

Institut für Landwirtschaftliche Botanik  
der Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität  
Bonn

---

**Charakterisierung von *Helianthus* – Wildarten im Freiland:  
Biometrische, histologische und biochemische  
Untersuchungen**

**Inaugural – Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität

Bonn

vorgelegt im

Mai 2003

von

Dipl. -Ing. agr. Claudio Carboncini

aus

Bad Oeynhausen

**Referent:** Prof. Dr. H. Schnabl

**Koreferent:** Prof. Dr. W. Kühbauch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2003

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

**D 98**

## **Kurzfassung:**

### **Charakterisierung von *Helianthus* – Wildarten im Freiland: Biometrische, histologische und biochemische Untersuchungen**

*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary ist weltweit einer der bedeutendsten Pathogene der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) und bedingt hohe wirtschaftliche Verluste in der Produktion dieser Ölpflanze. Innerhalb des kultivierten annualen *Helianthus*-Genpools existiert auf Grund einer geringen Variabilität keine ausreichende Resistenz gegenüber diesem Pathogen. *Helianthus* Wildarten zeigen hingegen eine beachtliche Diversität und gelten als viel versprechende Resistenzquellen. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals eingehende mehrjährige Untersuchungen zur Feld-Resistenz der in der Züchtung der Sonnenblume bislang nicht berücksichtigten perennierenden *Helianthus* – Wildarten gegenüber dem Krankheitskomplex der *Sclerotinia* - Stängelfäule durchgeführt.

Hierbei wurden 21 perennierende Wildarten mit Hilfe von artifiziellen Myzelinokulationen hinsichtlich ihrer Stängel- und Blattresistenz im Freiland sowie unter kontrollierten Umweltbedingungen untersucht. Als robustes phänotypisches Resistenzmerkmal konnten in beiden Pflanzenorganen die Läsionslängen vier Tage nach Inokulation erschlossen werden. In zwei Populationsakzessionen von *H. maximiliani* sowie in *H. salicifolius* konnten Stängelresistenzen ermittelt werden. *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC 7 zeigten erhöhte Blattresistenzen gegenüber *Sclerotinia* Infektion. In *H. maximiliani* AC 7 konnte eine Wildart mit partiellen Resistenzen in beiden Pflanzenorganen ermittelt werden. In den histologischen Untersuchungen zur Stängelresistenz konnte als wesentlicher präformierter Resistenzfaktor das Lignifizierungsmuster der Sprossachsen erkannt werden. Eine verstärkte Cuticula konnte in *H. salicifolius* Sprossachsen als Resistenzfaktor detektiert werden. Zur pathogeninduzierten Resistenz wurde durch Epifluoreszenzmikroskopie die resistenzbegleitende Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe ermittelt, welche chromatographisch als Di-Caffeoyl-ester nachgewiesen werden konnte. Untersuchungen zum *Sclerotinia* induzierten Phenolstoffwechsel über die Bestimmung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) Aktivität zeigten genotypische Abhängigkeiten. Eine stark erhöhte 30fache Steigerung der PAL – Aktivität im Vergleich zur gesunden Kontrolle konnte in *H. salicifolius* ermittelt werden. Zusammenhänge zur Phenolakkumulation nach Pathogenbefall ließen bei dieser Wildart auf eine resistenzvermittelnde Bedeutung der PAL - Aktivierung schließen. Resistenzbegleitend konnte in partiell stängelresistenten Wildarten eine signifikant erhöhte Aktivität zellwandgebundener Peroxidasen ermittelt werden deren Bedeutung als potentielle Markerenzyme der partiellen *Sclerotinia* Stängelresistenz damit möglich erscheint.

Zur Untersuchung des wirkungsbezogenen Zusammenhangs zwischen präformierten Blattphenolen der *Helianthus* Wildarten und deren Bedeutung zur *Sclerotinia* - Blattresistenz wurde zunächst ein chromatographisches Verfahren zur Detektion kompletter Blattphenolfingerprints in *Helianthus* entwickelt. In der anschließenden multivariaten Analyse konnte ein starker quantitativer Zusammenhang zwischen potentiell flavonoiden Inhaltsstoffen und der *Sclerotinia* Myzelausbreitung im Mesophyll erkannt werden.

## **Abstract:**

### **Characterization of wild *Helianthus* species under natural conditions: biometrical, histological and biochemical investigations**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is one of the major fungal diseases of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and causes great economic losses in sunflower production worldwide. The pathogen can attack all parts of the plant on every plant growth stage, predominantly the capitulum, the leaf and stem. Due to the narrow genetic variability no source of complete resistance to *Sclerotinia* is available in the cultivated *Helianthus* gene pool. However, wild species exhibit a great diversity and hence are promising sources of genes for disease resistance.

In the present study, 21 perennial *Helianthus* species of diverse origin were evaluated in multiannual field trials and controlled environment studies on their resistance level to mid-stem and leaf infection using an artificial inoculation method. The evaluation revealed considerable and significant differences within the genotypes in all recorded resistance traits. The induced lesion length four days after infection was evaluated as a confident predictor of disease resistance level and was used as a reliable phenotypic trait for screening the wild *Helianthus* species against *Sclerotinia* stem and leaf rot. Three genotypes, two *H. maximiliani* Accessions and *H. salicifolius*, showed enhanced partial resistance levels to mid-stem infection. *H. divaricatus* and *H. maximiliani* AC 7 exhibits resistances to leaf infection and additionally in *H. maximiliani* AC 7 partial resistances in both plant parts were discovered.

Further histological investigations revealed a close interrelation between the genotypic lignification patterns of the stems and their level of resistance to *Sclerotinia* mid stem rot. Moreover in *H. salicifolius* a reinforced stem cuticle was identified as preformed partial resistance factor to stem infection. Postinfectious *in situ* detection of phenolic compounds in stem tissues performed by epi - fluorescence microscopy showed their strong accumulation in partial resistant genotypes and was characterized as dicaffeoyl ester by thin layer chromatography. Pathogen induced changes of the initial phenolic metabolism were examined by determination the pre and postinfectious phenylalanine-ammonia-lyase activity (PAL) and revealed a great variation among the genotypes. A 30 fold increase of PAL-activity in partial resistant *H. salicifolius* internodes shows a rapid and coordinated induction of the phenylpropanoid metabolism in response to *Sclerotinia* attack. In addition, the defence reaction of stems from partial resistant genotypes was accompanied by a significant increase in cell wall bound peroxidase (POX) activity which can be used as biochemical marker for *Sclerotinia* resistance.

To investigate the interrelationship between preformed phenolic compounds in wild sunflower leaves and their resistance to mycelial extension a new chromatographic method was developed to determine complete phenolic patterns in the genus *Helianthus*. The subsequently applied multivariate analysis revealed a close quantitative and inverse association between putative flavonoid leaf phenolics and the mycelial extension in the leaf mesophyll.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary als wirtschaftlich bedeutender Pathogen der Sonnenblume.....	4
1.2	Das Wirt - Pathogensystem <i>Helianthus</i> - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - Biologie und Pathogenese.....	6
1.3	Bekämpfungsstrategien.....	9
1.4	Resistenzniveau der Kultursonnenblume gegenüber <i>Sclerotinia</i> -Befall und Resistenzscreening.....	11
1.5	Resistenzfaktoren der Gattung <i>Helianthus</i> gegenüber <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	13
1.6	Pflanzliche Pathogenerkennung als wesentliche Voraussetzung induzierter Abwehrmechanismen.....	14
1.7	Pathogensensitiver Phenolmetabolismus.....	17
1.8	Der natürliche <i>Helianthus</i> Genpool – Quelle für Diversität und Pathogen-Resistenzen...	18
1.9	Ziele der Arbeit.....	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Verwendetes Pflanzenmaterial, Herkünfte, Aufzucht und Pflegemaßnahmen.....	22
2.2	Herkunft, Isolation und Aufzucht des <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Isolates.....	24
2.3	Evaluierung des Resistenzverhaltens perennierender <i>Helianthus</i> Wildarten gegenüber artifizierlicher <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Blatt- und Stängelinfektion.....	24
2.3.1	Untersuchungen zur <i>Sclerotinia</i> -Stängelreaktion im Freiland.....	27
2.3.2	Untersuchungen zur <i>Sclerotinia</i> -Blattreaktion im Freiland.....	27
2.3.3	Untersuchungen zur <i>Sclerotinia</i> -Blattreaktion unter kontrollierten Bedingungen - Detached-Leaf Test.....	28
2.3.4	Datenerhebungen, Bonituren und statistische Auswertung.....	29
2.4	Evaluierung präformierter Blatt-Phenolprofile als Resistenzmarker zur <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Myzelausbreitung im Mesophyll perennierender <i>Helianthus</i> -Wildarten.....	31
2.4.1	Verwendetes Pflanzen- und Blattmaterial, Versuchsanlage und zeitliche Dimensionierung.....	32
2.4.2	Probenaufarbeitung und Extraktion.....	33
2.4.3	HPLC-Analytik löslicher Phenole.....	33
2.4.4	Versuchsauswertung und statistische Analyse.....	36
2.5	Histologische, chromatographische und biochemische Evaluierung von Resistenzparametern der <i>Sclerotinia</i> -Stängelreaktion perennierender <i>Helianthus</i> Wildarten.....	37

2.5.1	Verwendetes Pflanzenmaterial und Versuchsanlage.....	39
2.5.2	Histologische Untersuchung prä- und postinfektioneller Resistenzfaktoren.....	39
2.5.3	Postinfektionelle Änderungen im Phenolstoffwechsel und der Peroxidaseaktivität.....	42
2.5.3.1	Dünnschichtchromatographie resistenzbegleitender Inhaltsstoffe.....	42
2.5.3.2	Extraktion und Bestimmung der prä- und postinfektionellen Phenylalanin-Ammoniak-Lyase - (E.C. 4.3.1.5) und Peroxidase - (E.C. 1.11.17) Aktivität.....	44
2.5.3.2.1	Ermittlung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase - (PAL, E.C. 4.3.1.5) Aktivität.....	45
2.5.3.2.2	Ermittlung der Peroxidase - (POX, E.C. 1.11.17) Aktivität.....	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Untersuchungen zum Resistenzverhalten perennierender <i>Helianthus</i> Wildarten auf artifizielle <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Inokulation.....	49
3.1.1	<i>Sclerotinia</i> -Stängelreaktion im Freiland.....	50
3.1.1.1	Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Sprossachse und Umweltkonstanz des Merkmals Läsionslänge.....	50
3.1.1.2	Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und Korrelation zum Hauptboniturmerkmal Läsionslänge.....	58
3.1.1.3	Phänologische Charakteristika der Stängelreaktion auf <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Inokulation.....	59
3.1.2	<i>Sclerotinia</i> -Blattreaktion im Freiland.....	63
3.1.2.1	Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Blätter und Umweltkonstanz des Merkmals Läsionslänge.....	63
3.1.2.2	Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und Korrelation zum Hauptboniturmerkmal Blattläsionslänge.....	67
3.1.2.3	Phänologische Charakteristika der Blattreaktion auf <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Inokulation.....	68
3.1.3	<i>Sclerotinia</i> -Blattreaktion unter kontrollierten Umweltbedingungen.....	69
3.1.3.1	Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Blätter unter kontrollierten Umweltbedingungen.....	69
3.1.3.2	Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und phänologische Charakteristika der Blattreaktion.....	72
3.1.4	Phänotypische Korrelation zwischen den Testverfahren und Evaluierung potentieller Genotypen mit erhöhter Stängel- und Blattresistenz gegenüber <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Infektion.....	74
3.2	Untersuchung präformierter Blatt-Phenolprofile als potentielle Resistenzmarker der <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Myzelausbreitung im Mesophyll perennierender <i>Helianthus</i> Wildarten.....	77

---

3.2.1	Ermittlung optimaler Extraktions- und Elutionsparameter zur HPLC-Analyse löslicher phenolischer Inhaltsstoffe.....	78
3.2.2	Identifikation phenolischer Komponenten, interspezifische Diversität und Variabilität im Polyphenolmuster.....	79
3.2.3	Zusammenhänge zwischen der qualitativen- und quantitativen Diversität im Phenolmuster und der <i>Sclerotinia</i> -Myzelausbreitung im Mesophyll.....	83
3.2.3.1	<i>Sclerotinia</i> -Myzelausbreitung im Mesophyll - Ergebnisse des DTL – Tests.....	83
3.2.3.2	Qualitative Relationen zwischen Interspezifischen Phenolmustern und der Läsionsausdehnung.....	84
3.2.3.3	Quantitative Relationen zwischen Interspezifischen Phenolmustern und der Läsionsausdehnung.....	86
3.3	Prä- und postinfektionelle Charakteristik der <i>Sclerotinia</i> Stängel-Resistenzreaktion.....	91
3.3.1	Histochemische Untersuchung prä- und postinfektioneller Strukturen.....	91
3.3.1.1	Präformierte morphologische Eigenschaften der Sprossachsen.....	91
3.3.1.2	Makroskopische und histopathologische Beobachtungen nach <i>Sclerotinia</i> -Inokulation...	92
3.3.2	Dünnschichtchromatographie resistenzbegleitender Inhaltsstoffe.....	96
3.3.3	Induzierbarkeit der PAL-Aktivität bei abiotischem (Verwundung) und biotischem ( <i>Sclerotinia</i> -Inokulation) Stress.....	100
3.3.4	Induzierbarkeit der POX-Aktivität durch <i>Sclerotinia</i> – Inokulation.....	102
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>

---

4.1	Effizienz der artifiziellen Inokulationen.....	105
4.2	Selektionskriterien der Blatt- und Stängelresistenz gegenüber <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ..	107
4.3	Unterschiede zwischen Blatt- und Stängelresistenzniveaus und Umweltabhängigkeit des Resistenzphänomens.....	109
4.4	Ermittlung von Partialkomponenten der <i>Sclerotinia</i> -Resistenz in Sprossachsen und Blättern perennierender Wildarten.....	112
4.5	Erschließung von konstitutiven <i>Sclerotinia</i> - Resistenzfaktoren der Sprossachsen.....	118
4.6	Induzierte Resistenzmechanismen der Sprossachsen auf einen <i>Sclerotinia</i> Befall.....	123
4.7	Wirkungszusammenhänge präformierter Blattphenolfingerprints zur <i>Sclerotinia</i> -Resistenz.....	132
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>

---

<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
-----------	-----------------------------	------------

---

## 1. Einleitung

Die Familie der Korbblütler (*Compositae*) hat im Zuge ihrer Phylogenese neben dem Saflor (*Carthamus tinctorius* L.), der Ölradie (*Madia sativa* Mol.), der Mariendistel (*Silybium marianum* L.) und der Ringelblume (*Calendula officinalis* L.) die Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) als ihre wirtschaftlich bedeutendste Ölpflanze hervorgebracht (Schuster, 1992). Die Kultursonnenblume ist hinsichtlich der annualen Ölproduktion hinter der Ölpalme (*Elaeis guineensis* Jacq.; 24,1 Mio. t), der Sojabohne (*Glycine max* L.; 24,3 Mio. t) und dem Raps (*Brassica napus* L.; 12,8 Mio. t) mit 8,4 Mio. t erzeugtem Öl die viertwichtigste ölliefernde Pflanze der Welt (FAO, 2002). Sie deckt damit rund 9% des Globalhandels mit pflanzlichen Ölen und Fetten ab. Bedeutende Erzeugerländer für Sonnenblumensamen sind nach FAO (2002) Argentinien (1.9 Mio. ha; 3.1 Mio. t), die Russische Föderation (3.4 Mio. ha; 2.7 Mio. t), die Ukraine (2.4 Mio. ha; 2.2 Mio. t), die Volksrepublik China (1.1 Mio. ha; 1.7 Mio. t), die Vereinigten Staaten (1.0 Mio. ha; 1.5 Mio. t) sowie Frankreich (0.7 Mio. ha, 1.6 Mio. t). In Europa dominiert die Erzeugung in Frankreich mit über 30% Anteil an der gesamteuropäischen Produktion. Größere Anbauflächen und Samenproduktionen weisen in Europa daneben Spanien (0.9 Mio. ha; 0.9 Mio. t) sowie Rumänien (0.8 Mio. ha; 0.8 Mio. t) auf. Trotz der weltweit höchsten durchschnittlichen Erträge von 25 dt./ha besteht in Deutschland ein jährlicher Importbedarf von 500.000 t (ZMP, 1997). Dies ist bedingt durch die erhöhte Nachfrage von Lebensmittel- und oleochemischer Industrie bei einer gleichzeitig marginalen Produktion von 62.000 t auf knapp 25.000 ha Fläche.

Trotz der spät im April gesäten Sommerkultur weist die Sonnenblume in der Hauptwachstumsphase hohe tägliche Zuwachsraten von maximal 200kg/ha auf (Merrien, 1986). Dieses ist im Wesentlichen in der Kombination aus geringen stomatären Diffusionswiderständen (Potter & Breen, 1980), hochspezifischer Rubisco Aktivität (Danley & Walker, 1978; Ranty & Cavalié, 1982) sowie effizientem Elektronentransport (Connor & Hall, 1997) und damit hohen Nettophotosyntheseleistungen begründet (Fock et al., 1979; Hervé et al., 2001). Infolgedessen ist unter günstigen Bedingungen der kontinental-warmen Klimazonen die Ölproduktion/Fläche der Sonnenblume allen anderen ölerzeugenden Kulturpflanzen überlegen (Geisler, 1983). Neben acker- und pflanzenbau-lichen Aspekten, die hauptsächlich in der Auflockerung der zumeist engen Fruchtfolgen, im geringen Nährstoffbedarf sowie in der Amelioration der Bodenfruchtbarkeit gesehen werden (Geisler, 1988), stellen auch ökonomische Aspekte einen Anreiz zur Sonnenblumenproduktion dar (Hugger, 1989).

Abgesehen von der Ölerzeugung aus den Achänen, können fast alle Pflanzenteile der Sonnenblume potentiell genutzt werden (Schuster, 1993; Hugger, 1989). Diese alternativen Nutzungsformen sind jedoch auf Grund des hochtechnisierten Produktionsverfahrens

globalwirtschaftlich von geringer Bedeutung (Lofgren, 1997; Kleingartner, 1997) oder noch im experimentellen Status (Park et al., 1997; ISA, 2000).

Das Öl konventioneller Linol- und Linolensäurereicher *High-Linolic* (HL) Sorten findet aufgrund seines ausgewogenen Fettsäurespektrums zur menschlichen Ernährung als hochwertiges Speiseöl im Nahrungsbereich Anwendung. Wesentliche Qualitätskriterien zur Ölerzeugung und Verarbeitung der Lebensmittelindustrie sind neben der Ölausbeute, dem  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherolgehalt und einem geringen Wachsgehalt, die Anteile an ernährungsphysiologisch bedeutenden mehrfach ungesättigte Fettsäuren, insbesondere der Linolsäure (Dorrell & Vick, 1997).

Neben den konventionellen HL-Sorten finden in den letzten Jahren auch hochölsäurehaltige (HO) - Sorten steigendes Interesse in *Food* und *Non-Food*-Anwendungen (Eierdanz, 1996). Die zunächst von Soldatov (1976) durch Samenbehandlung mit Dimethylsulfoxid gewonnenen Mutanten sowie deren Kreuzung mit der konventionellen ölsäurereichen Sorte *Pervenets* führte zur Erzeugung ölsäurereicher Nachkommenschaften mit Gehalten bis 80% im Fettsäuremuster. Unabhängige Untersuchungen konnten dabei zeigen, dass ein dominantes Gen (*Ol*) die hohen Ölsäuregehalte determinierte (Urie, 1985; Schmidt et al., 1989). Darüber hinaus konnten Miller et al. (1987) ein zusätzliches modifizierendes Gen (*ml*) aufdecken, welches in homozygoten Nachkommen stabile und weitgehend umweltunabhängige Ölsäuregehalte > 85% determinierte. Die aus aktuellen Züchtungsarbeiten hervorgegangenen HO-Sorten stellen mittlerweile ein Öl mit annähernd umweltstabilen Ölsäuregehalten von > 85% teilweise sogar > 90% bereit, welches bislang nur von der Sonnenblume erreicht wird (Lagravere et al., 2000).

Die industrielle Fettchemie hat eine große Zahl von Produkten auf Basis der Ölsäure hervorgebracht. Sie ist Bestandteil und Grundlage einer Reihe wichtiger industrieller Produkte wie Kosmetika, Wasch- und Reinigungsmittel, Emulgatoren, Körperpflegemittel und Pharmazeutika. Veränderungen an der Carboxylgruppe (Aha et al., 1998) sowie an der hochreaktiven C9-C10-Doppelbindung (Zobel & Schäfer et al., 1998) als reaktives und definiertes Zentrum für chemische Synthesen sind oleochemische Eingriffe, die Ölsäure zu dieser Vielzahl von Produkten modifizieren lassen (siehe auch Tabelle 1).

Derzeit wird Ölsäure von der oleochemischen Industrie vorrangig aus tierischen Schlachtkörperabfällen, in der Hauptsache aus Rindertalg, gewonnen. In den aufgearbeiteten Fetten kann sie mit speziellen Techniken nur auf 70% angereichert werden. HO-Öle weisen aufgrund ihres maßgeblich von Ölsäure dominierten Fettsäuremuster eine nur selten im Bereich nachwachsender Rohstoffe beobachtete Reinheit auf, die sie zum prädestinierten Rohstoff für fettchemische Derivatisierungen macht. Die Industrie ist deshalb stark an HO-Ölen pflanzlicher Herkunft interessiert, wenn deren Ölsäuregehalt > 83%, günstiger > 90%, beträgt (Graf et al., 1999). Neben den rein chemischen Eigenschaften sind der

reduzierte Reinigungsaufwand und physikochemische Eigenschaften wie die hohe oxidative Stabilität (gutes Hochtemperaturverhalten) und das gute Tieftemperaturverhalten der Ölsäure wesentliche Bestimmungsgründe für die hohe industrielle Nachfrage ölsäurereicher Chargen (Piazza & Foglia, 2001). Größere Anbauflächen im industriellen Vertragsanbau von HO-Sonnenblumen existieren bislang in Frankreich, den USA und Argentinien mit jeweils hohen, vom Industriepartner garantierten Erzeugerpreisen (Narocon, 2001). Das Anbaupotential von HO-Sonnenblumen wird in Deutschland auf ca. 100.000 ha geschätzt (Narocon, 2001), von denen im Jahr 2001 lediglich 9000 ha im Vertragsanbau erzeugt wurden. Die Abnahmerisiken im Vertragsanbau mit der Oleochemie sind hierbei relativ gering, da nicht erzielte Qualitäten (< 83% Ölsäure) problemlos im Nahrungsmittelbereich abgesetzt werden können (Graff et al, 1999; Narocon, 2001).

<b>Ester</b>	<b>Amide</b>	<b>Unges. Alkohole</b>	<b>Seifen</b>
Schmierstoffe			
Hydraulikflüssigkeiten	Polymeradditive	Emulgatoren	Reinigungsmittel
Kosmetika	Polyamide	Entschäumungsmittel	Schmierstoffe
Trennmittel	Gleitmittel	Kosmetika	Polymeradditive
Kühlschmierstoffe	Kunststoffe	Pharmazeutika	Flotationsmittel
Turbinenöl			

**Tabelle 1:** Technisches Anwendungsspektrum pflanzlicher Ölsäure (Graff et al., 1999; Narocon, 2001)

Die Anbaueignung aktueller HO und HL-Sorten für marginale Standorte der Sonnenblumenproduktion, wie sie in weiten Teilen Deutschlands vorherrschen, wird dagegen als mittel bis schlecht angegeben (Graff et al., 1999). Gründe hierfür sind neben den ausgeprägt kontinentalen Klimaansprüchen der Sonnenblume, im Besonderen in der reduzierten genetischen Variabilität aller züchterischen Ausgangsformen aktueller Kultursorten zu sehen.

