Ht2* eingestuft. Das zunächst in den Virulenzuntersuchungen als avirulent eingestufte Isolat 161-1 konnte durch diese tiefgehenden Untersuchungen nun als virulent beschrieben werden. Alle anderen Isolate (130-2, 127-2, 186-1, 159-4) sind auf Basis dieser Ergebnisse als avirulent auf *Ht2* eingestuft worden. Die Befallsstärke wurde nur in den Fällen herangezogen, in denen eine eindeutige Abgrenzung zwischen anfällig und resistent anhand der qualitativen Beurteilung auf Basis der Befallsreaktionen nicht möglich war.

Im klassischen Sinne wird angenommen, dass Resistenzen, die eine Sporulation zulassen, nicht rassenspezifisch wirksam sind. Dennoch wurden mit den rassenbildenden Erregern des Schwarzrostes im Weizen (*Puccinia graminis* var. *tritici*) oder der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln (*Phytophthora infestans*) Pathosysteme beschrieben, in denen in inkompatiblen Interaktionen eine Sporulation in geringem Umfang möglich ist (Johnson & Taylor, 1976). Diese Beispiele und die hier diskutierten Ergebnisse zeigen, dass eine Vermehrung durch Sporulation auf resistenten Genotypen kein Widerspruch zur rassenspezifischen Resistenz sein muss. Die hier aufgezeigte Wirkung von *Ht2* auf die Reduktion, nicht aber vollständige Unterbindung der Sporulation in inkompatiblen Interaktionen ist ebenfalls für *Ht1*, *Ht3* und *HtN* bekannt (Raymundo & Hooker, 1982), (Thakur et al., 1989a; Welz & Geiger, 2000). Der hohe Grad an nekrotisierter Blattfläche in Verbindung mit einer nicht vollständig unterbundenen Sporulation wirft die Frage auf, wie sich dies auf die Verhinde-

rung von Epidemien im Feld auswirken könnte. Insbesondere durch den diskutierten Einfluss des genetischen Hintergrundes auf *Ht2* kann dies von großer Bedeutung sein. So berichten Pataky et al. (1986), dass Genotypen mit *Ht2* nicht in der Lage waren, die Ausbreitung der Turcicum-Blattdürre in einem Feldbestand zu verhindern, obwohl es sich um eine für *Ht2* als avirulent beschriebene *E. turcicum* Population handelte. Die Autoren vermuteten die Ursache für die drastisch reduzierte Wirkung von *Ht2* im genetischen Hintergrund der verwendeten Linie.

Es stellt sich grundsätzlich die Frage, wie wertvoll monogene Resistenzen für den praktischen Anbau sind, wenn sie zwar die Vermehrung des Pathogens auf der Pflanze stark reduzieren, aber dennoch beträchtliche Nekrosen in Verbindung mit Chlorosen auf dem Blattgewebe zulassen. In Versuchen anderer Autoren wurde dieser Frage nachgegangen. Der parallele Anbau von Genotypen mit *Ht1* und Genotypen mit breiter quantitativer Resistenz, jedoch ohne *Ht1* an Orten mit avirulenten *E. turcicum* Populationen zeigten diesbezüglich interessante Ergebnisse. In mehreren Fällen konnte nachgewiesen werden, dass Resistenzreaktionen in Form von Nekrosen mit Chlorosen auf *Ht1*-Genotypen bei entsprechend vorhandenem Inokulum zum Absterben großer Teile der Blattfläche führten. Das wurde insbesondere beobachtet, wenn *Ht1* in ansonsten anfälligen Genotypen genutzt wurde. Die Blattverluste auf den mit ausschließlich quantitativer Resistenz ausgestatteten Genotypen fielen hingegen deutlich geringer aus. Diese deutlichen Effekte im Blattbefall wirkten sich in Einzelfällen auch negativ auf den Kornertrag aus. (Ullstrup, 1970; Pataky, 1994; Welz & Geiger, 2000; Pataky et al., 2011). Vor dem Hintergrund der diskutierten *Ht2*-Symptomatik ist dieses Szenario ebenso für das Resistenzgen *Ht2* denkbar.

Zusammenfassend stellt die Nutzung einer breiten, quantitativen Resistenz in Kombination mit der gezielten Auswahl monogener Resistenzen die wirkungsvollste und langfristig effektivste Methode für die Resistenzzüchtung gegen die Turcicum-Blattdürre im Mais dar. Diese Aussage ist für keinen Pflanzenzüchter neu. Dennoch wurde in dieser Arbeit neben dem klassischen Argument des Schutzes der monogenen Resistenzen vor dem Hintergrund der beträchtlichen Resistenzreaktion in Form von Nekrosen durch das Resistenzgen *Ht2* ein weiteres Argument aufgezeigt.

#### 4.5 Histologische Untersuchungen

Vergleichende histologische Untersuchungen von kompatiblen mit inkompatiblen Interaktionen bilden die Grundlage für eine Interpretation der genetischen Interaktion zwischen Pathogen und Wirt. Im Rahmen der histologischen Untersuchungen zur Pathogenese von

*E. turcicum* in Mais wurden drei Parameter im Zeitverlauf des Infektions- und Besiedlungsprozesses für jedes der vier *Ht*-Resistenzgene erfasst, nämlich 1. Xylem-Penetrations-Effizienz, 2. Xylem-Besiedlungs-Effizienz und 3. Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz. Die Parameter beschränkten sich auf die Abläufe der Besiedlung des Blattgewebes nach Penetration der Epidermis, da die initialen Schritte des Infektionsverlaufs, wie Sporenkeimung, Appressorienbildung und Penetration der Epidermis bereits von (Hilu & Hooker, 1964; Knox-Davies, 1974) untersucht wurden. Andere Autoren konnten ebenfalls aufzeigen, dass diese Prä-Penetrationsschritte im Verlauf des Infektionsprozesses nicht durch qualitative Resistenz beeinflusst werden (Hilu & Hooker, 1964; Muiro et al., 2008). Stichprobenartige Testungen im Rahmen der eigenen histologischen Untersuchungen bestätigen diese Aussagen.

Sowohl in den kompatiblen als auch in den inkompatiblen Interaktionen fand nach dem Eindringen in die Epidermiszellen ein verzweigtes, intrazelluläres Hyphenwachstum in Richtung der Leitbündelgefäße statt (Abb. 34). In der näheren Umgebung dieser epidermalen Penetrationsstellen konnten braungefärbte Bereiche sowohl in der Linie B37 als auch in den Linien mit *Ht*-Gen beobachtet werden. Diese Verfärbungen könnten als Reaktion der Pflanze auf die Zellwandpenetrationen der die Leitbündel umgebenden Mesophyllzellen gedeutet werden, z. B. durch Akkumulation von Phenolen. Eine hypersensitive Reaktion erscheint unwahrscheinlich, da die Braunfärbung auch in Linien ohne *Ht*-Gene beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zeigen, dass die für die Braunfärbung verantwortlichen Substanzen das Wachstum der Pilzhypen nicht negativ beeinflussen und nicht auf die *Ht*-Gene zurückzuführen sind. Die hier beschriebene Reaktion könnte als Ursache für die wenige Stunden nach der Inokulation auftretenden chlorotischen Punkte verantwortlich sein. Welz (1998) hat diese Punkte als 80-100 kollabierte Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Penetrationsstelle beschrieben. Im Rahmen der Virulenztestungen diente das Auftreten der chlorotischen Punkte bereits zwölf Stunden nach Inokulation als Indikator für eine erfolgreiche Infektion (Abb. 5). Eine weitere Ursache für die erscheinenden chlorotischen Punkte könnte ein von *E. turcicum* gebildetes Phytotoxin namens Monocerin sein. Es ist bekannt, dass Monocerin die Chlorophyllsynthese reduziert und auf diesem Weg Chlorosen hervorrufen kann (Cuq et al., 1993). Monocerin wurde ursprünglich nicht in *E. turcicum*, sondern in *E. monoceras* beschrieben (Cuq et al., 1993). Demnach handelt es sich um ein unspezifisches Phytotoxin und kann nicht als Virulenzfaktor für eines der *Ht*-Gene vermutet werden. Da die chlorotischen Punkte sowohl in der hochanfälligen Linie B37 ohne *Ht*-Gen als auch in inkompatiblen Interaktionen beobachtet werden konnten, erscheinen Phytotoxine als durchaus wahrscheinliche Ursache für die chlorotischen Punkte.

Ziel der histologischen Untersuchungen war es festzustellen, wo genau und zu welchem Zeitpunkt die Resistenzfaktoren für die einzelnen *Ht*-Resistenzgene im Blattgewebe vermutet werden müssen.

Das erhobene Merkmal Xylem-Penetrations-Effizienz beschreibt den Anteil an epidermalen Penetrationsstellen, denen ein Eindringen durch Pilzhyphen in das Xylem folgte. Bis drei Tage nach Inokulation konnte in der inkompatiblen Interaktion mit Ausnahme von *HtN* kein Effekt der Resistenzgene nachgewiesen werden. Erst zwischen dem dritten und sechsten Tag nach Inokulation wurde kein weiteres Eindringen in das Xylem beobachtet. Alle *Ht*-Gene zeigten also zwischen dem dritten und sechsten Tag in der inkompatiblen Interaktion eine signifikante Reduktion der Xylem-Penetration. Dennoch konnte für alle *Ht*-Linien in den inkompatiblen Interaktionen ein Eindringen in das Xylem nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die *Ht*-Gene in der Linie B37, anders als für eine qualitative Resistenz erwartet, nicht zu einer vollständigen Abwehr der Xylem-Penetration führen.

