

Nina Meyer
Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz

Entwicklung eines PCR basierten
Analyseverfahrens zur
Bestimmung des Befalls durch
Oculimacula spp.
sowie Verifizierung von Markern
für das Resistenzgen Pch1
im Weizen (*Triticum aestivum* L.)



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt:
Nina Meyer
KWS SAAT AG
Grimsehlstr. 31
37555 Einbeck

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind oder herausragende eigenständige Arbeiten aus den Forschungsgebieten des JKI darstellen.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-87-2

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2012.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
Justus-Liebig-Universität Giessen
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt

Entwicklung eines PCR basierten Analyseverfahrens zur Bestimmung
des Befalls durch *Oculimacula* spp. sowie Verifizierung von Markern
für das Resistenzgen *Pch1* im Weizen (*Triticum aestivum* L.)

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften
- Dr. agr. -**

**Im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Vorgelegt von
Nina Meyer
aus Gronau (Westf.)

Gießen 2011

Mitglieder der Prüfungskommission:
Vorsitzende: Prof. Dr. G. Leithold
Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt
Gutachter: PD Dr. F. Ordon
Prüfer: Prof. Dr. M. Frisch
Prüfer: Prof. Dr. B. Honermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	5
1.1.	Der Brotweizen (<i>Triticum aestivum</i> L. em. Thell.)	5
1.1.1.	Entstehung des hexaploiden Weizens	5
1.1.2.	Anbau und wirtschaftliche Bedeutung.....	5
1.1.3.	Wichtige Pilzkrankheiten an Weizen und Stand der Resistenzzüchtung	8
1.1.4.	Resistenzen gegen die Erreger der Halmbruchkrankheit.....	11
1.2.	<i>Oculimacula yallundae</i> und <i>Oculimacula acufornis</i>	13
1.2.1.	Taxonomie und Lebenszyklus	13
1.2.2.	Symptomausprägung	16
1.3.	Nutzung von molekularen Markern in der Pflanzenzüchtung	17
1.4.	Ziele der Arbeit	24
1.5.	Literatur	25
2.	VERÖFFENTLICHUNGEN	37
2.1.	Development of a Real-time PCR method for the identification of wheat genotypes carrying different eyespot resistance genes	37
2.2.	Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene <i>Pch1</i> in wheat.....	38
3.	DISKUSSION	39
3.1.	Entwicklung von Markern	39
3.1.1.	Populationsaufbau als Voraussetzung für die Markerentwicklung.....	39
3.1.2.	Phänotypisierung zur Ermittlung der Segregation des Merkmales.....	40
3.1.3.	Eignung verschiedener Markersysteme.....	43
3.2.	Stand und Perspektiven der Nutzung von Markern für die markergestützte Selektion in der Pflanzenzüchtung	45
3.3.	Stand der Markeranwendung in der Resistenzzüchtung gegenüber <i>Oculimacula</i> spp.....	46
3.4.	Ausblick: Markergestützte Selektion	48
3.5.	Literatur	50
4.	ZUSAMMENFASSUNG	56
5.	ABSTRACT	58
6.	TABELLENVERZEICHNIS	60
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	60

Diese kumulative Dissertation basiert auf folgenden Artikeln in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Meyer N, Lind V, Karlovsky P, Zahn M, Friedt W, Ordon F (2011) Development of Real-time PCR method for the identification of wheat genotypes carrying different eyespot resistance genes. *Plant Breeding* 130, 16-24

Meyer N, Lind V, Heindorf M, Korzun V, Friedt W, Ordon F (2011) Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1* in wheat. *Euphytica* 177: 267-275

1. Einleitung

1.1. Der Brotweizen (*Triticum aestivum* L. em. Thell.)

1.1.1. Entstehung des hexaploiden Weizens

Der hexaploide Back- oder Brotweizen (*Triticum aestivum* L. em. Thell., $2n=6x=42$) ist ein allopolyploider Bastard, der die drei Genome A, B und D enthält. Erste Funde von freidreschendem Weizen wurden in Syrien gemacht und stammen aus der Zeit von 7500-6000 vor Christus (Kilian et al. 2007). Die Entstehung des Brotweizens erfolgte in zwei Schritten. Zunächst fand eine Hybridisierung zwischen *Triticum urartu* (AA) und einer Art aus der Sektion Sitopsis vor ca. 10.000 Jahren statt (Kimber und Feldman 1987, Feldman und Moshe 2007). Hieraus entstand die tetraploide Art *Triticum turgidum* (AABB). Es gibt verschiedene *T. turgidum* Unterarten, wobei *T. turgidum* var. *dicoccon* als Donor des AB-Genoms bestimmt werden konnte (Kimber und Feldman 1987). Als Donor des D-Genoms des heutigen hexaploiden Weizens konnte mittels Kreuzungsversuchen eindeutig *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*) ermittelt werden (McFadden und Sears 1946).

Die Hypothese der spontanen Entstehung von Amphiploiden wurde erstmalig durch Tschermak und Bleier (1926) an Kreuzungen zwischen *T. turgidum dicocoides* und *Ae. geniculata* Roth nachgewiesen. Später zeigten unter anderem Benavente et al. (2001) und Zhang et al. (2008) für *T. turgidum* x *Aegilops tauschii* das gleiche Phänomen. Es gibt weitere Beispiele von amphidiploiden Bastarden in der Familie der Poaceae, zu nennen ist hier unter anderem die Entstehung von *Triticale* gegen Ende des 19. Jahrhunderts durch Kreuzung von *T. aestivum* x *Secale cereale* L. (Lorenz und Pomeranz 1974). Auch der hexaploide Kulturhafer (*Avena sativa* L.) ist nachweislich durch die Addition verschiedener Chromosomensätze entstanden (Vavilov 1965). Insbesondere für molekulare Analysen sind Kenntnisse über die Genomzusammensetzung im Hinblick auf die Markerentwicklung und den Erfolg markergestützter Selektionsverfahren von besonderer Bedeutung (Hoisington et al. 2002).

1.1.2. Anbau und wirtschaftliche Bedeutung

Der Brotweizen ist die weltweit verbreitetste Kulturart mit einer Anbaufläche von 223,6 Mio ha und nimmt bezüglich der Erntemenge [Mio t] Platz zwei hinter Mais ein (Abb. 1). Im Jahr 2008 wurden für Weizen höhere Erntemengen als für Reis erzielt. Deutschland lag

mit einer Ernte von 26,0 Mio t Weizen im Jahr 2008 hinter China, Indien, den USA, der Russischen Föderation, Frankreich und Kanada auf Platz sieben (Anonymus 2010a). Diese Erntemenge wurde auf einer Weizenanbaufläche von 3,214 Mio. ha bei einem durchschnittlichen Ertrag von 8,1 t/ha (Abb. 2) erzielt. Sommerformen und Durum-Weizen (*T. durum*) spielen in Deutschland nur eine untergeordnete Rolle, es wird fast ausschließlich Winterweizen angebaut (98,5% der Weizenflächen, Anonymus 2010b), wobei diese ca. 45,6% der Getreideanbaufläche und 26,9% der gesamten Ackerfläche Deutschlands entspricht (Anonymus 2010b). Nach neuen Zahlen von 2009 erhöhte sich die Anbaufläche von Winterweizen um 0,5% zum Vorjahr, was, bei einem minimal abnehmenden Trend der genutzten Ackerfläche (0,1% gegenüber dem Vorjahr), die anhaltende Bedeutung dieser Fruchtart für Deutschland zeigt (Anonymus 2009). Dabei hat sich durch Zuchtfortschritt und verbesserte Produktionsbedingungen seit Beginn der 1960er Jahre der Ertrag in Deutschland um mehr als 70% von 2,9 t/ha auf ca. 8 t/ha erhöht (Abb. 2). Die Erträge variieren in den von der FAO erfassten Ländern von 0,3 – 9,4 t/ha. Damit steht Deutschland im Jahr 2009 laut FAO (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor; 19.12.2010>) nach Belgien, den Niederlanden, Irland, Dänemark und dem Vereinigten Königreich an sechster Stelle von 124 erfassten Ländern weltweit.

Weizen wird sowohl für die tierische als auch menschliche Ernährung genutzt. Dafür sind die Quantität und Qualität der Inhaltsstoffe im Korn entscheidend. Das Korn (botanisch: Karyopse) besteht aus dem Keimling (3,5%), dem Endosperm (80-82% des Volumens), der Fruchtschale mit 15-17% und der dünnen Aleuronschicht (Aufhammer 2003).

Als Energielieferant für alle Nutzungsrichtungen dienen die Kohlenhydrate, die im Großteil des Kornes als langkettige Stärkemoleküle gespeichert werden (Tabelle 1). Für die menschliche Ernährung ist, bedingt durch den Backprozess, der Gehalt an Proteinen, im besonderen Gliadin und Glutenin, entscheidend. Diese Proteine ermöglichen ein Quellen des Teiges und eine Elastizität, die das Brotbacken zulässt. Die für die Produktion dieser Proteine verantwortlichen Gene sind im Wesentlichen auf dem D-Genom lokalisiert (Payne 1987). Hartweizen (AABB) ist aus diesem Grund nur bedingt für Backerzeugnisse geeignet. Für die tierische Ernährung ist Weizen mit seinem hohen energetischen Wert für Rinder, Schweine und Geflügel gut geeignet. Weizen kann auch für die thermische Verwendung sowie die Biogas- und Bioethanolerzeugung genutzt werden (Lindhauer 2009).

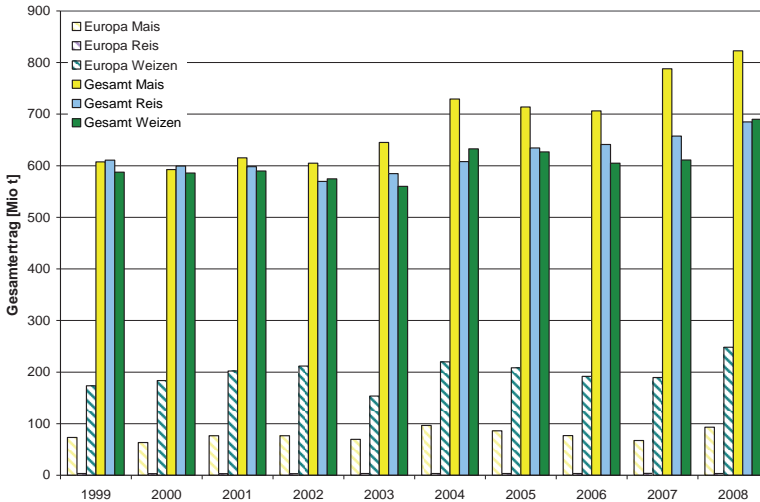


Abbildung 1: Gesamtertrag [Mio t] der drei wichtigsten Kulturarten, dargestellt für Europa und weltweit. Die Daten enthalten offizielle und geschätzte Werte der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

(Quelle: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> 23.02.2010)

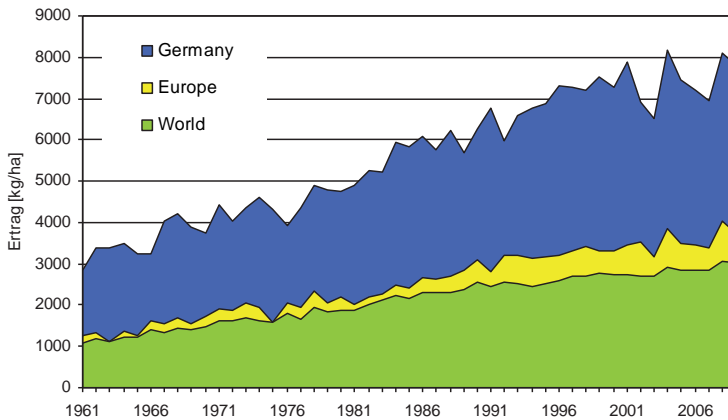


Abbildung 2: Weizenertag [kg/ha] der letzten 50 Jahre dargestellt für Deutschland, Europa und weltweit. Die Daten basieren auf geschätzten Werten der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

(Quelle: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> 19.12.2010)

Tabelle 1: Gewichtsprozente (Gesamttrockenmasse der jeweiligen Kornbestandteile = 100) verschiedener Inhaltsstoffe in den Kornbestandteilen von Weizen (Quelle: Aufhammer 2003).

	Kohlenhydrate	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser	Rohasche
Schale	57,1 ¹⁾	8,4	0,9	29,4	4,3
Aleuron	32,6 ¹⁾	36,6	10,5	7,6	12,7
Endosperm	84,3 ²⁾	12,8	1,7	0,4	0,8
Keimling	22,2	37,8	30,7	2,7	6,6

¹⁾ nahezu ausschließlich Pentosane, ²⁾ nahezu ausschließlich Stärke

1.1.3. Wichtige Pilzkrankheiten an Weizen und Stand der Resistenzzüchtung
Zahlreiche Krankheiten von Weizen, meist hervorgerufen durch pilzliche Pathogene, wenige durch Viren und Bakterien, stellen wichtige produktionsbegrenzende Faktoren an fast allen Weizenstandorten dar (Rajaram and van Ginkel 1996). Eine Auswahl wichtiger pilzlicher Krankheiten im Weizenanbau soll hier vor dem Hintergrund des jeweiligen Standes der Resistenzzüchtung dargestellt werden.

In letzter Zeit haben die Ährenfusariosen, hervorgerufen durch die Erreger *Fusarium graminearum* Schwabe und *F. culmorum* (W.G. Smith) Saccardo, stark an Bedeutung gewonnen. Zwar können *F. graminearum* und *F. culmorum* auch den Keimling, die Wurzel oder den Halm befallen, meist zeigen sich in Deutschland die Schädwirkungen jedoch in Form von Ährenbefall. Dort bilden sich im Verlauf der Krankheit rosafarbene Sporenlager an den Spelzenkanten und es kommt zum Absterben der Kornanlagen (Rodemann 2009). Ohne den Einsatz von Fungiziden können Ertragverluste zwischen 17-29% liegen (Matthies und Buchenauer 2000). Problematisch sind jedoch nicht nur die zu erwartenden Ernteeinbußen, sondern auch die durch den Pilz produzierten Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol (Sobrova et al. 2010). Das Erntegut darf bei Überschreitung der festgelegten Grenzwerte (Zearalenon 100µg/kg und Deoxynivalenol 1250µg/kg, jeweils unverarbeitetes Getreide) nicht für die tierische und menschliche Ernährung verwendet werden (Anonymus 2005). Bisher konnten verschiedene Quantitative Trait Loci (QTLs) in unterschiedlichen Resistenzquellen nachgewiesen werden (Bürstmayr et al 2009). QTLs wurden auf allen Chromosomen mit Ausnahme von 7D nachgewiesen (Bürstmayr et al. 2009). Von besonderer Bedeutung für die Resistenzzüchtung sind *Fhb1* (syn. *Qfhs.ndsu-3BS*) (Cuthbert et al. 2006, Liu et al. 2006) auf Chromosom 3BS, *Qfhs.ifa-5A* (Buerstmayr et al. 2002, 2003) auf 5AS und *Fhb2* (Cuthbert et al. 2007) auf 6BS (Buerstmayr et al. 2009). Diese Resistenzen gehen auf Zuchtmaterial zurück, das aus Kreuzungen mit der

chinesischen Sommerweizensorte Sumai3 entstanden ist, sodass Sumai3 als Grundlage für die weitere Züchtung von Fusarium resistenten Winterweizensorten eine größere Bedeutung bekommen dürfte.

Braunrost, hervorgerufen durch den pilzlichen Erreger *Puccinia triticina* Erikss. (Syn. *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. *sp. tritici*), ist eine weitere wichtige Krankheit des Weizens. Braunrostbedingte Ertragsverluste im Weizen werden in Europa auf 10% geschätzt (Manninger 1992, Hoffmann und Schmutterer 1999). Bei starkem Auftreten kann der Ernteverlust sogar bis zu 40% betragen (Clifford 1988). *P. triticina* ist ein obligat biotropher Pilz (Williams 1984), der an seinen auf der Blattoberseite auftretenden gelbbraunen Uredosporenlager erkennbar ist (Bolton et al. 2009). Bei Weizen wurden mittlerweile über 60 Resistenzgene (Lr-Gene) identifiziert und zum Teil in der Züchtung genutzt. Die Lr-Gene stammen aus min. 18 verwandten Arten neben *T. aestivum* (*Ae. kotschyi*, *Ae. speltoides*, *Ae. geniculata*, *Ae. peregrina*, *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides*, *Ae. tauschii*, *Ae. truncialis*, *Ae. ventricosa*, *Ae. umbellulata*, *Elymus trachycaulis*, *Secale cereale*, *T. dicoccoides*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. timopheevi*, *Th. intermedium* und *Th. ponticum* (McIntosh 1995, Chełkowski und Stępień 2001).

Für etwa die Hälfte dieser Gene wurden mittlerweile molekulare Marker entwickelt, die eine markergestützte Selektion erlauben (Vida et al. 2009). Da allerdings das Potential der Anpassung des Braunrosts an monogenische Resistenzen sehr hoch ist, steigt die Virulenz gegenüber neu genutzten Resistenzgenen schnell. Im Jahr 2008 wurde die Resistenz gegen das in deutschen Winterweizensorten stark genutzte Resistenzgen *Lr37* gebrochen (Lind, pers. Mitt.). Walther (2000) hatte dies schon Ende der 1990er Jahre für das Resistenzgen *Lr1* nachgewiesen. In vier Jahren erhöhte sich der Anteil an Rostpopulationen mit Virulenz gegenüber diesem Gen von 0,8% auf 62,1%.

Um eine dauerhaftere Resistenz zu erzielen, wird vielfach eine „Pyramidisierung“ durch Kombination verschiedener Lr-Gene angestrebt (vgl. 1.3) (Slikova et al. 2004; Bender et al. 2000).

Im letzten Jahrzehnt konnten verschiedene Lr-Gene isoliert werden: *Lr10* auf Chromosom 1AS konnte durch eine Kombination aus map based cloning und Haplotyp-Studien isoliert werden (Feuillet et al. 2003). Das Gen codiert ein CC (coiled coil)-NBS (nucleotid-binding site)-LRR (leucin-rich repeat)-Protein, bestehend aus 919 Aminosäuren. NBS-LRR-Proteine interagieren direkt mit Avirulenz-Proteinen (Nimchuk et al. 2003). Ein zweites in dieser Region lokalisiertes Gen (*RGA2*), welches ebenfalls für ein CC-NBS-LRR-Protein kodiert, ist

ebenso zwingend für die Resistenz erforderlich (Loutre et al. 2009). In der letztgenannten Untersuchung konnten nur zwei Haplotypen im Weizenmaterial festgestellt werden, entweder besaßen die geprüften Linien beide (Haplotyp 1) oder keines (Haplotyp 2) der Gene *Lr10* und *RGA2*. Das Resistenzgen *Lr1* auf Chromosom 5DL wurde 2007 von zwei Arbeitsgruppen parallel isoliert (Qiu et al. 2007; Cloutier et al. 2007). Dieses CC-NBS-LRR-Protein konnte jedoch eindeutig von *Lr10* unterschieden werden. Weiterhin konnte von Krattinger et al. (2009) das Resistenzgen *Lr34* isoliert werden. Hierbei handelt es sich im Gegensatz zu den vorgenannten Resistenzgenen um einen ABC (ATP binding cassette)-Transporter. Als mögliche Resistenzmechanismen kommen die Förderung von Senesenzprozessen oder aber auch der Export von Metaboliten, die das Wachstum des Pathogens beeinflussen, in Frage (Krattinger et al. 2009).