Die ersten züchterischen Bearbeitungen der in Nord- und Mittelamerika autochthonen annuellen Sonnenblume (Seiler, 1992; Sanchez & Elizondo, 1995) wurden zunächst von den Olmeken Süd-Mexikos in präkolumbianischer Zeit 3000 v. Chr. vollzogen (Lentz et al.; 2001). Isoenzym- und molekulare Untersuchungen der Variabilität der cpDNA und plastidärer Enzyme zwischen annuellen Wild- und Kulturformen (Rieseberg & Seiler, 1990; Arias & Rieseberg, 1995; Cronn et al., 1997; Cheres & Knapp, 1998) belegen hierbei einen genetisch extrem eingeschränkten Genpool der Kulturform und lässt die genannten Autoren auf ein singuläres Domestikationsereignis schließen. Nach der Einführung der Sonnenblume nach Europa zu Beginn des 16. Jh. durch die Spanier (Monardes, 1574), erfuhr die Sonnenblume erst im 18. Jh. und Mitte des 20 Jh. in Russland wesentliche züchterische Modifikationen. Dieses gestattete erst die Erzeugung der heutigen modernen, ölreichen Achänen (Putt, 1965; Putt, 1997). Die nachfolgende Aufdeckung und Einlagerung der cytoplasmatischen männlich exprimierten Sterilität (*cms*) (Leclerq, 1969)

der annualen Wildart *H. petiolaris* (pet1 cms) in die Kulturform ermöglichte darüber hinaus durch die Nutzung der Heterosis die Erzeugung heutiger Hohertragsorten. Trotz der bislang 62 entdeckten cms Quellen der Gattung *Helianthus* (Miller et al., 1992; Serieys, 1994; Serieys, 1996) wird infolge unvollständiger Expression der cms-Quellen und Schwierigkeiten in der Identifikation einfacher und kompetenter Restorer zur F<sub>1</sub>-Hybriderzeugung fast ausschließlich auf das pet1 cms-System zurückgegriffen (Miller & Fick, 1997). Die seit drei Dekaden praktizierte intensive Einlagerung des pet1 Cytoplasmas in die ohnehin genetisch kaum variablen Ausgangspopulationen annualer Zuchtformen hat hierbei zu einer weiteren Verarmung der genetischen Variabilität geführt, mit der Folge extrem pathogen- und schädlingsempfindlicher Kulturformen (Seiler, 1992; Sackston, 1992; Gulya et al., 1997). Die ausgesprochen enge genetische Basis, auf der alle heute genutzten Hohertragshybride beruhen, birgt dabei ein unabsehbares epidemiologisches und phytosanitäres Problem und kann Grundlage ernstvernichtender Kalamitäten sein.

Eine ähnlich reduzierte Variabilität durch Einlagerung des gleichen *Helminthosporium* empfindlichen Texas-Cytoplasmas in sämtliche Maishybride, führte 1970 in den USA zur Vernichtung eines großen Teils der damaligen Mais-Anbaufläche durch die Blattfleckenkrankheit *Helminthosporium maydis* (Tatum, 1971).

### **1.1 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary als wirtschaftlich bedeutender Pathogen der Sonnenblume**

Der mit Abstand globalwirtschaftlich bedeutendste Pathogen der Kultursonnenblume ist der Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, der in allen Klimazonen prävalent ist (Sackston, 1978; Acimovic, 1988; Masirevic & Gulya, 1992; Porter & Clark, 1992; Kedera, 1997; Leite et al., 2000; Huguet & Heiland, 2000). In Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen kann er alle Pflanzenteile in jedem Entwicklungsstadium befallen (Gulya et al., 1997). Stark *Sclerotinia* befallene Pflanzenteile sind insbesondere die Wurzel mit der Sprossachsenbasis, die Blätter mit nachfolgender Stängelfäule, die Blütenknospen sowie der blühende Korb (Lamarque, 1985). Wirtschaftliche Verluste entstehen durch die Reduktion des Ölertrages/Fläche infolge welkender bzw. umgefallener Pflanzen (Sala et al., 1998; Prioletta & Bazzalo, 1998). Unter günstigen Infektions- und Wachstumsbedingungen des Pilzes können die Verluste leicht 100% betragen (Rashid & Platford, 1990; Masirevic & Gulya, 1992; Rashid, 1993). Im Durchschnitt der Jahre und Klimazonen wird hierbei jedoch ein Verlust von 1% - 40% beobachtet (Purdy, 1979; Gulya et al. 1986; Rashid, 1993; Gianessi et al., 2002). Die jährlichen ökonomischen Verluste der Sonnenblumenproduktion durch *Sclerotinia* - Befall werden von der National Sunflower Association (NSA) der USA alleine für die anbaustarken Bundesstaaten Kansas, Minnesota sowie North- und South-Dakota auf über 70 Mio. US\$ geschätzt (Gianessi et al., 2002). Auf klimatischen Grenzstandorten für den Sonnenblumenanbau, wie sie in weiten Teilen

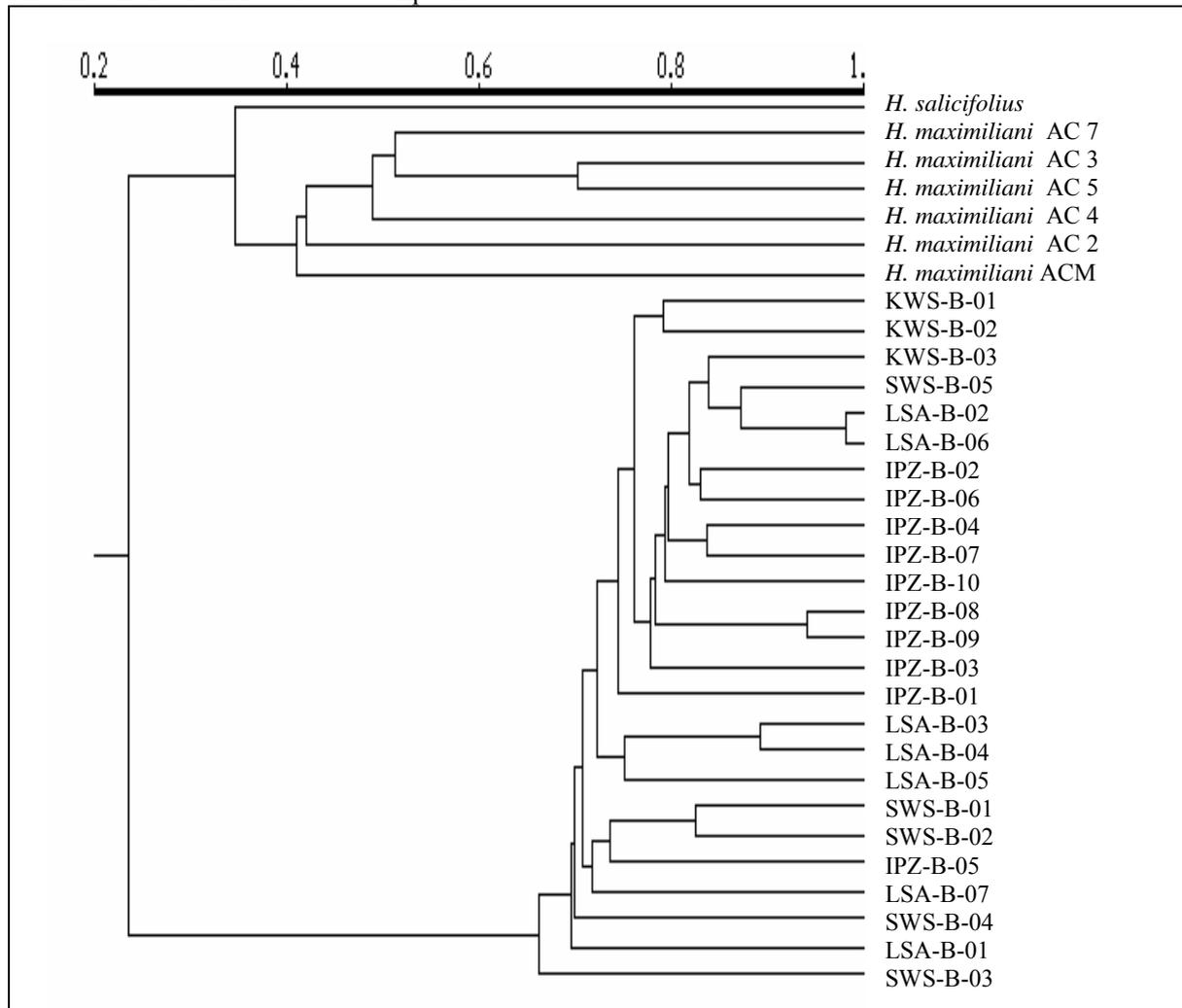
Deutschlands vorherrschen, wird der Krankheitskomplex der *Sclerotinia*-Fäule als einer der Hauptdeterminanten zur Produktion eines ertragssicheren Ölertrags/Fläche und damit zur Erzielung konkurrenzfähiger Deckungsbeiträge gesehen (Graf et al., 1999). Infolgedessen wird neben dem Ölertrag, einer kurzen Vegetationszeit von 100 Tagen sowie der Kältetoleranzen auch die Krankheitsresistenz gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* als ein wesentliches Zuchtziel zur Amelioration des Anbaurisikos für Sonnenblumen in den gemäßigten Breiten berücksichtigt (BSA, 2001; Hahn, 2000). Chemische Bekämpfungsmaßnahmen sind prinzipiell möglich (Yarden et al., 1986; Patterson & Grogan, 1985; Smith et al., 1991; Lamey, 1998), sind jedoch aufgrund der zur Prävalenz der *Sclerotinia* - Korb- und Stängelfäule bereits erreichten Bestandeshöhen technisch und ökonomisch nicht vertretbar (Péres & Regnault, 1985; Péres et al., 1991; Lamey, 1998).

Eindeutige Resistenzen liegen in der Sonnenblume gegenüber *Sclerotinia* nicht vor, lediglich Unterschiede in der Befallstärke von Sorten und Linien sind vorhanden (Thompson et al., 1978; Gulya 1985; Tourvieille et al., 1996; Degener et al., 1998; Hahn, 2000). Als einen wesentlichen Grund für die geringe Variabilität vorhandener *Sclerotinia*-Resistenzpotentiale der annualen Kultursorten und Linien gilt der intensive Gebrauch des pet 1 Cytoplasmas zur Linienherzeugung und F<sub>1</sub>-Hybridzüchtung (Seiler, 1992; Sackston, 1992). In der Ausweitung der genetischen Basis heutiger Kulturformen von *Helianthus annuus* und der Einlagerung neuer Resistenzquellen wird somit ein wesentlicher Ansatzpunkt der Züchtungsforschung zur Verbesserung des *Sclerotinia*-Resistenzpotentials gesehen. Als Quellen der Diversität kann hierbei sowohl der primäre, aus einjährigen *Helianthus*-Wildarten bestehende Genpool als auch der systematisch weiter stehende, sekundäre (perennierende) *Helianthus*-Genpool dienen.

Erschließung und Nutzung dieser Diversitäts- und Resistenzquellen erfolgten jedoch aufgrund bestehender Kreuzungsbarrieren mit perennierenden Wildarten (Chandler & Beard, 1978; Bohorova & Atanassov, 1990) im Wesentlichen aus dem annualen (primären) Genpool. Neu entwickelte biotechnologische Ansätze zur Überwindung existenter Kreuzungsbarrieren (Jan, 1997; Sukno et al., 1999; Binsfeld, 1999; Binsfeld et al., 2000; Schnabl et al., 2002) und die Erzeugung fertiler interspezifischer Nachkommen (Henn et al., 1998; Binsfeld et al., 2001; Gavrilova et al., 2000; Binsfeld & Schnabl, 2002; Jan et al., 2002; Pérez-Vich et al., 2002) ermöglichen nun die stabile Introgression genetischen Materials aus dem sekundären Genpool in die Kultursonnenblume. Sie rücken damit den perennierenden Formenkreis zunehmend in das allgemeine Züchtungsinteresse (Degener et al., 1999a; Degener et al., 1999b; Hahn et al., 2001).

In Abbildung 1 sind die genetischen Distanzen von High-Oleic Inzuchtlinien der aktuellen HO-Züchtung in Relation zu perennierenden *Helianthus* Wildarten des sekundären Genpools grafisch dargestellt und veranschaulichen den oben dargestellten Sachverhalt.

**Abbildung 1:** Vergleichende genetische Diversität im kultivierten primären (HO-B Linien) und wildem sekundären *Helianthus* Genpool <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> UPGMA-Dendrogramm aus 145 AFLP-Primerkombinationen ohne monomorphe Banden. Ergebnisse aus dem Verbundprojekt GFP/FNR: Untersuchungen zur Verbesserung der *Sclerotinia*-Resistenz von 'High Oleic' Sonnenblumen. KWS = KWS Saat AG – D-37555 Einbeck; SWS = Südwestdeutsche Saatzucht D- 76437 Rastatt; IPZ = Institut für Pflanzenzüchtung - Universität Giessen, D-35392. LSA = Landessaatzuchtanstalt Eckartsweier D-77731 Willstätt. *H. maximiliani* und *H. salicifolius* Akzessionen perennierender *Helianthus* Wildarten aus der *in vivo* Kollektion des Instituts für Landwirtschaftliche Botanik, D-53115 Bonn.

## 1.2 Das Wirt - Pathogensystem *Helianthus* - *Sclerotinia sclerotiorum* - Biologie und Pathogenese

*Sclerotinia sclerotiorum* gehört mit *Sclerotinia minor* und *Sclerotinia trifoliorum* zu den wirtschaftlich bedeutendsten Phytopathogenen der Gattung *Sclerotinia*. Ihnen gemeinsam ist die Bildung von vegetativen dormanten Dauerorganen – den Sklerotien. Diese sind durch einen stark melanisierten Cortex sowie medullär eingelagerte Reserveproteine, Kohlenhydrate und Lipide gekennzeichnet. Sie werden durch wiederholte diochotome Teilung der Hyphen und ihrer nachfolgenden multiplen Septierung gebildet (Lumsden & Dow, 1973; Lumsden, 1979; Kohn, 1979a; Webster, 1993; Moore-Landecker, 1996; Willetts, 1997; Carlile et al., 2001) und überdauern im Boden in Abhängigkeit von Bodentiefe und Temperatur mehrere Jahre. Für die Überlebensfähigkeit von *S. sclerotiorum* Sklerotien sind bis zu sieben Jahre ermittelt worden (Ben-Yephet et al., 1993).

*Sclerotinia sclerotiorum* unterscheidet sich von *S. minor* und *S. trifoliorum* durch irregulär geformte, binucleäre Ascosporen (Kohn, 1979b) sowie im wesentlich größeren Umfang der befallenen Wirtspflanzen (Held & Heansler, 1953; Melzer et al., 1997; Boland & Hall, 1994; Pratt & Rowe, 1991). Der Ascomycet parasitiert über 400 Pflanzenarten in 75 Pflanzenfamilien mit 278 Genera inklusive einem Pterophyten sowie 29 monokotylen Pflanzen (Ahmad & Mirza, 1987; Farr et al., 1989; Boland & Hall, 1994). Er bedingt neben dem Krankheitskomplex der Fäule bei Sonnenblumen wirtschaftlich bedeutende Verluste bei Raps (Rapskrebs, Weißstängeligkeit), der Sojabohne (*white mold disease*), dem Kopfsalat (*lettuce drop*), dem Tabak, der Erdnuss (Stängelfäule) sowie durch Weichfäulen verursachte Lagerverluste bei Kartoffeln, Möhren, Bohnen und zahlreichen anderen Lagergemüsen (Jellis et al., 1990; Agrios, 1997).

Primäres Inokulum zunächst nicht befallener Bestände stellen die windbürtigen Ascosporen dar (Abawi & Grogan, 1975; Gulya, 1997). Obwohl die Ascosporenkeimung innerhalb von vier Stunden erfolgen kann, sind im Durchschnitt 20 - 40h anhaltende freie Feuchte zur erfolgreichen Besiedlung des pflanzlichen Gewebes notwendig (Payen, 1983; Hugger, 1989; Ratkos & Nagy, 1992). Das primäre Wachstum des gekeimten Ascosporenmyzels erfolgt zunächst saprophytisch (Abawi & Grogan, 1975; Abawi & Grogan, 1979; Abawi et al., 1975; Lithourgidis et al. 1989). Als Nährstoffquellen dienen sowohl floraler (Says-Lesage & Tourvieille, 1988) aber auch extrafloraler Nektar, senescentes pflanzliches Gewebe wie Teile der abgeblühten Röhrenblüten (Lamarque et al., 1985), nekrotische Blattspitzen (Degener et al., 1998) oder diffusible Assimilate der Blattspreiten (Sedun & Brown, 1986). Hauptbefallsorte der Ascosporeninfection sind alle oberirdischen Pflanzenteile mit Schwerpunkt auf den Blattspreiten und den geöffneten Blütenkörben als diejenigen Pflanzenorgane mit der größten Oberfläche und günstigen Inklinationswinkeln zur Ascosporenlandung und zur Feuchteretention. Die Penetration des Wirtsgewebes erfolgt durch die intakte Cuticula, in seltenen Fällen auch direkt durch geöffnete Stomata (Jones, 1976; Lumsden & Wergin, 1980), wobei thigmotrope Reize und Chemoperzeption zur erfolgreichen Besiedlung pflanzlichen Gewebes nicht nachgewiesen worden sind (Lumsden, 1979). Nach erfolgreicher primärer Penetration der Pflanze erfolgt deren enzymatische Degradation durch sequenziell sezernierte Endo- und Exoplygalacturonasen (Favaron et al., 1993; Fraissinet-Tachet et al., 1995; Martel et al., 1998),  $\beta$ -Galactosidasen (Waksman, 1988; Waksman 1989); Phosphatidasen (Lumsden, 1976), Pectinmethylesterasen (Morall et al., 1972), Cellulasen (Riou et al., 1991) sowie saurer Proteasen (Poussereau et al., 2001). Zusätzlich wird nach Erreichen eines stabilen Wirt – Parasit - Verhältnisses Oxalsäure sezerniert. Diese gilt neben den lytischen Enzymen als einer der Hauptpathogenitätsfaktoren für *Sclerotinia sclerotiorum* (Noyes & Hancock, 1981; Ziman et al., 1998; Godoy et al., 1990). Zusammenhänge zwischen der Aggressivität des Pilzes und den sezernierten Mengen an Enzymen oder Oxalsäure sind hierbei nicht

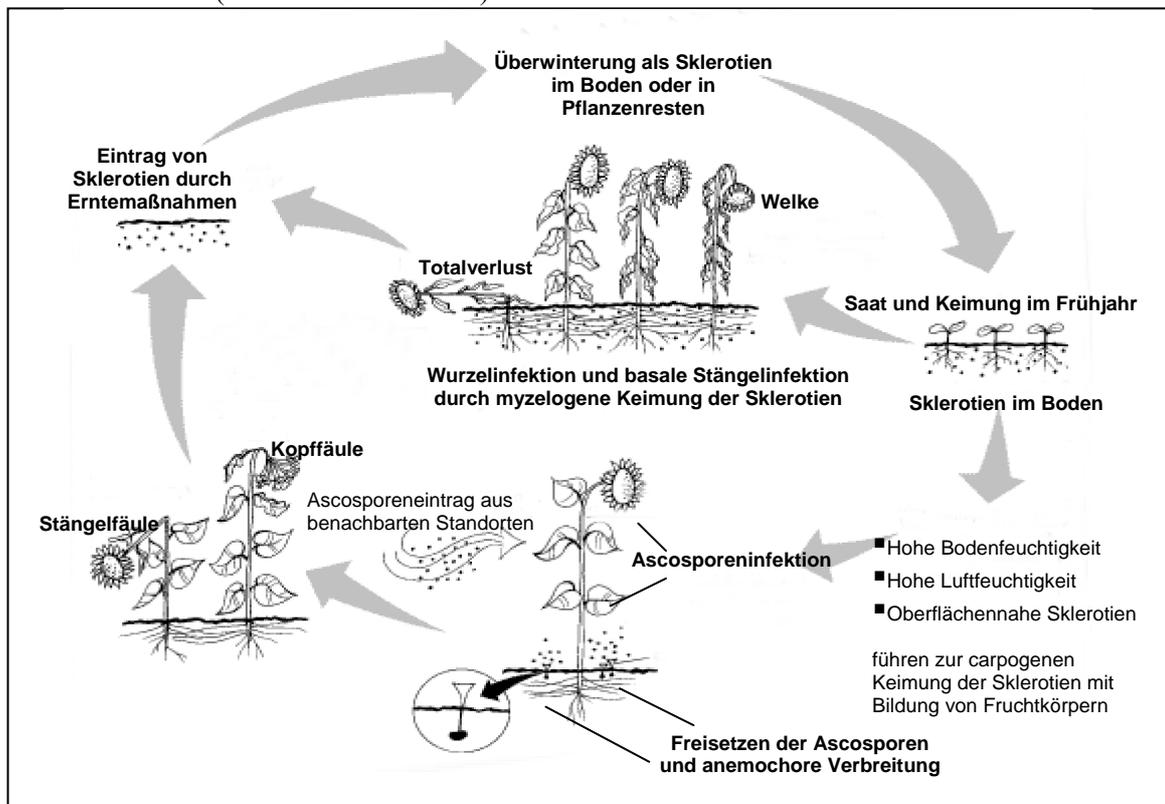
konstant, sondern ändern sich in Abhängigkeit vom untersuchten Isolat (Lumsden, 1979). Neben der Senkung des pH-Wertes, der Chelatisierung von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und der damit verbundenen Aktivitätssteigerung der parallel sezernierten lytischen Enzyme (Bateman & Beer, 1965; Lumsden, 1979; Marciano et al., 1983; Dutton & Evans, 1996) wird der Oxalsäure auch eine Funktion zur Inhibierung von *o*-Diphenoloxidasen (Laccasen) und damit in der Unterbindung nekrotisch - melanisierender Reaktionen zugeschrieben (Ferrar & Walker, 1993). Infiziertes Gewebe erscheint aufgrund der lytischen Enzymaktivität wassergesättigt und bricht infolge der vollständigen Mazeration zusammen. In den induzierten Läsionen wandert hierbei das Pilzmyzel direkt hinter der Läsionsfront. Damit ist die Läsionsextension direkt mit der Myzelaktivität im penetrierten Gewebe assoziiert (Sedun & Brown, 1989). Die Ernährung des parasitierenden Thallus erfolgt bei *Sclerotinia sclerotiorum* ausgesprochen perthotroph – nekrotroph, in dem die den penetrierenden Hyphenspitzen vorausliegenden Zellen durch Einwirkung der sezernierten Enzyme und der Oxalsäure abgetötet werden (Lumsden, 1979; Venette, 1998). Ein biotrophes Stadium ist zu keinem Zeitpunkt der Pathogenese nachweisbar. Auf die Mazeration des Gewebes folgt nach ca. 8-14 Tagen die Vollendung der Pathogenese durch die Bildung von Sklerotien auf der Pflanzenoberfläche und besonders in entstandenen Kavitäten wie dem parenchymreichen Stängellumen.

Neben der Infektion über Ascosporen können auch die Sklerotien als Inokulum zur Infektion dienen (Ekins et al., 2002). Ihre Auskeimung im Boden erfolgt in Abhängigkeit von der Bodentemperatur und Feuchte in zwei distinkten Formen (Lumsden, 1979; Huang & Kozub, 1991b; Sun & Yang, 2000). Eine vorherige Kälteinduktion führt zur carpogenen Keimung mit der Ausbildung von Apothecien und der nachfolgenden Freisetzung von Ascosporen. Durch die infizierte Vorfrucht in die obersten 2 - 5cm Bodenschicht gelangte Sklerotien bilden dabei den Hauptanteil der fruchtkörperbildenden Dauerorgane. Die Prävalenz der Apothecienbildung und des Ascosporenfluges liegt hierbei in Mitteleuropa zwischen April und September. Jedes Apothecium kann dabei zwischen 2 - 30 Mio. Ascosporen und in Abhängigkeit von der Bodenfeuchtigkeit über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen freisetzen (Venette, 1998; Hugger, 1989). Stark *Sclerotinia* befallene Standorte können Apotheciendichten bis zu 40.000 Fruchtkörper / ha aufweisen (Venette, 1998).

Ohne Kälteinduktion und bei geringer Luftfeuchtigkeit erfolgt die mycelogene Keimung der Sklerotien mit der nachfolgenden bodenbürtigen Infektion der Wurzel und Stängelbasis (Nelson & Lamey, 2000; Ekins et al., 2002). Unter mitteleuropäischen Klimaverhältnissen kommen beide Infektionsarten vor, jedoch mit starker Prävalenz zur Ascosporen vermittelten Blatt- und Korbinfektion (Degener et al., 1998). Der Blattinfektion folgt anschließend die Stängelfäule durch Penetration des *Sclerotinia*-Myzels über die Petiole in die Sprossachse (Masirevic & Gulya, 1992; Degener et al., 1998). Dieses führt letztendlich

zum Zusammenbruch der oberirdischen Pflanzensubstanz und zum Verlust der Ertragskomponente „Blütenkorb“.

**Abbildung 2:** Krankheitszyklus der *Sclerotinia sclerotiorum* Fäule bei Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.)<sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> verändert nach NDSU (2000).

### 1.3 Bekämpfungsstrategien

Der Krankheitskomplex der *Sclerotinia*-Fäule kann prinzipiell sowohl über pflanzenbauliche Maßnahmen, den Einsatz von Hyperparasiten als auch durch den Anbau toleranter Sorten in Grenzen kontrolliert werden.

Eine Anbaupause von drei bis fünf Jahren innerhalb der Fruchtfolge kann die Anzahl an Sklerotien im Boden signifikant reduzieren (Adams & Ayers, 1979; Termorshuizen, 2002), ist jedoch bei den heutigen engen Fruchtfolgesystemen und dem großen Wirtspflanzenspektrum des Pathogens häufig mit Schwierigkeiten verbunden. Ebenso sollen eine wendende Bodenbearbeitung (Kurle et al., 2001) sowie eine Erhöhung des Boden pH-Wertes über eine Kalkung die Vitalität der Sklerotien reduzieren und somit die Anzahl an Primärinfektionen vermindern (Gulya et al., 1997; Abawi & Widmer, 2000).