In der kompatiblen Interaktion zeigten die beiden Linien B37-*Ht1* und B37-*Ht3* über den gesamten Versuchszeitraum wie erwartet einen vollständigen Wirkungsverlust. Die Linie B37-*HtN* war nicht durch einen vollständigen Wirkungsverlust gekennzeichnet, sondern verzögerte die Xylem-Penetration lediglich. Dieser Effekt zeigt sich durch einen kontinuierlichen Anstieg der Xylem-Penetrationen im Zeitverlauf. Der Effekt des *HtN*-Gens gegen die Turcicum-Blattdürre ist in der Literatur als grundlegend verschieden gegenüber denen von *Ht1*, *Ht2* und *Ht3* beschrieben. Bisher ist bekannt, dass *HtN* nicht die typischen Resistenzreaktionen in Form von chlorotischen Nekrosen hervorruft, sondern eine Verlängerung der Inkubationszeit bewirkt und die Anzahl der auftretenden Läsionen reduziert (Raymundo et al., 1981). Die beschriebenen Eigenschaften von *HtN* zur verzögerten Befallsentwicklung durch Raymundo et al. (1981) werden anhand der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen durch eine verzögerte Xylem-Penetration ergänzt und somit bestätigt. Für die Linie B37-*Ht2* konnte erst 18 Tage nach Inokulation ein deutlicher Anstieg der Xylem-Penetrationen in der kompatiblen Interaktion festgestellt werden. Trotz des Anstiegs war zu dem Zeitpunkt aber noch eine deutliche Wirkung von *Ht2* vorhanden, die in diesem Ausmaß in einer kompatiblen Interaktion ungewöhnlich hoch erscheint. Wie bereits in Kapitel 4.4 diskutiert, kann die Wirkung von *Ht2* durch eine Interaktion mit dem jeweiligen genetischen Hintergrund beeinflusst werden. Durch die histologischen Untersuchungen kann die in Kapitel 4.4 beschriebene fördernde Wirkung des genetischen Hintergrundes auf die Wirkung des Resistenzgens *Ht2* bestätigt werden.

Anhand der in dieser Arbeit verwendeten Färbemethode (Chlorazol Black E) konnten im Infektionsverlauf vom Penetrieren der Epidermis bis zum Eindringen in das Xylem in keiner der untersuchten Interaktionen morphologische Veränderungen festgestellt werden, die als

physische Barriere hätten dienen können. Die entscheidenden Resistenzmechanismen zur Verhinderung des Eindringens in die Xylemgefäße müssen zwischen dem dritten und sechsten Tag nach Inokulation vermutet werden. Da das Gewebe der Xylemwand als physiologisch inaktives Gewebe betrachtet werden kann, müssen die möglichen Abwehrreaktionen in den umliegenden Zellen, beispielsweise den Leitbündelscheidenzellen vermutet werden.

Es ist vor allem ein Sekundärmetabolit allgemein für Gräser und speziell im Mais bekannt, der eine Resistenz gegenüber Schädlingen und Pathogenen bewirkt. Dabei handelt es sich um den Sekundärmetabolit Benzoxazinoid 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, kurz DIMBOA (Frey, 1997). Bei Versuchen im Mais konnten Courture et al. (1971) bereits eine Wirkung von DIMBOA gegenüber *E. turcicum* in Linien mit *Ht1* nachweisen. DIMBOA wird als nicht toxisches Glykosid in den Vakuolen der Pflanzenzellen gespeichert und entwickelt erst nach hydrolytischer Abspaltung durch  $\beta$ -Glukosidase seine toxische Wirkung (Frey, 1997). In histochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den Epidermis- und Mesophyllzellen in Maisblättern keine bzw. nur sehr geringe Gehalte an  $\beta$ -Glukosidasen vorhanden sind. Mace (1973) beobachtete zudem, dass zwei bis drei Tage nach Besiedlung mit *E. turcicum* vor allem in unmittelbarer Nähe der Leitbündelgefäße eine höhere DIMBOA-Konzentration als in anderen Zellbereichen zu finden war. Er stellte die Hypothese auf, dass die von *E. turcicum* synthetisierte  $\beta$ -Glukosidase die Hydrolyse des im Bereich der Leitbündelgefäße vorhandenen DIMBOA-Glykosids in die toxische Form maßgeblich fördert. Er bekräftigt diese Hypothese damit, dass DIMBOA erst zwei bis drei Tage nach der Epidermis-Penetration und dann lediglich in den Leitbündelgefäßen nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Hypothese, denn im Mesophyll wurde das Hyphenwachstum weder in der anfälligen noch in der resistenten Variante reduziert und zudem lag der Zeitpunkt des vermehrten Eindringens in die Xylemgefäße ebenfalls um den dritten Tag nach Inokulation. Long et al. (1978) konnten ebenfalls nachweisen, dass die DIMBOA-Konzentration in Maisblättern negativ mit dem Auftreten von *E. turcicum* Läsionen korreliert. Weitere Autoren konnten für Linien mit *Ht1* zeigen, dass ab 48 Stunden nach Inokulation vermehrt antimikrobielle Substanzen im Blattgewebe gebildet werden und dadurch eine deutliche Reduktion des Befalls bewirkten. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Synthese dieser als antimikrobiell beschriebenen Verbindungen stark vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Linie beeinflusst wird (Calub et al., 1974; Obi et al., 1980). Demnach würde das Hyphenwachstum erst ab dem dritten Tag durch die beschriebenen antimikrobiellen Substanzen verhindert bzw. reduziert werden. Diese Hypothese wird durch die histologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Da erst

am sechsten Tag nach Inokulation eine Wirkung der *Ht*-Gene in der inkompatiblen Interaktion für das Merkmal Xylem-Penetration nachgewiesen werden konnte, muss vermutet werden, dass das Eindringen in das Xylem zwischen dem dritten und sechsten Tag nach Inokulation gestoppt wurde. Da DIMBOA als Sekundärmetabolit auch in Maisgenotypen ohne *Ht*-Gene auftritt (Frey, 1997), kann dieser Metabolit allerdings nicht als einziger Resistenzfaktor für die hier untersuchten Interaktionen der *Ht*-Gene gesehen werden.

Die bisher diskutierten Reaktionen betreffen die möglichen Resistenzmechanismen bis zum Zeitpunkt des Eindringens in das Xylem. Der nächste Schritt der Pathogenese betrifft die Besiedlung des Xylems. Ab diesem Schritt haben Metabolite, die außerhalb des Xylems gebildet werden, einen sehr begrenzten Einfluss auf das Hyphenwachstum. Nachdem das Xylem erfolgreich penetriert war, konnte in den kompatiblen Interaktionen ab dem zwölften Tag nach Inokulation eine starke Ausbreitung in den Leitbahnen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für das Merkmal Xylem-Besiedlungs-Effizienz waren denen der Xylem-Penetration sehr ähnlich. Alle Linien mit *Ht*-Gen zeigten für Xylem-Besiedlung in der inkompatiblen Interaktion wie erwartet eine fast vollständige Reduktion. In der kompatiblen Interaktion konnte für die Linien B37-*Ht1* und B37-*Ht3* lediglich bis zum zwölften Tag nach Inokulation eine Wirkung der *Ht*-Gene nachgewiesen werden. Die Linie B37-*HtN* fällt auch in diesem Merkmal eher durch eine Verzögerung der Befallsentwicklung als durch eine vollständige Verhinderung auf. Am letzten Boniturtermin zeigte *HtN* zwar noch signifikante Wirkung, aber es ist anzunehmen, dass im weiteren Zeitverlauf ein kontinuierlicher Anstieg der Xylem-Besiedlung stattgefunden hätte. Die Linie B37-*Ht2* zeigte bis 12 dpi eine vollständige Verhinderung der Xylem-Besiedlung, folglich das genaue Gegenteil von dem einer kompatiblen Interaktion. Sogar nach 18 Tagen zeigte *Ht2* noch eine hoch signifikante Wirkung.

In Einzelfällen konnten in den besiedelten Xylemgefäßen dunkel gefärbte Bereiche beobachtet werden, in denen das Hyphenwachstum unterbunden wurde (Abb. 35). Hierbei handelte es sich nicht um regelmäßig und systematisch auftretende Reaktionen. Diese konnten also weder den inkompatiblen Interaktionen noch einem speziellen *Ht*-Gen zugeordnet werden.

Die Voraussetzung für eine Vermehrung durch Sporulation stellt für *E. turcicum* die Besiedlung des Mesophylls dar. Nachdem es in den Xylemgefäßen durch intensives Hyphenwachstum zu einer mechanischen Barriere des Wassertransports in den Maisblättern gekommen ist, beginnen die davon betroffenen Zellbereiche aufgrund von Wassermangel zunächst auszutrocknen und treten als grau-grünliche, dürreähnliche Läsionen in Erscheinung. Die Läsionen breiten sich sehr schnell aus und führen letztlich zum Absterben größerer lokal begrenzter Blattbereiche. Diese Symptome waren auf der anfälligen Linie B37 bereits nach acht bis neun Tagen sichtbar (Abb. 5). Nachdem das Zellgewebe nekrotisiert

ist, beginnen Pilzhyphen, ausgehend vom Xylem, die Mesophyllzellen zu besiedeln. Daraufhin wachsen einzelne Hyphen in Richtung Stomata. Durch die Stomata wachsen die Hyphen nach außen und bilden dort unter feuchten Bedingungen Sporenträger mit Konidiosporen aus. Die Beschreibung der Pathogenese im Blattgewebe verdeutlicht, dass das Ausmaß der Mesophyll-Besiedlung starken Einfluss auf die Sporenbildung hat.

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen konnte in den inkompatiblen Interaktionen eine nahezu vollständige Unterbindung der Mesophyll-Besiedlung in den *Ht*-Linien nachgewiesen werden. In den kompatiblen Interaktionen war die Linie B37-HtN wiederum durch eine verzögernde Wirkung auf die Mesophyll-Besiedlung gekennzeichnet, wohingegen B37-*Ht2* wie schon bei den anderen Merkmalen durch eine ungewöhnlich hohe Wirkung in der kompatiblen Interaktion gekennzeichnet war. Spätestens hier stellt sich die Frage, ob es sich bei dem gewählten Isolat und der Linie B37-*Ht2* um eine inkompatible Interaktion handelt. Denn bereits bei der Bonitur der Befallsreaktionen traten diesbezüglich Unstimmigkeiten auf. Zum Zeitpunkt 12 dpi waren die Befallsreaktionen auf den Pflanzen als Nekrosen mit Chlorosen zu erkennen und somit als resistent einzustufen. Sechs Tage später waren die Reaktionen hingegen als eindeutig anfällig ohne Chlorosen zu erkennen. In den Versuchen zur Virulenzeinstufung im Rahmen des Rassenscreenings wurde das betreffende Isolat ebenfalls eindeutig als virulent eingestuft. Dieser Sachverhalt unterstützt die Hypothese, dass die Wirkung von *Ht2* von mehreren Faktoren beeinflusst werden kann. Hier spielen sowohl die Licht- bzw. Temperaturbedingungen (Kapitel 4.3) als auch der genetische Hintergrund, in den *Ht2* eingebracht wurde, eine Rolle (Kapitel 4.4). Der genetische Hintergrund B37 hat sich in eigenen Versuchen als sehr förderlich für die Ausprägung der durch *Ht2* verliehenen Resistenz herausgestellt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die hier beschriebene hohe Wirksamkeit von *Ht2* in einer als inkompatibel definierten Interaktion sein.