Echter Mehltau, hervorgerufen durch das Pilzpathogen *Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal, der zu den obligat biotrophen Ascomyceten gehört (Elliott et al. 2002), spielt eine bedeutende Rolle im Weizenanbau kühler und maritimer Klimate (Bennett 1984). Symptome sind zuerst watteartige, weißliche bis hellgraue Pusteln aus Pilzgeflechten, wobei es bei starkem Befall schließlich zum Absterben der Blätter kommt. Zusätzlich zur Reduktion der Assimilationsfläche wird die Pflanze durch das Eindringen des Pilzes und den Assimilatentzug durch die Haustorien geschädigt (Rodemann 2009).

In Versuchen von Griffey et al. (1993) konnten Ertragseinbußen von 13% nachgewiesen werden. Mittlerweile sind 43 Resistenzloci bekannt (*Pm1-Pm43*) und auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert worden (He et al. 2009). Diese stammen nur zum Teil aus *T. aestivum*. Weitere Quellen sind *T. turgidum* var. *dicoccoides* and var. *dicoccum*, *T. timopheevii*, *T. monococcum*, *Aegilops squarrosa*, *Ae. speltoides*, *Ae. longissima*, *Ae. ovata*, *Secale cereale*, *Thinopyrum intermedium* und *Dasyphyrum villosum* (He et al. 2009). Für viele dieser Gene stehen molekulare Marker zur Verfügung (Huang und Roeder 2004, Perogini et al. 2008, Blanco et al. 2008, He et al. 2009). Elliott et al. (2002) berichteten von mehreren MLO-ähnlichen Genen und konnten demonstrieren, dass diese mit der Mehltauresistenz assoziiert sind. Weiterhin wurden auf verschiedenen Chromosomen QTLs nachgewiesen (Huang und Röder 2004). Im deutschen Winterweizenzuchtsortiment werden als Resistenzquellen momentan *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm4b*, *Pm5*, *Pm6*, *Pm8* und *MIHa2* genutzt (Bundessortenamt 2010). Als bisher einziges Mehltauresistenzgen wurde *Pm3b* kloniert. Auch bei diesem Resistenzgen handelt es sich um ein CC-NBS-LRR-Protein (Yahiaoui et al. 2004). Von *Pm3* ist bekannt, dass es 17

verschiedene funktionale Allele besitzt (*Pm3a-Pm3r*) (Bhullar et al. 2009). Die wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Allelen von *Pm3* konnten in einer Studie von Bhullar et al. (2009) in den Bereichen der LLR und der IS (Interspacer) ausgemacht werden. Die IS separiert die NBS und LRR codierenden Bereich (Bhullar et al. 2010).

Die Schwarzbeinigkeit, hervorgerufen durch *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx and Olivier var. *tritici* Walker, gehört wie die Halmbruchkrankheit zu den Halmbasierkrankungen beim Getreide. Der Erreger, ein Ascomycet, gehört zu der Familie der Magnaportheaceae (Cook 2003). Zu Beginn der Infektion zeigen befallene Pflanzen Nährstoffmangelserscheinungen aufgrund der fehlenden Nährstoffversorgung aus der Wurzel, es können auch Trockenstresssymptome auftreten. Im weiteren Verlauf kann es zu der sogenannten Weißährigkeit, fehlendem Kornansatz und - einem wichtigen Erkennungsmerkmal dieser Krankheit - der "schwarzen Stengelbasis" kommen (Cook 2003). Bateman et al. (1994) postulierten, dass ein effektives Fungizid gegen *G. graminis* i) eine gute Pilztoxizität, ii) Wassermobilität und iii) saisonale Persistenz benötigt. Bisher konnte jedoch, bis auf einige nur eingeschränkt wirksame Fungizide, kein effektives Mittel entwickelt werden. Bislang sind keine Resistenzen im Weizen oder in anderen *Poaceae*n identifiziert worden, sodass die Krankheit nur durch Fruchtfolgemaßnahmen oder den natürlichen Decline-Effekt bei Monokultur eingedämmt werden kann (Cook 2003). Die Nutzung von Resistenzen wäre hier von großem Vorteil.

1.1.4. Resistenzen gegen die Erreger der Halmbruchkrankheit

In der Gattung *Triticum*, vor allem in dem bei uns vorwiegend angebauten Weichweizen (*T. aestivum*, AABBDD), konnten trotz intensiver Bemühungen nur die französische Sorte 'Cappelle Desprez' mit partieller Resistenz gegen *Oculimacula yallundae* (Boerema, R. Pieters & Hamers) Crous & W. Gams (syn. *Tapesia yallundae*; anamorph: *Helgardia yallundae* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *herpotrichoides*) und *O. acuformis* (Boerema, R. Pieters & Hamers) Crous & W. Gams (syn. *Tapesia acuformis*; anamorph: *Helgardia acuformis* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *acuformis*) identifiziert werden (Batts und Fiddian 1955, Macer 1966, Vandam et al. 1980, Law et al. 1975). Die Sorte wurde daher vor allem in westeuropäischen Ländern in zahlreichen Zuchtprogrammen verwendet (Heun und Mielke 1982). Ihre quantitative Resistenz wurde als komplex vererbt beschrieben, so wurden neben dem Hauptgen *Pch2* auf Chromosom

7AL (Law et al. 1975, de la Peña et al. 1996) noch weitere Resistenzgene auf den Chromosomen 2B und 5D identifiziert. Auch von Doussinault und Dosba (1977) sowie von Lind (1999) wurden die Sorte 'Cappelle Desprez' und ihre Abkömmlinge zur Verbesserung der Resistenz im adulten Stadium genutzt.

Viele in Deutschland zugelassene Sorten besitzen jedoch das Resistenzgen *Pch1* auf Chromosom 7DL (Jahier et al. 1978). Das Gen wurde in *Ae. ventricosa* Tausch (Genom MvMvDD) identifiziert und von Maia (1967) in den Kulturweizen übertragen. Die dabei selektierte Linie 'VPM1' wurde weltweit als Kreuzungselter verwendet. Die ersten in Frankreich, Großbritannien und den USA angebauten Sorten waren 'Roazon', 'Rendezvous', 'Hyak', 'Madson' und 'Renan'. Die Krankheit ist jedoch nach wie vor von Bedeutung, so dass das Bundessortenamt die Anfälligkeit gegenüber *Oculimacula* ssp. bzw. „*Pseudocercospora*“ seit 2003 wieder in der ‚Beschreibenden Sortenliste‘ aufführt. Hier zeigten die Sorten 'Cardos' (3), 'Certo' (2), 'Striker' (2), 'Hermann' (2) und 'Türkis' (3), in deren Stammbäumen 'VPM1' bzw. 'Rendezvous' zu finden sind, besonders niedrige Ausprägungsstufen gegenüber dem parasitären Halmbruch (Bundessortenamt 2005). Aktuelle Sorten mit einer niedrigen Ausprägungsstufe gegenüber der obengenannten Krankheit sind Alves (Zulassung 2010, Ausprägungsstufe 2), Famulus (Zulassung 2010, Ausprägungsstufe 2) Format (Zulassung 2007, Ausprägungsstufe 2) und Kalahari (Zulassung 2010, Ausprägungsstufe 2). Nachdem zunächst eine Kopplung des Resistenzgens *Pch1* mit dem biochemischen Marker *Ep-D1* nachgewiesen worden war (McMillin et al. 1986), stehen heute molekulare Marker zur Verfügung (Groenewald et al. 2003, Chapman et al. 2008, Leonard et al. 2009), die für die Nutzung in der praktischen Pflanzenzüchtung einsetzbar sein sollen (siehe Kapitel 1.3.2).

Eine weitere Resistenz gegen *Oculimacula* spp., die bereits in den Kulturweizen eingekreuzt wurde, stammt aus der tetraploiden *Aegilops kotschyi*-Herkunft AE120 (Aserbaidshan). Sie wurde zuerst von Freier (1982) nachgewiesen und später von Bang (1986) bestätigt. *Ae. kotschyi* enthält keines der eigentlichen Weizengenome (UUSvSv), so dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine divergente Resistenzgrundlage handelt. Trotz der unterschiedlichen Genome ist *Ae. kotschyi* gut mit *T. aestivum* kreuzbar. Die auftretende Sterilität konnte durch zweimalige Rückkreuzung und drei Selbstungsgenerationen überwunden werden. Die aus den Kreuzungen mit den Sorten 'Alidos', 'Borenos' und 'Kontrast' hervorgegangenen Linien wurden in den Jahren 1998 bis 2000 Resistenzprüfungen unterzogen, um die besten Genotypen zu selektieren (Thiele et

al. 2002). Im Mittel über die Jahre erreichten 12 Linien das Resistenzniveau von 'Cappelle Desprez'. Die Grundlage der *Ae. kotschyi*-Resistenz wurde bislang nicht aufgeklärt und es liegen keine genetischen Marker vor. Das erhöhte Resistenzniveau der von Thiele et al. (2002) selektierten Linien konnte allerdings in eigenen wiederholten Versuchen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine planmäßige Verwendung der Linien in der Resistenzzüchtung erfolgte bisher nicht.

Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche Ergebnisse aus Evaluierungsprojekten veröffentlicht, in denen in Wildformen des Weizens auch Resistenzen gegen *Oculimacula* spp. identifiziert wurden. Auffallend häufig traten resistente Genotypen in *Ae. tauschii* (Genom DD) auf, aber auch in tetraploiden Formen wie *T. dicoccoides* (Genom AABB) konnten Resistenzen nachgewiesen werden (Jones et al. 1995, Yildirim et al. 1995, Assefa und Fehrmann 1998, Figliuolo et al. 1998). In Einkorn (*T. monococcum*, AA) konnten zahlreiche Genotypen mit Resistenzen identifiziert werden, die in ihrem Effekt *Pch1* noch übertrafen (Cadle et al. 1997). Eine andere Resistenz wurde auch in einem entfernten Verwandten des Weizens, *Dasyphyrum villosum* (Genom VV), entdeckt. Das Gen (*Pch3*) wurde auf Chromosom 4V lokalisiert (Yildirim et al. 1998, 2000). Untersuchungen von Uslu et al. (1998) konnten dies jedoch nicht bestätigen. Letztgenannte Autoren identifizierten Resistenzen gegen *OY* auf den Chromosomen 1V, 2V, 3V, 4V und gegen *OA* auf 1V, 2V, 3V und 5V. Weiterhin wurden von Li et al. (2004, 2005) neue Resistenzquellen in *Thinopyrum*-Arten entdeckt. Bei der Übertragung eines Segmentes des Chromosoms 4J von *Th. ponticum* (Podp.) in den Weizen (Chromosom 4D) konnte gezeigt werden, dass Weizenpflanzen mit dieser Substitution über ein Resistenzniveau gleich dem von *Pch1*-Trägern verfügen (Li et al. 2004). In der Arbeit Li et al. (2005) konnten ähnliche Ergebnisse durch Übertragung des Segmentes 4Ai#2 von *Th. intermedium* (Host.) Barkworth and D.R. Dewey in den Weizen erzielt werden. Auch hier zeigte sich eine ähnliche Resistenzwirkung wie bei *Pch1*-Trägern. Über die Verwendung dieser Resistenzquellen in der Resistenzzüchtung liegen bisher keine Veröffentlichungen oder andere Befunde vor.

1.2. *Oculimacula yallundae* und *Oculimacula acuformis*

1.2.1. Taxonomie und Lebenszyklus

Die Erreger der Halmbruchkrankheit *O. yallundae* (anamorph *Helgardia yallundae*, Abb. 3a) und *O. acuformis* (anamorph: *H. acuformis*, Abb. 3b) wurden von Crous et al. (2003) aufgrund von molekularen Arbeiten als zwei verschiedene Arten definiert. Früher

wurden diese nach der taxonomischen Definition von Nirenberg (1981) als zwei pathogene Varietäten eines Pilzes beschrieben und mit *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* und *P. herpotrichoides* var. *acuformis* bezeichnet. Dieses Identifikationssystem wurde vorwiegend in Deutschland verwendet (Nirenberg et al. 1981), während in England die Unterscheidung in W- und R-Typen (Scott et al. 1975) erfolgte. Ursprünglich wurde angenommen, dass sich die beiden Gruppen jeweils entsprechen. Techniken des DNA-Fingerprinting zeigten jedoch, dass zwischen der Varietät *herpotrichoides*, W-Typen und schnell wachsenden Typen einerseits und der Varietät *acuformis*, R-Typen und langsam wachsenden Typen andererseits keine signifikanten Korrelationen bestehen (Frei 1992). Diese Unterschiede in den Klassifizierungssystemen waren bei der Identifizierung von *Oculimacula*-Pathotypen und dem Austausch von Versuchsdaten hinderlich. Eine eindeutige Differenzierung zwischen W- und R-Typen konnte von Julian und Lucas (1990) und Priestley et al. (1992) anhand der α -Esterase- und des DNA-Fragment-Musters vorgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die W-Typen in der Gesamtgröße des mitochondrialen Genoms (35kb) von den R-Typen (29kb/27kb) unterscheiden (Priestley et al. 1992). Ein weiteres auf PCR (Polymerase Chain Reaction) basierendes Klassifizierungssystem wurde von Nicholson et al. (1997) entwickelt. Diese Arbeitsgruppe konnte RAPD-Marker (Random Amplified Polymorphism DNA) in einen spezifischen STS-Marker (Sequence-Tagged Sites) für *O. acuformis* (0,38 kb Bande) und in einen spezifischen STS-Marker für *O. yallundae* (1,1 kb Bande) umwandeln, der zur Differenzierung der Arten genutzt werden kann.

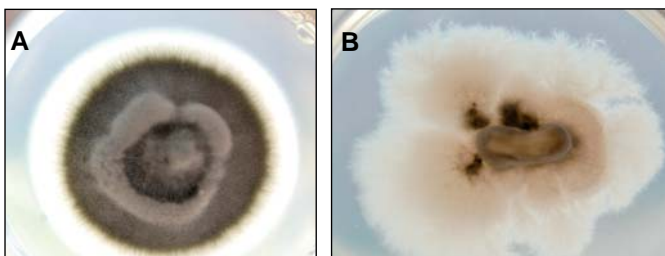


Abbildung 3: Myzel von a) *Helgardia yallundae* und b) *H. acuformis* auf Potato-Dextrose-Agar-Medium 20 Tage nach Beimpfung.

Bei *Helgardia*-Infektionen (teleomorph: *Oculimacula*) im Feld wird weitgehend angenommen, dass diese von vegetativ erzeugten Konidien des anamorphen Stadiums

ausgehen. Ende der 80er Jahre wurde jedoch auch das sexuelle oder teleomorphe Stadium zuerst in Australien (Wallwork 1987) und Neuseeland (Sanderson and King 1988) später dann in Belgien (Moreau et al. 1989), England (Hunter 1989, Nicholson et al. 1991) und Deutschland (King 1990) entdeckt. In Apothecien des Pilzes entwickelten sich Ascosporen, aus denen Kolonien hervorgingen, die dem W-Typ von *H. yallundae* entsprachen. Die teleomorphe Form erhielt die Bezeichnung *Tapesia yallundae* (synonym: *O. yallundae*). In allen Untersuchungen wurden Apothecien nie auf lebenden Pflanzen, sondern nur auf Strohresten nach der Ernte nachgewiesen (Dyer et al. 2001a). Des Weiteren wurden im Feld in geringem Umfang Apothecien isoliert, aus denen Ascosporen hervorgingen, die Kolonien mit den Merkmalen des R-Typs von *Helgardia* bildeten (Moreau und Maraite 1995). W- und R-Typ haben zwar heterothallische Paarungssysteme, allerdings ohne einen Hinweis auf sexuelle Kompatibilität zwischen Isolaten beider Typen (Dyer et al. 1996). Der R-Typ wurde deshalb schon damals von dieser Arbeitsgruppe als eine eigenständige Art, *H. acuformis*, neben *H. yallundae* angesehen. Die sexuelle Reproduktion beider Spezies kann für die Erzeugung und Erhaltung der genetischen Variation innerhalb der Pathogenpopulation eine Rolle spielen (Daniels et al. 1995, Lucas et al. 2000). Für beide Arten ist jedoch die Bedeutung des sexuellen Zyklus noch nicht vollständig aufgeklärt. Genetische Rekombinationen bei Pathogenen sind neben Mutationen eine Voraussetzung für die Entstehung neuer Pathotypen und für die Überwindung vorhandener Resistenzgene (Dodds und Thrall 2009). Sowohl für die Differenzierung der beiden Erregerarten als auch für ihren quantitativen Nachweis werden zunehmend PCR-Tests eingesetzt (Bardsley et al. 1998, Bateman et al. 2000, Burnett et al. 2000, Dyer et al. 2001b, Nicholson et al. 2002). Untersuchungen von Crous et al. (2003) zeigten, dass die Einordnung der Pathogene in die Gruppe der *Tapesia*-Arten genetisch nicht korrekt ist. Beim Vergleich von ITS (Internal transcribed spacer) - Regionen verschiedener Pilzarten der Ordnung *Mycosphaerellales* und *Helotiales* stellte sich heraus, dass *P. herpotrichoides* keine genetische Verwandtschaft zu den *Tapesia*-Arten besitzt (Abb. 4).

Daraufhin wurde eine neue Namensgebung vorgeschlagen: *O. acuformis* (syn. *T. acuformis*, anamorph: *H. acuformis*) und *O. yallundae* (syn. *T. yallundae*, anamorph: *H. herpotrichoides*) (Crous et al. 2003), abgeleitet von dem lateinischen Namen für Augenfleck = *Oculimacula*, welche mittlerweile in der Literatur vornehmlich Verwendung finden.

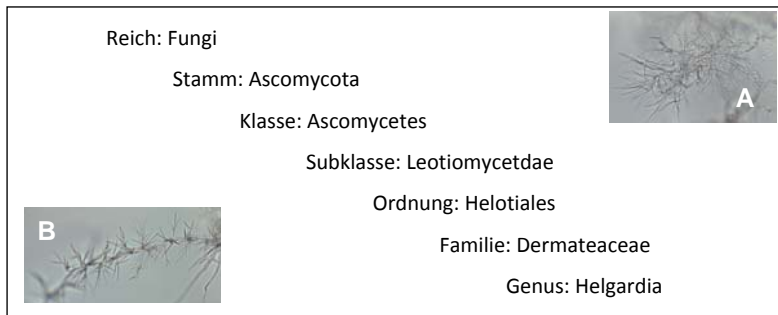


Abbildung 4: Taxonomische Einordnung (nach Crous et al. 2003) der Erreger *Oculimacula yallundae* (anamorph: *Helgardia yallundae*; A) und *O. aciformis* (anamorph: *Helgardia aciformis*; B).