Durch die Wahl der Pflanzendichte kann ein Einfluss auf wesentliche Parameter des Mikroklimas wie z.B. der Bestandesfeuchte bewirkt werden. Dieses kann indirekt über die Beeinflussung der Boden- und Blattfeuchte sowohl die Anzahl an induzierten Apothecien als auch die mycelogenen Keimung vermindern und somit Primärinfektionen reduzieren helfen (Hoes & Huang, 1976; Peres et al., 1989). Ebenso werden über den Anbau von frühreifen Sorten und/oder durch frühere Aussaatzeiten eine schnellere Abreife der Körbe

im Herbst und hierüber eine Verminderung der Korb- und Blattinfektionen erreicht (Clarke et al., 1992; Slatter, 1992). Diesem sind jedoch unter mitteleuropäischen Klimaverhältnissen enge Grenzen gesetzt, da sowohl keine echten frühreifen Sorten verfügbar sind und sich das in weiten Teilen Deutschlands atlantisch geprägte Klima im Sommer und Frühherbst nur in extremen Jahren niederschlagsarm darstellt.

In der Bodenmikroflora existieren zahlreiche Nahrungskonkurrenten und Hyperparasiten von *Sclerotinia sclerotiorum* (Zizzerini & Tosi, 1985). Insbesondere die im Boden überdauernden Sklerotien stellen das Nährsubstrat für einige hocheffektive Hyperparasiten dar und werden für ein vorbeugendes und nachhaltiges Bekämpfungsverfahren zur Reduktion der Inokulumdichte erwogen (Huang & Hoes, 1976; Huang, 1980, Tu, 1997; El-Tarabily et al., 2000). Als effektive Hyperparasiten der Sklerotien konnten unter anderem *Coniothyrium minitans* (Tu, 1984; Huang & Kozub, 1991a; Whips & Gerlagh, 1992; McQuilken et al., 1997; Giczey et al., 2001), *Tichoderma* sp. (Wu, 1991; Escande et al., 2002), *Gliocladium virens* (Wu, 1991) und *Sporidesium sclerotivorum* (Adams & Ayers, 1981; Adams & Ayers, 1983) evaluiert werden. Bislang konnte von diesen Hyperparasiten *C. minitans* in einem praxisreifen Verfahren als bodenapplizierbares Sporengranulat umgesetzt werden und bewirkt, bei allerdings jährlich zu applizierenden stark erhöhten Aufwandmengen, einen signifikanten Abbau des Sklerotienpotentials über mehrere Jahre (Gerlagh et al., 1999; von Tiedemann et al., 2001).

Sowohl pflanzenbauliche Verfahren als auch die Biokontrolle über Hyperparasiten führen zwar zu einer effektive Reduktion der Sklerotiendichte am Standort, verhindern jedoch nicht den anemochoren Ascosporeneintrag aus benachbarten Standorten. Dieser kann noch aus Entfernungen von 40km erfolgen (Lefol & Morrall, 1997; Venette, 1998).

Neben den klassischen Bekämpfungsstrategien wird in jüngster Zeit in der Reduktion hoher Oxalsäurekonzentrationen im infizierten Gewebe über transgene Pflanzen als eine Möglichkeit der Schadensminderung erachtet (Kesarwani et al., 2000; Scelonge et al., 2000; Lu et al., 2000; Cober et al., 2003). So konnten Scelonge et al. (2000), Lu et al. (2000) sowie Bazzalo et al. (2000) durch *Agrobacterium* vermittelte Integration einer konstitutiv exprimierten Oxalatoxidase aus Gramineen reduzierte Blatt- und Stängelläsionen der Transformanten nachweisen. Der resistenzvermittelnde Effekt war jedoch lediglich bei Transformanten mit *Sclerotinia* tolerantem, genetischen Hintergrund signifikant effektiver als bei suszeptiblen Ausgangspflanzen zur Transformation. Ebenso konnten Cobert et al. (2003) durch *Agrobacterium* vermittelte Integration einer Oxalatoxidase in *Sclerotinia* suszeptible Sojabohnen - Linien zwar eine erhöhte Stängelresistenz nachweisen, die jedoch nicht das Resistenzniveau bereits verfügbarer, partiell resistenter Sorten übertraf. Zusätzlich impliziert dieser monogene, transgene Ansatz einen ebenso monogen determinierten Pathogenitätsfaktor Oxalsäure, der jedoch nicht in allen

*Sclerotinia* Isolaten als kausaler Aggressivitätsfaktor ermittelt werden konnte (Lumsden, 1979; Magro et al., 1988; Callahan & Rowe, 1991).

#### **1.4 Resistenzniveau der Kultursonnenblume gegenüber *Sclerotinia*-Befall und Resistenzscreening**

Die ausgesprochen perthotrophe Verhaltens- und Ernährungsform, das beachtliche Wirtspflanzenspektrum (Boland & Hall, 1994) sowie die Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren von *Sclerotinia sclerotiorum* implizieren eine extreme Anpassungsfähigkeit des Pilzes an seinen Wirt. Diese Eigenschaften haben bislang noch in keiner von diesem Pathogen befallenen Kulturpflanze zur Erschließung kompletter Resistenzen geführt (Steadman, 1979; Seiler, 1992; Masirevic & Gulya, 1992; Gulya et al., 1997; Subbarao, 1998). Auch in den kultivierten Sorten, Hybriden und Linien der Sonnenblume konnten bislang keine echten Resistenzen gegenüber den verschiedenen Infektionsformen von *Sclerotinia sclerotiorum* erschlossen werden. Unter ungünstigen klimatischen Bedingungen zur Infektion und Parasitisierung der Sonnenblume zeigen resistent und anfällig getestete Sorten und Linien zwar genotypische Unterschiede, die jedoch unter favorisierenden Witterungsbedingungen für den pilzlichen Parasitismus marginal ausfallen oder nicht mehr existent sind. Die CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitaines) klassifiziert 22% ihrer 114 vertriebenen F<sub>1</sub>-Hybriden als Genotypen mit Toleranzen gegenüber *Sclerotinia* ein, jedoch keinen einzigen als resistenten (Gulya et al., 1997).

Resistenzphänomene der Kultursonnenblume gegenüber *Sclerotinia* sowie deren Erbllichkeit sind komplex und die Resistenz von F<sub>1</sub>-Hybriden kann häufig nicht aus dem Resistenzverhalten der Parentallinien vorhergesagt werden (Pirvu et al., 1985). Resistenzen gegen *Sclerotinia* im Genpool der kultivierten Sonnenblume sind partieller Natur und polygen determiniert (Miller, 1987; Robert et al., 1987; Škoric, 1992; Mestries et al., 1998; Castaño et al., 2001), wobei additive Effekte dominieren (Vear & Tourvieille, 1988; Tourvieille & Vear, 1990; Grezes-Besset et al., 1994; Achbani et al., 1996). Dabei ist ein Teilaspekt dieser Polygenität auch in dem divergierenden Resistenzverhalten von unterschiedlichen Pflanzenorganen wie Wurzel, Blätter, Stängel, Blütenknospe und blühender Korb desselben getesteten Genotypen zu sehen (Robert et al., 1987; Thuault & Tourvieille, 1988; Castaño et al., 1993; Rashid & Dedio, 1994; Vear et al., 2000; Castaño et al., 2001). Infolgedessen werden die unterschiedlichen Befallssituationen von *Sclerotinia* zu den divergent reagierenden Pflanzenorganen der Sonnenblume in der phytopathologischen Literatur als eigenständige Krankheiten aufgefasst (Gulya et al., 1997). Adäquate Toleranzen in verschiedenen Pflanzenteilen gegenüber *Sclerotinia* Befall sind darüber hinaus äußerst selten in Ausgangspopulationen zu finden (Gulya et al., 1986; Škoric, 1988) und implizieren eine separate Evaluierung und züchterische Bearbeitung

jedes einzelnen Pflanzenteiles zur Erzeugung resistenter Genotypen in den unterschiedlichen von *Sclerotinia* befallenen Pflanzenteilen.

Zur Erschließung von *Sclerotinia* Resistenzen liegen zahlreiche Testverfahren vor und umfassen sowohl das frühe Screening im Keimlingsstadium (Huang & Dorrell, 1978; Tourvieille & Vear, 1990) als auch das adulter Pflanzen mit Hilfe artifizieller Myzelexplantate oder durch Ascosporenapplikationen. Korrelationen zum natürlichen Befall bzw. Befallsverlauf sowie zum tatsächlichen, unter natürlichen Bedingungen beobachteten Ertragsverlust, werden hierbei nicht immer erzielt und führen hierdurch nur bei einem Teil der Evaluierungen zu einem messbaren Selektionserfolg (Škoric & Rajčan, 1992). Im Allgemeinen besteht kein Zusammenhang zwischen den Resistenzen im juvenilen Keimlingsstadium und den unter natürlichen Bedingungen beobachteten Welke- und Fäulerresistenzen adulter Pflanzen (Huang & Dorrell, 1978; Tourvieille & Vear, 1990; Gulya et al., 1997). Zusätzlich erfasst jeder Test in Abhängigkeit vom Inokulat (Myzeltest bzw. Ascosporentest) und der verwendeten Technik (Anwendung an intakter Pflanze oder nach Verwundung der Pflanze) unterschiedliche Resistenzen bzw. Resistenzkomponenten des polygen determinierten Merkmals und bedingt das zeit- und arbeitsaufwendige multiple Screening von Genotypen mit Hilfe differenzierender Testverfahren (Marum et al., 1994; Castaño et al., 2001). Der Möglichkeit zum simultanen Screening von Genotypen sind jedoch infolge starker Wechselwirkungen zwischen den Testverfahren enge Grenzen gesetzt und konnten z.B. von Castaño et al. (1989) für die artifizielle Wurzel- und Kopfinfektion ermittelt werden. Die Suche nach *Sclerotinia* resistenten Varietäten über künstliche *Sclerotinia* - Testinokulationen ist darüber hinaus in allen Kulturpflanzen häufig durch das Fehlen früher und robuster phänotypischer Selektionskriterien erschwert und impliziert die Ermittlung mehrerer phänotypischer Resistenzmarker (Läsionslängen, Inkubationszeiten, Latenzzeiten, Infektionshäufigkeiten) mit anschließender Evaluierung des Besten (Degener et al., 1998; Wegulo et al., 1998). Zum Krankheitskomplex der Stängelfäule in *Helianthus annuus* konnten dabei zwischen der artifiziellen Stängelinokulation mit Myzelexplantaten hohe Korrelationen zum erwarteten Ertragsverlust (Bazzalo et al., 1991; Sala et al., 1994; Castaño et al., 1993) sowie mit einer künstlichen Myzelinokulation der Blattspitzen hohe Korrelationen zum natürlichen Krankheitsverlauf in der Kultursonnenblume (Castaño et al., 1992; Degener et al., 1998) ermittelt werden. Sie werden inzwischen in den meisten Züchtungsprogrammen zur Erschließung von Resistenzen gegenüber *Sclerotinia*-Stängelfäule in Linien und Sorten der Kultursonnenblume angewendet (Castaño et al., 1992, Castaño et al., 1993; Achbani et al., 1994; Degener et al., 1998, Köhler & Friedt, 1999).

### 1.5 Resistenzfaktoren der Gattung *Helianthus* gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*

Resistenzfaktoren gegenüber phytopathogenen Pilzen können sowohl konstitutiver als auch induzierter Natur sein und umfassen sowohl mechanisch-strukturelle als auch biochemische Komponenten, die in ihrer variablen Kombination die Gesamtheit von Resistenzphänomenen bewirken (Elstner et al., 1996; Schweizer & Metraux, 1996; Agrios, 1997). Die ausgesprochen partielle Natur der *Sclerotinia* Resistenz der Gattung *Helianthus* sowie jeder anderen von diesem Pilz parasitierten Kulturpflanze impliziert eine mehr oder weniger große Anzahl an Genen bzw. Genprodukten, die additiv zur Resistenz beitragen.

Morphologisch-strukturelle Resistenzfaktoren konnten dabei bislang selten in Abhängigkeit divergierender Resistenzniveaus ermittelt werden. So konnten Mitriou-Radulescu et al. (1981) keine anatomischen Unterschiede der Sprossachse zwischen stängelfäuleresistenten und anfälligen Hybriden ermitteln. Bazzalo et al. (1991) konnten dagegen schwache und inverse Abhängigkeiten des lignifizierten Xylemgewebes der basalen Sprossachse zum variierenden Resistenzniveau bei basaler Stängelfäule ermitteln.

Infolge der Absenz von Penetrationsbarrieren oder Inhibitoren gegenüber der primären Infektion von *Sclerotinia* in Pflanzenteilen annueller Kulturpopulationen der Gattung *Helianthus* konzentrieren sich die Resistenzermittlungen in der Regel auf die Ausbreitung des Myzels im bereits penetrierten pflanzlichen Gewebe. Hierbei zeigten biochemische Studien eine starke Abhängigkeit vom Phenolmetabolismus. Die Kultursonnenblume weist nach *Sclerotinia sclerotiorum* Infektion der Stängelbasis (Bazzalo et al., 1985; 1987 & 1991) der Stängelnodien, Blätter, Blattpetiolen, des Hypokotyls (Avila, 1984; Yang, 1986) und der Blütenkörbe (Prats-Pérez et al., 2000a) erhöhte Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen auf. Hierbei werden präformierte Phenolderivate vom Prohibitin und Inhibitin-Typus (Ingham, 1973) für die praktische Züchtungsarbeit der Sonnenblume als potentiell nutzbar erachtet. Von den phenolischen konstitutiven Inhaltsstoffen konnten bislang Derivate der Caffeoylchinasäure (5-*O*-Caffeoylchinasäure; Chlorogensäure) als resistenzbegleitende phenolische Hydroxyzimtsäure-Abkömmlinge detektiert werden. Diese sind vor Infektion in Spuren nachweisbar, werden jedoch postinfektionell stark akkumuliert. Insbesondere Isochlorogensäure (1,5-; 3,4-; 3,5- sowie 4,5-*O*-Dicaffeoylchinasäure) weisen hierbei *in vitro* fungistatische Effekte gegenüber *Sclerotinia* ssp. auf (Bazzalo et al., 1985) und konnten als biochemisch - phänotypische Marker zur *Sclerotinia* Toleranz in Sprossachsen von Inzuchtlinien ermittelt werden (Bazzalo et al., 1985). Caffeoylchinasäuren konnten jedoch in der angewandten Züchtungsforschung bislang weder im annuellen noch im perennierenden *Helianthus* Genpool als robuste Marker zur *Sclerotinia* Myzelausbreitung in Blättern verifiziert werden (Tourvieille et al., 1997). Freilanduntersuchungen von Castaño et al. (1992) und Hemery-Tardin et al. (1998) an Phenolfingerprints von *Helianthus* Inzuchtpopulationen und deren Nachkommen zeigen

indes, dass präformierte Blattphenolgehalte eine starke Korrelation zur Myzelausbreitung und zur Läsionslänge aufweisen. Präformierte Phenolgehalte werden in beiden Arbeiten als putative und kostengünstig zu evaluierende Marker der *Sclerotinia*-Blattresistenz in *Helianthus* vorgeschlagen. Konstitutive Blattphenole werden darüber hinaus auch innerhalb der perennierenden Wildarten als präinfektionelle Resistenzfaktoren diskutiert (Mondolot-Cosson & Andary, 1994; Andary et al., 1996; Mondolot-Cosson et al., 1997).

Akkumulationen von Phenolen des Phytoalexintypus konnten bislang nach *Sclerotinia* Infektion nicht detektiert werden und sind im Wirt-Pathogensystem *Helianthus-Sclerotinia* als praktikable Resistenzmarker bzw. Faktoren bisweilen nicht erschlossen worden. Urdangarin et al. (1999) konnten jedoch eine starke, das Myzelwachstum von *Sclerotinia* hemmende, *in vitro* Aktivität des 7-hydroxylierten Cumarins Scopoletin und insbesondere dessen Lacton Ayapin nachweisen. Beide Cumarine werden als Stress - Phytoalexine der Gattung *Helianthus* bei biotischen (Tal & Robeson, 1986a; Tal & Robeson, 1986b; Spring et al., 1991; Olsen & Roseland, 1991; Benz, 1995; Serghini et al., 2001) und abiotischen Reizen (Koeppel et al., 1969; Gutiérrez et al., 1995; Gutiérrez-Mellado et al., 1996; Cabello-Hurtado et al., 1998) induziert. Sie wurden dagegen bislang nicht bei *Sclerotinia* Inokulationen nachgewiesen. Ihnen wird jedoch aufgrund ihres allgemein defensiven Potentials gegenüber einem großen Spektrum an mikrobiellen Schadorganismen sowie ihrer ubiquitären Induzierbarkeit in *Helianthus ssp.* eine Bedeutung als Zielmoleküle der klassischen als auch biotechnologisch orientierten Sonnenblumenzüchtung zur Erzeugung pathogenresistenter Linien und Sorten beigemessen (Prats-Pérez et al.; 2000b).

Die Beteiligung induzierter phenolischer Inhaltsstoffe an der *Sclerotinia*-Resistenzreaktion der Stängel impliziert hierbei die Gegenwart stress- bzw. pathogensensitiver Induktionsmechanismen des initialen Phenolstoffwechsels (Prats-Pérez et al.; 2000b). Dieser wurde jedoch bislang aufgrund der geringen Variation in der *Sclerotinia*-Resistenz annueller Zuchtpopulationen weder biochemisch noch molekularbiologisch näher charakterisiert.

## **1.6 Pflanzliche Pathogenerkennung als wesentliche Voraussetzung induzierter Abwehrmechanismen**

Die phytopathologische Literatur bedient sich zum Verständnis der Pflanze – Pathogen – Interaktionen in Abhängigkeit der verschiedenen Ebenen pflanzlicher Resistenzphänomene unterschiedlicher Arbeitshypothesen (Kombrink & Somssich, 1995; Prell, 1996; Ebel & Mithöfer, 1998; Hutcheson, 1998; Somssich & Hahlbrock, 1998; Scheel, 1999; Prell & Day, 2001). Unter natürlichen Bedingungen können Pflanzen von der überwältigenden Mehrzahl der phytopathogenen Pilze nicht parasitiert werden, da sie für diese keinen Wirt repräsentieren. Dieses Resistenzphänomen wird als Nichtwirtresistenz, Basisresistenz bzw. Basisinkompatibilität bezeichnet, ist genetisch komplex determiniert, häufig unspezifisch und stellt die erste Ebene der pflanzlichen Abwehr dar. Diese Nicht – Wirts Beziehungen

zeichnen sich durch eine dauerhafte, völlige Resistenz gegen den entsprechenden Nicht – Pathogen aus, werden polygen determiniert und sind auf dem Niveau von Spezies (Kulturpflanzenart – Pathogenart) definiert (Heath, 1985; Ride, 1985). Dem seltenen Fall eines pilzlichen Parasitismus liegt demgegenüber eine Basiskompatibilität des pflanzlichen Organismus zugrunde und wird vom Pathogen durch speziell ausgerichtete Pathogenitätsfaktoren zur Überwindung der Basisresistenz ermöglicht (Shaner et al., 1992). Die Pflanze ist dann potentieller Wirt des Pathogens und die Pathogen – Pflanze - Interaktion wird als kompatibel umschrieben. Trotz bestehender Basiskompatibilität können Pflanzen im Zuge ihrer Phylogenese als auch durch züchterische Bearbeitung eine zweite Ebene meist induzierter Abwehrstrategien beinhalten, die eine erfolgreiche Besiedlung des Pathogens verhindern und als Wirtsresistenz benannt wird. Diese Interaktionen werden als inkompatibel bezeichnet, sind durch hohe Spezifität charakterisiert und zeichnen sich im Vergleich zur Basisresistenz durch einfachere genetische Konstitutionen mit häufig mono- bzw. oligogenen Erbgängen aus (Agrios, 1997; Prell, 1996; Prell & Day, 2001). Diese auf der zweiten Ebene der pflanzlichen Abwehr beruhenden Inkompatibilitäten sind in der Regel auf dem taxonomischen Niveau von Rassen (Kulturpflanzensorten – *forma specialis* des Pathogens) definiert. Die Wirtsresistenz einer Pflanze gegenüber bestimmten *forma specialis* eines Pathogens lässt sich hierbei über die Gen – für – Gen Hypothese erklären, in dem für jedes pflanzliche Resistenzgen ein komplementäres Avirulenzgen des Pathogens existiert (Flor, 1942; Flor, 1956; de Wit 1992; Bent, 1996). Zusätzlich handelt es sich häufig um genetisch kommunizierende Systeme, die coevolutiven Selektionsmechanismen unterliegen (Burdon & Thrall, 1999; Takken & Joosten, 2000; Richter & Ronald, 2000). Als induzierte Abwehrmechanismen können hierbei zwei physiologisch-biochemische Strategien angetroffen werden: a) die so genannte hypersensitive Reaktion (HR), die aus dem hypersensitiven Zelltod der unmittelbar vom Pilz penetrierten Zellen resultiert und hierdurch dem Pathogen die Nahrungsgrundlage entzieht (Goodman & Novacky, 1994; Naton et al., 1996; Greenberg, 1997) sowie b) die vom Pathogen betroffenen Zellen bzw. Gewebe überleben die Infektion und bewirken den Aufbau neuer Abwehrmechanismen gegen das Pathogen und wird mit *non - hypersensitive resistance* bzw. *histologischer Resistenz* bezeichnet (Prell, 1996; Prell & Day, 2001; Agrios, 1997).

Induzierte Abwehrmechanismen implizieren zunächst die Erkennung des Pathogens durch die Pflanze (Keen, 1990; Boller, 1995), welches aus theoretischen Überlegungen durch das biochemische Signal (Ligand; Elicitor) – Rezeptor – Modell erklärt wird und die Perzeption des Pathogensignals durch den Rezeptor beinhaltet (Dixon & Lamb, 1990; Gabriel & Rolfe, 1990; Yang et al., 1997). Im idealisierten Fall werden hierbei die Signale jeweils durch das Avirulenzgen des Pathogens, die Rezeptoren durch das Resistenzgen der Pflanze codiert (de Wit, 1995; Jones et al., 1994; Parker et al., 1997). Für kein

Resistenzgenprodukt konnte allerdings bisher die postulierte Funktion als pflanzlicher membranständiger Elicitorrezeptor für Avirulenz-Proteine von Pilzen als Liganden nachgewiesen werden, obwohl strukturelle Merkmale, wie Transmembrandomänen und leuzinreiche Protein/Protein-Interaktionsdomänen (LRR), prinzipiell darauf hinweisen (Mindrinos et al., 1994; de Wit, 1995; Meyers et al., 1999; Ellis et al., 2000).

Die bislang dargestellten theoretischen Zusammenhänge wurden durch zahlreiche Interaktionen von Pflanzen mit biotrophen oder zumindest temporär biotrophen Pathogenen entwickelt. In Folge dessen entziehen sich die Arbeitshypothesen der pflanzlichen Resistenz der Interaktion mit perthotrophen Phytopathogenen wie *Sclerotinia sclerotiorum* oder des taxonomisch nahe verwandten opportunistischen Parasiten *Botrytis cinera* (Grauschimmel). Ihr überaus breiter Wirtspflanzenkreis über zahlreiche Pflanzenfamilien hinweg lassen die Unterscheidung in Basisresistenz und wirtsspezifische Resistenz marginal erscheinen. Für die Überwindung der pflanzlichen Basisresistenz besteht bei diesen Pathogenen eine äußerst geringe Spezifität (Prell, 1996). Eine Vielzahl von Studien der vergangenen Jahre hat dagegen gezeigt, dass die Pathogenerkennung als auch die induzierten Abwehrmechanismen der Wirts- und Nichtwirtsresistenz ähnlich, in vielen Fällen wahrscheinlich sogar identisch sind (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Ebel & Scheel, 1997; Heath, 2000; Vleeshouwers et al., 2000). Die Erkennung der phytopathogenen Pilze über exogene und/oder endogene Elicitoren bildet hierbei das initiale Ereignis einer Signaltransduktionskette. Sehr frühe messbare Reaktionen der Signaltransduktion sind hierbei die Änderung von Membranpotentialen durch Öffnung spezifischer  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Cl^-$  sowie  $Ca^{2+}$  Ionenkanäle und dem nachfolgenden cytoplasmatischen Anstieg der  $Ca^{2+}$  Konzentration (Schwacke & Hager, 1992; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Able et al., 2001). Zusätzlich wird häufig parallel die Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (AOS) wie  $\bullet O_2^-$ ,  $H_2O_2$  und  $\bullet OH$  beobachtet (Bolwell et al., 2002), die im so genannten oxidativen Burst zusammengefasst werden und durch Aktivierung membrangebundener NADPH-Oxidasen generiert werden (Dangl et al., 1996; Low & Merida, 1996; Lamb & Dixon, 1997; Vranova et al., 2002). Durch die Weiterleitung des primären cytoplasmatischen Signals über Phospholipasen, Phosphatasen sowie Proteinkinasen (Yang et al., 1997) werden final diverse Transkriptionsfaktoren aktiviert sowie zahlreiche *pathogenesis related* (PR) Proteine mit teilweise antimikrobiellen bzw. fungistatischen Eigenschaften wie Chitinasen,  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Proteinasen, Thionine sowie Peroxidasen *de novo* exprimiert (Kombrink & Sossmich, 1995; Yun et al., 1997). In diesem Kontext wird auch die *de novo* Synthese von Phytoalexinen bzw. niedermolekularen Metaboliten des sekundären Stoffwechsels über die Aktivierung von dessen Schlüsselenzymen in befallenen und / oder angrenzenden Geweben induziert (Darvill & Albersheim, 1984; Harborne, 1999). Die Neusynthese von niedermolekularen sekundären Metaboliten kann sowohl begleitend zur HR-Reaktion als auch zur histologischen Resistenzreaktion erfolgen und als ein Teilaspekt

der pflanzlichen Abwehr den pilzlichen Parasitismus begrenzen bzw. inhibieren (Anderson, 1991; Oku & Shiraishi, 1994; Osbourn, 1996; Greyer & Kokubun, 2001).