Für keines der Resistenzgene konnte im Rahmen der mikroskopischen Untersuchungen in Bezug auf die drei Merkmale Hinweise auf morphologische Veränderungen in der inkompatiblen Interaktion gefunden werden. Diese Erkenntnisse bestätigen frühere Untersuchungen anderer Autoren, die für *Ht1* gegen *E. turcicum* ebenfalls keine morphologischen Barrieren zur Verhinderung bzw. Verminderung des Eindringens von Pilzhyphen in die Xylemgefäße nachweisen konnten (Hilu & Hooker, 1964).

Die Untersuchungen zur Pathogenese verdeutlichen, dass *E. turcicum* drei entscheidende Phasen für eine erfolgreiche Besiedlung und Vermehrung im Maisblattgewebe durchlaufen muss: 1. Eindringen in das Xylem (biotrophe Phase), 2. Ausbreitung innerhalb der Xylemgefäße und 3. nekrotrophe Phase beginnend mit dem Austritt aus dem Xylem in das nekrotisierte Mesophyll bis zur Ausbildung von Sporenträgern durch die Stomata.

An zwei Punkten wird deutlich, dass virulente Isolate von *E. turcicum* die Fähigkeit besitzen müssen, die Xylemwand aktiv zu durchdringen: zunächst beim Eintritt zwischen dem zweiten und vierten Tag nach Inokulation und danach beim Austritt in das Mesophyll, nachdem das umliegende Gewebe abgestorben ist. Es sind für *E. turcicum* verschiedene Enzyme und Phytotoxine bekannt, die aber bisher nicht als Virulenzfaktoren in Zusammenhang mit den *Ht*-Genen gebracht werden konnten. Zum Beispiel sind für *E. turcicum* Genomsequenzen bekannt, die für zwei zellwandabbauende Enzyme codieren, sogenannte Xylanasen (Degefu, 2003). Da die Synthese der Xylanase weder für eines der *Ht*-Gene noch für *E. turcicum* spezifisch ist (Mendgen et al., 1996), ist es wenig wahrscheinlich, dass diese Xylanasen als Faktoren für das Penetrieren der Xylemwand eine Rolle spielen. Es kann jedoch angenommen werden, dass diese Xylanasen eine wichtige Rolle in der Besiedlung des Mesophylls sowohl in der biotrophen als auch in der nekrotrophen Phase der Pathogenese spielen und somit als Pathogenitätsfaktoren von Bedeutung sind.

Für das Resistenzgen *HtN* haben Hurni et al. (2015) nachgewiesen, dass es sich um drei eng gekoppelte Gene am *HtN* Locus handelt. Diese Ergebnisse können eine Erklärung dafür sein, dass in den histologischen Untersuchungen für *HtN* in der kompatiblen Interaktion die Wirkung zu keinem Zeitpunkt vollständig verloren war. Vielmehr wirkte *HtN* verzögernd auf die Xylem-Penetration und die folgende Besiedlung des Blattgewebes. Diese Eigenschaft ist ein klassisches Merkmal einer quantitativen Resistenz. Als solche haben Hurni et al. (2015) die *HtN*-Resistenz auf Basis ihrer Ergebnisse zur Kartierung des *HtN* Locus auch definiert. Die Beobachtungen zur verzögerten Xylem-Penetration und Mesophyll-Besiedlung im Gegensatz zu einem vollständigen Wirkungsverlust für das Resistenzgen *HtN* bestätigen den quantitativen Charakter der *HtN* Resistenz.

Zusammenfassend konnte anhand der histologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass das Passieren der Xylemwand für alle untersuchten *Ht*-Gene den entscheidenden Resistenzfaktor darstellt. Dieser Faktor konnte als effektive Barriere gegen die weitere Ausbreitung der Pilzhyphen in den inkompatiblen Interaktionen für jedes Resistenzgen identifiziert werden. Dennoch war keines der *Ht*-Gene in der Lage, das Passieren der Xylemwand vollständig zu verhindern. Weiterführende Untersuchungen zu den biochemischen Abläufen vor allem in den Leitbündelgefäßen könnten Aufschluss darüber geben, welche Substanzen letztlich dafür verantwortlich sind, das Eindringen der Pilzhyphen in das Xylem zu verhindern.

## 5 Zusammenfassung

Hintergrund der vorliegenden Arbeit war die seit einigen Jahren zunehmende Bedeutung des pilzlichen Blattdürreerregers *Exserohilum turcicum* in intensiven Maisanbauregionen. Der Blattbefall durch die Turcicum-Blattdürre reduziert die photosynthetisch aktive Blattfläche und führt somit zu Ertragsverlusten. Als effektivste Maßnahme zur Ertragssicherung werden resistente Sorten mit Hilfe monogen wirkender Resistenzen (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* und *HtN*) gezüchtet und im praktischen Anbau verwendet. Die Wirksamkeit monogener Resistenzen ist durch die Entstehung virulenter Rassen limitiert. Ein Ziel der Arbeit war es, durch ein Rassen-Monitoring die regionale Wirksamkeit der Resistenzgene zu beurteilen. Auf Basis der gewonnenen Informationen könnten die Nutzung der Resistenzgene in der Sortenzüchtung angepasst und konkrete regionale Sortenempfehlungen ausgesprochen werden. Als Grundlage der Untersuchungen wurden in den Jahren 2011 und 2012 aus zehn europäischen Ländern von 168 Orten befallene Blattproben gesammelt. Insgesamt konnten von diesen Blattproben 559 Einsporisolate gewonnen und deren Virulenz-Eigenschaften charakterisiert werden. Die Rassenbestimmung wurde anhand der Befallsreaktionen nach Ganzpflanzeninokulation an einem Differentialsortiment bestehend aus nah-isogenen Inzuchtlinien durchgeführt. Es wurden die Linien B37 (ohne Resistenzen), B37-*Ht1*, B37-*Ht2*, B37-*Ht3* und B37-*HtN* verwendet.

Für jedes der untersuchten Resistenzgene konnten virulente Isolate nachgewiesen werden. Insgesamt wurden zwölf verschiedene Rassen charakterisiert. Die vier häufigsten Rassen in beiden Probenahmejahren waren Rasse 0 mit 45%, die sich avirulent auf den untersuchten Resistenzgenen verhält, Rasse 1 (22%), Rasse 3 (15%) und Rasse 3N mit einem Anteil von 14%. Die Rassen 13, 23, 123, 2, 23N, 12, 1N und 13N hatten im Durchschnitt beider Jahre einen kumulierten Anteil von 4%. Der kumulierte Anteil der drei dominierenden Rassen 1, 3 und 3N lag im Mittel der beiden Jahre 2011 und 2012 bei 52%. In den nördlichen Küstenregionen Frankreichs, Belgiens und den Niederlanden dominierten avirulente Isolate der Rasse 0 mit einem Anteil von über 75%. In der Oberrheinregion waren 48% der charakterisierten Isolate virulent auf *Ht1* und 26% virulent auf *Ht3*. Sowohl in norddeutschen als auch in süddeutschen Maisanbaugebieten dominierte die Rasse 0. In der Region Niederbayern waren 44% der untersuchten Isolate virulent auf *Ht3*. In den Maisanbaugebieten von Tschechien und Polen lag der Anteil virulenter Isolate für *Ht1* bei 37%. Die Virulenzfrequenzen der intensiven Maisanbauregion im südwestlichen Frankreich lagen bei 45% für *Ht3* und 38% für *HtN*. Der hohe Anteil virulenter Isolate für das Resistenzgen *HtN* und die Dominanz der Rasse 3N mit einem Anteil von 38% stellte ein Alleinstellungsmerkmal für die Region Südwestfrankreich dar. Die Region Steiermark im südlichen Österreich ist durch langjährigen intensiven Maisanbau gekennzeichnet. Der Anteil virulenter Isolate für *Ht1* lag

hier bei 83%, was einen Wirkungsverlust dieses Resistenzgens in der Region bedeutet. Darüber hinaus wurde in dieser Region der höchste Anteil der hochkomplexen Rasse 123 nachgewiesen. Die Maisanbauregion in der Po-Ebene Norditaliens war durch eine hohe Virulenzfrequenz von 60% für *Ht3* gekennzeichnet.

Die *E. turcicum* Populationen insbesondere in den südlichen Regionen mit intensivem Maisanbau sind durch zum Teil sehr hohe Virulenzfrequenzen für *Ht1* und *Ht3* gekennzeichnet. Eine Verwendung dieser monogenen Resistenzen erscheint daher in den entsprechenden Regionen als wenig sinnvoll. In den nördlichen Küstenregionen kann vor allem *Ht1* mittelfristig einen Schutz vor der Turcicum-Blattdürre bieten. Für die Verhinderung großflächiger *E. turcicum*-Epidemien bietet eine Kombination aus dauerhafter quantitativer mit qualitativer Resistenz die einzige Möglichkeit, eine hohe Sortenresistenz zu erreichen.

Vor dem Hintergrund des ausgedehnten Maisanbaus sowohl in wärmeren Regionen in Südeuropa als auch in kühlen küstennahen Regionen in Nordeuropa war der Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit der Resistenzgene ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt dieses Projektes. Dazu wurden Klimakammerversuche mit dem Differentialsortiment aus nah-isogenen Linien des Genotyps B37 durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Resistenzgen *Ht2* durch einen Wirksamkeitsverlust bei Temperaturen unter 20°C gekennzeichnet ist. Darüber hinaus zeigte das Resistenzgen *Ht3* bei Temperaturen unter 15°C ebenfalls Wirksamkeitsverluste. Bei Temperaturen über 25°C war ein Virulenzverlust der untersuchten Rasse 123 gegenüber den Resistenzgenen *Ht2* und *Ht3* zu beobachten. Neben dem Einfluss der Temperatur konnte für das Resistenzgen *Ht2* eine deutliche Interaktion mit dem jeweiligen genetischen Hintergrund aufgezeigt werden. Die Nutzung von *Ht2* in frühreifen Sorten für die kühlen-nördlichen Anbauregionen erscheint aufgrund der Temperatursensitivität wenig sinnvoll.