1.2.2. Symptomausprägung

Die Erreger der Halmbrechkrankheit können die Kulturarten Roggen, Gerste, Triticale und Weizen sowie verwandte Wildgräser infizieren (Mielke 1995). Die Häufigkeit ihres Auftretens und die Befallsstärke stehen in enger Beziehung zu den Anbauverhältnissen im landwirtschaftlichen Betrieb. Die Krankheit wird durch einen hohen Getreideanteil in der Fruchtfolge gefördert (Christen 2009), wobei sich gegenwärtig in der Landwirtschaft die Tendenz verstärkt, Weizen nach Weizen (sog. Stoppelweizen) oder in dichter Folge (z.B. Raps-Weizen-Weizen-Gerste) anzubauen. Neben der Verengung der Fruchtfolge und dem hohen Getreideanteil begünstigen vor allem die Reduzierung der Bodenbearbeitung, Direktsaatverfahren und Frühsaaten im Herbst das Überdauern und die Verbreitung der Erreger (Mielke 1995), welche vorwiegend durch Strohreste der Vorfrucht erfolgt (Fitt et al. 1988). Die jungen Weizenpflanzen werden von den Erregern an der Halmbasis befallen und die Erreger penetrieren im Verlauf der Infektion Blattscheide für Blattscheide von außen nach innen (Lange-de la Camp 1966a). Dabei kommt es zu der charakteristischen Ausprägung des Augenfleckes mit zentraler Aufhellung und unscharfen braunen Rändern (Bockmann und Knoth 1971), wobei im weiteren Krankheitsverlauf eine Vermorschung des Halmes stattfindet. Neben dieser Schwächung der Halmbasis, welche zum Lagern der Pflanzen führt und damit indirekte Ertragsverluste hervorruft, verursacht die Schädigung der Leitbündel und die damit einhergehende verminderte Wasser- und Nährstoffzufuhr direkt eine Minderung des Kornertrages (Scott und Hollins 1974). Ertragseinbußen von 10 bis 15% kommen dabei recht häufig vor, sie können aber auch deutlich höher sein (Lange-

de la Camp 1966b, Mielke 1995). Da allerdings Ertragsverluste in der Praxis meist schwer erfassbar sind, werden sie bei ausbleibendem Lager häufig unterschätzt.

1.3. Nutzung von molekularen Markern in der Pflanzenzüchtung

Unter einem molekularen Marker versteht man eine DNA-Sequenz, die einfach und wiederholbar zu identifizieren ist und mit einem interessierenden Merkmal bzw. Gen gekoppelt ist (Becker 2011). Durch die Kopplung mit dem Merkmal ergeben sich für die Pflanzenzüchtung vielfältige Nutzungsmöglichkeiten dominanter und codominanter molekularer Marker (Hoisington et al. 2002). Ein entscheidender Vorteil von Markern ist die Möglichkeit, die für die molekulare Analyse benötigte DNA-Extraktion schon in einem sehr jungen Entwicklungsstadium der Pflanzen oder bereits vor der Aussaat am Korn selbst durchzuführen. Durch diese Vorgehensweise kann eine sehr frühe Selektion der positiv selektierten Pflanzen erfolgen (Kuchel et al. 2007). Zu diesem Zeitgewinn gegenüber einer Phänotypisierung im Verlauf der Vegetation kommt hinzu, dass die Phänotypisierung selbst häufig aufwändiger als eine Genotypisierung ist (Kuchel et al. 2007, William et al. 2007). Weiterhin können mittels eng gekoppelter codominanter Marker im Gegensatz zur visuellen Bonitur Aussagen darüber getroffen werden, ob das betreffende Merkmal homozygot oder heterozygot vorliegt. Darüber hinaus entfallen die Einflüsse der Umwelt und der Genotyp-Umwelt-Interaktion bei der Nutzung molekularer Marker.

Eines der ersten molekularen Markersysteme, nach morphologischen Markern und Isoenzymmarkern, waren RFLP-Marker (Restriction Fragment Length Polymorphisms), welche nach Restriktion und Southern blotting mittels Hybridisierung detektiert werden (Botstein et al. 1980). Für die Weizenchromosomen der Gruppe 7 (A, B und D) konnte mittels RFLPs bereits Ende der 1980er Jahre die erste genetische Karte, basierend auf molekularen Markern und Isoenzymen, entwickelt werden (Chao et al. 1989). Zudem konnten während der letzten Jahre durch diese Technik für diverse Resistenzgene eng gekoppelte Marker identifiziert werden (*pm42*; Hua et al. 2009, *Lr3*; Sacco et al. 1998, *Lr23*, *Lr27*, *Lr31*; Nelson et al. 1997, *Lr32*; Autrique et al. 1995, *Pm2*; Ma et al. 1994, *Pm6*; Tao et al. 2000, *Pm12*; Jia et al. 1996 und *Pm26*; Rong et al. 2000).

Mitte der 1980er Jahre beschrieben Saiki et al. (1985) das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion, als Grundlage für verschiedene PCR-basierte Markersysteme. Bei den RAPDs (Random Amplified Polymorphism DNA) (Williams et al. 1991) werden kurze, zufällig im

Genom vorkommende Primersequenzen (i.d.R. 10bp) eingesetzt. Diese Art der Marker wurde z.B. genutzt, um Unterschiede zwischen Weizensorten (He et al. 1992) sowie zwischen Weizen und anderen *Triticum*-Arten (Vierling und Nguyen 1992) zu ermitteln. Eine gewisse Einschränkung der Nutzungsmöglichkeiten der RAPDs für die genetische Kartierung besteht durch deren dominanten Vererbungsmodus sowie die hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Fragmente aus repetitiven DNA-Sequenzen stammen (Devos und Gale 1992). Weiterhin zeigte sich in späteren Untersuchungen an verschiedenen Tierarten (*Cervus elaphus* L., *Sus scrofa* L. und *Drosophila melongaster* L.), dass die Wiederholbarkeit von spezifischen RAPD-Fragmenten im Durchschnitt unter 30% lag (Pérez et al. 1998). Bis zum Beginn des 21. Jahrhundert konnten dennoch verschiedene gekoppelte RAPD-Marker für Resistenzgene gegenüber Pilzkrankheiten (z.B. *snb7M*, Cao et al. 2001; *Lr19*, Gupta et al. 2006; *PM1*, Hu et al. 1997), Virosen (z.B. *Bdv2*, Zhang et al. 2004; *Wsm1*, Talbert et al. 1996) und tierischen Schaderregern an Weizen entwickelt werden (z.B. *Dn2*, Myburg et al. 1998). RAPDs werden heute zwar nur noch selten, dann aber wegen ihrer einfachen und kostengünstigen Methodik genutzt, um Resistenzgene im Weizen zu lokalisieren (Samsampour et al. 2010).

SSR-Marker (simple sequence repeats, Mikrosatelliten) wurden von Tautz und Renz (1984) beschrieben. Es handelt sich hierbei um kurze repetitive Sequenzen (1 bis 5bp), welche in unterschiedlicher Wiederholungszahl im Genom auftreten. Diese kommen relativ häufig vor und sind meist von hoch konservierten Regionen flankiert (Meudt und Clarke 2007). Unter Nutzung spezifischer Primer, die homolog zu den umgebenden konservierten Sequenzen sind, erfolgt mittels PCR eine exponentielle Amplifikation des spezifischen Mikrosatellitenmotivs. Je nach Häufigkeit der wiederholten repetitiven Sequenz, variiert die Basenpaarlänge des Amplifikates (Morgante und Olivieri 1993). Diese Art der Marker ist sehr polymorph (Morgante und Olivieri 1993), codominant (Morgante und Olivieri 1993), multiallelisch (Smeets et al. 1989) und lokusspezifisch (Beckmann und Soller 1990). SSR-Marker können in Multiplex-Reaktionen und unter Verwendung fluoreszenzbasierter Systeme mit automatischer Auswertung eingesetzt werden, wodurch eine Hochdurchsatzanalyse erfolgen kann (Morgante und Olivieri 1993). Oetting et al. (1995) stellten als Alternative zur Direktmarkierung der spezifischen Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff ein kosteneffizientes System unter der Nutzung eines zusätzlichen universell einsetzbaren fluoreszenzmarkierten Primers (M13-Primer) vor. Für verschiedene Resistenzgene des Weizens konnten bisher eng gekoppelte SSR-Marker

entwickelt werden, unter anderem für *Lr21* (Huang et al. 2003), *Pm24* (Huang et al. 2000), *Pm30* (Liu et al. 2002), *Pm16* (Chen et al. 2005), *L39* (Raupp et al. 2001) und *L38* (Mebrate et al. 2008).

Mitte der 1990er wurde von der Firma Keygene N.V. (Niederlande) die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) -Technik entwickelt (Vos et al. 1995). Nach Restriktion der DNA mit spezifischen Endonukleasen erfolgt die Ligation von kurzen Oligoadaptoren an den jeweiligen Enden der geschnittenen Sequenzen. Danach werden eine bzw. mehrere PCRs durchgeführt. Die Primer bestehen aus der Sequenz des Oligoadapters plus weiteren selektiven Basen am 3'-Ende (Vos et al. 1995). Bei diesem Verfahren kann mit einer Fluoreszenzmarkierung gearbeitet werden, sodass in jüngerer Zeit für die Visualisierung meist hochauflösende Polyacrylamid-Gele oder Kapillarsequencer eingesetzt werden. Im Gegensatz zu der RAPD-Technologie ist diese Markertechnik sehr gut reproduzierbar, robust und informativ (Gupta et al. 1999). Weiterhin können informative Polymorphismen auch zwischen Arten gewonnen werden, ohne vorherige vergleichende molekulare Studien durchführen zu müssen (Meudt und Clarke 2007). Beschränkungen im Einsatz erfahren AFLPs dadurch, dass mehrere Schritte bis zur Visualisierung notwendig sind (Vos et al. 1995) und es sich um ein dominantes Markersystem handelt (Hoisington et al. 2002). Als Konsequenz für den praktischen Einsatz im Hochdurchsatz erfolgt deshalb häufig eine Konvertierung geeigneter AFLP-Sequenzen in einfacher handhabbare Markersysteme wie z.B. STS-Marker (Sequence-Tagged Sites) oder CAPS-Marker (Cleaved Amplified Polymorphic DNA) (Juergens et al. 2010, Korell et al. 2008).

Die Information über die Abfolge einer Genomsequenz bildet die Grundlage zur Etablierung eines STS-Markers. Dabei werden ausgehend von der Basensequenz spezifische Primer entwickelt, die dann in einer PCR-Reaktion einen Polymorphismus aufgrund der Sequenzlänge nachweisen (Tragoonrung et al. 1992). Der Vorteil dieser Markertechnik liegt darin, dass die mit aufwändigeren Techniken (wie z.B. AFLP-Analyse) identifizierten polymorphen DNA-Fragmente zu einem spezifischen, schnell und einfach zu handhabenden PCR-basierten Marker umgewandelt werden (Talbert et al. 1994). Auch im Weizen wurden STS-Marker für verschiedene Resistenzgene entwickelt. So wurden beispielsweise verschiedene eng mit Mehltairesistenzgenen gekoppelte RFLP-Marker (Ma et al. 2004, Ji et al. 2008) bzw. RFLP- und AFLP-Marker für Resistenzen gegen Braun- und Streifenrost (Lagudah et al. 2006, Smith et al. 2007) in STS-Marker umgewandelt.

Ende der 1970er Jahre haben Sanger et al. (1977) gezeigt, wie die Basenabfolge eines Organismus über Sequenzierung ermittelt werden kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden mittlerweile für viele Kulturarten sequenzbasierte DNA-Polymorphismen (SNPs; single nucleotide polymorphisms) in Markersystemen für Simplex- und Multiplexreaktionen genutzt. Diese beinhalten z.B. TaqMan®- und SNPlex™-Technologien (Applied Biosystem, Foster City, USA), sowie arraybasierte Technologien wie GoldenGate® und Infinium® (Illumina, San Diego, USA, Affymetrix, Santa Clara, USA, (Sobrinho et al. 2005)). Vorteile dieser biallelischen Marker sind neben ihrer Eignung zur automatischen Auswertung (Norton et al. 2002) auch ihre Redundanz im Genom. Diese reicht beim Weizen von 1 SNP/223 bp (Ravel et al. 2007) bis 1 SNP/540 bp (Somers et al. 2003); für andere Kulturarten ist die Häufigkeit teilweise noch deutlich höher (Tenailon et al. 2001). Alle genannten Markersysteme haben, je nach Forschungsstand bei der jeweiligen Kulturart, schon in erheblichen Umfang Einzug in die Pflanzenzüchtung erhalten. Dabei gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten. Zur Nutzung von Markern in der markergestützten Selektion müssen diese zunächst eindeutig im Genom lokalisiert werden. Diese genetische Kartierung erfolgt durch die Anordnung von Markern aufgrund der Häufigkeit von Rekombinationsereignissen (van Ooijen 2006). Dies erlaubt die Identifizierung von eng gekoppelten Markern, welche den Selektionsprozess beschleunigen können (Leonard et al. 2008). Eine Referenzkarte aller Kopplungsgruppen des Weizens wurde für eine RIL-Population (recombinant inbred lines) erstellt, die aus der Kreuzung zwischen einer synthetischen Weizenlinie (*Aegilops tauschii* x Altar 84 durum) und der Sommerweizensorte Opata 85 entwickelt wurde (CIMMYT; International Maize and Wheat Improvement Center). Durch Zuhilfenahme einer Resyntheselinie konnte so aufgrund vieler Polymorphismen eine sehr dichte RFLP-Karte erstellt werden (Nelson et al. 1995a, 1995b, 1995c). Jedoch ist erst seit der Integration von SSR-Markern (Röder et al. 1998) sechs Jahre nach Erstellung der RFLP-Karte die Nutzung der Information auch mit einer schnelleren und kostensparenden Markertechnik möglich. Mit Hilfe der SSR-Marker konnte eine hochauflösende Karte mit 1235 Markern erstellt werden, welche durchschnittlich in 2,2 cM Intervallen alle drei Genome mit einer Länge von 2569 cM überspannt (Somers et al. 2004).

Für die Identifikation von Markern für Resistenzgene ist es jedoch erforderlich, spezielle Kartierungspopulationen zu entwickeln, welche für das zu betrachtende Merkmal segregieren (Häberle et al. 2009, Mebrate et al. 2008, Schmolke et al. 2008). Sind

geeignete Marker ermittelt, so kann durch die Integration von markergestützter Selektion (MAS) und markergestützter Rückkreuzung (MABC) der klassische Züchtungsprozess unterstützt werden. Als Ergebnis der Markeranalyse werden in jeder Generation nur solche Pflanzen selektiert, die das positive eng gekoppelte Markerallel tragen (Gupta et al. 2009). Der Erfolg der MAS in der Züchtung hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab. Dies sind neben der Vererbung des Merkmals (mono- oder polygenisch) (Gupta et al. 2009), der Abstand zwischen Marker und Gen und die Kosten für die Markeranalysen im Verhältnis zur Merkmalserfassung im Feld (Mohler und Singrün 2004, Dreher et al. 2003). Zusätzlich zu der Feststellung, ob das gewünschte Donorallel vorhanden ist (Vordergrundselektion), kann weiterhin überprüft werden, welche Pflanzen im Restgenom möglichst geringe Anteile an Donorfragmenten besitzen (Hintergrundselektion, MABC). Ohne Selektion errechnet sich der Anteil des Donorgenoms je Generation nach der Formel $BC_n = 1/2^{n+1}$ (Frisch und Melchinger 2005). Dieser Wert kann durch gezielte Markeranalysen reduziert werden. Bei der Untersuchung jeder Generation mittels Markeranalysen können dadurch bis zu zwei Rückkreuzungsgenerationen im Feld eingespart werden (Frisch et al. 1999). Des Weiteren entfallen in der Resistenzzüchtung aufwändige phänotypische Inokulationsversuche, die von Umwelteinflüssen und Genotyp-Umwelt-Interaktionen stark beeinflusst werden können (Ribaut und Hoisington 1998, Nita et al. 2003) und z.B. für Pilzkrankheiten bei Getreide je nach Merkmal eine hohe Wiederholungszahl benötigen, um eine gesicherte Aussage treffen zu können (Bockus et al. 2007).

Die Nutzung eines einzelnen Resistenzgens bedingt jedoch häufig keine dauerhafte Resistenz gegenüber einem Krankheitserreger (Kloppers et al. 1997, Takken et al. 2000). Nach der sogenannten „Gen für Gen Hypothese“ (Flor 1971) gilt folgendes: für jedes Gen, welches im Wirt eine Reaktion (z.B. Anfälligkeit) auslöst, gibt es ein korrespondierendes Gen im Parasit, welches Pathogenität bedingt. Deshalb bringt man bei der sogenannten Pyramidisierung von Genen gezielt mehrere positive Allele, z.B. für Resistenz gegen ein bestimmtes Pathogen, in das Genom einer Wirtspflanze ein. Durch diese Addition verschiedener Resistenzgene kann eine deutliche Stabilisierung der Resistenz erreicht werden (Nas et al. 2005). Da je nach Anzahl der Loci die Addition sehr aufwändig werden kann, wurden z.B. von Servin et al. (2004) verschiedenste Szenarien simuliert, um ein Optimum des Aufwandes gegenüber dem Nutzen der Pyramidisierung zu bestimmen. Erst molekulare Marker erlauben den Nachweis, dass eine Pyramidisierung verschiedener

Resistenzgene tatsächlich erfolgt ist, da durch eine Phänotypisierung allein die Effekte der einzelnen Gene nur sehr aufwändig oder gar nicht voneinander unterschieden werden können (Bauer et al. 1997). Im Gegensatz zur Stabilisierung des Resistenzniveaus durch Pyramidierung von Resistenzgenen ist eine Erhöhung des Resistenzniveaus nicht immer gegeben. In Arbeiten mit verschiedenen Blattlausresistenzgenen (Porter et al. 2000) und mit zwei Halmbruchresistenzgenen (Burt et al. 2010) konnte kein additiver Effekt durch die Nutzung der Kombination verschiedener Resistenzgene nachgewiesen werden. Andererseits zeigten Arbeiten zur Pyramidierung von zwei Zystennematodenresistenzgenen *CreX* und *CreY* (Barloy et al. 2007) und verschiedenen *Fusarium pseudograminearum* Resistenz-QTLs (Bovill et al. 2010) in Weizen eine deutliche Erhöhung der Resistenz. Da mithin eine generelle Erhöhung der Resistenz durch Addition von Resistenzgenen nicht gegeben ist, muss jeder Fall für sich spezifisch betrachtet werden.

Aufgrund des Trends sinkender Kosten für Markerdatenpunkte (Gandon und Crepieux 2008), steigt die Effektivität des Einsatzes von molekularen Markern in der modernen Pflanzenzüchtung stetig an. Insgesamt ist die Entwicklung und Nutzung molekularer Techniken in der Weizenzüchtung aufgrund der Komplexität des Genoms schwieriger als in anderen Kulturarten (Hoisington et al. 2002). Das Weizengenom besitzt mit über 16 GB eine Größe, die ein Fünffaches des menschlichen Genoms ausmacht, darüber hinaus ist es durch seine drei unabhängigen Genome und einen hohen Anteil repetitiver Sequenzen (> 80%) überaus komplex (Kumar et al. 2011). Dennoch wird in der Weizenzüchtung die Markertechnologie für verschiedene Merkmale genutzt. Laut einer Studie von Gupta et al. (2009) wurden mittlerweile verschiedenste Merkmale mittels Markern genetisch lokalisiert. Deren Einsatz in der praktischen Pflanzenzüchtung beschränkt sich jedoch vor allem auf Resistenzen gegen Braunrost, Mehltau, Fusarium und die *Pch1*-Resistenz gegen Halmbruch (Gupta et al. 2009). Die *Pch1*-Resistenz gegen die Halmbruchkrankheit kann mittels verschiedener Markertechniken bestimmt werden. Ein biochemischer Marker *Ep-D1b* (McMillin et al. 1986, Winzeler et al. 1991) wird häufig in der klassischen Züchtung genutzt, weiterhin konnte ein eng gekoppelter PCR basierter Marker entwickelt werden (Groenewald et al. 2003), welcher jedoch nicht diagnostisch ist (Santra et al. 2006) und in jüngster Vergangenheit ist ein weiterer enggekoppelter STS-Marker veröffentlicht worden (Leonard et al. 2008). Da momentan nur für *Pch1* enggekoppelte Marker zur Verfügung stehen, wird zurzeit nur dieses Gen gegen Halmbruch planmäßig in der Weizenzüchtung genutzt.