### 1.7 Pathogensensitiver Phenolmetabolismus

Pflanzen, deren pathogeninduzierte Abwehrmechanismen auf der Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe beruhen, zeigen meist eine vorausgehende pathogen sensitive Induktion einiger Schlüsselenzyme des initialen Phenolstoffwechsels. Die über die zahlreichen induktiven Mechanismen vermittelte Resistenz bleibt allerdings nur dann wirksam, wenn sie rechtzeitig, effizient und sensitiv aktiviert werden.

Als primäre Induktionssignale konnten hierbei zahlreiche Elicitoren aus der Interaktion Pflanze – Pilz nachgewiesen werden, deren Erkennung im Wesentlichen an der Zelloberfläche erfolgt (Hahlbrock & Scheel, 1987; Nürnberger et al., 1995; Hammond-Kosack & Jones, 1996). Während als endogene Elicitoren die aus der pflanzlichen Zellwand durch lytische Enzyme des Pathogens herausgelösten Poly- und Oligosaccharide bekannt sind (Ryan & Farmer, 1991), kommen exogene Elicitoren in größerer struktureller Vielfalt vor. Deren Herkunft stammt meist vom Pathogen selbst. Sie repräsentieren neben Oligosacchariden (Sharp et al., 1984) auch Glykoproteine (Parker et al., 1991), Proteine (Sholtens-Toma & de Wit, 1988) und Fettsäuren (Bostock et al., 1982). Als pathogensensitives System in zahlreichen inkompatiblen Interaktionen ist dabei die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) Enzymaktivität erhöht, deren resistenzvermittelnder Einfluss darüber hinaus in zahlreichen Inhibitorstudien gezeigt werden konnte (Fritzemeyer et al., 1987; Hahlbrock & Scheel, 1989; Freytag & Hahlbrock, 1992; Bate et al., 1994; Dixon & Paiva, 1995; Oßwald, 1995; Elstner et al., 1996; Mayr et al., 1997). Als initiales Schlüsselenzym des sekundären Phenylpropanoidstoffwechsels stellt die PAL durch Desaminierung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure eine essentielle Vorstufe für den nachfolgenden Lignin-, Suberin-, Flavonoid-, Cumarin- sowie Hydroxyzimtsäurestoffwechsel bereit, deren Bedeutung zur induzierten Resistenz in zahlreichen Untersuchungen von Wirts – Pathogen Beziehungen belegt ist (Kuc & Rush, 1985; Blount et al., 1993; Barz, 1997; Barber et al., 2000). Ihre durch Stressfaktoren induzierte Aktivitätssteigerung stellt einen starken metabolischen *sink* für den Kohlenhydrat und N-Stoffwechsel dar. Dieser wird über die Bereitstellung der Assimilate des vorgelagerten Shikimatstoffwechsels, der Glykolyse und des Pentosephosphatstoffwechsels (Davin & Lewis, 1992; Dixon et al., 1992; Herrmann, 1995; Batz et al., 1998) bewirkt.

Neben dem aktivierten Phenolstoffwechsel sind häufig dazu parallel in zahlreichen Resistenzreaktionen begleitend erhöhte Peroxidase (POX)-Aktivitäten identifiziert worden, die neben der PAL als generelle Resistenzmarker erachtet werden (Hammerschmidt et al., 1982; Stermer & Hammerschmidt, 1984; Srivastava, 1987; Reuveni et al., 1990; Lorenzini et al., 1994; Casal et al., 1994; Reuvueni, 1995). Der Beitrag pflanzlicher Peroxidasen zum

Resistenzphänomen umfasst dabei eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen wie der verstärkten Lignifizierung der Zellwände (Kombrink & Somssich, 1995), der Bildung fungitoxisch - radikalischer Melanine in nekrotischen Reaktionen (Elstner, 1990; Oßwald, 1995; Elstner, 1996), induzierter Suberineinlagerungen in Zellwände (Bolwell et al., 1997; Bernards & Lewis, 1998), sowie der Zellwandfestigung über die Polymerisierung hydroxyprolinreicher Glykoproteine (Bradley et al., 1992; Iiyama et al., 1994, Oßwald, 1995; Warneck et al., 1997; Jackson et al., 2001). Darüber hinaus scheinen Peroxidasen in einigen Pflanzenfamilien eine modifizierende Funktion in der Phytoalexinsynthese zu besitzen (Kobayashi et al., 1994).

### **1.8 Der natürliche *Helianthus* Genpool – Quelle für Diversität und Pathogen-Resistenzen**

Der natürliche *Helianthus* Genpool Nord- und Mittelamerikas stellt die genetische Basis der Kultusonnenblume dar. Er beinhaltet mit 49 Arten, 19 Subspezies mit 12 annuellen und 37 perennierenden Arten einen der größten Formenkreise und Variabilitäten bei Kulturpflanzen (Seiler 1992; Škoric, 1993; Seiler & Rieseberg, 1997). Nach Anascenko (1982) lassen sich drei spezifische Basisgenome mit der Chromosomengrundzahl  $n = 17$  unterscheiden, die durch RAPD-Analysen perennierender und annueller Wildarten weitestgehend bestätigt werden konnten (Sivolap & Solodenko, 1998; Sossey-Alaoui et al., 1998). Hierbei hat das spezifische Genom A sein Genzentrum in den südlichen Appalachen und ist charakteristisch für die meisten perennierenden *Helianthus*-Arten. Das spezifische Genom B besitzt sein Genzentrum in den Rocky Mountains und ist durch die annuellen Wildarten charakterisiert, während das spezifische Genom C ebenfalls aus den Rocky Mountains stammt und durch die westamerikanischen perennierenden Arten *H. ciliares* und *H. pumulis* repräsentiert wird.

Die phylogenetischen und taxonomischen Verhältnisse in der Gattung *Helianthus* sind komplex und nicht vollständig geklärt (Schilling & Heiser, 1981; Schilling et al., 1998). Die Gattung enthält 11 polyploide und drei diploide Hybrid-Spezies (Heiser et al., 1969; Rieseberg, 1991). Insbesondere die interspezifischen Verhältnisse der diploiden Spezies liefern in ihren plastidären und Kern DNA-Analysen eine inkongruente Kladistik und stehen darüber hinaus nicht mit den morphologisch erhobenen Daten im Einklang (Schilling & Heiser, 1981; Rieseberg, 1991; Schilling, 1997; Schilling et al., 1998). Interspezifische Hybridisierung (Rieseberg et al., 1990; Rieseberg et al., 1999) und Polyploidie sollen nach Sossey-Alaoui et al. (1998) und Wolf et al. (1999) eine Anpassung an extreme Standortverhältnisse der Great Plains wie Trockenheit, Kälte und Salzstress sein. Der annuelle Genpool hat sich innerhalb der Gattung nach molekularen

Untersuchungen der cpDNA in den letzten 1 Mio. Jahre (Rieseberg et al., 1991) mit nachfolgender rascher Evolution und Diversifizierung entwickelt (Ungerer et al., 1998).

Der annuelle und insbesondere perennierende *Helianthus* Genpool beinhaltet Spezies, die sich an die diversesten Standorte angepasst haben. Sie besitzen eine beachtliche Variabilität hinsichtlich der meisten agronomisch bedeutenden Merkmale wie der Schädlings- und Krankheitsresistenzen, der Salz- und Kältetoleranz als auch in der Fettsäurequantität und Qualität ihrer Achänen (Chandler & Jan, 1984; Rogers, 1992; Seiler, 1992; Miller, 1993; Seiler, 1994; Brewer & Charlet, 1995; Seiler & Rieseberg, 1997; Seiler, 1998; Fernández-Martínez et al., 2000; Seiler, 2001).

Hinsichtlich der Pathogenresistenzen konnten in annualen und perennierenden Spezies Resistenzen gegen den Sonnenblumenrost *Puccinia helianthi* (Quersh et al., 1993), den falschen Mehltau *Plasmopara halstedii* (Seiler, 1991a; Seiler, 1991b; Tan et al., 1992), die Verticillium Welke - *Verticillium dahliae* (Hoes et al., 1973), die Alternaria Blattfleckenkrankheit - *Alternaria helianthi* (Morris et al., 1983; Block, 1992), den echten Mehltau - *Erysiphe cichoracearum* (Jan & Chandler, 1985), die Phomopsis Stängelfäule - *Phomopsis helianthi* (Škoric, 1985; Dozet, 1990) sowie gegen den Krankheitskomplex der Sclerotinia - Fäule - *Sclerotinia sclerotiorum* (Škoric, 1987) evaluiert werden. Die erfolgreiche Übertragung der erschlossenen potentiellen Resistenzgene oder Resistenzeigenschaften waren hierbei jedoch auf mono- bzw. oligogen determinierte Resistenzen der mit der annualen Kulturform kreuzbaren jährigen Formen beschränkt. Polygen determinierte Resistenzen, wie sie für *Sclerotinia sclerotiorum* in der Gattung *Helianthus* vorliegen (Seiler, 1992; Degener et al., 1998; Castaño et al., 2001), entzogen sich bisher ebenso einem erfolgreichen Transfer wie die Introgression von Resistenzkomponenten der in der praktischen Züchtungsarbeit bislang kaum beachteten perennierenden Wildarten. Darüber hinaus zeigen die Daten zur Erschließung und Charakterisierung von *Sclerotinia* Resistenzen der Wildarten variierende Ergebnisse innerhalb der gleichen Art (Škoric, 1987; Serieys, 1987; Thompson et al., 1978) und sind im Wesentlichen auf die diversen Testpopulationen bzw. Ökotypen annualer als auch perennierender Wildarten sowie auf die unterschiedlichen Testverfahren zur Resistenzermittlung zurückzuführen.

Die einzelnen Arten des annualen und insbesondere des perennierenden Genpools weisen eine ausgesprochen große Variabilität und Plastizität hinsichtlich zahlreicher morphologischer und physiologischer Eigenschaften auf und sind die Konsequenz starker Genotyp-Umwelt Interaktionen (Miljanović et al., 2000). Natürliche und anthropogen bedingte Habitat Fragmentierung (Seiler & Rieseberg, 1997; Foré & Guttman, 1999; Natel & Gagnon, 1999) sowie die nachfolgende Ausbildung von Ökotypen (Welch & Rieseberg, 2002) führt zu morphologisch und physiologisch stark differierenden Merkmalsausprägungen innerhalb einer Art, die sich in Form geographisch abgegrenzter Akzessionspopulationen niederschlägt.

Die potentielle Bedeutung wilder *Helianthus* Arten zur Verbreiterung der genetischen Basis und zur Integration neuer Resistenzen in die Kulturform wurde schon früh erkannt (Pustovit et al., 1976) und führte zur systematischen und explorativen Sammlung zahlreicher Arten (Seiler & Cuk, 1981; Seiler et al., 1981; Seiler et al., 1990; Seiler et al., 1992). Diese sind in der USDA-ARS Wildart Kollektion (North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, USA) zusammengefasst und beinhalten inzwischen über 2000 Akzessionen von denen 70% annuelle und 30% perennierende Formen repräsentieren (Seiler & Rieseberg, 1997).

Daten zur Erschließung des sekundären perennierenden Genpools im Hinblick auf dessen *Sclerotinia* Resistenzpotential sind dagegen rar und aufgrund der variierenden Testbedingungen, Umwelten sowie Inokulationstechniken nur selten für intra- und interspezifische Vergleiche geeignet (Gulya et al., 1997). Des Weiteren fehlen mehrjährige Resistenzevaluierungen im Freiland unter mitteleuropäischen Klimabedingungen vollkommen. Sie sind jedoch unter Berücksichtigung des ausgesprochen perthotropen sowie umweltabhängigen Verhaltens von *Sclerotinia sclerotiorum* (Kurnik et al., 1978) unbedingte Voraussetzung zur Ermittlung robusten Datenmaterials zur Erschließung und Selektion resistenter Genotypen für interspezifische Züchtungsansätze. Als ein Teilziel dieser Arbeit sollten deshalb in mehrjährigen Freiland-Versuchen perennierende *Helianthus*-Wildarten mittels künstlicher Infektionen auf ihre Resistenzen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* untersucht werden. Hierdurch sollten die wesentlichen Grundlagen zur Evaluierung von normierten und vergleichbaren Testverfahren zum *Sclerotinia* Resistenzscreening innerhalb eines großen Teils des sekundären *Helianthus* Genpools geschaffen werden.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll im Wesentlichen das *Sclerotinia* – Resistenzpotential ermitteln sowie strukturelle als auch biochemische Resistenzkomponenten des bislang zur *Sclerotinia* Resistenzzüchtung nicht berücksichtigten sekundären *Helianthus*-Genpools erfassen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht dabei der Krankheitskomplex der *Sclerotinia* Stängelfäule, die neben der Kopffäule in gemäßigten Breiten prävalent ist und hohe Ertragseinbußen im Anbau der Kultursonnenblumen bedingt. Vergleichende Daten zum Feldresistenzniveau diverser perennierender Wildarten liegen bisweilen ebenso nicht vor wie die ihr zugrunde liegenden Resistenzkomponenten und Faktoren. Darüber hinaus sind für den sekundären Genpool in *Helianthus* essentielle Informationen zu konstitutiven und induzierten strukturellen sowie biochemischen Resistenzcharakteristika der Interaktion mit *Sclerotinia sclerotiorum* nicht vorhanden. Sie können jedoch als Indikator für die am Resistenzphänomen potentiell beteiligten Gene bzw. Mechanismen dienen. Die Kenntnis

von genotypischen Verteilungsparametern der Resistenzreaktionen sowie der strukturell-morphologischen und resistenzbegleitender biochemischen Eigenschaften sind hierbei die wesentliche Grundlage für die gezielte Selektion geeigneter Kandidaten zum Transfer neuer Resistenzeigenschaften in die Kultursonnenblume.

Als grundlegende Voraussetzung der weitergehenden morphologisch-histologischen und biochemischen Charakterisierung der genotypischen Resistenzphänomene sollte hierbei das spezifische Resistenzniveau perennierender Wildarten in mehrjährigen Freilandversuchen untersucht werden. Da die Ätiologie der Stängelfäule die Beteiligung des Blattes als auch des Stängels am gesamten Krankheitskomplex beinhaltet, sollten zunächst die genotypisch distinkten Blatt- und Stängelresistenzniveaus mit Hilfe üblicher Testverfahren der aktuellen Resistenzzüchtung in *Helianthus annuus* ermittelt werden. Durch die Erhebung der für die Pathogenese der *Sclerotinia*-Stängelfäule wesentlichen phänotypischen Charakteristika sollte eine robuste Datengrundlage geschaffen werden, die zur Ermittlung geeigneter phänotypischer Selektionskriterien der *Sclerotinia*-Resistenz innerhalb des sekundären Genpools beiträgt.

In den weitergehenden biochemischen und histologischen Untersuchungen sollten potentielle morphologische und physiologische Resistenzfaktoren der *Sclerotinia* Resistenz evaluiert werden. Der in der Literatur postulierte divergente Beitrag induzierter bzw. präformierter phenolischer Inhaltsstoffe am *Sclerotinia*-Resistenzniveau der Blätter und Sprossachsen sollte in separaten Untersuchungen evaluiert werden:

Hierbei wurden zur *Sclerotinia* Blattresistenz vergleichende Untersuchungen zum Spektrum präformierter Blattphenole sowie deren potentieller Wirkungszusammenhang zum *Sclerotinia* - Blattresistenzniveau der perennierenden Wildarten durchgeführt. Zur *Sclerotinia* Resistenz der Sprossachsen hingegen sollten als dem ertragsbeinhaltenden Pflanzenorgan mikroskopisch- histologische Untersuchungen prä- als auch postinfektioneller Resistenzfaktoren evaluiert werden. Darüber hinaus sollte insbesondere die spezifische – durch *Sclerotinia* Inokulation vermittelte - Induzierbarkeit des Phenolstoffwechsels sowie der daran beteiligten PAL-Aktivität und der Peroxidaseaktivität untersucht und deren Verwendbarkeit als Markerenzyme zur Stängel-Resistenzreaktion innerhalb des sekundären *Helianthus* Genpools ermittelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial, Herkünfte, Aufzucht und Pflegemaßnahmen

Die untersuchten *Helianthus*-Akzessionen wurden aus der ständigen *in vivo* Kollektion von perennierenden *Helianthus*-Wildarten des Instituts für Landwirtschaftliche Botanik, Bonn entnommen. Bei den im Screening durchgeführten Wiederholungen der einzelnen Wildarten (Prüfglieder) wurden ausschließlich Populationsakzessionen von natürlichen Standorten in Nord-Amerika verwendet. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Genotypen (Akzessionen) sowie deren Originalherkünfte gibt Tabelle 2.

Die Auswahl der *Helianthus* Arten zu allen *Sclerotinia*-Resistenzscreenings erfolgte ohne Vorinformationen über deren Toleranz- bzw. Resistenzverhalten gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*. Alle Untersuchungen zur Feldresistenz wurden auf den Versuchsflächen des Instituts für Landwirtschaftliche Botanik in Bonn-Poppelsdorf durchgeführt. Der Standort ist durch eine tiefgründige, typische Parabraunerde der Köln-Aachener Bucht charakterisiert.

Um der langjährigen Selbstunverträglichkeit einiger Akzessionen entgegenzuwirken, wurde im Jahr 1998 eine neue, komplett randomisierte Versuchsfläche angelegt (Nelson & Hartman, 1987).

Der Pflanzabstand zwischen den Prüfgliedern innerhalb der Pflanzreihe betrug 40cm, als Reihenabstand wurde 120cm gewählt. Auf den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln wurde mit Rücksicht auf die nicht kalkulierbaren Wechselwirkungen sowohl mit den *Helianthus*-Wildarten als auch auf die Pathogenität von *Sclerotinia sclerotiorum* (Casale & Hart, 1986; Radke & Grau, 1986; Leela & Ganeshan, 1993) vollständig verzichtet. Eine Beikrautregulierung erfolgte 2x jährlich zu Beginn der Vegetationsphase (Anfang April) und während der Hauptwachstumsphase (Anfang Juli) durch maschinelles Mulchen. Als Düngegaben wurden 2x jährlich zu den Mulchterminen insgesamt 3,4kg/100m<sup>2</sup> Nitrophoska® spezial Blau-Dünger (Typ: 12+12+17+2+6, Fa. COMPO GmbH D-48008 Münster) entsprechend 40kg N/ha, 40kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha und 60kg K<sub>2</sub>O/ha appliziert.

Zu dichten Pflanzenbeständen bedingt durch starken Rhizomaustrieb der Populationen von *H. pauciflorus* ssp. und *H. tuberosus* wurde durch Teilung der Rhizome während der winterlichen Dormanz entgegengewirkt. Anfang November, zum Ende der Vegetationszeit, wurden alle oberirdischen *Helianthus*-Pflanzenrückstände abgeschnitten und zur Vermeidung von Infektionsbrücken von der Versuchsfläche entfernt.

**Tabelle 2:** Herkünfte der untersuchten *Helianthus* Spezies

Spezies	Herkunft
<i>Helianthus atrorubens</i> L. [purple disk sunflower]	North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, USDA-ARS; Ames, IA 50011-1170, USA
<i>Helianthus maximiliani</i> Schrad. [Maximilian's sunflower] Akzessionen: AC M	Jardim Botânico da Faculdade de Ciência da Universidade Lisbon P-1250 Lisbon
AC 1, AC 3, AC 4, AC 5, AC 7	North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University ;USDA-ARS; Ames, IA 50011-1170, USA
<i>Helianthus decapetalus</i> L. [forest-, pale-, thin-leaved sunflower]	Orto Botanico dell'Università di Palermo, I- 90128 Palermo.
<i>Helianthus divaricatus</i> L. [woodland sunflower]	Botanischer Garten, St. Gallen CH-9016 St. Gallen
<i>Helianthus giganteus</i> L. [giant sunflower]	Botanischer Garten der Universität Mainz, D-55099 Mainz
<i>Helianthus grosseserratus</i> Martens [saw-tooth sunflower]	Botanischer Garten der Universität Göttingen, D-37073 Göttingen
<i>Helianthus ×laetiflorus</i> Pers. [cheerful sunflower, mountain sunflower]	Botanischer Garten der Universität Bonn, D-53115 Bonn.
<i>Helianthus microcephalus</i> Torr. & Gray [small woodland sunflower]	Botanischer Garten St. Gallen, CH-9016 St. Gallen.
<i>Helianthus nuttallii</i> Torr. & Gray [Nuttall's sunflower]	Botanischer Garten der Universität Bonn, D-53115 Bonn.
<i>Helianthus pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>subrhomboideus</i> (Rydb.) O. Spring & E. Schilling [stiff sunflower] Akzessionen: R 1, R 2	Botanischer Garten der Universität Bonn, D-53115 Bonn.
<i>Helianthus pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>pauciflorus</i> [stiff sunflower, few-leaved sunflower, prairie-sunflower] Akzessionen: P 1, P 1745, P 1747	North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, USDA-ARS; IA 50011-1170, USA.
<i>Helianthus salicifolius</i> A. Dietr. [willow leaf sunflower]	North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, USDA-ARS; IA 50011-1170, USA.
<i>Helianthus strumosus</i> L. [pale leaf woodland sunflower, rough-leaved sunflower]	Orto Botanico dell'Università di Palermo, I- 90128 Palermo.
<i>Helianthus tuberosus</i> L. [Jerusalem-artichoke, Topinambur]	North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, USDA-ARS; IA 50011-1170, USA.
<i>Helianthus annuus</i> L. [common sunflower] Restorer-Inzuchtlinien: SWS-R1	Südwestdeutsche Saatzucht Dr. Rolf Spaeth, D- 76437 Rastatt
SEM-R1	Semundo Saatzucht GmbH Teendorf, D- 29582 Hanstedt

## 2.2 Herkunft, Isolation und Aufzucht des *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates

Das in dieser Arbeit verwendete *Sclerotinia sclerotiorum* Isolat wurde in einem natürlich infizierten Sonnenblumen-Feldbestand bei Sindelfingen (Baden-Württemberg) im Herbst 1997 gesammelt. Das Isolat zeichnete sich im Vergleich zu anderen evaluierten *Sclerotinia*-Linien durch ein besonders starkes Myzelwachstum und große Sklerotien (> 0,8cm) aus. Des Weiteren wies es in Vorversuchen mit *Helianthus annuus* (cv. Albena, KWS Saat AG, D-37555 Einbeck) eine besonders hohe Pathogenität auf.

Die Sklerotien wurden zunächst einer Oberflächensterilisation in Anlehnung an Arbeiten von Grezes-Besset et al. (1994) unterworfen. Hierbei wurden die Sklerotien zunächst 5min in 1% Ca(OCl)<sub>2</sub>-Lösung gerührt, anschließend einige Sekunden in 70% Ethanol getaucht und schließlich zwei Mal mit sterilem Aq. dest. gewaschen. Die auf sterilisiertem Filterpapier getrockneten Sklerotien wurden anschließend auf 1,5% ungeklärtem V-8-Agar, pH 6.5 (Miller, 1955) mit 20Vol% Campbell's V-8 Vegetable Juice (Campbell Soup Company, Camden, NJ, USA) in Petrischalen bei 20°C im Dunkeln kultiviert. Nach 3 Tagen war die gesamte Agaroberfläche mit weißem und dichtem Myzel überwachsen. Nach vier Tagen zeigten sich am Rand der Petrischale erste Myzel-Agglomerationen die nach 5 Tagen zur Bildung der für *Sclerotinia ssp.* charakteristischen Sklerotien führte.