Im Rahmen vergleichender histologischer Untersuchungen von kompatiblen mit inkompatiblen Interaktionen zur Pathogenese von *E. turcicum* in Mais wurden im Zeitverlauf des Infektions- und Besiedlungsprozesses für jedes der vier *Ht*-Resistenzgene drei Parameter erfasst, nämlich 1. Xylem-Penetrations-Effizienz, 2. Xylem-Besiedlungs-Effizienz und 3. Mesophyll-Besiedlungs-Effizienz. Es konnte gezeigt werden, dass die Passage der Xylemwand in den inkompatiblen Interaktionen für jedes der untersuchten *Ht*-Gene die entscheidende Resistenz-Barriere im Rahmen der Pathogenese von *E. turcicum* darstellt. Eine vollständige Verhinderung der Xylem-Penetration wurde durch keines der untersuchten *Ht*-Gene bewirkt. In den kompatiblen Interaktionen war das Resistenzgen *HtN* im Vergleich zu den anderen *Ht*-Genen weniger durch einen vollständigen Wirkungsverlust als durch eine zeitliche Verzögerung der Xylem-Penetration und der Mesophyll-Besiedlung gekennzeichnet.

## 6 Summary

In the last few years, the importance of *Exserohilum turcicum*, the causal agent of Northern Corn Leaf Blight (NCLB), has increased in European maize growing regions. The infestation of maize leaves by NCLB reduces the photosynthetically active leaf surface area and thereby leads to considerable yield losses. To ensure high and stable yields therefore, the use of resistant cultivars is the most effective method. The efficiency of monogenic resistances however is restricted, as virulent races of the pathogen which overcome the resistance keep emerging. One of the aims of this work was to determine the regional efficacy of NCLB resistance genes (R-genes) through race monitoring so as to recommend resistant cultivars to specific regions and provide relevant information that can be used in resistance breeding. Infested maize leaf samples were collected from 168 different locations of 10 European countries over the years 2011 and 2012. From these samples, 559 single spore isolates were successfully obtained and their virulence characteristics were thoroughly described. For the race classification, the disease reaction was assessed on a differential set of 5 near isogenic inbred lines: B37-*Ht0* (with no *Ht* gene), B37- *Ht1*, B37- *Ht2*, B37- *Ht3* and B37- *HtN*.

For each tested R-gene, at least one corresponding virulent isolate was found. In total 12 different races were characterized. Of which, the four dominant races were race 0 (which made up 45% and is avirulent to all the tested R-genes), race 1 (22%), race 3 (15%) and race 3N (14%). The remaining 8 races (13, 123, 23, 2, 23N, 12, 1N and 13N) represented a cumulated two years percentage of 4%. The cumulative two years average proportion of the 3 most dominant races (1, 3 and 3N) was 52%. Interestingly, in the northern and coastal regions of France, Belgium and the Netherlands which are known for their intense maize cultivation, race 0 was predominant making up over 75%. In the Upper Rhine Valley, characterized by higher temperatures and long tradition of maize cultivation, 48 and 26% of the isolates were found to be virulent on *Ht1* and *Ht3*, respectively. In the northern and southern regions of Germany, again with a history of intensive maize cultivation, the dominant race was race 0 directly followed by race 3. In the Inn valley in southeast Germany, 44% of the tested isolates were virulent on *Ht3*. In maize cultivation regions of Czech Republic and Poland, 37% of the isolates were virulent on *Ht1*. Isolates collected in south west France showed virulence frequencies of 45% for *Ht3* and 38% for *HtN*. The unique characteristic of this region, in contrast to the other regions considered in this study, was the high virulence frequency on *HtN* mainly due to race 3N which had a virulence percentage of 38%. In south-east France, especially in the Rhône-Alpes region, the virulence frequency for *Ht1* is higher than 50%. The region Steiermark in southern Austria is characterized by an intensive and long tradition of maize cultivation. The percentage of virulent isolates for *Ht1* in this region

was higher than 83%, indicating that the *Ht1* gene is no longer effective in the region. More importantly, the highest proportion of the highly complex race 123 was identified in this region. The maize cultivation region in north Italy was characterized by a high virulence frequency (60%) for *Ht3*.

The present study revealed that the European *E. turcicum* population is characterized by regional very high virulence frequencies particularly against *Ht1* and *Ht3* in the southern regions where intensive maize cultivation have been practiced for long period of time. It is thus not worthwhile to use these R-genes in these areas. In the northern coastal regions however, *Ht1* can probably deliver a medium-term protection against NCLB. Nevertheless, in order to prevent widespread *E. turcicum* epidemics and further slowdown the emergence of new virulent races, it is advisable to continuously use resistant cultivars that possess a combination of quantitative and qualitative resistance traits.

Like in the colder coastal regions of northern Europe, an extended cultivation of maize is being take place in the warmer regions of southern Europe. Accordingly, the effect of temperature on the efficiency of the R-genes was also a point of interest of this work. Hence, climate chamber experiments were conducted using a differential set of near isogenic lines derived from B37. The results showed that the efficiency of two R-genes, namely *Ht2* and *Ht3*, was reduced at temperatures below 20°C and 15°C, respectively. Furthermore, it was found that the race 123 appeared to be less virulent against the R-genes *Ht2* and *Ht3* at temperatures above 25°C. In addition to the temperature effect, the potential role of genetic background was evident. Due to their temperature sensitivity for example, the utilization of *Ht2* in early ripening cultivars in the cooler northern regions seems to be not helpful.

This study further addressed histological aspects of the compatible and incompatible interactions between *E. turcicum* and Maize. Efficient parameters (1. Xylem penetration efficiency, 2. Xylem colonization efficiency, 3. Mesophyll colonization efficiency ) that help to compare fungal colonization processes at different stages of infection were established. Using this method, it was found that the xylem wall was the crucial resistance barrier in the incompatible interactions of all the tested *Ht* genes. The complete prevention of xylem penetrations was not observed in any of the tested genotypes with *Ht* genes. In contrast to the other tested *Ht* genes, the *HtN* gene, in the compatible interactions, was characterized by a delayed xylem penetration and mesophyll colonization instead of a total loss of function of the R-gene.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abadi R, Y Levy, A Bar-Tsur (1989) Physiological races of *Exserohilum turcicum* in Israel. *Phytoparasitica*, 17 (1), 23–30.
- AGPM (2016) Association Générale des Producteurs de Maïs, The Maize Market & Economy in France. Online verfügbar unter <http://www.agpm.com/en/generalites.php>, zuletzt geprüft am 31.01.2016.
- Agrios GN (2008) Plant Pathology, Elsevier Academic Press Amsterdam, 5. Edition 2008.
- Andrison D, C Vallavieille-Pope (1993) Racial diversity and complexity in regional populations of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in France over a 5-year period. *Plant Pathology*, 42 (3), 443–464.
- Andrison D, C Vallavieille-Pope (1995) Race diversity and complexity in selected populations of fungal biotrophic pathogens of cereals. *Phytopathology*, 85 (8), 897–905.
- Anonymus 1 (2001) Richtlinie 2001/77/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. September 2001 zur Förderung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energiequellen im Elektrizitätsbinnenmarkt 2001.
- Anonymus 2 (2004) Gesetz zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich, Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 40, 1918-1930 2004.
- Baufeld P (2004) Quantification of maize production in selected EU countries, DIABROTICA Report, Europäische Kommission. Online verfügbar unter [http://cordis.europa.eu/result/rcn/33632\\_en.html](http://cordis.europa.eu/result/rcn/33632_en.html), zuletzt geprüft am 31.01.2016.
- Beck JJ (1998) Detection of maize fungal pathogens using the polymerase chain reaction, Patentschrift. Veröffentlichungsnr: 5,800,997.
- Becker H (1993) Pflanzenzüchtung, Ulmer Verlag Stuttgart 1993.
- Bennetzen, Jeff L.; Hake, Sarah C (2009) Chilling Stress in Maize Seedlings; Handbook of Maize: Its Biology, 291 - 310, New York, Springer New York.
- Bergquist R, O Masias (1974) Physiologic specialization in *Trichometasphaeria turcica* f. sp. *zea* and *T. turcica* in Hawaii. *Phytopathology*, 64, 645–649.
- Bigirwa G, AM Julian, E Adipala (1993) Characterization of Ugandan isolates of *Exserohilum turcicum* from maize. *African Crop Science Journal*, 1 (1), 69–72.
- Borchardt DS, HG Welz, HH Geiger (1998a) Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 88 (4), 322–329.

- Borchardt DS, HG Welz, HH Geiger (1998b) Molecular marker analysis of European *Setosphaeria turcica* populations. *European Journal of Plant Pathology*, 104 (6), 611–617.
- Bowen KL, WL Pedersen (1988) Effects of northern leaf blight and detasseling on yields and yield components of corn inbreds. *Plant Disease*, 72, 952–956.
- Brandfass C, P Karlovsky (2008) Upscaled CTAB-based DNA extraction and real-time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (11), 2306–2321.
- Brandt J (2014) Charakterisierung der Aggressivität von 12 europäischen *Exserohilum turcicum* Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften. Bachelorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- Bunkoed W, S Kasam, P Chaijuckam, J Yhamsoongnern, S Prathuangwong (2014) Sexual reproduction of *Setosphaeria turcica* in natural corn fields in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)* (48), 175–182.
- BVL (2016) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel in Deutschland mit Informationen über beendete Zulassungen Braunschweig 2016.
- Calub A, G Dunn, D Routley, R Couture (1974) Genetic and environmental effects on production of inhibitory compounds in corn resistant to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science*, 14 (3), 359–361.
- Carson, M L (1999) “Helminthosporium” Leaf Spots and Blights, in Compendium of Corn Diseases, Herausgeber: White DG, 3. Edition, St. Paul, American Phytopathological Society.
- Carson ML (1995) A new gene in maize conferring the “chlorotic halo” reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease*, 79 (7), 717–720.
- Ceballos H, VE Gracen (1989) A dominant inhibitor gene inhibits the expression of *Ht2* against *Exserohilum turcicum* race 2 in corn inbred lines related to B14. *Plant Breeding*, 102 (1), 35–44.
- Chung C, JM Longfellow, EK Walsh, Z Kerdieh, G van Esbroeck, P Balint-Kurti, RJ Nelson (2010) Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem. *BMC Plant Biology*, 10 (103).