Der für die Pflanzenzüchtung am besten geeignete molekulare Marker ist selbstverständlich immer das Gen selbst (Gandon und Crépieux 2008). Im Weizen wurden bisher unter anderem die Resistenzgene *Cre1* und *Cre3* (Nematodenresistenz, de Majnik et al. 2003), verschiedene Braunrostresistenzgene, z.B. *Lr1* (Cloutier et al. 2007), *Lr10* (Feuillet et al. 2003), *Lr21* (Huang et al. 2003) und *Lr34* (Krattinger et al. 2009), das Mehltairesistenzgen *Pm3b* (Srichumpa et al. 2005) und die Helminthosporium-Resistenz *Tsn1* (Haen et al. 2004) identifiziert und kloniert. In diesen Fällen handelt es sich jedoch um monogenische Resistenzen. Bei komplexeren, oligo- oder polygenischen Resistenzen – wie derjenigen gegen die Erreger des parasitären Halmbruchs – dürfte die Klonierung von beteiligten Resistenzgenen noch eine Weile auf sich warten lassen. Daher sind hier enggekoppelte molekulare Marker nach wie vor sehr nützlich und dringend gesucht.

1.4. Ziele der Arbeit

1) Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Nachweismethode zur Ermittlung des Befalls von *Oculimacula* spp. nach Inokulation von Weizenpflanzen. Durch die Nutzung der Real-Time PCR kann der Gehalt spezifischer DNA-Fragmente eines Pathogens, wie z.B. *Rhizotonia solani* (Okubara et al. 2007), *Fusarium gramineum* (Burlakoti et al. 2007, Brandfass and Karlovsky 2006) oder *F. culmorum* (Brandfass and Karlovsky 2006), in Pflanzen bestimmt werden. Basierend auf der Sequenz der ITS1-Region von *Oculimacula* spp. (Poupard et al. 1993) wurde in der vorliegenden Untersuchung mittels Sybr Green®-Assay eine preisgünstige Methode für die Ermittlung des DNA-Gehaltes von *O. yallundae* und *O. aciformis* in künstlich infizierten Weizenpflanzen entwickelt. Diese sichere Phänotypisierung dient als Grundlage für die Entwicklung von molekularen Markern für die Reaktion von Weizen genotypen auf *Oculimacula*-Befall.

2) Die Nutzung von Markern in der markergestützten Selektion (MAS) ist häufig limitiert durch den begrenzten Polymorphiegrad eng gekoppelter Marker im Zuchtmaterial. Für die momentan am häufigsten genutzte Resistenz gegen den parasitären Halmbruch *Pch1* sind verschiedene eng gekoppelte Marker verfügbar (Groenewald et al. 2003; Chapman et al. 2008; Leonard et al. 2008). Zur Evaluierung der Möglichkeit einer Nutzung in der MAS, wurden cosegregierende Marker nach Kartierung in drei DH-Populationen in einem diversen Set von Winterweizensorten getestet, um so Erkenntnisse über deren Nutzbarkeit in der aktuellen Weizenzüchtung zu gewinnen.

1.5. Literatur

- Assefa S, Fehrmann H (1998) Resistance in *Aegilops* species against leaf rust, stem rust, *Septoria tritici* blotch, eyespot and powdery mildew of wheat. *J. Plant Dis Protec* 105: 624-631
- Anonymus (2010a) Kapitel A: Internationale Übersichten. In: Statistisches Jahrbuch 2010, Wiesbaden, S 707 Tab. A.13.3
- Anonymus (2010b) Kapitel 13: Land- und Forstwirtschaft. In: Statistisches Jahrbuch 2010, Wiesbaden, S. 348 Tab. 13.14
- Anonymus (2009) Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. Bodennutzung der Betriebe (Landwirtschaftlich genutzte Flächen). In: Statistischen Bundesamt, Fachserie 3, Reihe 3.1.2, Wiesbaden
- Anonymus (2005) VERORDNUNG (EG) Nr. 856/2005 DER KOMMISSION vom 6. Juni 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Fusarientoxine. *Amtsblatt Nr. L143 vom 07.06.2005*: 3-8
- Aufhammer W (2003) Rohstoff Getreide. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Autrique E, Singh R P, Tanksley S D, Sorrells M E (1995) Molecular markers for 4 leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. *Genome* 38: 75-83
- Bang R (1986) Experimentelle Untersuchungen zur genetischen Analyse und zur Verbesserung der Widerstandsfähigkeit des Saatweizens *Triticum aestivum* L. gegenüber *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Bardsley E S, Burgess J, Daniels A, Nicholson P (1998) The use of a polymerase chain reaction diagnostic test to detect and estimate the severity of stem base diseases in winter wheat. In: Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases. Proc International Conference, Vol. 3. Brighton, UK, 1041-1046
- Barloy D, Lemoine J, Abelard P, Tanguy A M, Rivoal R, Jahier J (2007) Marker-assisted pyramiding of two cereal cyst nematode resistance genes from *Aegilops variabilis* in wheat. *Mol Breeding* 20: 31-40
- Bateman G L, Edwards S G, Marshall J, Morgan L W, Nicholson P, Nuttall M, Parry D W, Scrancher M, Turner A S (2000) Effects of cultivar and fungicides on stem-base pathogens, determined by quantitative PCR, and on diseases and yield of wheat. *Ann Appl Biol* 137: 213-221
- Bateman GL, Hornby D, Payne RW, Nicholls PH (1994) Evaluation of fungicides applied to soil to control naturally-occurring take-all using a balanced-incomplete-block design and very small plots. *Annals of Applied Biology*: 124: 241–51.
- Batts C C V, Fiddian W E H (1955) Effect of previous cropping on eyespot in four varieties of winter wheat. *Plant Pathology* 4, 25-28
- Bauer E, Weyen J, Schiemann A, Graner A, Ordon A (1997) Molecular mapping of novel resistance genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). *Theor Appl Genet* 95: 1263-1269
- Becker H (2011) Pflanzenzüchtung. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Beckmann J S, Soller M (1990) Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Nature Biotechnology* 8: 930-932

- Benavente E, Alix K, Dusautoir J-C, Orellana J, David J L (2001) Early evolution of the chromosomal structure of *Triticum turgidum* – *Aegilops ovata* amphiploids carrying and lacking the *Ph1* gene. *Theor Appl Genet* 103: 1123-1128
- Bender C M, Pretorius Z A, Kloppers F J, Spies J J (2000) Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing *Lr12* and *Lr13*. *J. Phytopathology* 148: 65-76
- Bennett F G A (1984) Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathol* 33: 279–300
- Bhullar N K, Street K, Mackay M, Yahiaoui N, Keller B (2009) Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the *Pm3* resistance locus. *PNAS* 106: 9519-9524
- Bhullar N K, Zhang Z, Wicker T, Keller B (2010) Wheat gene bank accessions as a source of new alleles of the powdery mildew resistance gene *Pm3*: a large scale allele mining project. *BMC Plant Biology* 10: 88-100
- Blanco A Gadaleta A, Cenci A, Carluccio A V, Abdelbacki A M, Simeone R (2008) Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *diccoides* in durum wheat. *Theor Appl Genet* 117: 135-142
- Bockmann H, Knoth K E (1971) Der verstärkte Getreidebau aus pflanzenhygienischer Sicht. *Zschr f PflKrankheiten u PflSchutz* 78: 1-33
- Bockus W W, Su Z, Garrett K A, Gill B S, Stack J P, Fritz A K, Roozeboom K L, Martin T J (2007) Number of experiments needed to determine wheat disease phenotypes for four wheat diseases. *Plant Dis.* 91: 103-108
- Bolton M D, Kolmer J A, Garvin D F (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* 9: 563-575
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W (1980) Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331
- Bovill W D, Horne M, Herde D, Davis M, Wildermuth G B, Sutherland M W (2010) Pyramiding QTL increases seedling resistance to crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) of wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet* 121: 127-136
- Bundessortenamt (2010) Beschreibende Sortenliste. Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Hannover
- Bundessortenamt (2005) Beschreibende Sortenliste. Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Hannover
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M, Ruckenbauer P (2002) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theor Appl Genet* 104: 84-91
- Buerstmayr H, Ban T, Anderson J A (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed* 128: 1-26
- Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, Griesser M, Angerer N, Lengauer D, Miedaner T, Schneider B, Lemmens M (2003) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor Appl Genet* 107: 503-508

- Burnett F J, Oxley S J P, Laing A P (2000) The use of PCR diagnostics in determining eyespot control strategies in wheat. In: Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases. Proc. International Conference, Vol. 1. Brighton, UK, 107-112
- Burt C, Hollins T W, Nicholson P (2010) Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. *Genetics* DOI 10.1007/s00122-010-14271
- Cadle M M, Murray T D, Jones S S (1997) Identification of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* in *Triticum monococcum*. *Plant Dis* 81: 1181-1186
- Cao W, Hughes G R, Ma H, Dong Z (2001) Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat. *Theor Appl Genet* 102: 551-554
- Chao S, Sharp P J, Wordland A J, Warham E J, Koeber R M D, Gale M D (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* 78: 495-504
- Chapman N H, Burt C, Nicholson P (2009) The identification of candidate genes associated with *Pch2* eyespot resistance in wheat using cDNA-AFLP. *Theor Appl Genet* 118: 1045-1057
- Chełkowski J and Stępień Ł (2001) Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J Appl Genet* 42: 117-126
- Chen X M, Luo Y H, Xia X C, Xia L Q, Chen X, Ren Z L, He Z H, Jia J Z (2005) Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. *Plant Breeding* 124: 225-228
- Christen O (2009) Nutzungssysteme und Fruchtfolgen. In: Christen O (ed) Winterweizen. Das Handbuch für Profis. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt, Germany
- Clifford B C (1988) *Puccinia recondita* Roberge. In: Smith IM, Dunez R, Lelliott RA, Phillips DH, Archer SA (eds) European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publ: 185-187
- Cloutier S, McCallum B D, Lourte C, Banks T W, Wickel T, Feuillet C, Keller B, Jordan M C (2007) Leaf rust resistance *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Mol Biol* 65:93-106
- Cook R J (2003) Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 73-86
- Crous P W, Groenewald J Z, Gams W (2003) Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *European J Plant Pathol* 109: 841-950
- Cuthbert P A, Somers D J, Thomas J, Cloutier S, Brule-Babel A (2006) Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling Fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 112: 1465-1472.
- Cuthbert P A, Somers D J, Brule-Babel A (2007) Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 114: 429-437
- Daniels A, Papaikonoumou M, Dyer P S, Lucas J A (1995) Infection of wheat seedlings by ascospores of *Tapesia yallundae*: Morphology of the infection process and evidence for recombination. *Phytopathol* 85: 918-927
- Devos K M, Gale M D (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572
- Dodds P, Thrall (2009) Recognition events and host-pathogen co-evolution in gene-for-gene resistance to flax rust. *Functional Plant Biology* 36: 395-408

- Doussinault G, Dosba F (1977) An investigation into increasing the variability for resistance to eyespot in wheat. Eyespot-variability in the subtribe *Triticinae*. Z Pflanzzüchtg 79: 122-133
- Dreher K, Khairallah M, Ribaut J-M, Morris M (2003) Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. Mol Breed 11: 221-234
- Dyer P S, Nicholson P, Lucas J A, Peberdy F J (1996) *Tapesia acuformis* as a causal agent of eyespot disease of cereals and evidence for a heterothallic mating system using molecular markers. Mycol Res 100: 1219-1226
- Dyer P S, Bateman G L, Wood HM, (2001a) Development of apothecia of the eyespot pathogen *Tapesia* on cereal crop stubble residue in England. Plant Pathol 50: 356-362
- Dyer P S, Furneaux P A, Douhan D, Murray T D (2001b) A multiplex PCR test for determination of mating type applied to the plant pathogens *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. Fung Genet Biol 33: 173-180
- Elliott C, Zhou F, Spielmeyer W, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002) Functional conservation of wheat and rice *Mlo* orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus. Mol Plant Microbe Int 15: 1069-1077
- Feldman M, Kislev M E (2007) Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat. Israel J Plant Sc 55: 207-221
- Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublat A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS) 100: 15253-15258
- Figliuolo G, Jones S S, Murray T D, Zeuli P L S (1998) Characterization of tetraploid wheat germplasm for resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides*, cause of eyespot disease. Genet Resources Crop Evol 45: 47-56
- Fitt B D L, Goulds A, Polley R W (1988) Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat – a review. Plant Pathol 37: 311-328
- Flor H H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296.
- Frei U (1992) Molekulare Pathogendiagnose und Charakterisierung von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. Dissertation, Technische Universität München
- Freier U (1982) Prüfung von *Aegilops*-Arten auf Resistenz gegen *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Frisch M, Bohm M, Melchinger A E (1999) Comparison of selection strategies for marker assisted backcrossing of a gene. Crop Sci 39: 1295-1301
- Frisch M, Melchinger A E (2005) Selection theory for marker-assisted backcrossing. Genetics 170: 909-917
- Gandon B, Crepeux S (2008) Marker implementation in wheat breeding programs: status and prospects. Options Méditerranéennes, Serie A, Séminaires Méditerranéens 81: 93-98
- Griffey C A, Das MK, Stromberg E L (1993) Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to powdery mildew in winter wheat. Plant Dis 77: 618–622.
- Groenewald J Z, Marais A S, Marais G F (2003) Amplified fragment length polymorphism-derived microsatellite sequence linked to the *Pch1* and *Ep-D1* loci in common wheat. Plant Breed 122: 83-85

- Gupta P K, Langridge P, Mirr R R (2009) Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Molecular Breeding* DOI 10.1007/s11032-009-9359-7
- Gupta P K, Varshney R K, Sharma P C, Ramesh B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed* 118: 269-390.
- Gupta S K, Charpe A, Prabhu K V, Haque Q M R (2006) Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor Appl Genet* 113: 1027-1036
- Haeberle J, Schweizer G, Schondelmaier J, Zimmermann G, Hartl L (2009) Mapping of QTL for resistance against *Fusarium* head blight in the winter wheat population Pelikan//Bussard/Ning8026. *Plant Breed* 128: 27-35
- Haen K M, Lu H, Friesen T L, Faris J D (2004) Genomic targeting and high-resolution mapping of the *Tsn1* gene in wheat. *Crop Sci* 44: 951-962
- He R, Chang Z, Yang Z, Yuan Z, Zhan H, Zhang X, Liu J (2009) Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theor Appl Genet* 118: 1173-1180
- He S, Ohm H, Mackenzie S (1992) Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor Appl Genet* 84: 573-578
- Heun M, Mielke H (1982) Resistenzzüchtung gegen *Pseudocercospora herpotrichoides* und *Gaeumannomyces graminis* beim Weizen. *Mitteil. Biol. Bundesanst Land- u Forstwirtsch Berlin-Dahlem*, H. 207: 50 S.
- Hoffmann GM, Schmutterer H (1999) Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Vol. 2 erweiterte und ergänzte Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart: 675 S.
- Hoisington D, Bohorova N, Fennell S, Khairallah M, Pellegrineschi A, Ribaut J M (2002) The application of biotechnology to wheat improvement. In: Curtis BC, Rajaram S, Gomez Macpherson H (ed) *Bread wheat: improvement and production*. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Rome
- Hu X Y, Ohm H W, Dweikat I (1997) Identification of RAPD markers linked to the gene *PM1* for resistance to powdery mildew in wheat. *Theor Appl Genet* 94: 832-840
- Hua W, Liu Z, Zhu J, Xie C, Yang T, Zhou Y, Duan X, Sun Q, Liu Z (2009) Identification and genetic mapping of *pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer. *Theor Appl Genet* 119: 223-230
- Huang L, Brooks S A, Li W, Fellers J P, Trick H N, Gill B S (2003) Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655-664
- Huang X Q, Hsam S L K, Zeller F J, Wenzel G, Mohler V (2000) Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene *Pm24* and marker validation for molecular breeding. *Theor Appl Genet* 101: 407-414
- Huang X-Q, Röder M S (2004) Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* 173: 203-223
- Hunter T (1989) Occurrence of *Tapesia yallundae*, teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*, on unharvested wheat culms in England. *Plant Pathol* 38: 598-603
- Jahier J G, Doussinault G, Dosba F, Bourgeois F (1978) Monosomic analysis of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. *Proc 5th Intern Wheat Genet Symp New Delhi, Indien*: 437-480

- Ji J, Qin B, Wang H, Cao A, Wang S, Chen P, Zhuang L, Du Y, Liu D, Wang X (2008) STS markers for powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat. *Euphytica* 163: 159-165
- Jia J, Devos K M, Chao S, Miller T E, Reader S M, Gale M D (1996) RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat. *Theor Appl Genet* 92: 559-565
- Jones S S, Murray T D, Allan R E (1995) Use of alien genes for the development of disease resistance in wheat. *Annu Rev Phytopathol* 33: 429-443
- Julian A M, Lucas J A (1990) Isozyme polymorphism in pathotypes of *Pseudocercospora herpotrichoides* and related species from cereals. *Plant Pathol* 39: 178-190
- Kilian B, Özkan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, Kohl J, Martin W, Salamini F (2007) Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Mol Biol Evol* 24: 217-227
- Kimber G, Feldman M (1987) Wild wheat. University of Missouri Press, Columbia
- King A C (1990) First record of *Tapesia yellundae* as the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *acuformis*, and its occurrence in the field in the Federal Republic of Germany. *Plant Pathol* 30: 44-49
- Kloppers F J, Pretorius Z A (1997) Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust. *Plant Pathology* 46: 737-750
- Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeyer W, Singh R P, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter L L, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360-1363
- Kuchel H, Fox R, Reinheimer J, Mosionek L, Willey N, Bariana H, Jefferies S (2007) The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy. *Mol Breed* 20: 295-308
- Kumar S, Singh C K, Bandopadhyay R (2011) Wheat genome sequence: challenges and success. *Current Sc* 100: 455-457
- Lagudah E S, McFadden H, Singh R P, Huerta-Espino J, Bariana H S, Spielmeyer W (2006) Molecular genetic characterisation of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114: 21-30
- Lange-de la Camp M (1966a) Die Wirkungsweise von *Cercospora herpotrichoides* Fron, dem Erreger der Halmbruchkrankheit des Getreides. I. Feststellung der Krankheit, Beschaffenheit und Infektionsweise ihres Erregers. *Phytopathol Z* 55: 34-66
- Lange-de la Camp M (1966b) Die Wirkungsweise von *Cercospora herpotrichoides* Fron, dem Erreger der Halmbruchkrankheit des Getreides, III. Art und Ausmaß des Schadens – Bekämpfungsmöglichkeiten. *Phytopathol Z* 56: 363-392
- Law C N, Scott P R, Worland A J, Hollins T W (1975) The inheritance of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. *Genet Res* 26: 73-79
- Leonard J M, Watson C J W, Carter A H, Hansen J L, Zemetra R S, Santra D K, Campbell K G, Riera-Lizarazu O (2008) Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase *EpD1* locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. *Theor Appl Genet* 116: 261-270
- Li H J, Arterburn M, Jones S S, Murray T D (2005) Resistance to eyespot of wheat, caused by *Tapesia yellundae*, derived from *Thinopyrum intermedium* homoeologous group 4 chromosome. *Theor Appl Genet* 111: 932-940