Um die Vitalität und Pathogenität des Isolates zu erhalten, wurde im Abstand von vier Wochen eine Wirtspassage auf Blättern und Stängeln von *Helianthus annuus* (cv. Albena) durchgeführt. Das daraus erhaltene Myzel wurde dann als primäres Inokulum für die Resistenztests verwendet. Dazu wurden *Helianthus annuus* (cv. Albena) Stängel- und Blattgewebe nach Oberflächensterilisation mit 70 Vol. % Ethanol in ca. 0,5 cm dicke Stücke geschnitten und in eine Petrischale (Ø 20cm) auf eine 1 cm große, runde Scheibe V8-Agar mit *Sclerotinia sclerotiorum* Myzel gelegt. Nach einer Wachstumsphase von vier bis fünf Tagen bei 20°C im Dunkeln hatte das Myzel die gesamte Biomasse durchwachsen und wurde zur Herstellung der Reinkultur auf V-8 Agar übertragen. Für alle artifiziellen Inokulations-Versuche wurden vier Tage alte Myzel-Kulturen des *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates verwendet.

## 2.3 Evaluierung des Resistenzverhaltens perennierender *Helianthus*-Wildarten gegenüber artifizieller *Sclerotinia sclerotiorum* Blatt- und Stängelinfektion

Grundlage jeder züchterischen Aktivität in der Pflanzenproduktion die eine verbesserte Pathogen-Resistenz zum Ziel hat, ist das Screening, die Identifizierung und Charakterisierung neuer resistenter bzw. toleranter Genotypen. Resistenzquellen können hierbei sowohl bereits beschriebene Sorten der Kulturpflanzen als auch neue Resistenzmechanismen aus dem der Kultursorten nahe verwandten Wildartpopulationen

sein (Waller et al., 2002). Hierzu kann auch der systematisch weiter entfernte, nicht mehr klassisch einkreuzbare sekundäre Genpool gerechnet werden (Harlan, 1971; Harlan, 1992). Im Zuge der Charakterisierung und Identifizierung neuer *Sclerotinia sclerotiorum* Resistenzen im natürlichen Genpool der Gattung *Helianthus* wurden insgesamt 21 Genotypen perennierender *Helianthus*-Wildartpopulationen auf ihr Verhalten gegenüber einer artifiziellen Pilzinfektion untersucht. Hierzu wurden in mehrjährigen Freilandversuchen die Blatt-(BT) und Stängelreaktion (ST) auf Inokulation mit *Sclerotinia sclerotiorum* evaluiert. Des Weiteren wurde mit Hilfe eines Detached-Leaf Test (DTL) die *Sclerotinia*-Blattreaktion unter kontrollierten Bedingungen ermittelt.

Alle Inokulationen wurden zum Hauptinfektionszeitpunkt der *Sclerotinia* Blatt- und Stängelfäule (Hugger, 1989; Gulya et al., 1997) zwischen dem Beginn der generativen Phase, im Sternstadium R1 und der Vollblüte R5.9 (Klassifikation nach Schneiter et al., 1981 sowie Schneiter, 1994), vorgenommen. Die in den Freilandversuchen durchgeführten Inokulationen wurden in den frühen Abendstunden durchgeführt, um das kühlere und feuchtere Nachtklima für hohe Infektionsraten zu nutzen. Zur Kompensation eines geringen Infektionserfolges wurden in jedem Resistenztest (ST, BT, DTL) jeweils 6 Einzelpflanzen pro Prüfglied inokuliert. Hiermit wurde sichergestellt, dass mindestens vier Wiederholungen jedes Genotyps und Tests zur statistischen Auswertung herangezogen werden konnten.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der *Sclerotinia*-Stängelreaktion im Freiland wurden 3-jährig angelegt und in den Jahren 1998, 1999 und 2000 durchgeführt. Die Freilandversuche zur *Sclerotinia*-Blattreaktion wurden in den Jahren 1999 und 2001 durchgeführt. Ein Screening der *Sclerotinia*-Blattreaktion unter kontrollierten Bedingungen wurde in den Jahren 1998 und 1999 vorgenommen. Einen Überblick über die an den einzelnen Wildarten durchgeführten Resistenztests ist in Tabelle 3 dargestellt. Eine Übersicht der Zeitpunkte aller durchgeführten Inokulationen, der Anzahl an getesteten Genotypen sowie die Anzahl der unabhängigen Wiederholungen im Jahr gibt Tabelle 4.

**Tabelle 3:** Übersicht der an den *Helianthus*-Genotypen durchgeführten *Sclerotinia*-Resistenztests.\* ST = Stängeltest (Freiland); BT = Blatttest (Freiland), DTL = Detached Leaf Test

Genotyp	evaluiertes Pflanzenorgan *
<i>H. atrorubens</i> L.	ST, BT, DTL
<i>H. divaricatus</i> L.	ST, BT, DTL
<i>H. decapetalus</i> L.	ST
<i>H. giganteus</i> L.	ST, BT, DTL
<i>H. grosseserratus</i> Martens	ST, BT, DTL
<i>H. x laetiflorus</i> Pers.	ST, BT, DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC M	ST, BT, DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC 1	ST, BT, DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC 3	DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC 4	ST, BT, DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC 5	ST, BT, DTL
<i>H. maximiliani</i> Schrad. AC 7	ST, BT, DTL
<i>H. microcephalus</i> Torr. & Gray	ST, BT, DTL
<i>H. nuttallii</i> Torr. & Gray	ST, BT, DTL
<i>H. pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>subrhomboideus</i> R1	ST, BT, DTL
<i>H. pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>subrhomboideus</i> R2	ST, BT, DTL
<i>H. pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>pauciflorus</i> P1	ST, BT, DTL
<i>H. pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>pauciflorus</i> P1745	ST, BT, DTL
<i>H. pauciflorus</i> Nutt. ssp. <i>pauciflorus</i> P1747	ST, BT, DTL
<i>H. salicifolius</i> A. Dietr.	ST, BT, DTL
<i>H. strumosus</i> L.	ST, BT, DTL
<i>H. tuberosus</i> L.	ST, BT, DTL
<i>H. annuus</i> L. SWS-R1	ST
<i>H. annuus</i> L. SEM-R1	ST

**Tabelle 4:** Übersicht der Inokulationszeitpunkte, der Anzahl getesteter Genotypen sowie der Anzahl an unabhängigen Wiederholungen pro Jahr und Genotyp im *Sclerotinia*-Resistenz Screening

Test-Art	Ort	Anzahl Wdhg. / Genotyp	Monat/Jahr der Durchführung	Anzahl unabhängiger Wdhg./Jahr	Anzahl der getesteten Genotypen	Hauptbonitur Läsionslänge: [Tage nach Inokulation]
Stängeltest [ST]	Freiland	4	07-08/1998	5	21	4d
		4	07-08/1999	5	21	4d
		4	07-09/2000	3	13	4d
Blatttest [BT]	Freiland	4	07-08/1999	2	19	4d
		4	07-08/2001	2	19	4d
Detached Leaf Test [DTL]	feuchte	4	06-08/1998	3	19	4d
	Klima Kammer	4	07-08/1999	2	19	4d

### 2.3.1 Untersuchungen zur *Sclerotinia*-Stängelreaktion im Freiland

Die Tests zur *Sclerotinia*-Stängelreaktion wurden im Wesentlichen in Anlehnung an Thuault & Tourvieille (1988) sowie Castaño et al. (1993) durchgeführt. Hierzu wurden Myzel überwachsene Agarscheiben mit einem Durchmesser von 0,5cm mit Parafilm am Spross der Pflanze befestigt. Das Myzel erhielt hierbei direkten Kontakt mit der Sprossepidermis.

Um ein Austrocknen des Inokulums zu verhindern, wurde über den Parafilm jeweils schmale Streifen Polyethylen-Folie befestigt. Zu den Inokulationen wurden nur solche Agarscheiben verwendet, die eine gleichmäßig dicht mit Myzel bewachsene Oberfläche aufwiesen. Hiermit konnte für jede Infektion eine weitgehend gleichmäßige Inokulationsdichte erreicht werden.

Um eine möglichst hohe Infektionsrate der Stängel zu erreichen, wurde bei warmer und trockener Witterung die Inokulationsstelle zum Infektionszeitpunkt mit sterilisiertem Aq. Dest. (ca. 5mL) aus einer Sprühflasche befeuchtet. Als Inokulationsort wurde jeweils das 4. – 6. Internodium, entsprechend dem oberen Drittel des Sprosses gewählt. Dieses entspricht dem Hauptbefallsort der *Sclerotinia*-Stängelfäule bei *H. annuus*-Kultursorten (Gulya et al., 1997). Die Infektionsorte lagen in Abhängigkeit vom Genotyp 1–1,5m über der Bodenoberfläche. Eine Kreuz-Kontamination der Inokulationsstelle durch vom Boden abprallendes Regenwasser wurde somit weitgehend vermieden.

### 2.3.2 Untersuchungen zur *Sclerotinia*-Blattreaktion im Freiland

Zum Screening der *Sclerotinia*-Blattreaktion perennierender *Helianthus*-Wildarten wurde ein leicht abgewandeltes, von Bertrand & Tourvieille (1987) für *Phomopsis helianthi* entwickeltes und von Degener et al. (1998) auf *Sclerotinia sclerotiorum* adaptiertes Blatt-Testverfahren angewendet. Als Inokulationsort wurde entsprechend dem Stängelttest jeweils ein voll ausgewachsenes Blatt des 10. - 12. Blattpaares (4. - 6. Internodium) jedes Prüfgliedes mit *Sclerotinia*-Myzel inokuliert. Hierzu wurden Myzel überwachsene Agarscheiben (Ø 0,5cm) am terminalen Drittel der adaxialen Blattspreite mit Parafilm befestigt. Das Inokulat wurde zentral auf die Costa platziert und war in unmittelbarem Kontakt zur Epidermis. Um ein gleichmäßiges, feuchtes Klima in allen Blattinfektionen zu garantieren, wurden die Blätter mit umschließenden Polyethylenbeuteln versehen und mit Klebestreifen an den Stängeln fixiert. Jeder PE-Beutel wurde mit 2mL sterilisiertem Aq. dest. gefüllt. Die Beutel wurden nach oben hin offen gehalten, ein ungehinderter Gasaustausch war somit möglich. Der Wassergehalt in den Plastikbeuteln wurde laufend kontrolliert und bei extrem warmer und trockener Witterung mehrmals täglich

wiederaufgefüllt. Dem Inokulationsverfahren wurden nur vollkommen beschattete Blätter unterzogen um erhöhte Temperaturen im Mikroklima der PE-Beutel zu vermeiden.

### **2.3.3 Untersuchungen zur *Sclerotinia*-Blattreaktion unter kontrollierten Bedingungen - Detached-Leaf Test**

Detached-Leaf Tests werden zur Prüfung der Pathogenität eines Erregers, zur Bestimmung von Pathogenrassen, zur Evaluierung neuer Fungizide (Thind et al., 1989) sowie zur Ermittlung genetisch determinierter Resistenzen (Dingra & Sinclair, 1995; Steadman et al., 1997, Halimi & Rowe, 1998; Wegulo et al., 1998) angewandt. In vielen Wirt-Pathogen Systemen wurden hohe Korrelationen zwischen DTL und Inokulationen der intakten Pflanze erhalten (Hsieh, 1974, Morris & Thorne, 1978; Herath et al., 2001).

Alle zum Detached-Leaf Test verwendeten Blätter wurden von Freilandpflanzen entnommen. Hierzu wurden Blätter des 10-12 Blattpaares mit Petiole an ihrer Insertionsstelle zum Spross mit sterilen Einweg-Skalpellklingen abgeschnitten. Ein Verlust der Blattturgescenz wurde vermieden, indem noch auf dem Feld die Blätter in eine Styroporbox mit Leitungswasser gegeben wurden. Nach zweimaligem Waschen mit sterilisiertem Leitungswasser wurde das Blattgut in Kunststoffkästen (Polypropylen, 70cm x 40cm; Fa. Carl Roth GmbH D-76185 Karlsruhe) platziert. Die Kästen waren am Grund mit zwei Lagen Aqua dest. getränktem Filterpapier (Whatman No. 1) ausgekleidet, gefolgt von einer grobporigen Schaumstofflage (Polyurethan, Schichtdicke 1,5cm, Porendurchmesser Ø 1,5mm; Fa. Eich, D-53117 Bonn). Durch die Platzierung der Blätter auf dem grobporigen Schaumstoff waren sie nicht in Kontakt mit freiem Wasser. Auf seneszenzverzögernde Cytokinin- und/oder Saccharose-Behandlung des Blattgutes wurde im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen mit der Abwehrreaktion verzichtet.

Alle Bestandteile des DTL-Tests (PP-Behältnisse, Filterpapier, PU-Schaumstoff) wurden vor Gebrauch durch Abwaschen mit 70vol% Ethanol (PP-Behältnisse, PU-Schaumstoff) bzw. Autoklavieren (Filterpapier) sterilisiert.

Die *Sclerotinia* Inokulation erfolgte in Anlehnung an die Freilandtests: 0,5cm Myzel überwachsene Agarscheiben wurden am terminalen Drittel der adaxialen Blattspreite platziert. Der Detached Leaf Test wurde unter kontrollierten Bedingungen in einer vollautomatisch geregelten Klimakammer bei 20°C, 90% rel. Luftfeuchtigkeit und unter einem Tag – Nacht-Rhythmus von 12h Licht/12h Dunkel durchgeführt (2,4 W cm<sup>-2</sup>; Phillips HPL-N Lampen, Photosynthese-Beleuchtung mit erhöhtem Blaulichtanteil).

### 2.3.4 Datenerhebungen, Bonituren und statistische Auswertung

Als wesentliches Resistenzcharakteristikum wurde die Länge der durch das Myzelwachstum von *Sclerotinia sclerotiorum* erzeugten Läsion gemessen. Als Hauptresistenzmerkmal wurde in allen Screening-Verfahren (ST, DTL und BT) die Läsionslänge in cm vier Tage nach Inokulation gewertet. Die Messungen erfolgten hierbei jeweils in der Longitudinalen der Läsion.

Zusätzlich wurde die Geschwindigkeit der Myzelausbreitung in cm/Tag im befallenen Gewebe der *Helianthus*-Genotypen zweimal pro Versuchsjahr ermittelt. Des Weiteren wurden an jedem Genotyp folgende in Tabelle 5 aufgezeigten Datenerhebungen im Screening-Verfahren durchgeführt:

**Tabelle 5:** Charakteristika der im *Sclerotinia*-Resistenzscreening erhobenen Parameter <sup>a)</sup>

Parameter	Einheit	Beschreibung (Test)
<b>Myzelwachstum</b>	[cm/d]	Ausbreitungsgeschwindigkeit des Myzels im penetriertem Gewebe (ST, BT, DTL)
<b>Welke-Index</b>	[+ bzw. -] <sup>a)</sup>	typische Welkesymptome charakterisiert durch Verlust der Turgeszenz des oberen Drittel der Pflanze (ST)
<b>Totalverluste</b>	[% Pflanzen]	aufgrund der kompletten Mazeration des Stängelgewebes umgefallene Sprossachsen (ST)
<b>Sklerotien-Index</b>	[+ bzw. -] <sup>a)</sup>	Vorkommen von Sklerotien im Stängelmark bzw. auf der Blattoberfläche (ST, BT, DTL)
<b>Inkubations-Index [Inkubationszeit]</b>	Symptome nach 36h [+ bzw. -] <sup>a)</sup>	Anzahl von Individuen mit visuellen Symptom 36h nach Inokulation (ST, BT, DTL)
<b>natürlicher Infektionsverlauf</b>	[+ bzw. -] <sup>a)</sup>	natürlicher Infektionsverlauf der <i>Sclerotinia</i> Stängelfäule durch Penetration des Myzels über das Blatt in die Sprossachse (BT)
<b>natürliche Infektion</b>	[+ bzw. -] <sup>a)</sup>	Infektion durch natürlichen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Ascosporenflug

<sup>a)</sup> + = vorhanden; - = nicht vorhanden.

Nicht erfolgreiche Inokulationen wurden in Anlehnung an Degener et al. 1998 von der statistischen Kalkulation ausgeschlossen, wurden jedoch im Infektionserfolg berücksichtigt um potentielle, primäre Penetrationsbarrieren zu erfassen.

Zur Überprüfung der Globalhypothese, dass genotypische Unterschiede hinsichtlich der Reaktion auf *Sclerotinia*-Infektion bestehen (Parameter: Läsionslänge vier Tage postinfektionell) wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) nach dem allgemeinen linearen Modell (non full rank linear model, GLM-Prozedur; Kirk, 1995) für balancierte und unbalancierte Versuchsdesigns durchgeführt. Unter Verwendung einer multifaktoriellen Varianzanalyse wurden zusätzlich potentielle Umweltinteraktionen der

Art Genotyp x Zeitpunkt der Infektion als auch Genotyp x Versuchsjahr detektiert. Der multifaktoriellen Varianzanalyse lag folgendes statistisches Modell zu Grunde:

$$x_{ijr} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijr} ;$$

wobei:  $x_{ijr}$  = die individuelle Läsionslänge der Genotypen,  $\mu$  = den Gesamtmittelwert des Versuchs,  $\alpha_i$  = den differentiellen Effekt des Faktors A „Genotyp“,  $\beta_j$  = den differentiellen Effekt des Faktors B „Zeitpunkt der Inokulation“ bzw. „Versuchsjahr“,  $(\alpha\beta)_{ij}$  = den differentiellen Effekt der Faktor-Interaktion A x B und  $\varepsilon_{ijr}$  = den Versuchsfehler darstellen. Als Maß für die Stärke der Interaktion zwischen den betreffenden Faktoren und der Läsionslänge wurden der Haupt- und Interaktions- Koeffizient Eta ( $\eta^2$ ) berechnet (SPSS, 1999a). Hierbei wurde sowohl der Koeffizient des genotypischen Einflusses ( $\eta_g^2$ ) als auch der Umwelt ( $\eta_e^2$ ) und der Wechselwirkung Umwelt x Genotyp ( $\eta_{ge}^2$ ) bestimmt.

Die Voraussetzungen zur Durchführung der Varianzanalyse wurden mit dem KOLMOGOROV-SMIRNOW-Test auf Normalverteilung der Residuen  $\varepsilon \approx N(0, \sigma^2)$  bzw. mit dem LEVENE-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen (Varianzhomogenität) geprüft.

Zur Evaluierung signifikanter Unterschiede zwischen den Genotypen wurden multiple Mittelwertsvergleiche durchgeführt. Hierbei wurde der TUKEY-Test für balancierte Datensätze, der SCHEFFÉ-Test für unbalancierte Datensätze zum Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  verwendet. Für nicht varianzhomogene Datensätze wurde der GAMES-HOWELL-Test für nicht varianzhomogene Populationen zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0,1\%$  angewandt.

Zur Abschätzung des Anteils der genotypischen Varianz an der phänotypischen Gesamtvarianz wurde eine Schätzung der Varianzkomponenten über das gesättigte Verfahren nach der MINQUE-Methode (*minimum norm quadratic unbiased estimator* nach Rao, 1971 und Lamotte, 1973) berechnet. Der Abschätzung der Varianzkomponenten lag folgendes Modell zugrunde:

$$\hat{\sigma}_P^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_E^2 + \hat{\sigma}_{GE}^2 ;$$

mit  $\hat{\sigma}_P^2$  = phänotypische Varianz der Läsionslänge;  $\hat{\sigma}_G^2$  = genotypische Varianz;  $\hat{\sigma}_E^2$  = Fehlervarianz und  $\hat{\sigma}_{GE}^2$  = Interaktionsvarianz vom Typ „Jahr x Genotyp“. Die genäherte Schätzung des Anteils der genotypischen Varianz an der phänotypischen Gesamtvarianz erfolgte dementsprechend durch den Quotienten:

$$\hat{V}_g [\%] = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_E^2 + \hat{\sigma}_{GE}^2} \cdot 100 .$$

Signifikante, genotypische Unterschiede der nominalskalierten Variablen Welke-Index, Totalverluste, Sklerotien-Index, natürlicher Infektionsverlauf und natürliche Infektion wurden über den  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstest detektiert.

Art und Stärke von Beziehungen zwischen dichotomen Merkmalen (Welke-Index, Totalverluste, Sklerotien-Index, natürlicher Infektionsverlauf und natürliche Infektion) und metrischen bzw. nominalen Parametern (Läsionslänge, Genotypen) wurden über die Ermittlung punktbiserialer Korrelationen ( $r_{pbis}$ ) bzw. des punktbiserialen Determinationskoeffizienten ( $r^2_{pbis}$ ) zum Signifikanzniveau  $\alpha = 1\%$  bestimmt.

Korrelationen zwischen den einzelnen Testverfahren (ST, BT, DTL) wurden über den Rangkorrelationskoeffizienten nach SPEARMAN zum Signifikanzniveau  $\alpha = 1\%$  errechnet.

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogrammpaket SPSS, Version 10.03, Landeslizenz NRW (SPSS Inc., Chicago, 60611 IL, USA).

#### **2.4 Evaluierung präformierter Blatt-Phenolprofile als Resistenzmarker zur *Sclerotinia sclerotiorum* Myzelausbreitung im Mesophyll perennierender *Helianthus*-Wildarten**

Innerhalb des gesamten Krankheitskomplexes „*Sclerotinia*-Stängelfäule“ der Kultursonnenblume stellen die Blattspreiten und zum geringeren Umfang die Blattachsen den natürlichen, primären Infektionsort für die windbürtigen *Sclerotinia*-Ascosporen dar (Sedun & Brown, 1986; Masirevic & Gulya, 1992; Gulya et al., 1997; Degener et al., 1998).

Penetrationsbarrieren oder Inhibitoren gegenüber der primären Infektion über Infektionshyphen von *Sclerotinia sclerotiorum* konnten bislang weder in Blättern annueller noch perennierender Populationen der Gattung *Helianthus* detektiert werden. Eine erfolgreiche Besiedlung des Stängels und damit des wirtschaftlich bedeutenden Ertragsverlustes - nach erfolgter Ascosporenenkeimung und primärer Penetration der Blattepidermis - hängt damit neben Resistenzeigenschaften des Stängels auch von der Penetrierbarkeit des Blattgewebes bzw. der Petiole für das *Sclerotinia*-Myzels ab. Resistenzen gegenüber der *Sclerotinia sclerotiorum* Myzelausbreitung im penetrierten Gewebe werden in der Gattung *Helianthus* neben strukturellen Resistenzkomponenten im Wesentlichen auf die Existenz präformierter als auch induzierter phenolischer Inhaltsstoffe zurückgeführt. Phenole bzw. deren Derivate werden hierbei mit passiven - präinfektionellen - als auch aktiv induzierten - postinfektionellen - Resistenzen gegenüber Schädlingen und Pathogenen assoziiert (Schlösser, 1994 & 1997; Harborne, 1985 & 1995; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Dixon & Paiva, 1995). In einigen Wirt-Pathogen Beziehungen konnten konstitutive phenolische Inhaltsstoffe als kausale Inhibitoren von Myzelaktivitäten im penetrierten pflanzlichen Gewebe ermittelt werden (Walker & Stahmann, 1955; Brownlee et al., 1990; Prusky & Keen, 1993; Maher et al., 1994).

Freilanduntersuchungen von Castaño et al. (1992) und Hemery-Tardin et al. (1998) an Phenolfingerprints von *Helianthus* Inzuchtpopulationen und deren Nachkommen zeigen, dass präformierte Blattphenolgehalte eine starke Korrelation zur Myzelausbreitung als auch

zur Läsionslänge aufweisen. Präformierte Phenolgehalte werden in beiden Arbeiten als putative und kostengünstig zu evaluierende Marker der *Sclerotinia*-Blattresistenz vorgeschlagen. Konstitutive Blattphenole werden daneben auch im perennierenden Genpool als präinfektionelle Resistenzfaktoren diskutiert (Mondolot-Cosson & Andary, 1994; Andary et al., 1996; Mondolot-Cosson et al., 1997). Vergleichende Untersuchungen zum Spektrum präformierter Blattphenole sowie deren Wirkungszusammenhänge zur *Sclerotinia*-Anfälligkeit innerhalb der perennierenden *Helianthus*-Akzessionen liegen bis heute nicht vor. Ihnen könnte jedoch ein wesentlicher Beitrag als Basis einer markergestützten Selektion eines interspezifischen Züchtungsansatzes zur Amelioration der *Sclerotinia*-Blattresistenz zukommen.

Ziel sollte neben einer einfachen Probenvorbereitung, einer hohen und reproduzierbaren Trennung phenolischer Substanzen und einer simultanen Bestimmung möglichst vieler Polyphenole, eine kurze Analysendauer sowie eine hohe Empfindlichkeit sein. Da für die komplexe Polyphenolanalytik der anfallenden *Helianthus*-Blattproben bisher keine Methode vorlag die diese Bedingungen hinreichend erfüllte, wurde eine neue Methode auf Basis der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC-Analytik) entwickelt. Als Grundlage hierzu dienten Arbeiten von Oertel (1994), Oertel et al. (2001) sowie Häkinnen et al. (1998) zur chromatographischen Analytik komplexer Polyphenolmuster in Rosaceen.