- Condon BJ, Y Leng, D Wu, KE Bushley, RA Ohm, R Otilar et al. (2013) Comparative genome structure, secondary metabolite, and effector coding capacity across *Cochliobolus* pathogens. *PLoS Genetics*, 9 (1), e1003233.
- Courtoure R, D Routley, G Dunn (1971) Role of cyclic hydroxamic acid in monogenic resistance of maize to *Helminthosporium turcicum*. *Physiological Plant Pathology* 1 (4) 515–521.
- Cuq F, M Petitprez, S Herrmann-Gorline, A Kläebe, M Rossignol (1993) Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. *Phytochemistry*, 34 (5), 1265–1270.
- Degefu Y (2003) Cloning and characterisation of xylanase genes from phytopathogenic fungi with a special reference to *Helminthosporium turcicum*, the cause of northern leaf blight of maize. Dissertation, Helsinki
- DESTATIS (2016) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Online verfügbar unter [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/link/statistiken/41\\*](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/link/statistiken/41*), zuletzt geprüft am 08.03.2016.
- Dingerdissen AL, HH Geiger, M Lee, HG Welz (1996) Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcica*, cause of northern leaf blight, in a tropical environment. *Molecular Breeding*, 2 (2), 143–156.
- DMK (2016) Sortenspiegel der in Deutschland und der EU zugelassenen Maissorten. Deutsches Maiskomitee e.V., Bonn.
- Dong J, Y Fan, X Gui, X An, J Ma, Z Dong (2008) Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in northern China. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3 (1), 389–398.
- Eder B, B Büttner, G Schweizer, J Eder (2015) Bavarian maize landraces: history, agronomic traits and breeding activities. 65. *Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkauleute Österreichs 2014*, 65, 67–70.
- EUROSTAT (2016) Statistisches Amt der Europäischen Union. Online verfügbar unter <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do>, zuletzt geprüft am 08.03.2016.
- Fan Y, J Ma, X Gui, X An, S Sun, J Dong (2007) Distribution of mating types and genetic diversity induced by sexual recombination in *Setosphaeria turcica* in northern China. *Frontiers of Agriculture in China*, 1 (4), 368–376.
- Ferguson LM, ML Carson (2004) Spatial diversity of *Setosphaeria turcica* sampled from the eastern United States. *Phytopathology*, 94 (8), 892–900.

- Ferguson LM, ML Carson (2007) Temporal variation in *Setosphaeria turcica* between 1974 and 1994 and origin of races 1, 23, and 23N in the United States. *Phytopathology*, 97 (11), 1501–1511.
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust. *Phytopathology*, 45, 680–685.
- Frey M (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 277 (5326), 696–699.
- Freymark LWM (1993) Quantitative and qualitative trait loci affecting host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 87, 537–544.
- Gevers HO (1975) New major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. *Plant Disease Reporter*, 59 (4), 296–299.
- Hallauer AR (2008) Corn Breeding. *Iowa State Research Farm Progress Reports*, 475.
- Hilu HM, AL Hooker (1964) Host-pathogen relationship of *Helminthosporium turcicum* in resistant and susceptible corn seedlings. *Phytopathology*, 54, 570–575.
- Hooker AL (1963) Inheritance of chlorotic-lesion Resistance to *Helminthosporium turcicum* in seedling corn. *Phytopathology*, 53, 660–662.
- Hooker AL (1977) A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science*, 17 (1), 132–135.
- Hooker AL (1981) Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 55, 87–88.
- Hovmøller MS, S Walter, RA Bayles, A Hubbard, K Flath, N Sommerfeldt et al. (2015) Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathology*, 10.1111/ppa.12433
- Hurni S, D Scheuermann, SG Krattinger, B Kessel, T Wicker, G Herren et al. (2015) The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112 (28) 8780–8785.
- Imgraben H (2002) Die Turcicum-Blattdürre – ein neues Problem. *Innovation* (4), 10–11.
- Johnson R, AJ Taylor (1976) Spore yield of pathogens in investigations of the race-specificity of host resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 14 (1), 97–119.

- Jordan EG, JM Perkins, RA Schall, WL Pedersen (1983) Occurrence of race 2 of *Exserohilum turcicum* on corn in the central and Eastern United States. *Plant Disease*, 67 (10), 1163–1165.
- Knox-Davies P (1974) Penetration of maize leaves by *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 64, 1468–1469.
- Krausz JP, RA Fredericksen, OR Rodrigues-Ballesteros (1993) Epidemic of northern corn leaf blight in Texas in 1992. *Plant Disease*, 77, 1063.
- Leath S, W Pedersen (1986) Differences in resistance between maize hybrids with or without *Ht1* gene when infected with *Exserohilum turcicum* race 2. *Phytopathology*, 76 (3), 257–260.
- Leath S, R Thakur, K Leonard (1990) Variation in Expression of monogenic resistance in corn to *Exserohilum turcicum* Race 3 (Today race: 23) under different temperature and light regimes. *Phytopathology* 80 (3), 309-3013
- Leonard KJ, S Leath (1986) Evidence that race 1 of *Setosphaeria turcica* caused the 1985 northern corn leaf blight epidemic in North Carolina. *Plant Disease*, 70 (10), 981.
- Leonard KJ, Y Levy, DR Smith (1989) Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant Disease*, 73 (9), 776–777.
- Levic J, D Ivanovic, S Stankovic (2007) Genetic variability of maize pathogens in Serbia. *Genetika*, 39 (2), 227–240.
- Levy Y (1984) The overwintering of *Exserohilum turcicum* in Israel. *Phytoparasitica*, 12 (3-4), 177–182.
- Levy Y, Y Cohen (1983) Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology*, 73 (5), 722.
- Levy Y, K Leonard (1990) Yield loss in sweet corn in response to defoliation or Infection by *Exserohilum turcicum*. *Journal of Phytopathology*, 128 (2), 161–171.
- Lipps PE, RC Pratt, JJ Hakiza (1997) Interaction of *Ht* and partial resistance to *Exserohilum turcicum* in maize. *Plant Disease*, 81, 277–282.
- Long B, G Dunn, D Routley (1978) Relationship of hydroxamate concentration in maize and field reaction to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science*, 18 (4), 573-575.
- Mace M (1973) Histochemistry of beta-glucosidase in isolines of *Zea mays* L. susceptible or resistant to northern corn leaf blight. *Phytopathology*, 63, 243–245.

- McDonald BA, C Linde (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40 (1), 349–379.
- Meissle M, P Mouron, T Musa, F Bigler, X Pons, VP Vasileiadis et al. (2010) Pests, pesticide use and alternative options in European maize production. Current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology*, 134 (5), 357–375.
- Mendgen K, M Hahn, H Deising (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 34 (1), 367–386.
- Meredith DS (1966) Airborne conidia of *Helminthosporium turcicum* in Nebraska. *Phytopathology*, 56, 949–952.
- Miedaner T (2011) Resistenzgenetik und Resistenzzüchtung, DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
- Moghaddam PF, JK Pataky (1994) Reactions of isolates from matings of races 1 and 23N of *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease*, 78 (8), 767–771.
- Muiru WM, B Koopmann, A v Tiedemann, JW Kimenju (2010) Race typing and evaluation of aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6 (3), 277–284.
- Muiru WM, EW Mutitu, JW Kimenju, B Koopmann, A v Tiedemann (2008) Infectious structures and response of maize plants to invasion by *Exserohilum turcicum* (Pass). in compatible and incompatible host pathogen systems. *Journal of Applied Biosciences*, 10 (2), 532–537.
- Obi I, A Hooker, S Lim (1980) Phytoalexin production by corn plants with different genetic backgrounds having chlorotic-lesion resistance against *Helminthosporium turcicum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 87 (4), 244–251.
- Ogliari JB, MA Guimarães, LEA Camargo (2007) Chromosomal locations of the maize (*Zea mays* L.) *HtP* and *rt* genes that confer resistance to *Exserohilum turcicum*. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3), 630–634.
- Ogliari JB, MA Guimarães, IO Geraldi, LEA Camargo (2005) New resistance genes in the *Zea mays*-*Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3), 435–439.
- Pataky J (1992) Relationship between yield of sweet corn and northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology*, 82 (3), 370–375.

- Pataky JK (1994) Effects of races 0 and 1 of *Exserohilum turcicum* on sweet corn hybrids differing for *Ht* and partial resistance to northern leaf blight. *Plant Disease*, 78 (12), 1189–1193.
- Pataky JK, T Ledencan (2006) Resistance conferred by the *Ht1* gene in sweet corn infected by mixtures of virulent and avirulent *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease*, 90 (6), 771–776.
- Pataky JK, JM Perkins, S Leath (1986) Effects of qualitative and quantitative resistance on the development and spread of northern leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum* Races 1 and 2. *Phytopathology*, 76, 1349–1352.
- Pataky JK, MM Williams, JM Headrick, C Nankam, LJ Du Toit, PM Michener (2011) Observations from a quarter century of evaluating reactions of sweet corn hybrids in disease nurseries. *Plant Disease*, 95 (12), 1492–1506.
- Paul PA, LV Madden, CA Bradley, AE Robertson, GP Munkvold, G Shaner (2011) Meta-analysis of yield response of hybrid field corn to foliar fungicides in the U.S. corn belt. *Phytopathology*, 101 (9), 1122–1132.
- Pedersen WL, JM Perkins, JA Radtke, J Miller (1986) Field evaluation of corn inbreds and selections for resistance to *Exserohilum turcicum* race 2. *Plant Disease*, 70 (5), 376–377.
- Raymundo AD, AL Hooker (1982) Single and combined effects of monogenic and polygenic resistance on certain components of northern corn leaf blight development. *Phytopathology* (72), 99–103.
- Raymundo AD, AL Hooker, JM Perkins (1981) Effect of gene *HtN* on the development of northern corn leaf blight epidemics. *Plant Disease*, 65 (4), 327.
- Robbins WA, HL Warren (1993) Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. *Maydica*, 38 (3), 209–213.
- Schmidt W (2003) Hybridmaiszüchtung bei der KWS SAAT AG. *Bericht über die 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*.
- Schuhmann P (1986) Kartoffelproduktion in den Niederlanden. *agrartechnik*, 7 (36), 307–308.
- Simcox KD, JL Bennetzen (1993) The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize. *Phytopathology*, 83 (12), 1326.
- Smith DR, JG Kinsey (1980) Further physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum*. *Plant Disease*, 64 (8), 779–781.