- Li H J, Arterburn M, Jones S S, Murray T D (2004) A new source of resistance to *Tapesia yellundae* associated with a homoologous group 4 chromosome in *Thinopyrum ponticum*. *Phytopathol* 94: 932-937
- Liu S, Zhang X, Pumphrey M O, Stack R W, Gill B S, Anderson J A (2006) Complex microcolinearity among wheat, rice and barley revealed by fine mapping of the genomic region harbouring a major QTL for resistance to Fusarium head blight in wheat. *Funct Intragr Genomics* 6: 83-89
- Liu Z, Sun Q, Ni Z, Nevo E, Yang T (2002) Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. *Euphytica* 123: 21-29
- Lind V (1999) Variation of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton in wheat genotypes carrying the gene *Pch-1*. *Plant Breed* 118: 281-287
- Lindhauer M G (2009) Verarbeitung und Verwertung. Weizen als Lebensmittel. In: Christen O (ed) Winterweizen. Das Handbuch für Profis. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt, Germany
- Lorenz K, Pomeranz Y (1974): The history, development, and utilization of triticale. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 5: 175-280
- Loutre C, Wicker T, Travella S, Galli P, Scofield S, Fahima T, Feuillet C, Keller B (2009) Two different CC-NBS-LRR genes are required for *Lr10*-mediated leaf rust resistance in tetraploid and hexaploid wheat. *The Plant Journal* 60: 1043-1054
- Lucas J A, Dyer P S, Murray T D (2000) Pathogenicity, host specificity, and population biology of *Tapesia* spp., causal agents of eyespot disease of cereals. *Advances in Botanical Research* 33: 225-258
- MA Z Q, Sorrells M E, Tanksley S D (1994) RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3*, and *Pm4* in wheat. *Genome* 37: 871-875
- Ma Z-Q, Wei J-B, Cheng S-H (2004) PCR-based markers for the powdery mildew resistance gene *Pm4a* in wheat. *Theor Appl Genet* 109: 140-145
- Macer R C F (1966) Resistance to eyespot disease (*Cercospora herpotrichoides* Fron) determined by a seedlings test in some forms of *Triticum*, *Aegilops*, *Secale* and *Hordeum*. *J Agric Sci* 67: 389-396
- Maia N (1967) Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *C R Acad Agric France* 53: 149-154
- de Majnik J, Ogonnaya F C, Moullet O, Lagudah E S (2003) The *Cre1* and *Cre3* nematode resistance genes are located at homeologous loci in the wheat genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1129-1134
- Matthies A, Buchenauer H (2000) Effect of tebuconazole (Folicur (R)) and prochloraz (Sportak (R)) treatments on Fusarium head scab development, yield and deoxynivalenol (DON) content in grains of wheat following artificial inoculation with *Fusarium culmorum*. *Journal of Plant Disease and Protection* 107: 33-52
- Manninger K (1992) Occurrence and virulence of wheat leaf rust in Hungary. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 24: 84-86
- McFadden E S, Sears E R (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered* 37: 81-89; 107-116
- McIntosh R A, Wellings C R, Park R F (1995) Wheat Rusts. An atlas for resistance genes. Kluwer Verlag. Dordrecht, Boston, London.
- McMillin D E, Allan R E, Roberts D E (1986) Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor Appl Genet* 72: 743-747

- Mebrate S A, Oerke E C, Dehne H W, Pillen K (2008) Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica* 162: 457-466
- Meudt H M, Clarke A C (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP: applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci* 12: 106-117
- Mielke H (1995) Studien zum Befall des Weizens mit *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton unter Berücksichtigung der Sorten- und Artenanfälligkeit sowie der Bekämpfung des Erregers. *Mitteil Biol Bundesanst Land- u Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 314: 197 S
- Mohler V, Singrün C (2004) General Considerations: Marker-assisted selection. In: Lörz H, Wenzel G (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: 55) Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement*. Springer Verlag
- Moreau J M, van Schingen J C, Maraite H (1989) Detection of *Tapesia yallundae*, the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*, on wheat stubbles in Belgium. *Mededelingen van de faculteit landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 54: 555-559
- Moreau J M, Maraite H (1995): Bipolar heterothallism in *Tapesia yallundae* for the two varieties of the anamorph *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycol Res* 99: 76-80
- Morgante M, Olivieri A M (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182
- Mori N, Kondo Y, Ishii T, Kawahara T, Valkoun J, Nakamura C (2009) Genetic diversity and origin of timopheevii wheat inferred by chloroplast DNA fingerprinting. *Breed Sci* 59: 571-578
- Meyburg A A, Cawood M, Wingfield B D, Botha A-M (1998) Development of RAPD and SCAR markers linked to the Russian wheat aphid resistance gene *Dn2* in wheat. *Theor Appl Genet* 96: 1162-1169
- Nas T M S, Sanches D L, Diaz M G Q, Mendioro M S, Virmani S S (2005). Pyramiding of thermosensitive genetic male sterility (TGMS) genes and identification of a candidate *tms5* gene in rice. *Euphytica* 145: 67-75
- Nelson J C, Singh R P, Autrique J E, Sorrells M E (1997) Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat. *Crop Sci* 37: 1928-19-35
- Nelson J C, Sorrells M E, Van Deynze A E, Lu Y H, Atkinson M, Bernard M, Leroy P, Faris J D, Anderson J A (1995a) Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics* 141: 721-731
- Nelson J C, Van Deynze A E, Autrique E, Sorrells M E, Lu Y H, Merlino M, Atkinson M, Leroy P (1995b) Molecular mapping of wheat homoeologous group 2. *Genome* 38: 516-524
- Nelson J C, Van Deynze A E, Autrique E, Sorrells M E, Lu Y H, Negre S, Bernard M, Leroy P (1995c) Molecular mapping of wheat homeologous group 3. *Genome* 38: 525-533
- Nicholson P, Rezanoor H N, Hollins T W (1991) Occurrence of *Tapesia yallundae* apothecia on field and laboratory-inoculated material and evidence for recombination between isolates. *Plant Pathol* 40: 626-634
- Nicholson P, Rezanoor H N, Simpson D R, Joyce D (1997) Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis* using a PCR assay. *Plant Pathol* 46: 842-856
- Nicholson P, Turner A S, Edwards S G, Bateman G L, Morgan L W, Parry D W, Marshall J, Nuttall M (2002) Development of stem-base pathogens on different cultivars of winter wheat determined by quantitative PCR. *Eur J Plant Pathol* 108: 163-177

- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt B F, Dangi J L (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet* 2003: 579-609
- Nirenberg H (1981) Differenzierung der Erreger der Halmbruchkrankheit. I. Morphologie. *Z PflKrankh PflSchutz* 88: 241-248
- Nita M, Ellis M A, Madden L V (2003) Reliability and accuracy of visual estimation of *Phomopsis* leaf blight of strawberry. *Phytopathology* 93: 995-1005
- Nirenberg H (1981) Differenzierung der Erreger der Halmbruchkrankheit I Morphologie Z Pflanzenkrankh u Pflschutz 88: 241-248
- Norton N, Williams N M, Williams H J, Spurlock G, Kirov G, Morris D W, Hoogendoorn B, Owen M J, O'Donovan M C (2002) Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. *Hum Genet* 110: 471-478
- Oetting W S, Lee H K, Flanders D J, Wiesner G L, Sellers T A, King R A (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30: 450-458
- van Ooijen JW (2006) JoinMap[®] 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Plant Research Internation, Wageningen, the Netherlands.
- Payne P I (1987) Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann Rev Plant Phys* 38: 141-153
- de la Peña R C, Murray T D, Jones S S (1996) Linkage relations among eyespot resistance gene *Pch2*, endopeptidase *Ep-A1b*, and RFLP marker *Xpsr121* on chromosome 7A of wheat. *Plant Breed* 115: 273-275
- Pérez T, Albornoz J, Domínguez A (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7: 1347-1357
- Perugini L D, Murphy J P, Marshal D, Brown-Guedira G (2008) *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor Appl Genet* 116: 417-425
- Porter D R, Burd J D, Shufran K A, Webster J A (2000) Efficacy of pyramiding greenbug (Homoptera: Aphididae) resistance genes in wheat. *Journal of Economic Entomology* 93: 1315-1318
- Priestley R A, Dewey F M, Nicholson P, Rezanoor H N (1992) Comparison of isoenzyme and DNA markers to differentiate W-, R- and C-pathotypes of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Plant Pathol* 41: 591-599
- Qiu J-W, Schürch A C (2007) Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor Appl Genet* 115: 159-168
- Rajaram S, van Ginkel M (1996) A guide to the CIMMYT bread wheat section. In Wheat Special Report No 5. Mexico, DF, CIMMYT
- Raupp W J, Sukhwinder-Singh, Brown-Guedira G L, Gill B S (2001) Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor Appl Genet* 102: 347-352
- Ravel C, Praud S, Canguier A, Dufour P, Giancola S, Balfourier F, Chalhoub B, Brunel D, Linossier L, Dardevet M, Beckert M, Rousset M, Murigneux A, Charmet G (2007) DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. *Euphytica* 158: 331-336
- Ribaut J M, Hoisington D (1998) Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3: 236-239

- Röder M S, Korzun V, Wendehake, K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, Ganal M W (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 1-17
- Rodemann B (2009) Krankheiten durch pilzliche Pathogene im Weizen. In: Christen O (ed) Winterweizen. Das Handbuch für Profis. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt, Germany
- Rong J K, Millet E, Manisterski J, Feldman M (2000) A new powdery mildew resistance gene: Introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. *Euphytica* 115: 121-126
- Sacco F, Suarez E Y, Naranjo T (1998) Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr3* on chromosome 6B of Sinvalocho MA wheat. *Genome* 41: 686-690
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Sci* 230: 1350-1354
- Samsampour D, Zanjani B M, Pallavi J K, Singh A, Charpe A, Gupta S K, Prabhu K V (2010) Identification of molecular markers linked to adult plant leaf rust resistance gene *Lr48* in wheat and detection of *Lr48* in the Thatcher near-isogenic line with gene *Lr25*. *Euphytica* 174: 337-342
- Sanderson F R, King A C (1988) Field occurrence of *Tapesia yallundae*, the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* Aust Plant Pathol 17: 20-21
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463-5467
- Santra D K, Watt C, Little L, Kidwell K K, Campbell K G (2006) Comparison of a modified assay method for the endopeptidase marker *Ep-D1b* with the Sequence Tag Site marker *XustSSR2001-7DL* for strawbreaker foot rot resistance in wheat. *Plant Breed* 125: 13-18
- Scott P R, Hollins T W (1974) Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Ann Appl Biol* 78: 269-279
- Scott P R, Hollins T W, Muir P (1975) Pathogenicity of *Cercospora herpotrichoides* to wheat, barley, oats and rye. *Trans Br Mycol Soc* 65: 529-538
- Schmolke M, Zimmermann G, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl L (2008) Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in a European winter wheat population. *Plant Breed* 127: 459-464
- Slikova S, Gregova E, Bartos P, Hanzalova A, Hudcovicova M, Kraic J (2004) Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24*. *Plant Soil and Environment* 50: 434-438
- Smeets H J M, Brunner H G, Ropers H-H, Wieringa B (1989) Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. *Hum Genet* 83: 245-251
- Smith P H, Hadfield J, Hart N J, Koebner R M D, Boyd L A (2007) STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBX-LRR-type resistance gene cluster. *Genome* 50: 259-265
- Sobrino B, Brión M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154: 181-194
- Somers D J, Isaac P, Edwards k (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 109: 1105-1114.

- Somers D J, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A (2003) Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 49: 431-437
- Srichumpa P, Brunner S, Keller B, Yahiaoui N (2005) Allelic series of four powdery mildew resistance genes at the *Pm3* locus in hexaploid bread wheat. *Plant Physiology* 139: 885-895
- Takken F L W, Joosten H A J (2000) Plant resistance genes: Their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* 106: 699-713
- Talbert L E, Blake N K, Chee P W, Blake T K, Magyar G M (1994) Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theor Appl Genet* 87: 789-794.
- Talbert L E, Bruckner P L, Smith L Y, Sears R, Martin T J (1996) Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. *Theor Appl Genet* 93: 463-467
- Tao W, Liu D, Liu J, Feng Y, Chen P (2000) Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 100: 564-568
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138
- Tenaillon M I, Sawkins M C, Long A D, Gaut R L, Doebley J F, Gout B S (2001) Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* spp. *mays* L.) *PNAS* 98: 9161-9166
- Thiele A, Schumann E, Peil A, Weber W E (2002) Eyespot resistance in wheat *Aegilops kotschyi* backcross lines. *Plant Breed* 121: 29-35
- Tschermak E, Bleier H (1926) Über fruchtbare *Aegilops*-Weizenbastarde. Beispiele für die Entstehung neuer Arten durch Bastardierung. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 44: 110-132
- Tragoonrun S, Kanazin V, Hayes P M, Blake T K (1992) Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl Genet* 84: 1002-1008
- Uslu E, Miller T E, Rezanoor N H, Nicholson P (1998) Resistance of *Dasypyrum villosum* to the cereal eyespot pathogens, *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Euphytica* 103: 203-209
- Vandam J, Defosse L, Raepsaet J (1980) Wheat breeding for resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides* Fron) at Gembloux Belgium. *Proc 3rd International Wheat Conference Madrid, Spanien*, 273-277
- Vavilov N I (1965) Chromosome duplication as a method of producing new plant forms. *Izdatel'stvo "Nauka"* 5: 400-405
- Vida G, Gál M, Uhrin A, Veisz O, Wang Z, Kiss T, Karsai I, Bedő Z (2009) Application of molecular markers in breeding for leaf rust resistance in wheat. *Ber 60 Arbeitstag Arbeitsgem Saatzuchtleiter, Gumpenstein, Bundesversuchsanst alpenländ Landwirtsch Irdning, Österreich*: 65-71
- Vierling R A, Nguyen H T (1992) Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theor Appl Genet* 84: 835-838
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijns M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
- Wallwork H (1987) A *Tapesia* teleomorph for *Pseudocercospora herpotrichoides*, the cause of eyespot in wheat. *Australasian Plant Pathology* 16: 92-93

- Walther U (2000) Analyses of virulences and selection of resistant material on the host/pathogen combination barley/*Puccinia hordei* and wheat/*Puccinia recondita*. Beitr Züchtungsforschung 6: 1-9
- William HM, Trethowan R, Crosby-Galvan FM (2007) Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. Euphytica 157: 307-319
- Williams PG (1984) Obligate parasitism and axenic culture. In: Bushnell WR, Roelfs AP (eds) The cereal rusts, Vol. I: Origins, specificity, structure, and physiology. Academic Press, Inc., London: 399-430
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V (1991) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531-6535
- Winzeler M, Keller B, Winzeler H (1991) Routinemäßiger Nachweis eines Resistenzgens gegen die Halmbruchkrankheit (*Pseudocercospora herpotrichoides*) mit Hilfe eines biochemischen Markers bei Winterweizen. Ber 42 Arbeitstag Arbeitsgem Saatzuchtleiter, Gumpenstein, Bundesversuchsanst alpenländ Landwirtsch Irdning, Österreich: 87-93
- Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. Plant J 37: 528-538
- Yildirim A, Jones S S, Murray T D, Cox T S, Line R F (1995) Resistance to stripe rust and eyespot diseases of wheat in *Triticum tauschii*. Plant Dis 79: 1230-1236
- Yildirim A, Jones S S, Murray T D (1998) Mapping a gene conferring resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* on chromosome 4V of *Dasyphyrum villosum* in a wheat background. Genome 41: 1-6
- Yildirim A, Jones S S, Murray T D, Line R F (2000) Evaluation of *Dasyphyrum villosum* populations for resistance to cereal eyespot and stripe rust pathogens. Plant Dis 84: 40-44
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N, McCouch S R (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 253: 535-545
- Zhang L Q, Yan Z H, Dai S F, Chen Q J, Yuan Z W, Zheng Y L, Liu D C (2008) The crossability of *Triticum turgidum* with *Aegilops tauschii*. Cereal Res Communications 36: 417-427
- Zhang Z, Xu J, Xu Q, Larkin P, Xin Z (2004) Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. Theor Appl Genet: 109: 433-439

2. Veröffentlichungen

2.1. Development of a Real-time PCR method for the identification of wheat genotypes carrying different eyespot resistance genes

N. Meyer¹, V. Lind¹, P. Karlovsky², M. Zahn^{1,3}, W. Friedt⁴, F. Ordon¹

¹ Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany; ² Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research Unit, Georg-August-University Goettingen, Grisebachstr. 6, 37077 Goettingen, Germany; ³ Institute of Plant Nutrition, Faculty of Natural Sciences, Leibniz University Hannover, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany; ⁴ Plant Breeding Department, Research Center for Bio Systems Land Resources and Nutrition (IFZ), Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany (correspondence to N. Meyer, email: nina.meyer@kws.com)

Abstract

Eyespot, caused by the fungus pathogens *Oculimacula acuformis* and *O. yallundae*, is an important disease of wheat (*Triticum aestivum*). The two pathogens generate similar symptoms and cannot be distinguished visually. In order to distinguish *O. acuformis* and *O. yallundae* infections as well as identifying reliable quantitative differences in the level of resistance of wheat genotypes, two SYBR Green based Real-time PCR assays were developed. The effect of species (*O. acuformis*, *O. yallundae*), the influence of time after inoculation until sample collection and the relevance of wheat cultivars carrying *Pch1*, *Pch2*, or none of the resistance genes on the pathogen-DNA content were analysed.

The most clear-cut difference of pathogen content between resistant and susceptible wheat genotypes was obtained 12 weeks after inoculation with *O. yallundae*. Growth chamber tests using artificial inoculation with *O. yallundae* and sampling 12 weeks after inoculation for Real-time PCR is shown to be a reliable procedure to determine the resistance level of wheat cultivars against eyespot. Likewise, this is the basis for the development of efficient molecular markers.

Keywords: Wheat, Eyespot, *Oculimacula* spp., Resistance, Real-time PC

2.2. Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1* in wheat

Nina Meyer¹, Volker Lind¹, Magdalena Heindorf¹, Viktor Korzun²,
Wolfgang Friedt³, Frank Ordon¹

¹Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

²KWS LOCHOW GMBH, Ferdinand-von-Lochow-Str. 5, 29296 Bergen, Germany

³Plant Breeding Department, Research Center for Bio Systems Land Resources and Nutrition (IFZ), Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen (correspondence to nina.meyer@kws.com)

Abstract

Eyespot is a major disease of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in temperate climates and causes yield losses of up to 40%. The causal agents of eyespot are *Oculimacula acuformis* (syn. *Tapesia acuformis*) and *O. yallundae* (syn. *T. yallundae*). *Pch1* located on chromosome 7DL is the most important and most effective resistance gene, but its use in practical breeding is limited because markers like *XustSSR2001-7DL* are often population-specific in German wheat cultivars and phenotyping causes difficulties. Therefore, based on results obtained for endopeptidase Ep-D1a, an endopeptidase, which is very closely linked to *Pch1*, molecular markers located in the terminal region of chromosome 7DL were analysed in three double haploid populations. Closely linked molecular markers were validated on a set of German winter wheat cultivars to obtain information on their usefulness for marker assisted selection (MAS). Based on the analysis of 127 DH-lines, linkage to *Pch1* (*Ep-D1*) was obtained for *Xorw1*, *Xorw5*, *Xorw6*, *Xcfd175*, *Xbarc76*, *Xwmc14*, and *Xcfa2040*. Analyses of 104 German winter wheat cultivars showed that the markers *Xorw1*, *Xorw6* and *Xcfd175* are well suited for MAS in German wheat breeding.

Keywords *Triticum aestivum*; *Oculimacula* spp.; DH; Doubled haploid

3. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Methoden zur Erfassung des Befalls des Weizens mit *Oculimacula* spp. (*T. aestivum*) zu entwickeln und zu etablieren, die eine sichere Erfassung des Resistenzniveaus als Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker für das Resistenzgen *Pch1* erlauben. Weiterhin wurden entsprechende Marker im Hinblick auf ihre Nutzbarkeit in markergestützten Selektionsverfahren (MAS) getestet. Im Folgenden werden deshalb die Entwicklung von enggekoppelten Markern für Resistenzen im Getreide und deren Anwendung in markergestützten Selektionsverfahren diskutiert.