#### **2.4.1 Verwendetes Pflanzen- und Blattmaterial, Versuchsanlage und zeitliche Dimensionierung**

Zur Analyse präformierter Blattphenole wurden insgesamt 18 perennierende *Helianthus*-Wildarten bzw. Akzessionen untersucht. Die Genotypen rekrutierten sich dabei aus dem im Abschnitt 2.1. näher beschriebenen *in vivo* Feldbestand des Instituts für Landwirtschaftliche Botanik. Im einzelnen wurden dabei Blattproben folgender Arten bzw. Akzessionen unter Verwendung der HPLC-Analytik untersucht: *H. strumosus*; *H. grosseserratus*; *H. salicifolius*; *H. microcephalus*; *H. divaricatus*; *H. giganteus*; *H. x laetiflorus*; *H. nuttallii*; *H. tuberosus* sowie die Akzessionen 1, 3 ,4 ,5 , 7 und M von *H. maximiliani* und P1, P 1745 und P 1747 von *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus*.

Um vertrauenswürdige Daten zur Korrelation zwischen der Myzelausbreitung im Mesophyll und präformierten Blattphenolprofilen zu erhalten, wurde zeitlich parallel zu den Ernteterminen der Blattproben, die Geschwindigkeit der Myzelausbreitung über einen DTL-Test mit vier Wiederholungen pro Wildart, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Insgesamt wurden an drei unabhängigen Terminen, im 14tägigen Abstand, zwischen Mitte Juni und Mitte Juli Blattproben jedes Genotyps zur chromatographischen Analyse gesammelt, sowie parallel jeweils ein DTL-Test durchgeführt. Durch die Wahl

von drei Zeitpunkten der Probennahme sollten im Wesentlichen Variationen im Phenolmuster über den Versuchszeitraum erfasst werden.

Als Blattprobenmaterial zur HPLC-Analytik und zum DTL-Test dienen, in Anlehnung an die Blattresistenztests, voll ausgewachsene Blätter des 10-12 Blattpaares.

#### 2.4.2 Probenaufarbeitung und Extraktion

Es wurden jeweils 10 voll entwickelte Blätter ohne Petiole von insgesamt fünf Pflanzen jeden Genotyps zu den Zeitpunkten der Probennahme jeweils um 9<sup>o</sup>Uhr morgens in Pergamenttüten geerntet. Das Blattmaterial wurde zur Bestimmung des Frischgewichtes gewogen und unverzüglich im Umlufttrockenschrank (Fa. Binder, D-78532 Tuttlingen) bei 35°C schonend bis zur Gewichtskonstante getrocknet. Im Anschluss an die Bestimmung des Trockengewichts wurden die Proben in einer Kugelmühle (Retsch MM 2000, Fa. Retsch, D-42781 Haan) bei mittlerer Frequenz 30s staubfein gemahlen. Jeweils 100mg gemahlene Blattprobe wurden mit 2mL 50%igem Methanol (v/v; Merck Chromasolv®) versetzt und 30min im Ultraschallbad bei 4°C mit Eis extrahiert. Nach anschließender 5min Zentrifugation bei 5000rpm (Hereaus, Biofuge 13) wurde der Überstand abgenommen und zur restlichen Entfernung evtl. kolloidaler Verunreinigungen membranfiltriert (Sartorius; 0.45µm Porenweite). 500µL des so gewonnenen klaren Rohextraktes wurden nochmals mit 1mL 50%igem Methanol verdünnt, in Braunglasvials gefüllt und mit einem 10µL Injektionsloop der HPLC-Analyse unterzogen. Sowohl die Extraktion in 50%igem Methanol als auch das geringe Injektionsvolumen wurden zur Vermeidung von Methanol-abhängigen Peakdeformationen gewählt.

#### 2.4.3 HPLC-Analytik löslicher Phenole

Zur Erzielung einer robusten Routineanalytik mit hoher Batch to Batch Reproduzierbarkeit wurde auf eine Gradientenelution mit einem binären Fließmittelgemisch zurückgegriffen. Hierbei wurden folgende mobile Phasen verwendet:

Solvent A: Doppelt entmineralisiertes Wasser mit 85%ige *ortho*-Phosphorsäure (Merck, p.a.) (99.5 / 0.5 - v/v) als *modifier* zur Verbesserung des Elutionsprofils.

Solvent B: Acetonitril (Merck, Gradient grade)

Alle im Gradienten verwendeten Lösungsmittel wurden vor ihrem Gebrauch membranfiltriert (Sartorius; 0.45µm Porenweite) und anschließend im Ultraschallbad unter Vakuum entgast. Die Gradientenelution ergab sich wie folgt aus:

Zeit [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]	Flussrate mL/min
0.0	90	10	1
5.0	90	10	1
56.0	30	70	1
60.0	0	100	1
65.0	0	100	1

Die Flussrate wurde über die zwei HPLC-Pumpen (Waters, Modell 515 und 590; D-65760 Eschborn) auf 1mL/min eingestellt. Die Trennung der Phenole erfolgte über ein octadecylsilanisierendes Adsorbens (Europher-100-C18 Vertex Column, 5µm, 250 x 4mm, Fa. Knauer D-14163 Berlin-Zehlendorf) welches für komplexe Naturstoffextrakte mit mono- bis oligomeren Inhaltsstoffen (< 3000Da) eine hohe Trennleistung aufweist (Oertel, 1994). Die Säule wurde über einen Säulenthermostat mit Peltiersteuerelement (Fa. Kontron, D-85371 Neufahrn) bei konstant 35°C ± 0,2°C Analysetemperatur gehalten. Die Detektion erfolgte über 3 Wellenlängen bei λ=280nm (Kontron Detektor 332), λ=310nm (Perkin-Elmer LC-75, Perkin-Elmer, D-88662 Überlingen) sowie bei λ=380nm (Knauer UV/VIS Detektor mit Wolframlampe). Alle phenolischen Inhaltsstoffe zeigten bei 280nm ein Signal. Da über komplexe Phenolmuster der Gattung *Helianthus* bislang keine Daten vorlagen, wurden phenolische Komponenten entsprechend ihrer Absorptionscharakteristika semiquantitativ durch Co-Chromatographie wie folgt bestimmt:

Detektion λ [nm]	Phenolkomponente	Peakhöhe	Referenzsubstanz (Herkunft)
280	alle Phenole, Gesamtphenolgehalt	≅ 100%	-
310	Hydroxymzimtsäure und Ester	50-125%	Chlorogensäure (Roth, HPLC) Kaffeensäure (Sigma, C 0625) Ferulasäure (Sigma, 46280)
	Hydroxybenzoesäure und Ester	10-20%	Gallussäure (Roth, HPLC)
	Flavan-3-ole	<5%	(+)-Catechin (Roth, HPLC) (-)-Epicatechin (Roth, TLC)
380	Flavonole; Flavonolglycoside	100%	Quercetin-dihydrat (Sigma, Q 0125) Quercetin-7-O-β-D-Glucose (Quercimeritin, Prof. Dr. H. Geiger; Uni. Saarland)

**Tab. 6:** Detektionscharakteristik phenolischer Komponenten in den *Helianthus* Blattextrakten

Die quantitative Analyse sowie Aufzeichnung und Integration der Detektorsignale erfolgte über einen Datenintegrator (Spectra-Physics Chrom Jet III; Spectra-Physics D-64291 Darmstadt) mit automatischer Basislinienfindung und Peakerkennung.

Zur Identifizierung phenolischer Komponenten der Extrakte wurde nach der Methode des internen, additiven Standards (Unger & Weber, 1995) verfahren. Hierzu wurden die in Tabelle 6 angegebenen Referenzsubstanzen den Extrakten in Konzentrationen von jeweils  $10^{-2}$  und  $10^{-4}$ M zugesetzt. Anschließend wurde für die qualitative Identifikation neben der identischen Retentionszeit und gleichem Absorptionsverhalten zu den drei Detektionswellenlängen sowohl die Peakfläche als auch die Peakhöhe und Peaksymmetrie im Chromatogramm ausgewertet.

Die Kompatibilität der Chromatogramme über alle *Helianthus*-Genotypen wurde, insbesondere im Hinblick auf nicht identifizierte Substanzen, durch eine Mischprobe aller Blattextrakte überprüft. Hierzu wurden von jedem methanolischen Extrakt der Genotypen 1ml entnommen und in ein Falcon-Reaktionsgefäß pipetiert. Nach 20sec. vortexen wurden 500 $\mu$ L der Mischprobe entnommen, mit 1mL Methanol verdünnt und der HPLC-Analyse mit den oben angegebenen chromatographischen Parametern unterzogen.

Sowohl die Peakidentifikation über den internen Standart als auch die Vergleichbarkeit der Blattextrakte wurde bei sonst identischen Elutionsparametern mit verändertem binärem Gradienten verifiziert. Hierzu wurde der organische Eluent Acetonitril (Solvent B) durch Methanol (Merck, Gradient grade) ersetzt und die HPLC-Analytik mit folgender Gradientenelution vollzogen:

Zeit [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]	Flussrate mL/min
0.0	90	10	1
5.0	90	10	1
92.0	40	60	1
97.0	0	100	1
100.0	0	100	1

Die Substanzpeaks wurden erst dann als identisch erachtet, wenn sie unter beiden Gradientenelutionen gleiches chromatographisches Verhalten hinsichtlich Retentionszeit, Peakfläche- bzw. höhe und Peaksymmetrie zeigten.

Zur Erzielung einer reproduzierbaren Vergleichbarkeit der Chromatogramme über die gesamte Gradientenelutionszeit erfolgte deren Kalibration über die Retentionszeiten der authentisch in der Gattung *Helianthus* detektierten Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Kaffeesäure sowie Quercetin-7-O- $\beta$ -D-Glucose. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch eine Verdünnungsreihe der Standardlösungen bei einem Injektionsvolumen von 10  $\mu$ L bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 2:1 angenommen, als Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 5:1. Zur Auswertung wurden nur jene Peaks herangezogen, deren Konzentrationen bei mindestens einer Blattprobe oberhalb der Bestimmungsgrenze lagen.

Die quantitative Bestimmung phenolischer Substanzen und des Gesamtphenolgehaltes erfolgte über die detektierten Peakflächen bei  $\lambda = 280$ nm. Die Substanzmengen wurden in Kaffeesäureäquivalenten durch die Kalibration mit einem externen Standart quantifiziert.

Hierzu wurden mindestens einmal täglich definierte Konzentrationen frisch angesetzter Kaffeesäurelösungen ( $8,6 \cdot 10^{-4} \text{M}$  in Methanol) mit konstanten Volumina (10  $\mu\text{L}$ ) mehrmals im Abstand von einer Minute injiziert. Anschließend wurden die Peakflächen und -höhen auf ihre Reproduzierbarkeit hin ausgewertet. Neben der äquivalenten Phenolquantifizierung konnte durch dieses Verfahren eine hohe *batch to batch* Reproduktion der HPLC-Analytik kontrolliert und gegebenenfalls justiert werden.

#### 2.4.4 Versuchsauswertung und statistische Analyse

Jede chromatographisch detektierte Substanz (Peak) wurde entsprechend ihrer Retentionszeit nummeriert. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte dabei sowohl über die Peakfläche als auch die Peakhöhe bei 280nm Detektionswellenlänge. Nicht näher identifizierte Substanzen wurden entsprechend ihrem Adsorptionsverhalten bei  $\lambda = 280, 310$  und  $380\text{nm}$  (siehe Tab. 5) in potentielle Phenolklassen eingeteilt und mit entsprechenden Indizes versehen (Hz = potentielle Hydroxyzimtsäuren; Fl = potentielle Flavonoide; lp = Substanzen die unter lipophilen Gradientenbedingungen eluieren).

Die Myzelwachstumsraten des *Sclerotinia*-Myzels im Blattgewebe wurde über die Läsionsvergrößerung im DTL-Test ermittelt und bis zum 4. Tag nach Inokulation ermittelt. Die unter kontrollierten Bedingungen gemessene Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pilzmyzels wurde anschließend bonitiert. Hierzu wurde Boniturnoten nach dem Verfahren von STURGES (Sturges, 1926; Köhler et al., 1996) zur Ermittlung der optimalen Klassenbreite vergeben und ergaben sich wie folgt:

Boniturnote [Note]	Läsionslänge nach 4d [cm]	Myzelwachstum Ø [cm/d]
4	$\leq 3,4$	$\leq 0,8$
3	$> 3,4 - \leq 4,2$	$\approx 1,0$
2	$> 4,2 - \leq 5,0$	$\approx 1,2$
1	$> 5,0 - \leq 5,8$	$\approx 1,4$
0	$> 5,8$	$> 1,4$

Qualitative Zusammenhänge zwischen dem komplexen interspezifischen Polyphenolmuster und der *Sclerotinia*-Myzelausbreitung wurden durch eine hierarchische Clusteranalyse untersucht. Hierbei wurde geprüft, ob allein die Anwesenheit oder Abwesenheit von distinkten phenolischer Komponenten Zusammenhänge zur Pilzausbreitung im Mesophyll erkennen lassen und erfolgte Initial durch die Generierung einer binären 0-1-Datenmatrix (0 = Komponente absent; 1 = Komponente vorhanden). Die binäre Matrix diente dabei durch Transponieren in den JACCARD'schen Ähnlichkeitskoeffizienten:

$$J = a_i / (n_i - d_i);$$

mit  $a$  = Anzahl der Proben eines Genotypen mit Präsenz der phenolischen Komponente  $i$ ,  $d$  = Anzahl der Proben mit Absenz der Komponente  $i$ ;  $n$  = Anzahl der gemessenen Proben; als Basis zur Darstellung von phänotypischen Ähnlichkeiten der Wildarten über die genotypisch divergierenden Phenolfingerprints. Durch die anschließende Implementierung der Ähnlichkeitsmatrix in den von Sneath & Sokal (1973) entwickelten UPGMA-Algorithmus (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) wurden Phänogramme in Form eines Dendrogramms (Phänogramm) erzeugt. Dendrogramme wurden mit dem Programm Treecon for Windows Version 1.3b (van de Peer & de Wachter, 1994) generiert.

In Anlehnung an Arbeiten von Hemery-Tardin et al. (1998), Tourvieille et al. (1997) sowie Sanlaville et al. (1988) und Achbani et al. 1994 wurden potentielle Wirkungszusammenhänge zwischen den Phenolmustern und der Myzelaktivität im Mesophyll über eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, SPSS 1999b) durchgeführt. Sie diente in der Hauptsache dazu, die multiple Anzahl von empirisch ermittelten quantitativen Variablen (Substanzkonzentrationen) über eine faktorisierte Korrelationsmatrix zu reduzieren. Grundlegendes Prinzip ist hierbei, dass Variablen denen unterschiedliche Faktoren zugrunde liegen untereinander geringer korrelieren als jene, denen potentielle - kausale - Gemeinsamkeiten (Faktoren) zugrunde liegen (Philippeau, 1986; Backhaus et al., 2000). Die explorative Faktoranalyse berücksichtigte hierbei alle detektierten phenolischen Komponenten sowie die *Sclerotinia*-Ausbreitung im Blattgewebe und erfolgte nach der Varimax-Rotationsmethode (Kaiser, 1956; Hair et al., 1998).

Korrelationen zwischen solitären Peaks im *Helianthus*-Phenolmuster und der Myzelaktivität wurden über den SPEARMAN'SCHEN Rangkorrelationskoeffizienten zum Signifikanzniveau  $\alpha = 1\%$  ermittelt. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Statistikprogrammpaket SPSS Version 10.03.

## **2.5 Histologische, chromatographische und biochemische Evaluierung von Resistenzparametern der *Sclerotinia*-Stängelreaktion perennierender *Helianthus*-Wildarten**

Das Umfallen der Stängel durch enzymatische Mazeration des Markgewebes stellt am gesamten Krankheitskomplex der *Sclerotinia*-Stängelfäule das wirtschaftlich bedeutendste Ereignis dar (Sala et al. 1998), welches hauptsächlich in der Reduktion des Flächenölertrages begründet ist (Gulya et al., 1997; Sala et al., 1998; Prioletta & Bazzalo, 1998). Resistenzfaktoren der Sprossachsen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* werden im annualen Genpool der Kultursonnenblume in der Hauptsache in deren präformierten Lignifizierungsgrad als auch in postinfektionellen Akkumulationen von niedermolekularen

phenolischen Verbindungen gesehen (Tourvieille & Vear 1984; Bazzalo et al. 1987 & 1991).

Vergleichende Untersuchungen und Evaluierungen resistenter und anfälliger Genotypen der Pathogen - Wirt Interaktion *Sclerotinia* - *Helianthus annuus* sind, in der Hauptsache aufgrund des Mangels an resistenten Sorten, rar (Gulya et al., 1997). Innerhalb des perennierenden Genpools fehlen bislang Daten zur Charakterisierung morphologischer und biochemischer Resistenzfaktoren der Sprossachse zur *Sclerotinia*-Resistenzreaktion und sollten durch die nachfolgende Untersuchung geklärt werden.

Als präformierte, morphologische Resistenzfaktoren gegenüber pilzlichen Pathogenen werden häufig lignifizierte Gewebe (Sklerenchyme) mit lignininkrustierten Zellwänden, Suberineinlagerungen (Korkgewebe) sowie Cutin-Auflagerungen der Cuticula (Kolattukudy, 1985; Howard et al., 1991; Agrios, 1997; Dickison, 2000) diskutiert. Hierbei wirken diese strukturellen Resistenzfaktoren inhibierend auf den primären Infektionsprozess als auch - nach erfolgreicher Besiedlung des pflanzlichen Gewebes - auf die Pathogenese durch mechanische bzw. chemische Barrieren.

Akkumulationen von löslichen phenolischen Verbindungen, insbesondere der phenolischen fungistatischen bzw. fungitoxischen Phytoalexine geht meist eine Steigerung des Phenolstoffwechsels über eine Aktivierung des Schlüsselenzyms Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL; E.C. 4.3.1.5) voraus. Untersuchungen an zahlreichen Pflanzenarten zeigen hierbei, dass die PAL-Aktivität durch zahlreiche Umweltfaktoren differentiell reguliert ist (Guerra et al., 1985; Liang et al., 1989; Logemann et al., 1995; Sakurai et al., 2001; Sarma et al., 1998) und in zahlreichen inkompatiblen Wirt - Pathogen Interaktionen durch erhöhte Transkriptionsraten gesteigert ist (Hahlbrook & Scheel, 1989; Elstner et al., 1996). Auch im annualen Formenkreis der Sonnenblume ist für die inkompatible Interaktion resistenter Inzuchtlinien nach Infektion des biotrophen Pathogens *Plasmopara halstedii* eine erhöhte Anzahl an PAL-m-RNA Transkripten im infizierten Gewebe beschrieben worden (Mazeyrat et al., 1999).

Neben dem aktivierten Phenolstoffwechsel sind häufig dazu parallel in zahlreichen Resistenzphänomenen erhöhte Peroxidase (POX)-Aktivitäten identifiziert worden, die als generelle Resistenzmarker erachtet werden (Hammerschmidt et al., 1982; Stermer & Hammerschmidt, 1984; Srivastava, 1987; Reuveni et al., 1990; Lorenzini et al., 1994; Casal et al., 1994; Reuveni, 1995). Der Beitrag der Multi-Enzymfamilie pflanzlicher Klasse III (Häm)-Peroxidasen E.C. 1.11.17 (Welinder, 1992; Hiraga et al., 2001) zum Resistenzphänomen umfasst dabei eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen wie der verstärkten Lignifizierung der Zellwände (Kombrink & Somssich, 1995) und der invasiven Pilzhyphen (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996), der Bildung fungitoxisch-radikalischer *O*-Chinone in nekrotischen Reaktionen (Elstner, 1990; Oßwald, 1995; Elstner, 1996; Richard-Forget & Gauillard, 1997, Barber et al., 2000), induzierter

Suberineinlagerungen in Zellwände (Bolwell et al., 1997; Bernards & Lewis, 1998), sowie der Zellwandfestigung über die Polymerisierung Hydroxyprolinreicher Glykoproteine (HRGP, Extensine) in die primären Zellwände dikotyler Pflanzen (Bradley et al., 1992; Iiyama et al., 1994, Oßwald, 1995; Warneck et al., 1997; Jackson et al., 2001).

Im Zuge der Charakterisierung des Wirt – Pathogen Systems *Sclerotinia sclerotiorum* – perennierende *Helianthus*-Wildarten sollte evaluiert werden, a) in wie weit die PAL- bzw. POX-Aktivität durch *Sclerotinia*-Stängelinfektion induzierbar ist, b) ob innerhalb des sekundären Genpools genotypische Unterschiede in der Induzierbarkeit des Phenolstoffwechsels bzw. der POX-Aktivität nach *Sclerotinia*-Infektion bestehen, c) ob für die erhobenen Parameter Schlussfolgerungen zur Stängelresistenzreaktion gezogen werden können und damit d) als selektierbare, biochemische Resistenz-Marker zur *Sclerotinia*-Stängelresistenzreaktion herangezogen werden können.

### 2.5.1 Verwendetes Pflanzenmaterial und Versuchsanlage

Zur histochemischen sowie biochemischen Evaluierung von prä- und postinfektionellen Resistenzparametern zur *Sclerotinia*-Stängelreaktion wurden solche Wildartakzessionen verwendet, die in ihrer Resistenzausprägung (partiell resistent; intermediär; suszeptibel) eine annähernd einheitliche und mehrjährige physiologische Konstanz aufwiesen (siehe dazu Abschnitt 3.1.1). Hierbei wurden verwendet:

- a.) partiell Resistent: *H. maximiliani* AC M, *H. maximiliani* AC 7 sowie *H. salicifolius*.
- b.) intermediärer Resistenztypus: *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* P1, *H. nuttallii* sowie *H. strumosus*.
- c.) suszeptibler Reaktionstypus: *H. tuberosus*, *H. grosseserratus* sowie *H. giganteus*.

Alle verwendeten Wildarten wurden wie zuvor beschrieben im Freiland gehalten. Anlage, Pflege und *Sclerotinia*-Inokulationstechnik der Bestände erfolgten wie bereits in Abschnitt 2.3.1 dargelegt. Die Untersuchungen erfolgten zweijährig mit jeweils vier Inokulationen und Probennahmen pro Jahr sowie vier Inokulationen pro Genotyp. Als Inokulationsort wurde wie zu den vorangegangenen Untersuchungen jeweils das 4. – 6. Internodium, entsprechend dem oberen Drittel des Sprosses gewählt.

### 2.5.2 Histologische Untersuchung prä- und postinfektioneller Resistenzfaktoren

In der nachfolgenden Untersuchung wurden gesunde wie auch *Sclerotinia*-Infizierte Stängelsegmente einer mikroskopisch - histochemischen Untersuchung unterzogen. Besonderer Wert wurde hier auf die für die Resistenzreaktionstypen einheitliche Symptomatologie gelegt. Von den inokulierten Sprossachsen wurden jeweils die für den Reaktionstypus charakteristischen Proben untersucht.

Das infizierte Probenmaterial bestand aus 2-3 Tage alten Inokulationsstellen und wurde zunächst stereomikroskopisch (Olympus SZH; Olympus D-20097 Hamburg) bei 366nm Anregungswellenlänge (Desaga UVIS 254nm/366nm Handlampe; Desaga D-69153 Wiesloch) auf Autofluoreszenz der nekrotisierten Zonen untersucht.

Zur histochemischen Untersuchung wurde das Probenmaterial sofort nach der Ernte in flüssigem N<sub>2</sub> tief gefroren und anschließend mit einem Gefriermikrotom (Leitz Kryostat 1720, Leitz D-35578 Wetzlar) Gefrierschnitte von 15-25 µm Stärke bei einer Schnitttemperatur von -10 - -15°C und einer Temperatur des Messers (Typ C; Stahl; R. Jung GmbH D-69226 Nussloch) von -5°C angefertigt. Aufgrund seiner geringen Autofluoreszenz wurde als Einbettmittel Tissue-Tek (Optimal Cutting Temperatur – OCT-Compound 4583, Sakurai Finetek Inc., 90504-Torrance, USA) verwendet. Die Schnitte wurden anschließend folgenden histochemischen Färbungen unterzogen und folgten im Wesentlichen Protokollen nach Gahan (1984) und Ruzin (1999):

**Suberin und Cutin:** Die Schnitte wurden zunächst für 5sec in 50% Ethanol vorfixiert und anschließend für 15min in einer gesättigten ethanolschen Sudan IV (Chroma 1A-262 Sudan IV; WALDECK Division Chroma, D-48161 Münster)-Lösung (0,07g in 100ml 70% Ethanol) gefärbt, nachfolgend zweimal mit 50%igem Ethanol gewaschen und nach Einbettung in 50Vol% Glycerin lichtmikroskopisch untersucht. Suberinisierte bzw. Cutin enthaltende Strukturen färbten sich aufgrund der lipophilen Affinitätsfärbung mit dem Diazo-Farbstoff tief rot.

Daneben zeigen Suberin und Cutin Autofluoreszenzsignale bei Anregung im langwelligen UV-Licht ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ) die durch Behandlung der Schnitte mit 0.02M Na-Phosphatpuffer (pH 9.1) differenzialdiagnostisch zur alleinigen Detektion von Suberin bei  $\lambda_{\text{ex}} = 530\text{-}550\text{nm}$  führt (Ruzin, 1999).