- Thakur RP, KJ Leonard, RK Jones (1989a) Characterization of a new race of *Exserohilum turcicum* virulent on corn with resistance gene *HtN*. *Plant Disease*, 73 (2), 151.
- Thakur RP, KJ Leonard, S Leath (1989b) Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn. *Phytopathology*, 79 (6), 631.
- Ullstrup AJ (1970) A comparison of monogenic and polygenic resistance to *Helminthosporium turcicum* in corn. *Phytopathology*, 60, 1597-1599
- Vallavieille-Pope C de, S Ali, M Leconte, J Enjalbert, M Delos, J Rouzet (2012) Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis f. sp. tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Disease*, 96 (1), 131–140.
- Wang H, H Li, Z Zhu, X Wang (2010) Expression of *Ht2*-related genes in response to the HT-Toxin of *Exserohilum turcicum* in Maize. *Annals of Applied Biology*, 156 (1), 111–120.
- Weiss J (2002) Mais – tiergerecht und qualitätsbewusst veredeln, Deutsches Maiskomitee e.V., Bonn
- Welz HG, A Schechert, D Borchardt, H Geiger (1997) Genetische Studien zur Wirtsresistenz und Erregervariabilität im Pathosystem *Zea mays* / *Setosphaeria turcica*. *Vorträge Pflanzenzüchtung - Angewandte Genetik im Dienst der Welternährung; Forschungsschwerpunkt Biotechnologie und Pflanzenzüchtung*, Hohenheim (38), 97–127.
- Welz HG (1998) Genetics and epidemiology of the pathosystem *Zea mays* / *Setosphaeria turcica*. Habilitation, Hohenheim.
- Welz HG, P Bassetti, HH Geiger (1996) Turcicum-Blattdürre und Aleppohirse: zwei Schaderreger auf dem Vormarsch. *Mais*, 24, 66–68.
- Welz HG, HH Geiger (1995) Globale Variation und Genetik der qualitativen Virulenz von *Setosphaeria turcica*, dem Erreger des „Northern corn leaf blight“. *Bericht über die 46. Arbeitstagung 1995 der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter im Rahmen der „Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter“*, BAL Gumpenstein.
- Welz HG, HH Geiger (2000) Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant Breeding*, 119 (1), 1–14.
- Welz HG, XC Xiao, P Bassetti, AE Melchinger, T Lübberstedt (1999) QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in an early maturing Dent x Flint maize population. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 (3-4), 649–655.

WIFO (2015) Maisanbau in Österreich – Zahlen & Fakten. Studie vom Österreichischen Institut für Wirtschaftsforschung. Universität für Bodenkultur Wien

Wilcox HE, LC Marsh (2009) Staining plant tissues with Chlorazol Black E and Pianese III-B. *Stain Technology*, 39 (2), 81–86.

Wolfe MS, JM McDermott (1994) Population genetics of plant pathogen interactions. The example of the *Erysiphe Graminis-Hordeum vulgare* pathosystem. *Annual Review of Phytopathology*, 32 (1), 89–113.

## Anhang

**Tab. 1A: Alle im Rahmen des Rassen-Monitorings untersuchte Isolate mit Rassencharakterisierung, Herkunftsinformationen und Jahr, sortiert nach Regionen.**

Nr.	Isolat	Rasse	Standort	Region	Land	Jahr
1	15_1	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
2	15_4	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
3	39_1	0	Bulat-Pestivien	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
4	39_2	0	Bulat-Pestivien	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
5	39_3	0	Bulat-Pestivien	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
6	39_4	0	Bulat-Pestivien	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
7	40_1	0	Chákeaulin	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
8	40_2	0	Chákeaulin	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
9	46_1	3	Saint-Renan	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
10	46_2	3	Saint-Renan	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
11	46_3	3N	Saint-Renan	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
12	46_4	3N	Saint-Renan	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
13	64_1	0	Fleurigné	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
14	64_2	0	Fleurigné	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
15	64_3	0	Fleurigné	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
16	64_4	0	Fleurigné	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
17	76_2	0	Les Cresnays	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
18	76_3	0	Les Cresnays	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
19	76_4	0	Les Cresnays	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
20	77_1	0	Breuville	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
21	77_2	0	Breuville	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
22	77_3	0	Breuville	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
23	77_4	0	Breuville	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
24	97_1	0	Guirliliau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
25	97_2	0	Guirliliau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
26	97_3	0	Guirliliau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
27	97_4	0	Guirliliau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
28	113_3	0	La Meziere	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
29	113_4	0	La Meziere	Bretagne/Normandie	Frankreich	2011
30	145_1	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2012
31	145_2	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2012
32	145_3	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2012
33	145_4	0	Ploudalmézeau	Bretagne/Normandie	Frankreich	2012
34	148_3	0	Quimperle	Bretagne/Normandie	Frankreich	2012
35	1_1	0	Hinx	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
36	1_2	0	Hinx	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
37	1_4	0	Hinx	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
38	2_1	1	Coublucq Pyrénées	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
39	2_2	1	Coublucq Pyrénées	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
40	2_4	1	Coublucq Pyrénées	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
41	11_2	3N	Alzonne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
42	11_3	3N	Alzonne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
43	11_4	3	Alzonne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
44	16_1	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
45	16_2	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
46	25_1	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
47	25_2	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
48	25_3	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011

49	25_4	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
50	26_2	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
51	26_3	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
52	26_4	3N	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
53	27_1	3	Saint Etienne	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
54	28_1	3N	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
55	28_2	0	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
56	28_3	0	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
57	28_4	0	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
58	29_1	0	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
59	29_2	0	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
60	29_3	3N	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
61	29_4	3	Orthevielle	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
62	34_2	1	Monheurt	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
63	34_3	1	Monheurt	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
64	34_4	1	Monheurt	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
65	35_1	0	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
66	35_2	0	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
67	35_3	3	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
68	36_1	0	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
69	36_2	1	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
70	36_3	1	Saint Léger	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
71	44_1	1	Bernac	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
72	44_2	1	Bernac	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
73	44_3	1	Bernac	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
74	44_4	1	Bernac	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
75	101_2	3N	Souprosse	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
76	101_3	0	Souprosse	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
77	101_4	3N	Souprosse	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
78	102_1	1	Mau Bourguet	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
79	102_2	1	Mau Bourguet	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
80	103_1	3N	Tartas	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
81	103_2	3N	Tartas	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
82	103_3	3N	Tartas	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
83	103_4	3N	Tartas	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
84	104_1	1	südwest Frankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
85	104_2	1	südwest Frankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
86	104_3	3N	südwest Frankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
87	104_4	0	südwest Frankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2011
88	127_1	3N	Peyrehorade	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
89	127_2	3N	Peyrehorade	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
90	127_3	3N	Peyrehorade	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
91	127_4	3N	Peyrehorade	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
92	130_1	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
93	130_2	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
94	130_3	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
95	130_4	0	Sabres	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
96	131_2	1	Auch	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
97	131_3	1	Auch	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
98	131_4	0	Auch	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
99	140_1	3	westl. v. Toulouse	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
100	140_2	3N	westl. v. Toulouse	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
101	140_3	3N	westl. v. Toulouse	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
102	140_4	3N	westl. v. Toulouse	Südwestfrankreich	Frankreich	2012

103	144_1	0	Meilhan	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
104	144_2	0	Meilhan	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
105	144_3	0	Meilhan	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
106	144_4	0	Meilhan	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
107	164_1	3N	Südwestfrankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
108	164_2	3N	Südwestfrankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
109	164_3	3N	Südwestfrankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
110	164_4	3N	Südwestfrankreich	Südwestfrankreich	Frankreich	2012
111	4_4	23	Codroipo	Italien PO Ebene	Italien	2011
112	5_1	0	Ferrera	Italien PO Ebene	Italien	2011
113	5_2	0	Ferrera	Italien PO Ebene	Italien	2011
114	21_2	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
115	21_3	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
116	21_4	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
117	22_1	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
118	22_3	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
119	22_4	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
120	23_1	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
121	23_2	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
122	23_3	3	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
123	24_1	13	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
124	24_2	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
125	24_3	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
126	24_4	0	Monselice	Italien PO Ebene	Italien	2011
127	125_1	3	Udine	Italien PO Ebene	Italien	2012
128	125_2	3N	Udine	Italien PO Ebene	Italien	2012
129	125_3	3	Udine	Italien PO Ebene	Italien	2012
130	125_4	3	Udine	Italien PO Ebene	Italien	2012
131	65_1	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
132	65_2	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
133	65_3	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
134	65_4	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
135	78_1	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
136	78_3	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
137	78_4	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
138	79_1	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
139	79_2	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
140	79_3	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
141	79_4	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
142	80_1	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
143	80_2	2	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
144	80_3	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
145	80_4	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
146	81_1	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
147	81_2	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
148	81_3	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
149	81_4	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
150	82_1	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
151	82_2	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
152	82_3	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
153	82_4	0	Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
154	86_1	0	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
155	86_2	0	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
156	86_3	0	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011

157	86_4	0	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
158	96_1	0	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
159	96_2	0	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
160	96_3	0	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
161	96_4	0	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2011
162	100_1	0	Kamp-Lintfort	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
163	100_2	0	Kamp-Lintfort	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
164	100_3	2	Kamp-Lintfort	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
165	100_4	0	Kamp-Lintfort	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
166	105_2	0	Geldern	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
167	105_3	0	Geldern	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
168	105_4	0	Geldern	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
169	110_1	23	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
170	110_2	0	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
171	110_3	0	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
172	110_4	3	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2011
173	116_1	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
174	116_2	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
175	116_4	0	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2011
176	151_1	0	Sinaai	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
177	151_2	0	Sinaai	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
178	151_3	0	Sinaai	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
179	151_4	0	Sinaai	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
180	159_1	3	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
181	159_4	3N	Lochem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
182	160_1	3N	Barchem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
183	160_2	3N	Barchem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
184	160_3	3N	Barchem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
185	160_4	3	Barchem	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
186	161_1	2	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
187	161_3	0	Dronten	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
188	162_1	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
189	162_2	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
190	162_3	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
191	162_4	0	Beervelde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
192	163_1	3N	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
193	163_3	3	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
194	163_4	3N	Sint-Maria-Lierde	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
195	166_1	3N	Rekken/Enschede	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
196	166_2	3N	Rekken/Enschede	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
197	166_3	3N	Rekken/Enschede	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
198	166_4	3N	Rekken/Enschede	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
199	167_1	0	Breda	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
200	167_3	0	Breda	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
201	167_4	0	Breda	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
202	168_1	0	Overloon	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
203	168_2	3	Overloon	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
204	168_3	0	Overloon	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
205	168_4	0	Overloon	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
206	169_1	0	Helmond	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
207	169_2	0	Helmond	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
208	169_3	0	Helmond	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
209	169_4	0	Helmond	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
210	170_1	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012