3.1. Entwicklung von Markern

Die Entwicklung von molekularen Markern für MAS erfolgt in mehreren Schritten. Als Ausgangspunkt wird eine für das Merkmal spaltende geeignete Population ausgewählt und eine Phänotypisierung durchgeführt. Durch verschiedene molekulare Verfahren können anschließend zunächst eng gekoppelte Marker lokalisiert und dann auf ihre Nutzbarkeit in der praktischen Pflanzenzüchtung überprüft werden.

3.1.1. Populationsaufbau als Voraussetzung für die Markerentwicklung

Welche Art der Population für eine Kartierung als erster Schritt der Markerentwicklung gewählt wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Üblich sind F_2 -, DH- (Doppelhaploide) und RIL-Populationen (Rekombinante Inzuchtlinien) (Varshney et al. 2006). Bei DH- und RIL-Populationen sind die entwickelten Linien stabil (immortal). Dies ist vorteilhaft, da bei weiteren Saatgutvermehrungen keine Segregation erfolgt, wodurch die Linien unbegrenzt nutzbar sind (Varshney et al. 2006). Damit ist sichergestellt, dass bei Phänotypisierungen an verschiedenen Orten über Jahre, gleiches Material verwendet werden kann und sichere phänotypische Daten erzeugt werden können (Young 1994). Der Aufwand der Erstellung von DH- und RIL-Populationen ist im Gegensatz zu F_2 -Populationen jedoch erheblich größer. Sofern es sich nicht um eine Kartierung innerhalb eines eng umgrenzenden Segmentes handelt, werden für den Aufbau einer RIL-Population zwischen sechs und acht Generationen benötigt (Semagn et al. 2006). DH-Linien können im Gegensatz zu rekombinanten Inzuchtlinien in einer kürzeren Zeitspanne erstellt werden und sind zudem komplett homozygot. Für fast alle Getreidearten sind Protokolle für die DH-Produktion verfügbar beispielhaft sind hier Gerste (Clapham 1973, Kasha und Kao 1970), Triticale (Tuveesson et al. 2000) und Hafer (Kiviharju et al. 2005) zu nennen. Für Weizen stehen sowohl das System der

Bestäubung mit Maispollen (Laurie und Bennett 1988) als auch das System der Mikrosporen- oder Antherenkultur (Ouyang et al. 1983) zur Verfügung. Bei dem direkten Vergleich zwischen DH- und RIL-Populationen gleicher Eltern beim Reis zeigten He et al. (2001), dass bei DH-Populationen weniger gestörte Spaltungen für gleiche Marker auftraten. Auch bei der Kartierung von SSR und DaRT Markern (Diversity Array Technology) in verschiedenen *T. aestivum* Populationen (RIL und DH) konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Frankie et al. 2008). Dies kann durch den Einfluss von Umwelt- und genetischen Effekten bei der Entwicklung der RIL Populationen entstanden sein (Frankie et al. 2008). In anderen Studien konnte bei DH-Populationen durch den negativen Einfluss der Gametophyten-Selektion für bestimmte genetische Regionen eine stärkere Spaltungsabweichung beobachtet werden (Xu et al. 1997)

Neben der Art der Population spielt auch die Populationsgröße bei der Kartierung eine wichtige Rolle. Ferreira et al. (2006) berechneten mittels Simulationen für Reis den positiven Einfluss der Erhöhung der Individuenanzahl auf das Kartierungsergebnis. Je größer die Anzahl der Individuen, desto besser konnten Kopplungsgruppen mit richtiger Markeranordnung berechnet werden (Ferreira et al. 2006), da die Berechnung der Rekombinantionsereignisse direkt durch die Anzahl der zugrunde liegenden Gameten, und somit der Anzahl an Individuen, ermittelt wird (Ritter et al. 1990).

3.1.2. Phänotypisierung zur Ermittlung der Segregation des Merkmales

Generell gibt es bei pilzlichen Erkrankungen verschiedene Möglichkeiten der Befallsermittlung, die je nach Erfahrungen, Budget und Ausstattung unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzen.

Die visuelle Bonitur des Krankheitsbefalls wird häufig in segregierenden Populationen im Rahmen der Markerentwicklung eingesetzt, z.B. im Weizen für Mehltau (He et al. 2009), Schwarzrost (Tsilo et al. 2009) oder Braunrost (Mebrate et al. 2008). Sie kann jedoch in Abhängigkeit der betrachteten Krankheit stark mit Fehlern behaftet sein. So zeigten Bockus et al. (2007), dass durch die hohe Varianz bei der Befallsermittlung nach künstlicher Inokulation von verschiedenen Pilzkrankheiten (Ährenfusariose, DTR-Blattdürre, Septoria Blatflecken und Blatt- und Spelzenbräune (hervorgerufen durch *Stagonospora nodorum*)) im Weizen, mindestens fünf Wiederholungen je Experiment auch bei Experimenten mit künstlicher Inokulation benötigt werden, um Resistenzunterschiede statistisch abgesichert ermitteln zu können. In einer anderen Untersuchung konnten Miedaner et al. (2001) zeigen,

dass bei Freilandversuchen nach Inokulation mit *F. culmorum* starke Genotyp x Umwelt - Interaktionen auftraten. Auch die zwei Arten *O. yallundae* und *O. acuformis* können visuell aufgrund ihrer Symptomausprägungen nicht unterschieden werden (Turner et al. 1999). Weiterhin ist es häufig schwierig die Symptomausprägungen von *Oculimacula* spp. von anderen Fußkrankheiten wie spitzer Augenfleck (hervorgerufen durch *Rhizoctonia cerealis*) oder durch *Fusarium* spp. hervorgerufene Fußkrankheiten zu unterscheiden (Turner et al. 2001). Ferner können die durch *Oculimacula* spp. hervorgerufenen Symptomausprägungen durch obengenannte Erreger maskiert werden (Nita et al. 2003, Turner 1999). Eine große Varianz der visuellen Ausprägung der Halmbruchkrankheit bei gleichmäßig inokulierten Pflanzen gleichen Genotyps konnte auch in Gewächshausversuchen am Julius Kühn-Institut festgestellt werden. In den von Meyer et al. (2011a) zugrunde liegenden Daten der visuellen Bonitur von ‚Hermann‘ und ‚St.906‘ schwankten die Standardabweichungen der prozentual befallenen Blattscheiden für drei Wiederholungen zwischen 0,029 und 0,106 bzw. 0,003 und 0,104 für verschiedene Inkubationszeiten und Inokulum (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mittelwerte (mean) und Standardabweichungen (SD) des prozentualen Anteils befallener Blattscheiden nach künstlicher Inokulation von *Oculimacula yallundae* (OY), *O. acuformis* (OA) und einem Gemisch aus beiden Pathogenen (OA + OY) über drei Wiederholungen für die Probenahme 8, 10 und 12 Wochen nach Applikation (p. i. = post inoculation). Der prozentuale Anteil befallener Blätter nach Inokulation wurde als Mittelwert von 10 Pflanzen je Genotyp erfasst. Sorte ‚Hermann‘ trägt Resistenzgen *Pch1*, ‚St906‘ ist hoch anfällig gegenüber *Oculimacula* spp.

cultivar	inokulation with	8 weeks p.i.		10 weeks p.i.		12 weeks p.i.	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
Hermann	OA + OY	0,336	0,029	0,459	0,106	0,624	0,094
	OA	0,303	0,031	0,355	0,083	0,324	0,090
	OY	0,372	0,042	0,336	0,043	0,458	0,097
St.906	OA + OY	0,495	0,033	0,818	0,018	0,966	0,050
	OA	0,349	0,003	0,559	0,101	0,844	0,060
	OY	0,492	0,064	0,602	0,104	0,874	0,049

Um eine bessere Standardisierung von Screeningverfahren zu erhalten, werden neben visuellen Bonituren im Gewächshaus und auf dem Feld für verschiedene pilzliche Erkrankungen auch standardisierte Laborverfahren entwickelt, die nach künstlicher Infektion visuell ausgewertet werden. Ein solches Verfahren wurde beispielsweise für Fusariuminfektionen an *T. aestivum*-Blattsegmenten angewendet (Browne und Cooke 2004). Zum Teil werden auch bildgebende Methoden bei Einzelgewebetrachtungen wie Blattinfektionen genutzt. Durch die Berechnung aus Intensität der Färbung und Flächengröße wird ein reproduzierbares Befallsbild erstellt (z.B. für *Botrytis cinerea* auf

Blättern von *Daucus carota* L. nach künstlicher Inokulation (Baranski et al. 2006)). Auch Jackson et al. (2007) konnten die Überlegenheit einer computergesteuerten Methode gegenüber der reinen visuellen Bonitur von Kronenrost an Hafer (*A. sativa* L.) zeigen.

Im Gegensatz dazu wird bei den vorwiegend für die Quantifizierung von Viruserkrankungen genutzten serologischen Methoden anhand der Antikörperbindung von spezifischen Seren die Anfälligkeit der infizierten Pflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen ermittelt (Clark und Adams 1977). Dieses Verfahren wird für verschiedene Krankheiten im Weizen eingesetzt. Zagula et al. (1990) stellten drei unterschiedliche ELISA (Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay)-Verfahren zur Detektion vom Gelbmosaikvirus im Weizen vor. Auch zur Lokalisation von Resistenzgenen für die Virose SBCMV (Soil-borne cereal mosaic virus) beim Weizen wurde diese Technik eingesetzt (Perovic et al. 2009). Ferner können einige pilzliche Erreger mit dieser Technik nachgewiesen werden, so z.B. *Gaeumannomyces graminis tritici* (Elnahaar et al. 1985), aber auch *Oculimacula* spp. (Lind 1992). Der ELISA für *Oculimacula* spp. unterscheidet jedoch nicht zwischen den beiden *Oculimacula* Erregern, obwohl das Serum aus einem einzelnen Pilzprotein aus infizierten Pflanzen isoliert wurde (Lind 1990), welches von anderen Fußkrankheitserregern wie z.B. *Fusarium*-Arten und *Microdochium nivale* klar unterschieden werden kann.

Ähnlich wird bei PCR-basierten Methoden die quantitative Menge der spezifischen Pathogen-DNA in der Wirtspflanze gemessen. Der Vorteil zu den anderen vorgestellten Verfahren besteht darin, dass Mischinfektionen insofern keinen Einfluss haben, da spezifische Primer nur die Menge eines spezifischen Pathogens amplifizieren, und somit das Ergebnis nicht durch andere Erreger verfälscht oder überdeckt wird (Brandfass und Karlovsky 2006, Meyer et al. 2011a). Für *Oculimacula* spp. wurden zunächst gelbasierte quantitative PCR-Nachweise von Nicholson et al. (1997) entwickelt. Anhand einer Zeitreihe bei der Entnahme im Verlauf der PCR für Zielfragmente und Kompetitor-DNA kann die Konzentration der zu untersuchenden Probe quantitativ nachgewiesen werden (Nicholson et al. 1997, Ray et al. 2004). Da es sich hierbei um eine gelbasierte Analyse handelt, ist die Bearbeitung jedoch sehr zeitaufwendig, und es kann nur ein begrenzter Probenumfang bearbeitet werden (Walsh et al. 2005, Meyer et al. 2011a). Dies trifft nicht auf die Real-time PCR mit Taq-Man Sonden zu, die Walsh et al. (2005) entwickelten. Zwar handelt es sich hierbei um ein hochpreisiges Verfahren, jedoch ist der Laboraufwand nach Extraktion der Proben geringer und die Aussagekraft präziser (Meyer et al. 2011a). Mit den in dieser Arbeit

entwickelten SYBR Green Assays (Meyer et al. 2011a) konnten alle Vorteile der Real-time PCR für die Detektion von pilzlicher DNA in Pflanzenmaterial mit einer zusätzlichen Kostenreduktion genutzt werden (Demontis et al. 2008, Giglio et al. 2003, Brandfass und Karlovsky 2006). Beispiele für die Anwendbarkeit und Präzision bei Infektionsscreenings zeigen unter anderem die Arbeit von Gachon und Saindrean (2004), die SYBR Green Assays zum Nachweis des Wachstums der Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* genutzt haben. Mit diesem Verfahren können schon geringste Mengen pilzlicher DNA nachgewiesen werden, welche noch keine phänotypischen Ausprägungen hervorrufen. Auch Chilvers et al. (2007) zeigten für *Botrytis aclada*, *B. allii*, and *B. byssoidea* in *Allium cepa* das Analysen mit SYBR Green die gleiche Genauigkeit wie Taq-Man-Sonden erreichen. Die Anwendung von Real-time PCR-Verfahren wird mittlerweile für viele Pathogennachweise genutzt, wie z.B. für *Rhizoctonia solani* (Okubara et al. 2007), *F. graminearum* (Burlakoti et al. 2007, Brandfass and Karlovsky 2006), *F. culmorum* (Brandfass and Karlovsky 2006) und *Oculimacula* spp. (Walsh et al. 2005).

Bei dem Vergleich der drei Methoden a) visuelle Bonitur, b) bildgebende Verrechnung und c) Real-time PCR für die Quantifizierung zur Kartierung eines Resistenz-QTLs (Quantitative Trait Loci) konnten auch Jackson et al. (2007) eine Erhöhung der Genauigkeit der Daten von a nach c feststellen.

3.1.3. Eignung verschiedener Markersysteme

Da oftmals zu Beginn der Markerentwicklung für ein Merkmal keine Erkenntnisse über die Lokalisation enggekoppelter Marker im Genom vorliegen, können z.B. PCR-basierte AFLP-Analysen eingesetzt werden, da ohne genetische Vorinformationen mit einer geringen Anzahl an Primerkombinationen viele aussagekräftige Fragmentlängenunterschiede detektiert werden können (Roy et al. 2006), welche das Weizengenom gleichmäßig abdecken (Hazen et al. 2002). Unter Nutzung der Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore et al. 1991) kann eine effektive Suche von potenziellen Zielfragmenten (Li et al. 2009, Juergens et al. 2010) bei der Bearbeitung einfach vererbter Merkmale erfolgen. Die Nutzung von polymorphen AFLP-Fragmenten im Züchtungsprozess ist jedoch aufgrund der Komplexität der Laborschritte (vgl. 1.3.1) ungeeignet. Durch Umwandlung in einfach handhabbare Marker (STS, CAPS) kann der gekoppelte Polymorphismus im Zuchtprozess schnell und effektiv genutzt werden. So wurde für das Streifenrost Resistenzgen *YrC591* ein eng gekoppeltes AFLP-Fragment in einen SCAR-Marker (Sequence Characterized Amplified

Region) (*SC-P35M48*) umgewandelt (Li et al. 2009). Ein mit dem Gen *ph1b* gekoppeltes AFLP-Fragment wurde von Qu et al. (1998) in einen STS-Marker umgewandelt, um ein Screening von *ph1b* Mutanten zu ermöglichen. Dieses Gen ist verantwortlich für die Chromosomenpaarung, wodurch *ph1b* Mutanten auch mit entfernt verwandten Arten kreuzbar sind, was das Einbringen von Resistenzen aus anderen Arten erleichtert (Qu et al. 1998). Auch in anderen Kulturarten wurde die Umwandlung von AFLP-Fragmenten für die Nutzung in der Züchtung durchgeführt, so z.B. für das Mehltauresistenzgen *Mlg* in Gerste (Korell et al. 2008), für den Restorer Lokus *Rfm1* bei Gerste (Murakami et al. 2005) oder für *Turnip yellows virus* Resistenz im Raps (Juergens et al. 2010). Shan et al. (1999) zeigten jedoch auch, dass die Umwandlung von polymorphen AFLP-Banden in sequenzspezifischen PCR-Markern nicht für jede Bande möglich ist. Bei der Umwandlung von AFLP-Fragmenten kann nur der innere Bereich betrachtet werden, die Spezifität der AFLP-Bande wird jedoch durch die Restriktionsstelle bzw. den Sequenzunterschied an den äußeren Enden der Fragmente bedingt. Diese Beobachtung konnte auch bei den zugrunde liegenden Arbeiten gemacht werden. Für die DH-Populationen BAZ07 und BAZ10 konnte ein cosegregierendes AFLP-Fragment identifiziert und kloniert werden. Dieses zeigte jedoch nach Entwicklung von endständigen Primern bei der Resequenzierung keine Unterschiede zwischen dem anfälligen und dem resistenten Elter (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu anonymen AFLP-Fragmenten sind die genetischen Positionen von SSR-Markern bekannt (z.B. Somers et al. 2004). Da es sich bei SSRs um codominante, multiallelische Marker handelt (Morgante und Olivieri 1993, Smeets et al. 1989), ist der Einsatz in der MAS durch eine hohe Anzahl an möglichen Polymorphismen sehr effektiv. Der Aufwand für die Entwicklung von SSRs ist jedoch relativ hoch (Song et al. 2005). Aufgrund der einfachen Nutzbarkeit und robusten Technik werden SSR Marker im Weizen stark genutzt. Dies zeigt eine von Feuillet und Keller (2004) erarbeitete Zusammenstellung diverser für die Resistenzzüchtung im Weizen genutzter Marker. SSR Marker für verschiedene Resistenzgene gegen Gelbrost, Mehltau, Braunrost und Schwarzrost sind bekannt. Auch Gupta et al. (2009) zeigten, dass mittels SSR-Analysen eine erfolgreiche Nutzung von QTLs verschiedener Fusarium-Resistenzen in der Weizenzüchtung möglich ist. Aufgrund ihrer Fülle und gleichmäßigen Verteilung im Genom geht der Trend zu SNP-basierten Markersystemen (Gupta et al. 2008). Da eine Referenzsequenz des Weizengenoms noch nicht komplett vorliegt, werden momentan Techniken wie DArT (Diversity Array

Technology) für Fragestellungen im Weizen genutzt (Akbari et al. 2006). Die genetischen Positionen der meisten DArT-Marker werden für die Nutzer der DArT-Technologie durch die vertreibende Firma „Diversity Arrays Technology P/L – Triticarte P/L“ auf ihrer Website (http://www.triticarte.com.au/content/wheat_diversity_analysis.html, 03.03.11) zum freien Download angeboten, sodass diese Information für Assoziations- oder Kartierungsansätze für Resistenzgene genutzt werden kann. Werden eng gekoppelte DArT-Marker für ein bestimmtes Merkmal wie beispielsweise ein Resistenzgen identifiziert, kann - bei öffentlichem Zugang zu der Sequenzinformation des DArT-Markers - die Umwandlung in einen Simplex-Marker erfolgen. Dieses konnte z.B. für einen Resistenz-QTL gegenüber *Bipolaris sorokiniana* bei Gerste erfolgreich gezeigt werden (Bovill et al. 2010a).

Auch genomweite Studien mit größeren Mengen von EST (Expressed sequence tag)-abgeleiteten SNPs zur Ermittlung der genetischen Diversität sind bekannt (Chao et al. 2009). Beispiele für die Entwicklung von eng gekoppelten SNP basierten Markern zu Resistenzgenen im Weizen sind aufgrund der fehlenden Lokalisierung dieser ESTs bisher nicht in größerem Umfang bekannt. Bei vorhandener Datengrundlage, können jedoch SNP-Marker z.B. auf Basis von EST-Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken entwickelt werden, beispielhaft ist hier das Resistenzgen *Lr1* zu nennen (Tyrka et al. 2004). Durch die Nutzung von EST-Sequenzen im Weizen kann über die so genannte Syntenie zu bereits vollständig sequenzierten und annotierten Kulturarten wie Reis und *Brachypodium* auch die Entwicklung eng gekoppelter genbasierter Marker erfolgen. So konnte in *Triticum turgidum* ssp. *durum* für den Bereich um das Resistenzgen *Sr13* eine 285kb große homeologe Region auf Reischromosom 2 identifiziert werden, die nun Ausgangspunkt für die Entwicklung eines diagnostischen Markers sein wird (Simons et al. 2011).