**Lignifiziertes Gewebe (WEISNER-Reaktion; Weisner, 1878):** Die Schnitte wurden zunächst 5min in Ethanol abs. fixiert, anschließend für 3min in ein 10%iges (w/v) ethanolsches Phloroglucin (Fluka)-Bad platziert, nachfolgend mit HCl conc. gewaschen und lichtmikroskopisch untersucht. Lignifiziertes Gewebe färbte sich infolge der durch HCl katalysierten Kondensation des Phloroglucins an Coniferylaldehyd-Seitenketten des Lignins (Clifford, 1974) mit  $\lambda_{\text{max}} = 550\text{nm}$  tief rot.

**Kondensierte Tannine (Flavanole):** Die Schnitte wurden 5min in einer Vanillin-HCl-Lösung (10%ige w/v Vanillinlösung in 1:1 v/v Lösung aus Ethanol abs. und HCl conc.) behandelt und anschließend lichtmikroskopisch examiniert. Die Präsenz von kondensierten Tanninen führt zu einer Rotfärbung der entsprechender Zonen (Sarker & Howarth, 1976).

**Flavonoide (WILSON'S-Reagenz):** Die Schnitte wurden 15 min in einer Lösung aus 5g Zitronensäure und 5g Borsäure in 100mL Methanol abs. behandelt und durch

Epifluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{\text{ex}} = 400\text{-}440\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520\text{-}560\text{nm}$ ) untersucht. Die Anwesenheit von Flavonoiden führt durch die Bildung von Borinsäure-Chelaten zu gelb fluoreszierenden Zonen (Hariri et al., 1991).

**Phenole (allgemein):** Zahlreiche sekundäre Inhaltsstoffe im pflanzlichen Gewebe zeigen Autofluoreszenz welche als diagnostisches Tool zur Identifikation Pathogen induzierter Aktivitäten des Sekundärstoffwechsels im befallenen Gewebe genutzt werden können (Ruzin, 1999; Goulas et al., 1990; Freytag & Hahlbrock, 1992).

Direkte lichtmikroskopische Beobachtungen phenolischer Komponenten sind reduziert auf anthocyanhaltiges Gewebe da hier die Zielmoleküle rot, blau oder violett gefärbt sind.

Phenolische Inhaltsstoffe wie Hydroxyzimtsäuren, Cumarine, Stilbene und Styrolpyrone weisen starke Autofluoreszenz bei Anregung im langwelligen UV Licht ( $\lambda = 365$ ) sowie im blauem Licht ( $\lambda = 460$ ) auf (Ibrahim & Barron, 1989, Veit et al., 1993; Gorham, 1995; Schmitz et al., 1996) und können somit fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Hutzler et al., 1998). In Tabelle 7 sind alle wesentlichen Charakteristika zur Phenoldetektion aufgezeigt.

**Tabelle 7:** Detektion autofluoreszenter Komponenten

Komponente	Excitation $\lambda_{\text{ex}}$ [nm]	Emission $\lambda_{\text{em}}$ [nm]	Detektion (Filtersatz)		
			$\lambda_{\text{ex}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	DM <sup>a)</sup> [nm]
<b>Cutin</b>	UV 365	440 – 480 blau	340-380	435-485	400
<b>Hydroxyzimtsäuren:</b> Kaffee-, Chlorogensäure	UV 365	450 – 480 blau	340-380	435-485	400
<b>Lignin</b> (auch Protolignine)	UV 365	450 – 480 blau	340-380	435-485	400
	UV 365	510 – 520 grün	340-380	515-555	400
	420–460 blau	>600 gelb-orange	450-490	600-660	505
<b>Suberin</b>	UV 365	440 – 480 blau	340-380	435-485	400
		530 – 550 gelb <sup>c)</sup>	340-380	520 Lp. <sup>b)</sup>	505

<sup>a)</sup> Dichroischer Spiegelfilter (Farbteiler); <sup>b)</sup> Langpassfilter (Mehrfachfluoreszenz). <sup>c)</sup> bei pH > 9.1 mit 0.02M Na-Phosphatpuffer.

Die mikroskopischen Untersuchungen der Präparate erfolgten licht- und epifluoreszenzmikroskopisch mit dem Inversmikroskop Nikon Eclipse TE 300-DV (Nikon GmbH, D-40472 Düsseldorf). Als Fluoreszenzlichtquelle diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe (Osram HBO 100 W/2, Osram, D-81543 München). Digitale Bildaufnahmen und Objektmessungen wurden mit dem Bilddokumentationssystem und der begleitenden Software Diskus Version 4.20 (Fa. Hilgers, D-53693 Königswinter) durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten zur Vermeidung von Bildartefakten (Inoué & Spring, 1997; van Vliet et al., 1998) der ungekühlten Digitalkamera (Hitachi HV 20A - 3 Chip CCD Kamera; Hitachi Denshi, D-63110 Rodgau) bei einer Integrationszeit von maximal drei Sekunden.

### 2.5.3 Postinfektionelle Änderungen im Phenolstoffwechsel und der Peroxidaseaktivität

#### 2.5.3.1 Dünnschichtchromatographie resistenzbegleitender Inhaltsstoffe

Als induzierte Resistenzfaktoren zur *Sclerotinia*-Stängelresistenz werden im annuellen Formenkreis der Gattung *Helianthus* erhöhte Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen, insbesondere Derivate der Caffeoylchinasäure (Chlorogensäure) diskutiert (Bazzalo et al., 1985; 1987 & 1991; Hemery, 1987) die nach der Klassifikation von Ingham (1973) als Inhibitine vor Infektion in geringsten Mengen präsent sind, sich jedoch postinfektionell stark akkumulieren. In der nachfolgenden chromatographischen Untersuchung sollte untersucht werden, ob in *Sclerotinia* inokulierten, perennierenden *Helianthus* Wildarten nach Infektion ähnliche Akkumulationen phenolischer Inhaltsstoffe erfolgen.

Als Probenmaterial wurden gesunde sowie zwei Tage alte Inokulationen der in den Resistenztypen charakteristischen Wildartakzessionen verwendet. Die vom Freiland geernteten Stängelproben wurden zunächst in flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren. Anschließend wurden die infizierten Stängelproben vor der Extraktion auf eine einheitliche Länge von 1.5cm geschnitten. Alle inokulierten Stängelproben enthielten sowohl gesundes als auch nekrotisches Gewebe.

0,5g des Probenmaterials wurden in einem mit flüssigem N<sub>2</sub> vorgekühlten Mörser und HCl conc. gewaschenem Carborundum fein zermahlen und anschließend mit 4mL 4°C kaltem 50%igen Methanol (v/v) extrahiert. Die entstandene Suspension wurde in 1,5mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 10.000g (SIGMA Universalzentrifuge 3K15; Sigma D - 37507 Osterode am Harz) für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand diente als Rohextrakt für die dünnschichtchromatographische Trennung.

Auf Grund der höheren Anzahl an theoretischen Böden, der höheren Trennleistung und der schnelleren Analysezeit (Hahn-Deistrop, 1997, Kraus et al., 1999) wurde als chromatographisches System auf die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) im Horizontalverfahren zurückgegriffen. Hierzu wurden 2 µL der Rohextrakte auf eine zuvor bei 100°C aktivierte HPTLC-Platte (HPTLC-Silica Gel 60, F 254, 10x10cm mit Konzentrierungszone; 6 µm Korngröße, Merck D-D-64293 Darmstadt) punktförmig ca. 1cm vom Plattenrand aufgetragen und anschließend in einer horizontalen HPTLC-Kammer (10x10cm, Teflon, Desaga D-69153 Wiesloch) entwickelt. Als mobile Phasen wurden folgende, für jeden Lauf frisch angesetzte Lösungsgemische verwendet:

- a) **System I für hydrophile Komponenten** : Ethylacetat : H<sub>2</sub>O : Ameisensäure – 67 : 20 : 13 (v/v/v); zur Trennung von Kaffeesäure und Chlorogensäurederivaten in Anlehnung an Protokolle von Hahn-Deistrop & Bauer (1999) zur Trennung von

niedermolekularen Phenolen der Asteraceen *Echniacea purpurea* sowie *E. angustifolia*.

- b) **System II für hydrophobe Komponenten**: Chloroform : Aceton : Ameisensäure – 130 : 53 : 17 (v/v/v); insbesondere zur Trennung und Detektion von Cumarinen in Anlehnung an Fried & Sherma (1996).

Die Laufstrecke betrug für beide Systeme ca. 7,5cm – bei einer Laufzeit von 20 min und 20°C Raumtemperatur. Alle Trennungen wurden bei 100% Kammersättigung durchgeführt und erfolgten zu System I mit einer gesättigten Ameisensäure- zu System II mit einer gesättigten Chloroform : Aceton (1:1; v/v) Atmosphäre.

Die Detektion phenolischer Komponenten erfolgte über:

- a) **Fluoreszenzreduktion im kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda = 254\text{nm}$ )**: Hierbei stellen sich alle Phenole auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator, bedingt durch ihren Benzolchromophor, als fluoreszenzmindernde Zonen dar (Sticher, 1999).
- b) **Eigenfluoreszenz im langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366\text{nm}$ )**: Insbesondere Cumarine weisen eine starke Eigenfluoreszenz auf und können ohne differenzierende Sprühreagenzien an ihrer Fluoreszenzfarbe erkannt werden (Kubeczeka & Bohn, 1985). Als wesentliches Charakteristikum weisen sie darüber hinaus auch bei  $\lambda = 254\text{nm}$  eine Eigenfluoreszenz auf, die eine Fluoreszenzminderung überdeckt.
- c) **Diphenylboryloxyethylamin - Sprühreagenz (Naturstoffreagenz A; Roth)**: Als 1%ige methanolische Lösung bedingt Naturstoffreagenz A eine differentielle Modifikation der Fluoreszenzfarbe ( $\lambda = 366\text{nm}$ ) phenolischer Inhaltsstoffe über einen von der Phenolstruktur abhängigen Chelatkomplex (Neu, 1956). Die Detektionsempfindlichkeit beträgt hierbei  $1\mu\text{g}/\text{Substanzfleck}$  (Kirchner, 1978) und kann durch anschließendes Besprühen der Chromatogramme mit 5%iger (w/v) ethanolischer PEG-4000 (Merck) Lösung um den Faktor 10-100 gesteigert werden (Stahl, 1997; Kraus et al., 1999).
- d) **Vanillin-HCl Reagenz**: Besprühen der Chromatogramme mit einer Vanillin-HCl-Lösung (1% Vanillin in HCl conc w/v) lässt Phenole, die das Substitutionsmuster des Phloroglucins oder Resorcins aufweisen, nach Erhitzen auf 105°C und Betrachtung im Tageslicht gelbrot bis violett erscheinen (Jork et al., 1993; Sticher, 1999).

Zur genauen Untersuchung resistenzbegleitender Inhaltsstoffe wurden präparative dünnschichtchromatographische Trennungen durchgeführt. Hierzu wurde nach

Entwicklung der DC-Platte (Merck - HPTLC-Silica Gel 60, ohne Fluoreszenzindikator; 10x10cm mit Konzentrierungszone; 6 µm Korngröße) der Substanzfleck unter UV markiert und mit einer feinen Präpariernadel ausgeschabt. Das mit Substanz beladene Kieselgel wurde in den oberen Teil einer Pasteurpipette, die in der Verjüngung mit Quarzwolle versehen war, quantitativ überführt. Anschließend wurde die Substanz mit 500µL Methanol (Merck, Chromasolv) aus der Säule in Quarzküvetten eluiert und auf ihr Absorptionsspektrum hin spektralphotometrisch untersucht (SmartSpec 3000 Spectrophotometer; Bio-Rad Laboratories D-80901 München). Der Scanbereich betrug dabei zwischen  $\lambda = 200\text{nm} - 700\text{nm}$ . Zur Verseifung etwaiger Esterbindungen wurden zusätzlich die eluierten resistenzbegleitenden Substanzzonen einer sauren Hydrolyse mit 2M HCl unterzogen. Hierbei wurden 400µL Eluat mit 400 µL mit HCl versetzt und im Wasserbad bei 25°C 3h inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch mit dem Laufmittel: Ethylacetat : H<sub>2</sub>O : Ameisensäure – 70 : 15 : 20 (v/v/v) bei einem Auftragsvolumen von 2µL entwickelt.

Als Vergleichs- und Referenzsubstanzen wurden jeweils 0,1%ige methanolische Lösungen von Kaffeesäure (Sigma, C 0625); Chlorogensäure (Roth, HPLC); Scopoletin (Aldrich, 24.658), Umbelliferon (Sigma, U 7626) und Esculetin (Aldrich, 24.657) mit einem Auftragsvolumen von 2µL als Referenzsubstanzen cochromatographiert. Die Dokumentation der HPTLC-Chromatogramme erfolgte mit dem Transilluminationssystem Gel Print 2000i (BioPhotonics Corp.; 48103 Ann Arbor, MI, USA).

### **2.5.3.2 Extraktion und Bestimmung der prä- und postinfektionellen Phenylalanin-Ammoniak-Lyase - (E.C. 4.3.1.5) und Peroxidase - (E.C. 1.11.17) Aktivität**

In den nachfolgenden Untersuchungen sollten die extrahierbaren PAL – und POX-Aktivitäten vor und nach *Sclerotinia* Inokulation der Sprossachsen ermittelt werden. Der Erntezeitpunkt der Proben erfolgte jeweils um 8°Uhr morgens, um tageszeitliche Schwankungen der Enzymaktivitäten zu vermeiden. Die einzelnen Stängelsegmente wurden zur Probennahme zunächst in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die durchgeführten Aktivitätsmessungen beruhen für beide Enzymassays auf der spektralphotometrischen Bestimmung des Endproduktes der enzymatischen Reaktionen. Hierbei wurde weitestgehend im Substrat-Sättigungsbereich der Enzyme gemessen, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr durch die MICHAELIS-MENTEN Kinetik (Michaelis & Menten, 1913) charakterisiert, sondern im Wesentlichen nur durch die Enzymkonzentration im Assay gegeben ist (Lottspeich & Zorbas, 1998; Fersht, 1999).

### 2.5.3.2.1 Ermittlung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase- (PAL, E.C. 4.3.1.5) Aktivität

Um differenzierende Aussagen über die spezifische Induktion der PAL durch Wundsignale und/oder einer biotischen *Sclerotinia* Induktion zu erhalten, wurden parallel zur Pilzinfektion Verwundungen an gesunden Sprossachsen durchgeführt. Hierzu wurden mit einer sterilen Skalpellklinge an vier Prüfgliedern/Wildart longitudinale Schnitte von ca. 1cm Länge und 0,5 cm Breite angelegt und mit Parafilm abgedichtet.

Als Untersuchungsobjekte dienten zwei Tage postinfektinell gesammelte Stängelsegmente. Die Proben wurden noch vor dem Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> in folgende 2cm lange Abschnitte getrennt und gewogen:

- a) gesunder Stängelabschnitt einer nicht inokulierten Pflanze
- b) *Sclerotinia* inokulierter Stängelabschnitt mit nekrotisierter Zone bzw. Läsion zwei Tage nach Inokulation
- c) mechanisch verwundeter Stängelabschnitt zwei Tage nach Verwundung

Die anschließende Extraktion und Messung der PAL-Aktivität erfolgte in Anlehnung an Arbeiten von Havir (1987) sowie Edwards & Kessmann (1992) zur PAL-Bestimmung in Leguminosen:

Jeweils zwei Stängelproben von 5g FW wurden in einem mit flüssigem N<sub>2</sub> vorgekühlten Mörser staubfein gemahlen und mit 5ml 4°C kaltem Extraktionspuffer versehen. Der Extraktionspuffer beinhaltete hierbei 50mM Tris-HCl (pH 8,5) mit 14,2mM 2-Mercaptoethanol sowie 5% (w/v) PVPP. Nach zweimaligem Vortexen in 15mL Falcon-Tubes und Quetschfiltration der Suspension über zweilagigem Miracloth (Miracloth No. 475855; Calbiochem - Novabiochem D-65796 Bad Soden) wurden die Proben mit 10000g 15min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417 R; Eppendorf D-50389 Wesseling). Da die gefärbten Bestandteile des Rohextraktes (Chlorophyll, Carotenoide, phenolische Inhaltsstoffe) die spektralphotometrische Messung stören und auch die PAL-Aktivität inhibieren können (Attridge et al., 1971; Seitz et al., 1985; Edwards & Kessmann, 1992) wurden die Rohextrakte mit 0,5g Dowex 1x2 Ionenaustauscher (24h equilibriert in 50mM Tris-HCl Puffer, pH 8,5) in der Kälte 5min (4°C) gerührt. Nach anschließender Zentrifugation (5000g) diente der entstandene klare Überstand als Rohextrakt zur Aktivitätsbestimmung.

Zur Aktivitätsmessung wurde der Umsatz an *L*-Phenylalanin durch die PAL in *trans*-Zimtsäure spektralphotometrisch bei  $\lambda = 290\text{nm}$  in Quarzküvetten ermittelt. Als Kontrolle wurde parallel zu jeder Messprobe eine Aktivitätsmessung mit *D*-Phenylalanin durchgeführt das von der PAL aufgrund der sterischen Inkompatibilität nicht zu *t*-Zimtsäure umgesetzt werden kann.

Jeweils 0,9mL des 12,1mM *L*-Phenylalanin (*D*-Phenylalanin zur Kontrolle) wurde in 50mM Tris-HCl (pH 8,5) in 3mL Quarzküvetten im Wasserbad auf 39°C vorgeheizt. Durch Zugabe von 0,1mL Rohextrakt und anschließender Durchmischung des Küvetteninhaltes wurde die Reaktion gestartet. Die Bildung von *t*-Zimtsäure wurde spektralphotometrisch durch die Extinktionszunahme bei  $\lambda = 290\text{nm}$  (SmartSpec 3000 Spectrophotometer; Bio-Rad Laboratories D-80901 München) ermittelt. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte gegen den 50mM Tris-HCl Puffer (pH 8,5) als Blindwert. Die *trans*-Zimtsäurekonzentration wurden alle 15min ermittelt und über insgesamt 2h verfolgt. Die Kalkulation der Enzymaktivität erfolgte in  $\mu\text{kats/kg}$  Protein (spezifische Aktivität). Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten für *t*-Zimtsäure bei  $\lambda = 290\text{nm}$  von  $10,0 \text{ cm}^2/\text{mol} \times 10^6$  folgte die Berechnung der spezifischen PAL-Aktivität nach:

$$27780 \cdot \left( \frac{\frac{\Delta A_{290} L - \text{Phenylalanin}}{60 \text{ min}} - \frac{\Delta A_{290} D - \text{Phenylalanin}}{60 \text{ min}}}{\mu\text{g Protein pro Inkubation}} \right) = \frac{\mu\text{kats}}{\text{kg Protein}}$$

Die Rohproteingehalte der Rohextrakte wurden spektralphotometrisch nach Bradford (1976) mit Rinderserum Albumin (BSA) als Standart bei  $\lambda = 595\text{nm}$  ermittelt.

Die Auswertung der PAL-Aktivitäten der einzelnen Probenvarianten und Genotypen erfolgte nichtparametrisch über den Kruskal-Wallis Test und anschließendem paarweisen Mittelwertsvergleich durch den Mann-Whitney U-Test zum Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$  mit dem Statistiksoftwarepaket SPSS Version 10.03, Landeslizenz NRW.

#### 2.5.3.2.2 Ermittlung der Peroxidase- (POX, E.C. 1.11.17) Aktivität

Als Untersuchungsobjekte dienten zwei Tage postinfektinell geerntete Stängelsegmente. Wie zur PAL-Aktivitätsermittlung wurden die Proben der einzelnen Genotypen noch auf dem Feld in gesunde und *Sclerotinia* inokulierte Stängelabschnitte separiert, in flüssigem  $\text{N}_2$  gefroren und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die nachfolgende Aufarbeitung und Extraktion der POX erfolgte in Abwandlung nach Arbeiten von Ranieri et al. (2000a) sowie Grison & Pilet (1985) zur Separation leicht löslicher, ionisch gebundener sowie covalent gebundener Fraktionen pflanzlicher Klasse III Peroxidasen in *Helianthus annuus* sowie *Zea mays*. Die Extraktion erfolgte in drei sequenziellen Schritten und nutzte die ungleiche Löslichkeit der POX-Fraktionen zu Puffern mit differierenden Ionenstärken. Hierbei gehen die leicht löslichen symplastischen als auch apoplastischen Fraktionen durch Extraktion in einem ionenschwachen Na-Phosphatpuffer in Lösung. Ionische, in der Hauptsache an die Zellwand gebundene

Fraktionen, werden durch ionenstarke  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen ausgetauscht. Die Behandlung der Zellwandmatrix mit cellulolytischen Enzymen extrahiert die covalent an die Zellwand gebundenen Peroxidasen und kann ca. 75% des fest an die Zellwandmatrix assoziierten Enzyms lösen (Elstner, 1990). Alle Extraktionsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C gekühlt durchgeführt:

- a) Jeweils zwei Stängelproben von insgesamt 5g FW wurden in einem mit flüssigem  $\text{N}_2$  vorgekühlten Mörser fein gemahlen und mit 8ml 4°C kaltem 66mM Na-Phosphat Extraktionspuffer (pH 6,1) versehen.
- b) Die Suspension wurde anschließend mit weiteren 4mL des kalten Extraktionspuffers quantitativ in 15mL Falcongefäße überführt und nach zweimaligem vortexen (30s) bei 800g und 4°C für 5min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R).
- c) Der Überstand wurde im Folgenden abgenommen, in 2mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 10000g und 4°C für 5min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417 R). Der entstandene Überstand diente als lösliche POX-Fraktion.
- d) Das bei b) erhaltene Pellet wurde zweimal mit kaltem Na-Phosphatpuffer sowie zweimal in Aq. bidest. resuspendiert und gewaschen. Das im Anschluss an die 5min Zentrifugation bei 1000g/4°C erhaltene Pellet wurde im Überschuss mit Na-Phosphatpuffer (pH 6,1) mit 0,5% (v/v) Triton X-100 resuspendiert und 1h auf Eis bei 200U/min geschüttelt. Nach zwei Waschschritten mit Extraktionspuffer und Aq. bidest. sowie Zentrifugation bei 800g (4°C, 5min) wurde das Pellet mit 8mL 1M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung auf Eis (4°C) bei 200U/min 1h geschüttelt. Der im Anschluss an die Zentrifugation (10min, 4°C, 800g) erhaltene Überstand beinhaltet die ionisch gebundene POX-Fraktion.
- e) Das aus d) erhaltene Pellet wurde zweimal mit Aq. bidest. gewaschen und nach der Zentrifugation (5min, 4°C, 800g) und Verwerfen des Überstandes mit 6mL 50mM Na-Acetattpuffer (pH 5.5) mit 0,4% (w/v) Cellulase (EC 3.2.1.4 aus *Aspergillus niger*, Merck) und 0,3% Mazerozym (Mazerozym R10 aus *Rhizopus ssp.*, Merck) (w/v) bei Raumtemperatur 20h inkubiert. Die anschließende 10min Zentrifugation bei 800g beinhaltet in ihrem Überstand die covalent gebundene Fraktion. Das Pellet wurde bei 90°C bis zur Gewichtskonstante getrocknet und anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt.

Die isolierten POX-Fraktionen wurden bis zur photometrischen Bestimmung bei -80°C gelagert, welches nach Dignum et al. (2001) keinen Einfluss auf deren Aktivität zeigt. Die

Rohproteingehalte der Rohextrakte wurden spektralphotometrisch nach Bradford (1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standart bei  $\lambda = 595\text{nm}$  ermittelt.

Für den photometrischen Nachweis der POX-Aktivität wurde Guajacol (2-Methoxyphenol) als Substrat verwendet, da es von annähernd allen Peroxidasen gleich gut unter Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in das braun-rot gefärbte Tetra-Guaiacol oxidiert wird.

Die spektralphotometrische Ermittlung des gebildeten Tetra-Guaiacol erfolgte bei  $\lambda = 470\text{nm}$  (SmartSpec 3000) in Standardküvetten (3mL Halbmikro-Küvetten, Brand, D- 97861 Wertheim). Der im Wasserbad auf  $30^\circ\text{C}$  vorgewärmte Assay beinhaltete  $100\mu\text{L}$  0,1% (v/v) Guajacol-Lösung (Merck, reinst);  $100\mu\text{L}$  der extrahierten POX-Fractionen, 2,7 mL Na-Phosphatpuffer (pH 5,2) und wurde durch Zugabe von  $100\mu\text{L}$  0,1%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung gestartet. Die Extinktionsänderung wurde über einen Zeitraum von 5min beobachtet. Das Photometer wurde gegen den Assaypuffer (2,7 mL) mit dem entsprechenden Anteil ( $100\mu\text{L}$ ) Extraktionspuffer der POX-Fractionen kalibriert. Die Messungen erfolgten im Linearitätsbereich und wurden gegebenenfalls durch entsprechende Aliquotierung des Enzymextraktes im Assay adjustiert.