211	170_2	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
212	170_3	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
213	170_4	0	Wilbertoord	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
214	171_1	0	Hengelo	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
215	171_2	0	Hengelo	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
216	171_3	0	Hengelo	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
217	171_4	0	Hengelo	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
218	172_2	0	Zwolle	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
219	172_3	0	Zwolle	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
220	172_4	0	Zwolle	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
221	173_1	3	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
222	173_2	3	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
223	173_3	3	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
224	173_4	0	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
225	174_1	0	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
226	174_2	0	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
227	174_3	3N	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
228	174_4	3N	Weert	Niederlande/Belgien	Niederlande	2012
229	175_1	3N	Dessel/Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
230	175_2	0	Dessel/Postel	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
231	176_1	0	Bocholt	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
232	176_2	0	Bocholt	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
233	176_3	0	Bocholt	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
234	176_4	0	Bocholt	Niederlande/Belgien	Belgien	2012
235	200_2	0	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2012
236	200_3	3	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2012
237	200_4	0	Alpen	Niederlande/Belgien	Deutschland	2012
238	3_1	3N	Bad Lauchstadt	Norddeutschland	Deutschland	2011
239	17_1	0	Ostbevern	Norddeutschland	Deutschland	2011
240	17_2	0	Ostbevern	Norddeutschland	Deutschland	2011
241	17_3	0	Ostbevern	Norddeutschland	Deutschland	2011
242	17_4	0	Ostbevern	Norddeutschland	Deutschland	2011
243	83_1	1	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2011
244	83_2	1	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2011
245	83_3	1	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2011
246	83_4	1	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2011
247	91_1	1	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2011
248	91_2	1	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2011
249	91_3	13	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2011
250	91_4	13	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2011
251	109_1	0	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2011
252	109_2	0	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2011
253	109_3	0	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2011
254	133_1	3	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2012
255	133_2	3	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2012
256	133_3	3	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2012
257	133_4	3	Göritz	Norddeutschland	Deutschland	2012
258	137_1	3	Edesheim/Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
259	137_2	3	Edesheim/Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
260	137_3	3	Edesheim/Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
261	137_4	3N	Edesheim/Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
262	142_1	3	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
263	143_1	0	Lorup	Norddeutschland	Deutschland	2012
264	143_2	0	Lorup	Norddeutschland	Deutschland	2012

265	143_3	0	Lorup	Norddeutschland	Deutschland	2012
266	143_4	0	Lorup	Norddeutschland	Deutschland	2012
267	153_1	3	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
268	153_2	3	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
269	153_3	3N	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
270	153_4	3	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
271	156_1	3N	Beesten	Norddeutschland	Deutschland	2012
272	156_2	3N	Beesten	Norddeutschland	Deutschland	2012
273	156_3	3	Beesten	Norddeutschland	Deutschland	2012
274	156_4	3N	Beesten	Norddeutschland	Deutschland	2012
275	177_1	0	Kiel (SH)	Norddeutschland	Deutschland	2012
276	177_2	0	Kiel (SH)	Norddeutschland	Deutschland	2012
277	177_3	0	Kiel (SH)	Norddeutschland	Deutschland	2012
278	195_1	3	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2012
279	195_2	3	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2012
280	195_3	3	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2012
281	195_4	3	Bergen	Norddeutschland	Deutschland	2012
282	197_1	0	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
283	197_2	0	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
284	197_3	0	Einbeck	Norddeutschland	Deutschland	2012
285	18_1	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
286	18_2	0	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
287	18_3	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
288	18_4	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
289	19_1	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
290	19_2	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
291	19_3	1	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2011
292	20_1	0	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2011
293	20_2	0	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2011
294	20_4	0	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2011
295	68_1	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2011
296	68_2	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2011
297	68_4	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2011
298	84_1	1	Illarsaz	Oberrheinregion	Schweiz	2011
299	84_2	1	Illarsaz	Oberrheinregion	Schweiz	2011
300	84_3	1	Illarsaz	Oberrheinregion	Schweiz	2011
301	84_4	1	Illarsaz	Oberrheinregion	Schweiz	2011
302	88_1	1	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
303	88_2	1	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
304	88_3	1	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
305	88_4	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
306	89_1	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
307	89_2	1	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
308	89_3	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
309	89_4	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
310	90_1	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
311	90_2	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
312	90_3	0	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
313	90_4	1	Rustenhart	Oberrheinregion	Frankreich	2011
314	99_3	1	Marckolsheim	Oberrheinregion	Frankreich	2011
315	99_4	1	Marckolsheim	Oberrheinregion	Frankreich	2011
316	107_1	0	Gondelsheim	Oberrheinregion	Deutschland	2011
317	119_1	1	Zürich	Oberrheinregion	Schweiz	2011
318	136_1	3	Ottmarsheim/Elsass	Oberrheinregion	Frankreich	2012

319	136_2	0	Ottmarsheim/Elsass	Oberrheinregion	Frankreich	2012
320	136_3	3	Ottmarsheim/Elsass	Oberrheinregion	Frankreich	2012
321	136_4	0	Ottmarsheim/Elsass	Oberrheinregion	Frankreich	2012
322	138_1	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
323	138_2	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
324	138_3	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
325	138_4	1	Fessenheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
326	139_1	0	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2012
327	139_2	3	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2012
328	139_3	0	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2012
329	139_4	0	Hombourg	Oberrheinregion	Frankreich	2012
330	152_1	3N	Hombrechtikon	Oberrheinregion	Schweiz	2012
331	152_2	3	Hombrechtikon	Oberrheinregion	Schweiz	2012
332	152_3	3N	Hombrechtikon	Oberrheinregion	Schweiz	2012
333	152_4	3N	Hombrechtikon	Oberrheinregion	Schweiz	2012
334	154_1	1	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2012
335	154_2	1	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2012
336	154_3	1	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2012
337	154_4	13N	Seebach	Oberrheinregion	Frankreich	2012
338	155_1	1	Breushwickersheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
339	155_2	1	Breushwickersheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
340	155_3	1	Breushwickersheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
341	155_4	1	Breushwickersheim	Oberrheinregion	Frankreich	2012
342	189_1	3	Dachsen/8447	Oberrheinregion	Schweiz	2012
343	189_2	3	Dachsen/8447	Oberrheinregion	Schweiz	2012
344	189_3	3N	Dachsen/8447	Oberrheinregion	Schweiz	2012
345	189_4	3N	Dachsen/8447	Oberrheinregion	Schweiz	2012
346	191_1	0	Rheinau/8462	Oberrheinregion	Schweiz	2012
347	191_2	0	Rheinau/8462	Oberrheinregion	Schweiz	2012
348	191_3	0	Rheinau/8462	Oberrheinregion	Schweiz	2012
349	191_4	0	Rheinau/8462	Oberrheinregion	Schweiz	2012
350	192_1	3N	Watt/8105	Oberrheinregion	Schweiz	2012
351	192_3	3	Watt/8105	Oberrheinregion	Schweiz	2012
352	192_4	3N	Watt/8105	Oberrheinregion	Schweiz	2012
353	193_1	1	Ins/3212	Oberrheinregion	Schweiz	2012
354	193_3	3N	Ins/3212	Oberrheinregion	Schweiz	2012
355	194_1	3N	Birrhard/5244	Oberrheinregion	Schweiz	2012
356	194_2	3N	Birrhard/5244	Oberrheinregion	Schweiz	2012
357	194_3	3	Birrhard/5244	Oberrheinregion	Schweiz	2012
358	194_4	3	Birrhard/5244	Oberrheinregion	Schweiz	2012
359	196_1	1	Colmar	Oberrheinregion	Frankreich	2012
360	196_3	1	Colmar	Oberrheinregion	Frankreich	2012
361	196_4	1	Colmar	Oberrheinregion	Frankreich	2012
362	30_1	1	St.Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
363	30_2	1	St.Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
364	30_3	1	St.Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
365	30_4	1	St.Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
366	47_1	1	Groß St. Florian	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
367	47_2	1	Groß St. Florian	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
368	47_3	3	Groß St. Florian	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
369	47_4	1	Groß St. Florian	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
370	48_1	123	Fehring	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
371	48_2	1	Fehring	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
372	48_3	123	Fehring	Österreich/Ungarn	Österreich	2011

373	48_4	1	Fehring	Österreich/Ungarn	Österreich	2011
374	61_1	0	Nak	Österreich/Ungarn	Ungarn	2011
375	61_2	1	Nak	Österreich/Ungarn	Ungarn	2011
376	61_3	13	Nak	Österreich/Ungarn	Ungarn	2011
377	61_4	0	Nak	Österreich/Ungarn	Ungarn	2011
378	149_1	1	Sankt Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
379	149_2	13	Sankt Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
380	149_3	1	Sankt Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
381	149_4	1N	Sankt Kind	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
382	150_1	1	Gleisdorf	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
383	150_2	0	Gleisdorf	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
384	150_3	1	Gleisdorf	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
385	150_4	1	Gleisdorf	Österreich/Ungarn	Österreich	2012
386	114_1	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
387	114_2	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
388	114_3	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
389	115_1	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
390	115_3	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
391	115_4	0	Ribadeo	Spanien (Galicien)	Spanien	2011
392	6_1	1	Thenn	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
393	6_2	1	Thenn	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
394	7_1	13	Thenn	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
395	8_1	23	Arnstorf-Lindach	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
396	8_2	0	Arnstorf-Lindach	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
397	8_3	23	Arnstorf-Lindach	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
398	8_4	0	Arnstorf-Lindach	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
399	9_1	0	Pocking/Schönburg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
400	9_2	0	Pocking/Schönburg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
401	9_3	0	Pocking/Schönburg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
402	9_4	0	Pocking/Schönburg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
403	10_1	0	Pocking/Börnau	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
404	10_2	0	Pocking/Börnau	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
405	10_3	1	Pocking/Börnau	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
406	10_4	0	Pocking/Börnau	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
407	12_1	3	Elgersdorf (SN)	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
408	13_1	0	Welbhausen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
409	14_1	1	Poching/Eggershaum	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
410	14_2	0	Poching/Eggershaum	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
411	14_3	0	Poching/Eggershaum	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
412	14_4	0	Poching/Eggershaum	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
413	31_1	123	Hartkirchen	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
414	31_2	3	Hartkirchen	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
415	31_4	0	Hartkirchen	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
416	32_1	1	Gleisdorf	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
417	32_4	1	Gleisdorf	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
418	37_1	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
419	37_2	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
420	37_3	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
421	37_4	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
422	38_2	3	Grucking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
423	38_3	3	Grucking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
424	69_1	3	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
425	69_2	1	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
426	69_3	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011