3.2. Stand und Perspektiven der Nutzung von Markern für die markergestützte Selektion in der Pflanzenzüchtung

Die markergestützte Selektion (MAS) ist ein sehr effizientes Werkzeug für die Pflanzenzüchtung, gerade wenn die Phänotypisierung des Merkmals aufwändig ist, wie es des Häufigeren bei Resistenzmerkmalen der Fall ist (William et al. 2007, Ordon et al. 2009). Für diese Merkmale ist oftmals eine künstliche Inokulation erforderlich, auf die dann häufig ein sehr aufwändiges Boniturverfahren folgt. Um hierbei schlüssige Ergebnisse erzielen zu können, müssen oft vielfache Wiederholungen erfolgen (Bockus et al. 2007). Da mittlerweile die Kosten für Markieranwendungen beständig sinken, erhöht sich der Vorteil von MAS-

Anwendungen gegenüber einer zeitintensiven phänotypischen Bonitur stetig (Langridge and Chalmers 2005) und es kann durch den effizienten Einsatz von Markern in der Züchtung ein finanzieller Vorteil erwirtschaftet werden. Kuchel et al. (2005) zeigten mittels Simulationen, dass bei einer optimierten MAS-Strategie 60% der finanziellen Mittel eingespart werden können. Dies ist vor allem in der Minimierung der aufwändigen Phänotypisierung im Feld begründet. Miedaner et al. (2009) konnten in der Praxis den gleichen Selektionserfolg durch markergestützte Selektion wie durch Phänotypisierung erreichen. Weiterhin kann ausschließlich durch die Nutzung der MAS bei der Pyramidisierung von Resistenzgenen zweifelsfrei festgestellt werden, welche Resistenzgene in den entsprechenden Genotypen vorhanden sind (Bovill et al. 2010b), um durch die Addition verschiedener Resistenzgene sowohl das Resistenzniveau (Barloy et al. 2007; Bovill et al. 2010b, vergl. 1.3) als auch die Dauerhaftigkeit der Resistenz (Ayliffe et al. 2008) zu erhöhen.

Auch wenn Marker für Resistenzen identifiziert sind, können diese nicht immer uneingeschränkt in der MAS genutzt werden. Zum einen können dominante Marker für bestimmte genetische Konstitutionen (F_2 , BCxSy) nur teilweise eingesetzt werden, da der heterozygote Zustand nicht von einem der homozygoten Zustände unterschieden werden kann (Meyer et al. 2011b). Zum anderen sind eng gekoppelte Marker nicht immer diagnostisch, dies konnte beispielsweise bei dem Marker *XustSSR2001-7DL* für *Pch1* gezeigt werden (Santra et al. 2006).

Bisher sind Veröffentlichungen zu MAS-Strategien für die gemeinsame Einbringung von mehreren Merkmalen in Weizen rar. Da in jüngster Vergangenheit verschiedene Projekte zur vollständigen Sequenzierung des Weizens durchgeführt werden und teilweise schon abgeschlossen sind (Paux et al. 2008), wird sich nach der Veröffentlichung der Daten die Dichte SNP-basierter Marker in den jeweiligen Zielregionen stark erhöhen. Da weiterhin verschiedene preisgünstige Plattformen wie etwa die KASPAR-Technology von KBioscience für SNP-Analysen zur Verfügung stehen (Chen et al. 2010), wird sich der monetäre Vorteil des Einsatzes von molekularen Markern in der Pflanzenzüchtung für *T. aestivum* künftig zunehmend erhöhen.

3.3. Stand der Markeranwendung in der Resistenzzüchtung gegenüber *Oculimacula* spp.

Das prominenteste Gen, welches momentan in der Pflanzenzüchtung gegen parasitären Halmbruch genutzt wird, ist *Pch1*. Dieses wurde von *Ae. ventricosa* Tausch in den Weizen

übertragen (Maia 1967). Schon Ende der 70er Jahre wurde berichtet, dass viele in Deutschland zugelassene Sorten das Resistenzgen *Pch1* auf Chromosom 7DL besitzen (Jahier et al. 1978), was die große Bedeutung dieser Resistenzquelle widerspiegelt.

Knapp 20 Jahre nach der Etablierung eines Endopeptidase-Markers (*Ep-D1*) mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) (McMillin et al. 1986), konnte ein SSR-basierter Marker von Groenewald et al. (2003) entwickelt werden, der einen Unterschied von 18bp zwischen resistenten und anfälligen Sorten zeigt. Dieser Marker ist jedoch nicht in allen genetischen Hintergründen einsetzbar. Bei der Sorte ‚Cardos‘ und dessen Nachkommen zeigt der Marker *XustSSR2001-7DL* keinen Unterschied zwischen resistenten und anfälligen Genotypen (Meyer et al. 2011b). In jüngster Vergangenheit wurden von Leonard et al. (2008) durch Synteniestudien zu Reis drei weitere Marker entwickelt. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit einem umfangreichen diversen Set von Winterweizenlinien konnte gezeigt werden, dass der Kandidatengen-Marker *Xorw1* (Leonard et al. 2008) uneingeschränkt im deutschen Winterweizensortiment einsetzbar ist. Ein Nachteil des Markers besteht jedoch darin, dass er dominant vererbt wird und daher die Identifizierung von heterozygoten Genotypen nicht erlaubt.

Weiterhin wurde als bisher einzige Resistenzquelle aus *T. aestivum* in der Weizensorte ‚Cappelle Desprez‘ das Gen *Pch2* identifiziert (Law et al. 1975). Zusätzlich zu dem Majorgen auf Chromosom 7AL wurden auf verschiedenen anderen Chromosomen dieser Sorte weitere Gene mit geringem Resistenzeinfluss detektiert (Law et al. 1975, de la Peña et al. 1996). Nach *Pch1* sind die Arbeiten zur Identifizierung von *Pch2* am weitesten fortgeschritten. 1997 wurden zwei flankierende RFLP-Marker identifiziert, die den Locus auf 29,2 cM eingrenzen (de la Peña et al. 1997). Bei neueren Arbeiten von Chapman et al. (2009) konnte ein Kandidatengen identifiziert und der Bereich auf 7 cM verkleinert werden. Für Anwendungen wird eine Kombination aus drei eng gekoppelten Markern *Xwmc346*, *Xwmc525* und *Xcfa2040* für die Identifikation von resistenten und anfälligen Pflanzen genutzt (Burt et al. 2010).

Weitere Resistenzen, die zwar identifiziert, aber in der praktischen Pflanzenzüchtung noch keine Anwendung gefunden haben, entstammen *D. villosum* (Murray et al. 1994), *Ae. tauschii* (Yildirim et al. 1995), *T. monococcum* (Cadle et al. 1997), *T. durum* (Figliuolo et al. 1998), *Ae. kotschyi* (Thiele et al. 2002), *Thinopyrum ponticum* (Li et al. 2004) und *Th. intermedium* (Li et al. 2005). In den meisten Untersuchungen wurde der Einfluss auf

O. yallundae betrachtet. Jedoch konnte bei dem Resistenzgen *Pch3*, welches in *D. villosus* identifiziert wurde (Murray et al. 1994), festgestellt werden, dass dieses nur eine Resistenz gegen *O. yallundae* hervorruft, nicht aber gegenüber *O. acufiformis* (Uslu et al. 1998). Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch Resistenzen aus verwandten Arten gleich bzw. sogar stärker als *Pch1* wirken (*Th. intermedium* (Li et al. 2005); *T. monococcum* (Cadle et al. 1997)).

Diese Gene wurden bisher nicht in zugelassenen Sorten eingelagert, obwohl eine Kombination von Resistenzgenen mittels Pyramidisierung eine stärkere und verlässlichere Resistenz hervorbringen könnte (Lind 1999).

3.4. Ausblick: Markergestützte Selektion

In jüngster Zeit wird an der Erstellung einer physikalischen Karte für Weizen gearbeitet. Hierbei werden nicht aufgrund von Rekombinationsereignissen wahrscheinliche Abstände zwischen Markern ermittelt, sondern durch gezielte Sequenzierung und Aneinanderreihung der Amplikone die Abfolge der realen Sequenz und somit der exakten Position von Markern im Genom ermittelt. Durch die Komplexität der Fruchtart *T. aestivum* und einer hohen Anzahl an repetitiven Sequenzen ist dies im Vergleich zu anderen landwirtschaftlich genutzten Kulturarten eine umfangreiche Aufgabe. Im Jahr 2005 wurde deshalb das Konsortium „The International Wheat Genome Sequencing Consortium“ (IWGSC) gebildet, welches in Kooperation mit vielen Partnern die komplette Sequenzierung des Weizengenoms in mehreren Teilschritten durchführen wird (Feuillet und Eversole 2007). Mittlerweile wurde der erste Meilenstein, die vollständige Sequenzierung des Chromosoms 3b erfolgreich abgeschlossen (Paux et al. 2008). Weiterhin sind seit Mitte des Jahres 2010 die Rohsequenzen des gesamten Genoms durch 454 Sequenzierung verfügbar (http://www.cerealsdb.uk.net/search_reads.htm). Durch die Ermittlung der physischen Position von Markern und zusätzlich der Identifizierung von SNPs, kann die Markerdichte für relevante Regionen erhöht werden.

Bedingt durch die fallenden Preise für Datenpunkte und die stetig zunehmenden genetischen und physischen Informationen von Markerpositionen, werden nunmehr gesamtheitliche Verfahren für pflanzenzüchterische Fragestellungen interessant. Das Verfahren der sogenannten „Genomic Selection“ (GS) ist eine Form der markergestützten Selektion, die simultan alle Loci, Haplotypen oder Markereffekte über das gesamte Genom zur Schätzung des Zuchtwertes (GEBV = genomic estimated breeding value) nutzt

(Meuwissen et al. 2001). In der Pflanzenzüchtung ist GS noch ein sehr junges Verfahren (Heffner et al. 2009). Die Nutzbarkeit des Verfahrens wurde empirisch an Mais (*Zea mays* L.), *Arabidopsis thaliana* und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) nachgewiesen (Lorenzana und Bernardo 2009). Weiterhin wurde bei einer Vergleichstudie der mittels MAS und GS erzielte Züchterfolg berechnet und verglichen. Hier zeigte sich, dass GS einen höheren Selektionserfolg erreicht und selbst für Weizen der jährliche Selektionserfolg um ein zweifaches höher lag, wodurch der Selektionszyklus dramatisch verkürzt werden könnte (Heffner et al. 2010). Zukünftig ist daher davon auszugehen, dass die molekulare Pflanzenzüchtung auf einfach und komplex vererbte Merkmale zunehmend an Bedeutung gewinnen wird.

3.5. Literatur

- Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yan S, Uszynski G, Mohler V, Lehmensiek A, Kuchel H, Hayden M J, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A (2006) Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet* 113: 1409-1420
- Ayliffe M, Singh R, Lagudah E (2008) Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 187-192
- Baranski R, Krämer R, Klocke E (2006) A laboratory leaf assay of carrot susceptibility to *Botrytis cinerea*. *J Phytopathology* 154: 637-640
- Barloy D, Lemoine J, Abelard P, Tanguy A M, Rivoal R, Jahier J (2007) Marker-assisted pyramiding of two cereal cyst nematode resistance genes from *Aegilops variabilis* in wheat. *Mol Breed* 20: 31-40
- Bockus W W, Su Z, Garrett K A, Gill B S, Stack J P, Fritz A K, Roozeboom K L, Martin T J (2007) Number of experiments needed to determine wheat disease phenotypes for four wheat diseases. *Plant Dis* 91: 103-108
- Bovill J, Lehmensiek A, Sutherland M W, Platz G J, Usher T, Franckowiak J, Mace E (2010a) Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations. *Mol Breed* 26: 653-666
- Bovill W D, Horne M, Herde D, Davis M, Wildermuth G B, Sutherland M W (2010b) Pyramiding QTL increases seedling resistance to crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) of wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet* 121: 127-136
- Brandfass C, Karlovsky P (2006) Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiol* 6: 1-10
- Browne R A, Cooke B M (2004) Development and evaluation of an *in vitro* detached leaf assay for pre-screening resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Europ J Plant Pathology* 110: 91-102
- Burlakoti R R, Estrada R, Rivera V V, Boddada A, Secor G A, Adhikari T B (2007) Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet and wheat. *Phytopathology* 97: 835-841
- Burt C, Hollins T W, Nicholson P (2010) Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. *Genetics* DOI 10.1007/s00122-010-14271
- Cadle M M, Murray T D, Jones S S (1997) Identification of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* in *Triticum monococcum*. *Plant Dis* 81: 1181-1186
- Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo M-C, Dubcovskz J (2009) Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Mol Breed* 23: 23-33
- Chapman N H, Burt C, Nicholson P (2009) The identification of candidate genes associated with *Pch2* eyespot resistance in wheat using cDNA-AFLP. *Theor Appl Genet* 118: 1045-1057
- Chen W, Kumpatla S P, Mingus J, Mammadov J, Backlund J E, Greene T, Thompson S (2010) Flexible and cost-effective SNP genotyping platforms for low to high-throughput applications in maize. Bericht 52nd Annual Maize Genetics Conference, Riva del Garda, Seite 49
- Chilvers M I, du Toit L J, Akamatsu H, Peever P L (2007) A Real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot on onion. *Plant Dis* 91: 599-608

- Clapham D (1973) Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. Z. Pflanzenzüchtg. 69: 142-145
- Clark M F, Adams A N (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol 34: 475-483
- Demontis M A, Cacciola S O, Orrù V, Maserti B E, Mascia L, Raudino F, de San Lio G M, Migheli Q (2008) Development of Real-time PCR systems based on SYBR®Green I and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected *Citrus*. Europ J Plant Pathol 120: 339-351
- ElNashaar H M, Moore L W, George R A (1985) The use of ELISA for early quantification of *Gaeumannomyces graminis tritici* associated with winter wheat roots. Phytopathology 75: 1363
- Ferreira A, Flores da Silva M, da Costa e Silva L, Damião Cruz C (2006) Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. Genetics and Molecular Biology 29: 187-192
- Feuillet C, Eversole K (2007) Physical mapping of the wheat genome: A coordinated effort to lay the foundation for genome sequencing and develop tools for breeders. Israel J Plant Sci 55: 307-313
- Feuillet C, Keller B (2004) Molecular markers for disease resistance: The example wheat. In: Lörz H, Wenzel G (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry: 55) Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement. Springer Verlag
- Figliuolo G, Jones S S, Murray T D, Zeuli P L S (1998) Characterization of tetraploid wheat germplasm for resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides*, cause of eyespot disease. Genet Resources Crop Evol 45: 47-56
- Frankie M G, Walker E, Crawford A C, Broughton S, Ohm H W, Barclay I, Wilson R E, McLean R (2008) Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. Mol Genetics and Genomics doi:10.1007/s00438-008-0403-9
- Gachon C, Saindrea P (2004) Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Phys Biochem 42: 367-371
- Giglio S, Monis P T, Saint C P (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR®Green I to specific DNA fragments in Real-time multiplex PCR. Nucleic Acids Res 31: 136-140
- Gupta SK, Charpe A, Koal S, Haque Q M R, Prabhu K V (2008) Development and validation of SCAR markers co-segregating with an *Agropyron elongatum* derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. Euphytica 150: 233-240
- Gupta P K, Rustgi S, Mir R R (2008) Array-based high throughput DNA markers for crop improvement. Heredity 101: 5-18
- Groenewald J Z, Marais A S, Marais G F (2003) Amplified fragment length polymorphism-derived microsatellite sequence linked to the *Pch1* and *Ep-D1* loci in common wheat. Plant Breed 122: 83-85
- Hazen S P, Leroy P, Ward R W (2002) AFLP in *Triticum aestivum* L.: patterns of genetic diversity and genome distribution. Euphytica 125: 89-102
- He P, Li J Z, Zheng X W, Shen L S, Lu C F, Chen Y, Zhu L H (2001) Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. Crop Sci 41: 1240-1246
- He R, Chang Z, Yang Z, Yuan Z, Zhan H, Zhang X, Liu J (2009) Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. Theor Appl Genet 118: 1173-1180

- Heffner E L, Loreny A J, Jannink J L, Sorrells M E (2010) Plant Breeding with Genomic Selection: Gain per unit time and cost. *Crop Sci* 50: 1681-1690
- Heffner E L, Sorrells M E, Jannink J-L (2009) Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Sci* 49: 1-12
- Jackson E W, Obert D E, Menz M, Hu G, Avant J B, Chong J, Bonman J M (2007) Characterization and mapping of oat crown rust resistance genes using three assessment methods. *Phytopathology* 97: 1063-1070
- Jahier, J.G., G. Doussinault, F. Dosba, F. Bourgeois, 1978: Monosomic analysis of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. Proc 5th Intern Wheat Genet Symp New Delhi, Indien: 437-480
- Juergens M, Paetsch C, Krämer I, Zahn M, Rabenstein F, Schondelmaier J, Schliephake E, Snowdon R, Friedt W, Ordon F (2010) Genetic analysis of the host pathogen system *Turnip yellows virus* (TuYV)-rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of molecular markers for TuYV-resistance. *Theor Appl Genet* 120: 735-744
- Kasha K J, Koa K N (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874-876
- Kiviharju E, Moisander S, Laurila J (2005) Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81: 1-9
- Korell M, Eschholz T W, Eckey C, Biedenkopf D, Kogel M K-H, Friedt W, Ordon F (2008) Development of a cDNA-AFLP derived CAPS marker co-segregating with the powdery mildew resistance gene *Mlg* in barley. *Plant Breed* 127: 102-104
- Kuchel H, Ye G Y, Fox R, Jefferies S (2005) Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy. *Mol Breed* 16: 67-78
- Langridge P, Chalmers K (2005) The principle: Identification and application of molecular markers. In: Lorz H and Wenzel G (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry. Molecular marker systems* (55), Springer, Heidelberg: 3-22
- Law C N, Scott P R, Worland A J, Hollins T W (1975) The inheritance of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. *Genet Res* 26: 73-79
- Laurie D A, Bennett M D (1988) The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 76: 393-397
- Leonard J M, Watson C J W, Carter A H, Hansen J L, Zemetra R S, Santra D K, Campbell K G, Riera-Lizarazu O (2008) Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase *Ep-D1* locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. *Theor Appl Genet* 116: 261-270
- Li Y, Niu Y C, Chen X M (2009) Mapping a stripe rust resistance gene *YrC591* in wheat variety C591 with SSR and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 118: 339-346
- Li H J, Arterburn M, Jones S S, Murray T D (2005) Resistance to eyespot of wheat, caused by *Tapesia yallundae* derived from *Thinopyrum intermedium* homoelogenous group 4 chromosome. *Theor Appl Genet* 111: 932-940
- Li H J, Arterburn M, Jones S S, Murray T D (2004) A New Source of Resistance to *Tapesia yallundae* associated with a homoelogenous group 4 chromosome in *Thinopyrum ponticum*. *Phytopathology* 94: 932-937
- Lind V (1990) Isolation of antigens for serological identification of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. *J Plant Dis Protect* 97: 490-501
- Lind V (1992) Measuring the severity of eyespot disease induced by *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton in wheat cultivars at different growth stages. *Plant Breed* 108: 202-209