427	69_4	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
428	70_1	3	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
429	70_2	3	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
430	70_3	3	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
431	70_4	3	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
432	71_3	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
433	71_4	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
434	72_1	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
435	72_2	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
436	73_1	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
437	73_2	0	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
438	73_3	1	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
439	73_4	13	Pocking/Maierhof	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
440	87_1	3N	Wilhering	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
441	87_2	3	Wilhering	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
442	87_3	3N	Wilhering	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
443	87_4	3N	Wilhering	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2011
444	92_1	0	Ulm	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
445	92_2	0	Ulm	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
446	92_3	0	Ulm	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
447	92_4	0	Ulm	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2011
448	128_1	3	Tabertshausen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
449	128_2	3	Tabertshausen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
450	128_3	3	Tabertshausen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
451	128_4	0	Tabertshausen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
452	132_1	0	Wenig im Innkreis	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2012
453	132_2	3	Wenig im Innkreis	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2012
454	132_3	3	Wenig im Innkreis	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2012
455	132_4	0	Wenig im Innkreis	Süddeutschland/Österreich	Österreich	2012
456	134_1	3	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
457	134_2	1	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
458	134_3	0	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
459	134_4	0	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
460	135_3	0	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
461	135_4	0	Pocking	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
462	141_1	1	Gschaid	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
463	141_2	0	Gschaid	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
464	141_3	3	Gschaid	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
465	141_4	3N	Gschaid	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
466	180_1	3N	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
467	180_2	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
468	180_3	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
469	180_4	3	Künzing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
470	181_1	1	Bad Füssing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
471	181_2	0	Bad Füssing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
472	181_3	3N	Bad Füssing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
473	181_4	1	Bad Füssing	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
474	182_1	3	Wartenberg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
475	182_2	0	Wartenberg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
476	182_3	0	Wartenberg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
477	182_4	1	Wartenberg	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
478	198_1	3N	Rieden a.d. Kötz	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
479	198_2	3N	Rieden a.d. Kötz	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
480	198_3	3N	Rieden a.d. Kötz	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012

481	199_2	3N	Strasskirchen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
482	199_3	0	Strasskirchen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
483	199_4	1	Strasskirchen	Süddeutschland/Österreich	Deutschland	2012
484	112_1	0	Gluchow	Tschechien/Polen	Polen	2011
485	112_2	0	Gluchow	Tschechien/Polen	Polen	2011
486	112_3	0	Gluchow	Tschechien/Polen	Polen	2011
487	178_1	0	Hrubčice	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
488	178_2	0	Hrubčice	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
489	178_3	1	Hrubčice	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
490	178_4	0	Hrubčice	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
491	179_1	1	Garzyn	Tschechien/Polen	Polen	2012
492	179_2	1	Garzyn	Tschechien/Polen	Polen	2012
493	179_3	1	Garzyn	Tschechien/Polen	Polen	2012
494	179_4	0	Garzyn	Tschechien/Polen	Polen	2012
495	183_1	1	Kojecin	Tschechien/Polen	Polen	2012
496	183_2	0	Kojecin	Tschechien/Polen	Polen	2012
497	183_3	0	Kojecin	Tschechien/Polen	Polen	2012
498	183_4	1	Kojecin	Tschechien/Polen	Polen	2012
499	184_2	3N	Velim	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
500	184_3	3N	Velim	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
501	184_4	3N	Velim	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
502	185_1	1	Olomouc	Tschechien/Polen	Tschechien	2012
503	122_1	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
504	122_2	23N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
505	122_3	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
506	122_4	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
507	123_1	0	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
508	123_2	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
509	123_3	23N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
510	123_4	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
511	124_1	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
512	124_2	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
513	124_3	3N	Adana	Türkei (Adana)	Türkei	2012
514	41_1	1	Grenoble	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
515	41_2	1	Grenoble	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
516	41_3	1	Grenoble	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
517	42_1	0	José/Avergne	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
518	42_2	3N	José/Avergne	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
519	42_3	3	José/Avergne	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
520	43_1	1	Lezay	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
521	43_2	12	Lezay	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
522	43_3	1	Lezay	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
523	43_4	1	Lezay	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
524	45_1	0	03240 Saint-Sornin	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
525	45_2	1	3241 Saint-Sornin	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
526	45_3	3	3242 Saint-Sornin	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
527	45_4	3N	3243 Saint-Sornin	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
528	66_1	1	Villy le Montier	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
529	66_2	1	Villy le Montier	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
530	66_3	1	Villy le Montier	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
531	66_4	1	Villy le Montier	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
532	67_1	0	St Vincent de Mercoze	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
533	67_2	0	St Vincent de Mercoze	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
534	67_3	0	St Vincent de Mercoze	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011

535	67_4	0	St Vincent de Mercoze	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
536	85_1	1	Frenières-sur-Bex	Zentralfrankreich/Westschweiz	Schweiz	2011
537	85_3	3	Frenières-sur-Bex	Zentralfrankreich/Westschweiz	Schweiz	2011
538	85_4	3	Frenières-sur-Bex	Zentralfrankreich/Westschweiz	Schweiz	2011
539	98_1	1	Certines	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
540	98_2	1	Certines	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
541	98_3	1	Certines	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
542	98_4	1	Certines	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2011
543	146_1	0	La Ferté-Hauterive	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
544	146_2	0	La Ferté-Hauterive	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
545	146_3	0	La Ferté-Hauterive	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
546	146_4	2	La Ferté-Hauterive	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
547	157_1	0	Viabon	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
548	158_1	0	Tignieu	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
549	158_3	3	Tignieu	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
550	158_4	3	Tignieu	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
551	186_1	1	Saint Andre de Corcy	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
552	186_3	1	Saint Andre de Corcy	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
553	186_4	0	Saint Andre de Corcy	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
554	187_2	1	Aubigny-sur-Nère	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
555	187_4	1	Aubigny-sur-Nère	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
556	188_1	3N	La Côte-Saint-André	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
557	188_2	1	La Côte-Saint-André	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
558	188_3	1	La Côte-Saint-André	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012
559	188_4	1	La Côte-Saint-André	Zentralfrankreich/Westschweiz	Frankreich	2012



Abb. 1A: Befallsreaktionen im Anfangsstadium an Mais nach *E. turcicum* Infektion im Freiland mit Gegenlicht, links: kompatible Interaktion grau/grüne Läsionen (2 – 3 cm lang) ohne Cholorsen (anfällig); rechts: inkompatible Interaktion Chlorosen (3 – 4 cm lang) mit begrenzten Nekrosen (resistent)



Abb. 1A: Befallsreaktionen an Mais nach *E. turcicum* Infektion im Freiland, links: kompatible Interaktion braune länglich ovale Läsionen (10 – 15 cm lang) ohne Cholorsen (anfällig); rechts: inkompatible Interaktion Chlorosen (5 – 10 cm lang) mit beträchtlichen Nekrosen (resistent)

## Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. Andreas von Tiedemann für die Überlassung des Themas und die gewährten Freiheiten während der Durchführung und den gezielten Anregungen zur rechten Zeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Heiko Becker danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Birger Koopmann. Seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Projektes während der vierjährigen Laufzeit haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Isabel Müller für die sehr verlässliche Zusammenarbeit und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ihre strukturierte Arbeitsweise im Labor und Gewächshaus hat die Durchführung der Versuche im vorgesehenen Zeitrahmen erst möglich gemacht.

Bei Dagmar Tacke bedanke ich mich besonders für die Unterstützung im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen und die zeitlich flexible Aushilfe in den Gewächshausversuchen.

Bei Evelin Vorbeck und Maik Knobel bedanke ich mich für die verlässliche, pragmatische Hilfsbereitschaft im Rahmen der Labor- und Gewächshausversuche.

Bei Frau Dr. Bettina Kessel, als Projektkoordinatorin der beteiligten Züchterfirmen, möchte ich mich für die stets gute und zuverlässige Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere die Bereitstellung des Saatgutes des Differentialsortiments durch die KWS Saat SE, hat über Bettina Kessel während des gesamten Projektzeitraums sehr zuverlässig funktioniert.

Allen anderen Doktoranden, Masterstudenten und Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und auch lustigen Momente sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts. Es waren vier tolle Jahre.

Bei Dr. Anke Sirrenberg, Fluturë Novakazi, und Jan Picker möchte ich mich für das zügige Gegenlesen großer Teile der Arbeit bedanken.

Bei der FNR bedanke ich mich für die Finanzierung des Projektes (M 36/11 NR) und bei den Züchterfirmen der GFPi Abteilung Mais für die gute Zusammenarbeit.

Ich widme diese Arbeit meinen lieben Eltern, meiner Mutter Elisabeth Hanekamp und meinem Vater Bernhard Hanekamp, der leider viel zu früh verstorben ist.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen im März 2016



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Hendrik Hanekamp

Geburtsdatum/-ort: 1983 in Lönigen

### Berufliche Tätigkeit

Seit 02/2016 Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Bezirkstelle Emsland  
Leiter Fachgruppe Pflanzenbau und Pflanzenschutz  
Pflanzenschutzdienst Niedersachsen

### Hochschulausbildung

- 10/2011 – 01/2016 Doktorand und Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen.
- 04/2009 – 09/2011 Masterstudium der Agrarwissenschaften (M. Sc. agr.) an der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Pflanzenzüchtung, Thema der Masterarbeit: „*Ascochyta*-Resistenz bei Ackerbohnen: Methodische Optimierungen zur Entwicklung eines Tests auf Resistenz in Winterackerbohnen (*Vicia faba* L.)“.
- 10/2005 – 04/2009 Bachelor of Science der Agrarwissenschaften (B. Sc. agr.) an der Georg-August-Universität Göttingen, Thema der Bachelorarbeit: „Internationale Wettbewerbsfähigkeit der Putenerzeugung am Standort Deutschland.“
- 09/2007 – 03/2008 Auslandsstudium an der Universidad de Córdoba, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos y Montes, Spanien.

### Berufsausbildung

08/2003 – 07/2005 Ausbildung zum Landwirt

### Zivildienst

08/2002 – 06/2003 Rettungsdienst, Malteser Hilfsdienst

### Schulausbildung

09/1999 - 06/2002 Gymnasium der Berufsbildenden Schulen Papenburg, Gewerbliche und kaufmännische Fachrichtung; Abschluss: Abitur