- Lind V (1999) Variation of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton in wheat genotypes carrying the gene *Pch-1*. *Plant Breed* 118: 281-287
- Lorenzana R E, Bernado R (2009) Accuracy of genotypic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations. *Theor Appl Genet* 120: 151-161
- Maia N (1967) Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *C R Acad Agric France* 53: 149-154
- McMillin D E, Allan R E, Roberts D E (1986) Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor Appl Genet* 72: 743-747
- Mebrate S A, Oerke E C, Dehne H W, Pillen K (2008) Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica* 162: 457-466
- Meuwissen T H E, Hayes B J, Goddard M E (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829
- Meyer N, Lind V, Karlovsky P, Zahn M, Friedt W, Ordon F (2011a): Development of Real-time PCR method for the identification of wheat genotypes carrying different eyespot resistance genes. *Plant Breed* 130: 16-24
- Meyer N, Lind V, Heindorf M, Korzun V, Friedt W, Ordon F (2011b) Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1* in wheat. *Euphytica* 177: 267-275
- Michelmore, RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832
- Miedaner T, Reinbrecht C, Lauber U, Schollenberger M, Geiger H H (2001) Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed* 120: 97-105
- Miedaner T, Wilde F, Korzun V, Ebmeyer E, Schmolke M, Hartl L, Schön CC (2009) Marker selection for *Fusarium* head blight resistance based on quantitative trait loci (QTL) from two European sources compared to phenotypic selection in winter wheat. *Euphytica* 166: 219-227
- Morgante M, Olivieri A M (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182
- Murakami S, Matsui K, Komatsuda T, Furuta Y (2005) AFLP-based STS markers closely linked to a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley. *Plant Breed* 124: 133-136
- Murray T D, de la Peña R C, Yildirim A, Jones S S (1994) A new source of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides*, cause of eyespot disease of wheat, located on chromosome 4V of *Dasyphyrum villosum*. *Plant Breed* 113: 281-286
- Nicholson P, Rezanoor H N, Simpson D R, Joyce D (1997) Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis* using a PCR assay. *Plant Pathol* 46: 842-856
- Nita M, Ellis M A, Madden L V (2003) Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis Leaf Blight of strawberry. *Phytopathology* 9: 995-1005
- Okubara P A, Li C Q, Schroeder K L, Schumacher R T, Lawrence L P (2007) Improved extraction of *Rhizoctonia* and *Pythium* DNA from wheat roots and soil samples using pressure cycling technology. *Can J Plant Pathol* 29: 304-310

- Ordon F, Habekuss A, Kastirr U, Rabenstein F, Kühne T (2009) Virus resistance in cereals: sources of resistance, genetics and breeding. *J Phytopathol* 157: 535-545
- Ouyang J W, Zhou S M, Jia S E (1983) The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 66: 101-109
- Paux E, Sourdilte P, Salse J, Saintenac C, Choulet F, Leroy P, Korol A, Michalak M, Kianian S, Spielmeier W, Lagudah E, Somers D, Kilian A, Alaux M, Vautrin S, Bergès H, Eversole K, Appels R, Safar J, Simkova H, Dolezel J, Bernard M, Feuillet C (2008) A Physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Sci* 322: 101-104
- de la Peña R C, Murray T D, Jones S S (1996) Linkage relations among eyespot resistance gene *Pch2*, endopeptidase *Ep-A1b*, and RFLP marker *Xpsr121* on chromosome 7A of wheat. *Plant Breed* 115: 273-275
- de la Peña R C, Murray T D, Jones S S (1997) Identification of an RFLP interval containing *Pch2* on chromosome 7AL in wheat. *Genome* 40: 249-252
- Perovic D, Förster J, Devaux P, Hariri D, Guilleroux M, Kanyuka K, Lyons R, Weyen J, Feuerhelm D, Kastier U, Sourdilte P, Röder M, Ordon F (2009) Mapping and diagnostic marker development for soil-borne cereal mosaic virus resistance in bread wheat. *Molecular Breed* 23: 641-653
- Qu L-J, Foote T N, Roberts M A, Money T A, Aragón-Alcaide L, Snape J W, Moore G (1998) A simple PCR-based method for scoring the *ph1b* deletion in wheat. *Theor Appl Genet* 96: 371-375
- Ray R V, Jenkinson P, Edwards S G (2004) Effects of fungicides on eyespot, caused predominantly by *Oculimacula acufiformis* and yield of early-drilled winter wheat. *Crop Protection* 23: 1199-1207
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plant from crosses between heterozygous parents. *Genomics* 125: 645-654
- Roy J K, Bhandopadhyay R, Rustgi S, Balyan H S, Gupta P K (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Sci* 90: 683-689
- Santra D K, Watt C, Little L, Kidwell K K, Campbel K G (2006) Comparison of a modified assay method for the endopeptidase marker *Ep-D1b* with the Sequence Tag Site marker *XustSSR2001-7DL* for strawbreaker foot rot resistance in wheat. *Plant Breed* 125: 13-18
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop M N (2006) Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 2569-2587
- Shan X, Blake T K, Talbert L E (1999) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor Appl Genet* 98: 1072-1078
- Simons K, Abate Z, Chao S, Zhang W, Rouse M, Jin Y, Elias E, Dubcovsky J (2011) Genetic mapping of stem rust resistance gene *Sr13* in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.). *Theor Appl Genet* 122: 649-658.
- Smeets H J M, Brunner H G, Ropers H-H, Wieringa B (1989) Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. *Hum Genet* 83: 245-251
- Somers D J, Isaac P, Edwards k (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 109: 1105-1114.
- Song Q J, Shi J R, Singh S, Fickus E W, Costa J M, Lewis J, Gill B S, Ward R, Cregan P B (2005) Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet* 110: 550-560
- Thiele A, Schumann E, Peil A, Weber W E (2002) Eyespot resistance in wheat *Aegilops kotschyi* backcross lines. *Plant Breed* 121: 29-35

- Tsilo T J, Chao S, Jin Y, Anderson J A (2009) Identification and validation of SSR marker linked to the stem rust resistance gene *Sr6* on the short arm of chromosome 2D in wheat. *Theor Appl Genet* 118: 515-524
- Turner A S, Nicholson P, Edwards S G, Bateman G L, Morgan L W, Todd A D, Parry D W, Marshall J, Nuttal M (2001) Evaluation of diagnostic and quantitative PCR for the identification and severity assessment of eyespot and sharp eyespot in winter wheat. *Plant Pathol* 50: 463-469
- Turner A S, O'Hara R B, Rezanoor H N, Nuttal M, Smith J N, Nicholson P (1999) Visual disease and PCR assessment of stem base diseases in winter wheat. *Plant Pathol* 48: 742-748
- Turesson S, Ljungberg A, Johansson N, Karlson K-E, Suijs W, Josset J-P (2000) Large-scale production of wheat and triticale double haploid through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding* 119: 455-459
- Tyrka M, Błaszczuk L, Chełkowski J, Lind V, Krämer I, Weilepp M, Wiśniewska H, Ordon F (2004) Development of the single nucleotide polymorphism marker of the wheat *Lr1* leaf rust resistance gene. *Cell Mol Biol Lett* 9: 879-889
- Uslu E, Miller T E, Rezanoor N H, Nicholson P (1998) Resistance of *Dasypyrum villosum* to the cereal eyespot pathogens, *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Euphytica* 103: 203-209
- Varshney R K, Balyan H S, Langridge P (2006) Wheat. In: Kole C (eds) *Genomic Mapping and Molecular Breeding in Plants. Cereals and Millets*. Springer, Heidelberg: 79-134
- Walsh K, Korimbocus J, Boohham N, Jennings P, Hims M (2005) Using Real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acuformis*. *J Phytopathol* 153: 715-721
- William HM, Trethowan R, Crosby-Galvan FM (2007) Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica* 157: 307-319
- Yildirim A, Jones S S, Murray T D, Cox T S, Line R F (1995) Resistance to stripe rust and eyespot diseases of wheat in *Triticum tauschii*. *Plant Dis* 79: 1230-1236
- Young N D (1994) Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. In: Roland IKV, Phillips L (eds) *DNA-based markers in plants*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London p.39-57
- Zagula K R, Barbara D J, Fulbright D W, Lister R M (1990) Evaluation of three ELISA methods as alternatives to ISEM for detection of the wheat spindle streak mosaic strain of wheat yellow mosaic virus. *Plant Dis* 74: 974-978

4. Zusammenfassung

Aufgrund der weltweit großen Verbreitung des hexaploiden Brot- oder Weichweizens (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) und enger Fruchtfolgen sind Pilzkrankheiten bei Weizen von besonderer Bedeutung. Der parasitäre Halmbruch stellt in der gemäßigten Klimazone eine wichtige Krankheit dar und kann erhebliche Ertragsverluste verursachen. Wesentliche Erreger der Krankheit sind die Pilzpathogene *Oculimacula acuformis* (syn. *Tapesia acuformis*; anamorph: *Helgardia acuformis* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *acuformis*) und *O. yallundae* (syn. *T. yallundae*; anamorph: *H. yallundae* syn. *P. h.* var. *herpotrichoides*). Gegen diese Ascomyceten, die gleiche Symptome hervorrufen und visuell nur mikroskopisch unterschieden werden können, bewirkt das Resistenzgen *Pch1* aus *Aegilops ventricosa* die bisher effektivste Resistenz. Zusätzlich wird im deutschen Winterweizenmaterial *Pch2* genutzt, welches in der Winterweizensorte ‚Cappelle Desprez‘ identifiziert wurde. Andere Resistenzgene, z.B. aus *Dasyphyrum villosum*, *Ae. tauschii*, *T. monococcum*, *T. durum*, *Ae. kotschyi*, *Thinopyrum ponticum* und *Th. intermedium*, werden bisher in der praktischen Pflanzenzüchtung nicht genutzt.

Zur Unterscheidung von *O. acuformis* und *O. yallundae* Infektionen nach künstlicher Inokulation im Gewächshaus und zur quantitativen Differenzierung der Anfälligkeit von Weizen genotypen wurden in dieser Arbeit zwei SYBR Green® basierte Real-time PCR Assays entwickelt. Der Einfluss von Inkubationszeit zwischen Inokulation und Probenahme, der Pathogeneffekt (*O. acuformis* und *O. yallundae*) sowie der Einfluss von Resistenzgenen (*Pch1*, *Pch2*, anfällig) auf den Pathogen-DNA-Gehalt im Weizenmaterial wurde ermittelt. Es wurde festgestellt, dass 12 Wochen nach Inokulation mit *O. yallundae* die eindeutigste Differenzierung von Genotypen mit unterschiedlichem Resistenzniveau nachweisbar war. Genotypen, welche das Resistenzgen *Pch1* tragen, zeigten signifikant geringere Pathogen-DNA-Gehalte als der *Pch2*-Träger ‚Cappelle Desprez‘ und anfällige Linien. Diese Phänotypisierungsmethode ermöglicht mithin eine klare Differenzierung und kann somit als Grundlage für die Entwicklung von eng gekoppelten Markern für Halmbruchresistenzgene genutzt werden.

Die Verfügbarkeit eng gekoppelter Marker in markergestützten Selektionsverfahren ist abhängig von deren diagnostischem Wert. Um die Nutzbarkeit von eng mit *Pch1* gekoppelten Markern zu ermitteln, wurden drei Kreuzungsnachkommenschaften (DH-

Populationen) per isoelektrischer Fokussierung auf das Vorhandensein der mit *Pch1* gekoppelten Endopeptidase *Ep-D1a* analysiert. Basierend auf 127 DH-Linien und 27 Markern wurde eine genetische Karte von Chromosom 7D erstellt. Die Marker *Xorw1*, *Xorw5*, *Xorw6*, *Xcfd175*, *Xbarc76*, *Xwmc14* und *Xcfa2040* zeigten eine vollständige Kopplung mit *Ep-D1a*. Die Marker *Xorw1*, *Xorw6*, *Xcfd175*, *Xbarc76* und *Xwmc14* wurden daraufhin anhand eines Sets von 104 Winterweizensorten evaluiert und mit Ergebnissen der vom Bundessortenamt durchgeführten Resistenztests für Halnbruchanfälligkeit verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Marker *Xorw1*, *Xorw6* und *Xcfd175* für den Einsatz in der markergetützten Selektion auf *Pch1* momentan am besten geeignet scheinen.

Bedingt durch die rasante Entwicklung in Sequenzierungs- und Markertechniken ist davon auszugehen, dass die markergestützte Selektion zukünftig noch deutlich an Bedeutung gewinnen wird – insbesondere in der Züchtung auf komplexe quantitative Merkmale.

5. Abstract

Bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) is one of the most important crop species worldwide. Due to this fact and reduced crop rotations many fungal diseases are common in wheat. Eyespot is one important disease of wheat in temperate climates and can cause severe yield losses. Causal agents of eyespot are the ascomycetes *Oculimacula acuformis* (syn. *Tapesia acuformis*; anamorph: *Helgardia acuformis* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *acuformis*) and *O. yallundae* (syn. *T. yallundae*; anamorph: *H. yallundae* syn. *P. h.* var. *herpotrichoides*). The two pathogens generate similar symptoms and can only be distinguished visually by microscopic analyses. *Pch1*, which derived from *Aegilops ventricosa* and is located on chromosome 7DL, is the most important and most effective resistance gene against eyespot. Additionally, *Pch2* derived from the winter wheat cultivar 'Cappelle Desprez' is used in wheat breeding and present in several German cultivars. Resistance genes, which were additionally detected in different species like *Dasyphyrum villosum*, *Ae. tauschii*, *T. monococcum*, *T. durum*, *Ae. kotschyi*, *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*, are not applied in practical wheat breeding, yet.

In order to distinguish between *O. acuformis* and *O. yallundae* infections and furthermore to reliably identify quantitative differences in the level of resistance of wheat genotypes, two SYBR Green® based Real-time PCR assays were developed in the course of this work. The influence of time after inoculation until sample collection, the effect of pathogen species (*O. acuformis*, *O. yallundae*), and the relevance of resistance genes (*Pch1*, *Pch2*, susceptible allele) on the pathogen-DNA content in wheat cultivars were analysed. The most clear-cut difference between resistant and susceptible wheat genotypes was obtained 12 weeks after inoculation with *O. yallundae*. Genotypes carrying *Pch1* showed significantly less pathogen DNA content than the *Pch2*-carrier 'Cappelle Desprez' and susceptible lines. Growth chamber tests using artificial inoculation with *O. yallundae* and sampling 12 weeks after inoculation for Real-time PCR are shown to be a reliable procedure to determine the differences of resistance level in wheat against eyespot. This protocol can be used as a basis for the development of efficient molecular markers linked to eyespot resistance genes.

Marker assisted selection by closely linked markers is only suitable if these markers are also diagnostic. Therefore, based on results obtained for endopeptidase *Ep-D1a*, which is very closely linked to *Pch1*, molecular markers located in the terminal region of chromosome 7DL

were analysed in three doubled haploid (DH) populations. Based on the analysis of 127 DH lines with 27 markers, linkage to *Pch1* (*Ep-D1*) was obtained for *Xorw1*, *Xorw5*, *Xorw6*, *Xcfd175*, *Xbarc76*, *Xwmc14*, and *Xcfa2040*. By analyses of 104 German winter wheat cultivars the markers *Xorw1*, *Xorw6*, *Xcfd175*, *Xbarc76* and *Xwmc14* were validated for their diagnostic character in order to obtain information on their usefulness for marker assisted selection (MAS). For this purpose they were compared to the results obtained with *Ep-D1* and the classification for the reaction to eyespot by the German Plant Variety Office (Bundessortenamt). Analyses of German winter wheat cultivars showed that out of these markers, *Xorw1*, *Xorw6* and the SSR *Xcfd175* are well suited for MAS in wheat breeding. Due to the fast development in sequencing and marker techniques it is assumed that marker assisted selection will become even more important in near future – particularly in breeding for complex quantitative traits.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewichtsprozente (Gesamtrockenmasse der jeweiligen Kornbestandteile = 100) verschiedener Inhaltsstoffe in den Kornbestandteilen von Weizen (Quelle: Aufhammer 2003).

Tabelle 2: Mittelwerte (mean) und Standardabweichungen (SD) des prozentualen Anteils befallener Blattscheiden nach künstlicher Inokulation von *Oculimacula yallundae* (OY), *O. aciformis* (OA) und einem Gemisch aus beiden Pathogenen (OA + OY) über 3 Wiederholungen für die Probenahme 8, 10 und 12 Wochen nach Applikation (p. i. = post inoculation). Der prozentuale Anteil befallener Blätter nach Inokulation wurde als Mittelwert von 10 Pflanzen je Genotyp erfasst. Sorte ‚Hermann‘ trägt Resistenzgen *Pch1*, ‚St906‘ ist hoch anfällig gegenüber *Oculimacula* spp.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamtertrag [Mio t] der drei wichtigsten Kulturarten, dargestellt für Europa und weltweit. Die Daten enthalten offizielle und geschätzte Werte der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

(Quelle: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> 23.02.2010)

Abbildung 2: Weizenertrag [kg/ha] der letzten 50 Jahre dargestellt für Deutschland, Europa und weltweit. Die Daten basieren auf geschätzten Werten der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

(Quelle: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> 19.12.2010)

Abbildung 3: Myzel von a) *Helgardia yallundae* und b) *H. aciformis* auf Potato-Dextrose-Agar-Medium 20 Tage nach Beimpfung.

Abbildung 4: Taxonomische Einordnung (nach Crous et al. 2003) der Erreger *Oculimacula yallundae* (anamorph: *Helgardia yallundae*; A) und *O. aciformis* (anamorph: *Helgardia aciformis*; B).

Lebenslauf

Nina Meyer
geboren am 30.03.1978 in Gronau (Westf.)

Schulbildung

1984-1988 kath. Wilhelmschule
1988-1994 Fridtjof-Nansen-Realschule, Abschluss: Mittlere Reife
1994-1997 Werner-von-Siemens-Gymnasium, Abschluss: Abitur

Berufsausbildung

1997-2000 Syngenta Seeds, Bad Salzflen, Abschluss: staatl. geprüfte
landwirtschaftl. technische Assistentin

2000-2005

Studium

Studium der Agrarwissenschaften an der Georg-August-Universität,
Göttingen, Abschluss: Master of Science Agriculture (M. Sc. agr.)

Berufsausübung

2000 sechsmonatige Anstellung bei Saaten Union Resistenzlabor GmbH als
LTA, Leopoldshöhe

2005-2008

Anstellung als wissenschaftliche Angestellte beim Julius Kühn-Institut,
Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg, zur
Bearbeitung eines befristeten wissenschaftlichen Projektes

seit 2008

Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der
KWS Saat AG, Einbeck

Danksagung

Herrn PD Dr. Frank Ordon und Herrn Dr. Volker Lind danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die kontinuierliche Begleitung während der Zeit am Julius Kühn-Instituts und der Promotion.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Friedt danke ich für die wissenschaftliche Betreuung an der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) und der GFP danke ich für die finanzielle Unterstützung des zugrunde liegenden Forschungsprojektes, sowie den mitwirkenden kooperierenden Firmen für die Bereitstellung von Material und Daten.

Allen Kollegen am Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (JKI), besonders Karin Ernst und Monique Jürgens, möchte ich für ihre Hilfe, Ideen und Begleitung danken.

Desweiteren danke ich meinen Freunden - besonders Kerstin Reiners - für ihre Anregungen, Hilfestellungen und Rücksicht.

Auch bei meinen neuen Kollegen/Innen von der KWS Saat AG (BR-MA-BT), vor allem Carsten Knaak und Milena Ouzunova, möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und Thomas Lüpken bedanken, die mir in der gesamten Zeit durch Rat und Tat beigestanden haben.

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich: Die vorgelegte Dissertation habe ich selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Nina Meyer