Die POX-Aktivität der löslichen und ionisch gebundenen Fraktion wurde als Absorptionsdifferenz pro Minute und mg Protein ( $\Delta A_{470} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) im Assay berechnet. Die Aktivitäten der covalent gebundenen Fraktion bezogen sich auf die Absorptionsdifferenz  $\Delta A_{470}$  pro Minute und g TM der residualen Pellets aus Extraktionsschritt e).

Die statistische Auswertung der POX-Aktivitäten einzelner Probenvarianten und Genotypen erfolgte Varianzanalytisch mit anschließendem multiplen Mittelwertsvergleich nach SCHEFFE zum Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$  und wurden mit dem Statistiksoftwarepaket SPSS Version 10.03, Landeslizenz NRW, durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zum Resistenzverhalten perennierender *Helianthus*-Wildarten auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Inokulation

Die ausgesprochen perthotrophe Verhaltens- und Ernährungsform, das beachtliche Wirtspflanzenspektrum (Boland & Hall, 1994) als auch die Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren von *Sclerotinia sclerotiorum* implizieren eine extreme Anpassungsfähigkeit des Pilzes. Diese Eigenschaften haben bislang noch in keiner von diesem Pathogen betroffenen Kulturpflanze zur Detektion kompletter - entsprechend dem FLOR'schen Postulat (Flor, 1942; 1956) – monogener Resistenzen geführt (Steadman, 1979; Seiler, 1992; Masirevic & Gulya, 1992; Gulya et al., 1997; Subbarao, 1998). Resistenzen gegenüber *Sclerotinia* im Genpool der kultivierten Sonnenblume sind partieller Natur und polygen determiniert (Miller, 1987; Robert et al., 1987; Škoric, 1992; Mestries et al., 1998; Castaño et al., 2001), wobei additive Effekte vorherrschend vor Dominanz- und epistatischen Effekten sind (Tourvieille & Vear, 1990, Grezes-Besset et al., 1994; Achbani et al., 1996).

Da die in dieser Arbeit evaluierten *Helianthus*-Wildartpopulationen ohne Vorkenntnis ihres Resistenzverhaltens getestet wurden und die Literatur auf äußerst variierende Ergebnisse hinsichtlich deren Verhalten gegenüber *Sclerotinia ssp.* verweist (Pustovoit & Gubin, 1974; Pustovoit & Krasnokutskaya, 1976; Thompson et al., 1978; Škoric, 1987; Serieys, 1987) wurden mehrjährige Freilandversuche durchgeführt. Hierdurch sollten innerhalb des sekundären Genpools der Gattung *Helianthus* im Wesentlichen a) potentielle genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen artifiziell inokulierten Sprossachsen und Blättern detektiert b) die Umweltkonstanz des Merkmals „Läsionslänge“ der *Sclerotinia* inokulierten Sprossachsen und Blätter charakterisiert, c) Änderungen im Resistenzverhalten in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Pflanze (Alters- bzw. Jugendresistenz) evaluiert und d) eine Abschätzung des spezifischen, genotypischen Effektes auf den Krankheitskomplex „*Sclerotinia*-Stängelfäule“ erfolgen. Die Determination weiterer, für die Pathogenese von *Sclerotinia sclerotiorum* bedeutender Parameter, sowie die Bestimmung der Korrelation zur Läsionslänge dienten zur Überprüfung der Veritabilität und Robustheit des phänologischen Markers „Läsionslänge nach 4 Tagen“ am gesamten Resistenzphänomen.

### 3.1.1 *Sclerotinia*-Stängelreaktion im Freiland

#### 3.1.1.1 Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Sprossachse und Umweltkonstanz des Merkmals Läsionslänge

In einem ersten Feldversuch wurden zunächst alle 21 Genotypen über 2 Jahre, 1998 und 1999, auf *Sclerotinia*-Stängelresistenz getestet (Experiment I). Im Jahr 2000 wurden zusätzlich nochmals aus den 21 Populationsakzessionen 13, in ihrer *Sclerotinia*-Stängelreaktion charakteristische Arten getestet (Experiment II), um die Umweltwechselwirkungen „Genotyp x Jahr“ und „Genotyp x Infektionszeitpunkt“ exakter zu erfassen.

Der Infektionserfolg war in beiden Versuchsansätzen hoch und betrug im Durchschnitt aller Genotypen und Jahre 96%. Alle Genotypen zeigten postinfektionell nach spätestens 48h typische Krankheitssymptome. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Infektionserfolges zwischen den Experimenten, Jahren und Inokulationszeitpunkten wurden nicht detektiert. Tendenziell zeigten die Genotypen *H. salicifolius* mit 92% und *H. maximiliani* AC M mit 94% erfolgreichen Infektionen die geringsten Infektionsraten. Hohe Infektionsraten von jeweils 100% zeigten *H. tuberosus* und *H. giganteus*, die somit in allen artifiziellen Inokulationen charakteristische *Sclerotinia*-Symptome aufwiesen.

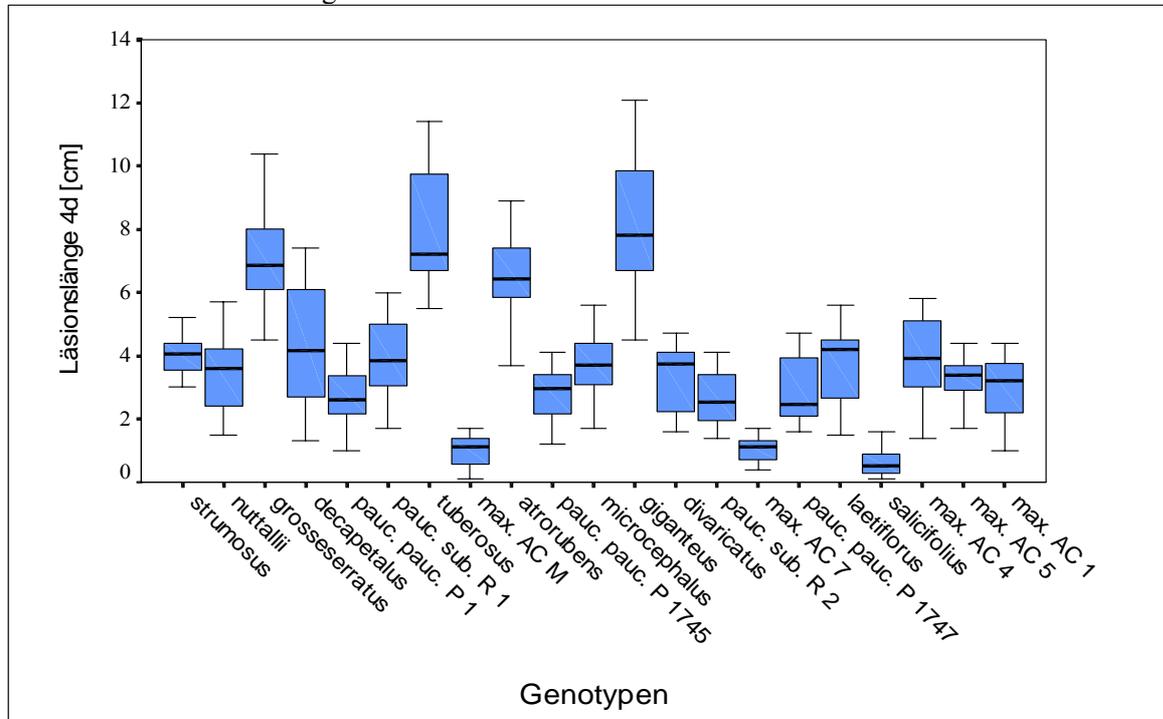
##### Experiment I:

Alle im zweijährigen Feldversuch evaluierten Parameter sowie deren signifikant genotypischen Unterschiede sind in Tabelle 8 notiert. Die genotypischen Verteilungsparameter der vier Tage postinfektionell gemessenen Läsionslänge über die Versuchsjahre sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Im zweijährigen Feldversuch wiesen sich im Mittel der Jahre und Infektionszeitpunkte hochsignifikante Unterschiede der Genotypen hinsichtlich der nach 4 Tagen gemessenen Läsionslängen aus ( $\alpha=0,1\%$ ,  $N = 588$ ). Als hoch teilresistente Genotypen konnten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M und *H. maximiliani* AC 7 evaluiert werden. Sie wiesen im Durchschnitt die geringsten Läsionslängen (Mittel 0,6 – 1,0cm) auf und zeigten in Abhängigkeit der Versuchsjahre und Inokulationszeitpunkte den konsistentesten Reaktionstyp hinsichtlich Läsionslänge, Rangplatz und Phänologie der induzierten Läsion (zur phänologischen Charakterisierung der Reaktionstypen siehe Abschnitt 3.1.1.3). Zusätzlich vergrößerten sich deren Läsionen nur äußerst langsam und spiegeln sich dementsprechend in den geringsten Myzelwachstumsraten aller evaluierten Genotypen ( $0,1-0,25 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) wieder. Häufig konnte 8 – 10 Tagen nach Inokulation keine Vergrößerung der Läsionen beobachtet werden. Dem gegenüber erwiesen sich die Arten *H. giganteus*, *H. atrorubens*, *H. decapetalus*, *H. tuberosus* und *H. grosseserratus* als

ausgesprochen empfindlich gegenüber *Sclerotinia*-Inokulation. Die Ausbreitung des *Sclerotinia*-Myzels erfolgte rasch ( $1,10\text{-}1,84\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) und führte häufig schon nach zwei Tagen zu charakteristischen Welkesymptomen.

**Abbildung 3:** Verteilungskennwerte im BOX-WHISKER-Plot des Resistenzparameters – Läsionslänge nach 4 Tagen - zum Konfidenzintervall 95% für 21 perennierende Wildarten über 2 Jahre im *Sclerotinia* Stängelresistenztest



Nach vier Tagen zeigten die empfindlichen Arten häufig einen Totalverlust der Pflanze durch Abbrechen der Sprossachse am Inokulationsort. Hochsignifikante Totalverluste im Vergleich zum Versuchsdurchschnitt (14,3%) von mehr als 50% aller inokulierten Individuen wiesen die Genotypen *H. grosseserratus* (67,8%), *H. giganteus* (98%), *H. tuberosus* (96,4%) auf. Alle anderen Genotypen, Akzessionen von *H. pauciflorus ssp.*, die *H. maximiliani* Akzessionen AC 1, 4, 5 sowie die Arten *H. x laetiflorus*, *H. microcephalus*, *H. strumosus*, *H. nuttallii* und *H. divaricatus* konnten hinsichtlich Läsionslänge als auch des phänologischen Reaktionstypus als intermediär benannt werden. Dieses intermediäre Resistenzverhalten charakterisierte sich durch häufige und hoch signifikante Rangwechsel ( $\alpha=0,1\%$ ) der Genotypen in Abhängigkeit vom Inokulationszeitpunkt. Die Effektstärke der Jahre war jedoch verglichen mit dem genotypischen Einfluss äußerst gering. Dies spiegelte sich sowohl in einem geringen Interaktionskoeffizienten für den Jahreseffekt mit  $\eta_c^2=0.02$  als auch in der Varianzkomponentenanalyse wieder.

**Tabelle 8:** Ergebnisse der 1998 und 1999 durchgeführten Feldresistenzprüfungen von 21 perennierenden *Helianthus*-Wildarten auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Stängelinkokulation (Experiment I)

Rang <sup>a)</sup>	Genotyp	Läsionslänge nach 4d [cm]				Sklerotien Index <sup>c)</sup>	Welke Index <sup>c)</sup>	Total- Verluste <sup>c)</sup>	Myzel- wachstum <sup>d)</sup>	Inkubations- Index <sup>c)</sup>
		$\bar{x}$	TUKEY-T. <sup>b)</sup>	S <sub>d</sub>	X <sub>min</sub> -X <sub>max</sub>	[% Pfl.]	[% Pfl.]	[% Pfl.]	[cm • d <sup>-1</sup> ]	[% Symptome] nach 36h
1	<i>H. salicifolius</i>	0,62	a	0,40	0,1-1,6	-	-	-	0,11	33,1 <sup>***</sup>
2	<i>H. maximiliani</i> AC M	0,98	a	0,49	0,1-1,7	-	-	-	0,24	100
3	<i>H. maximiliani</i> AC 7	1,03	a	0,36	0,4-1,7	-	-	-	0,22	100
4	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>subrhomboideus</i> R 2	2,71	b	0,89	1,4-4,1	-	-	-	0,72	100
5	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1	2,78	bc	0,91	1,0-4,4	-	-	-	0,63	100
6	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1745	2,81	bc	0,84	1,2-4,1	-	-	-	0,68	100
7	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1747	2,95	bc	1,09	1,6-4,7	-	-	-	0,67	100
8	<i>H. maximiliani</i> AC 1	2,98	bc	0,97	1,0-4,4	-	-	-	0,71	100
9	<i>H. maximiliani</i> AC 5	3,18	bc	0,84	1,3-4,4	-	-	-	0,63	100
10	<i>H. divaricatus</i>	3,34	bcd	1,01	1,6-4,7	-	-	-	0,74	100
11	<i>H. nuttallii</i>	3,45	bcd	1,18	1,5-5,7	3 <sup>n.s.</sup>	7,2 <sup>n.s.</sup>	3,5 <sup>n.s.</sup>	0,71	100
12	<i>H. strumosus</i>	3,67	bcd	1,23	1,0-5,2	3 <sup>n.s.</sup>	3,5 <sup>n.s.</sup>	3,5 <sup>n.s.</sup>	0,67	100
13	<i>H. microcephalus</i>	3,68	bcd	1,00	1,7-5,6	-	-	-	0,83	100
14	<i>H. x laetiflorus</i>	3,75	bcd	1,18	1,5-5,6	-	3 <sup>n.s.</sup>	-	0,91	100
15	<i>H. maximiliani</i> AC 4	3,88	bcd	1,34	1,4-5,8	-	-	-	0,72	100
16	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>subrhomboideus</i> R 1	3,92	cd	1,22	1,7-6,0	-	-	-	0,83	100
17	<i>H. decapetalus</i>	4,38	d	1,85	1,3-7,4	28,6 <sup>**</sup>	28,6 <sup>**</sup>	10,7 <sup>**</sup>	1,34	100
18	<i>H. atrorubens</i>	6,39	e	1,57	2,9-8,9	71,4 <sup>***</sup>	71,4 <sup>***</sup>	42,9 <sup>***</sup>	1,12	100
19	<i>H. grosseserratus</i>	7,16	ef	1,51	4,5-10,4	89,3 <sup>***</sup>	96,4 <sup>***</sup>	67,8 <sup>***</sup>	1,84	100
20	<i>H. tuberosus</i>	8,01	f	1,89	5,5-11,4	100 <sup>***</sup>	100 <sup>***</sup>	96,4 <sup>***</sup>	1,46	100
21	<i>H. giganteus</i>	8,17	f	2,15	4,5-12,1	96,4 <sup>***</sup>	100 <sup>***</sup>	98 <sup>***</sup>	1,34	100
$\bar{X}$	Gesamtversuch	3,80		2,36	0,1-12,1	18,7	19,3	14,3	0,82	96,8

<sup>a)</sup> Rangbildung entsprechend ANOVA und TUKEY-Test, Mittelwerte aus 28 unabhängigen Versuchsdurchführungen (n = 4; N = 588).

<sup>b)</sup> Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$ ; unterschiedliche Indizes bedeuten signifikante Unterschiede.

<sup>c)</sup> Signifikanz entsprechend  $\chi^2$ -Test, n.s. nicht signifikant, \*\*\* Signifikanz zum Niveau  $\alpha=0,1\%$ , \*\*  $\alpha=1\%$ .

<sup>d)</sup> Messung bis zum 8. Tag nach Inokulation.

Somit konnten lediglich 2% der Läsionsvariabilität aller Genotypen durch die Variabilität des Umweltfaktors „Jahr“ erklärt werden. Der weitaus größere Einfluss konnte über die Variabilität der Genotypen erklärt werden ( $\eta_g^2 = 0.74$ ). Wechselwirkungen des Typs Genotyp x Jahr, welche sich im mittleren Rangwechsel der Genotypen über die Jahre zeigen würden, bestanden nicht ( $\alpha > 90\%$ ). Die wesentlichen Kennwerte der genotypischen- und Umwelteffekte sowie deren Interaktionen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Einen starken Einfluss auf die Läsionslänge aller Inokulationen und Jahre konnte sowohl für die Inokulationszeitpunkte ( $\alpha = 0,1\%$ ;  $\eta_e^2 = 0.86$ ) als auch für die Wechselwirkung Inokulationszeitpunkt x Genotyp ( $\alpha = 0,1\%$ ;  $\eta_{ge}^2 = 0.72$ ) ermittelt werden. Tendenzen im Hinblick auf eine Altersabhängigkeit der Stängelreaktion gegenüber *Sclerotinia* waren jedoch nicht zu erkennen. Jeder der fünf pro Jahr durchgeführten Inokulationstermine zeigte ein distinktes Niveau hinsichtlich der Läsionslänge. Wechselwirkungen zwischen dem Inokulationszeitpunkt und der Genotypen manifestierten sich wie bereits weiter oben dargelegt im starken Rangwechsel der empfindlichen und besonders der intermediär evaluierten Wildarten. Insbesondere die Genotypen *H. pauciflorus ssp. subrhomboideus* R 1, *H. maximiliani* AC 4, *H. maximiliani* AC 1 und *H. decapetalus* vollzogen in Abhängigkeit vom Inokulationszeitpunkt starke Rangwechsel und zeigten damit wechselnde Empfindlichkeiten gegenüber *Sclerotinia*-Stängelbefall. Als ausgesprochen Umweltkonstante Genotypen hinsichtlich der *Sclerotinia*-Resistenzreaktion des Stängels konnten die partiell resistenten Wildarten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M und *H. maximiliani* AC 7 evaluiert werden.

**Tabelle 9:** Varianzanalyse, Interaktionskoeffizienten <sup>a)</sup> und Varianzkomponenten <sup>b)</sup> im zweijährigen Freilandversuch des *Sclerotinia*-Resistenzscreenings an 21 Genotypen (Experiment I)

VU	df	SQ	MQ	F	Varianzkomponenten <sup>b)</sup>			
					$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{ge}^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	$\hat{\sigma}_P^2$
Genotyp	20	2417,2	120,86	80,044***	4,32***	0,043 n.s.	1,51	5,87
Fehler	567	856,12	1,51		Haupt- und Interaktions-Koeffizienten			
					$\eta_g^2$	$\eta_e^2$	$\eta_{ge}^2$	
Gesamt	587	3273,32			0.74	0.02	0.02	

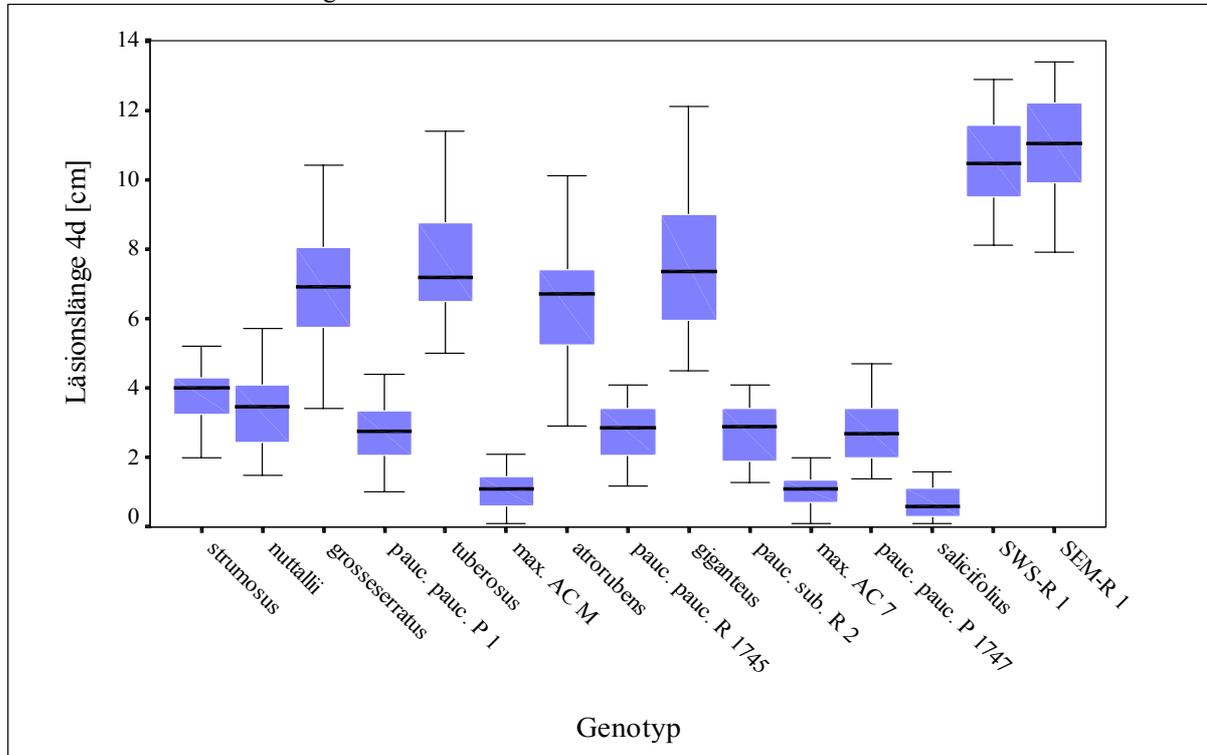
<sup>a)</sup> Interaktion Jahr x Genotyp.  $\hat{V}_g$  [%] = 73,5%. <sup>b)</sup> Wechselwirkungen Genotyp x Umwelt = Genotyp x Jahr + Genotyp x Inokulationszeitpunkt.

### Experiment II:

Im Experiment II wurden über drei Jahre in ihrer *Sclerotinia*-Stängelreaktion charakteristische Wildarten geprüft. Bei der Auswahl der Arten wurde insbesondere auf die Umweltstabilität des Merkmals Läsionslänge geachtet. Die im Feldversuch evaluierten Parameter sowie deren signifikant genotypischen Unterschiede sind in Tabelle 8

zusammengestellt. Die genotypischen Verteilungsparameter der vier Tage postinfektionell gemessenen Läsionslänge über alle Versuchsjahre sind graphisch in Abbildung 4 dargestellt. Zusätzlich wurden als Kontrolle im Jahr 2000 zwei *H. annuus* Restorerlinien aus der aktuellen HO-F<sub>1</sub>-Hybrid Züchtung verwendet.

**Abbildung 4:** BOX-WHISKER-Plot des Resistenzparameters – Läsionslänge nach 4 Tagen - zum Konfidenzintervall 95% von 13 *Helianthus*-Wildarten für 3 Jahre und zwei *H. annuus* Restorerlinien für das Jahr 2000 im *Sclerotinia* Stängelresistenztest



Die Ergebnisse des dreijährigen Screenings mit selektierten Wildarten waren hinsichtlich aller im Vorscreening evaluierten Charakteristika konsistent. Es bestanden hochsignifikante genotypische als auch Jahreseffekte bezüglich der Läsionslänge. Wechselwirkungen zwischen den Jahren und den evaluierten Wildarten bestanden nicht ( $\alpha > 30\%$ ). Ebenso wie im Vorscreening konnte ein Einfluss des Inokulationszeitpunktes als auch dessen Wechselwirkung mit einzelnen Arten ermittelt werden. Tendenzen im Hinblick auf eine altersabhängige Resistenzreaktion waren auch hier nicht zu erkennen. Durch die Beschränkung der evaluierten Wildarten auf charakteristisch teilresistente, intermediäre und suszeptible Reaktionstypen konnten klassenübergreifende Rangwechsel über die Jahre und Inokulationszeitpunkte vermieden werden. Alle weiteren biochemischen und histologischen Untersuchungen erfolgten mit dieser gezielten Genotyp-Selektion.

Auffällig waren die selbst im Vergleich zu den empfindlichsten Wildarten *H. giganteus*, *H. atrorubens*, *H. tuberosus* und *H. grosseserratus* im Mittel um 3,5cm längeren Läsionen (4d) der Restorerlinien SWS-R 1 und SEM-R 1. Im Verlauf der Pathogenese wies das *H. annuus* Inzuchtmaterial die größten Myzelwachstumsraten von über 3 cm pro Tag auf und spiegelten

sich entsprechend in den längsten, nach 8 Tagen final ermittelten Läsionslängen von über 25cm wieder (siehe dazu Abbildung 5).

**Tabelle 10:** Varianzanalyse, Interaktionskoeffizienten <sup>a)</sup> und Varianzkomponenten <sup>b)</sup> des dreijährigen *Sclerotinia*-Resistenzscreenings im Freiland an 13 Genotypen (Experiment II)

VU	df	SQ	MQ	F	Varianzkomponenten <sup>b)</sup>			
					$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{ge}^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	$\hat{\sigma}_P^2$
Genotyp	12	3929,55	327,46	226,08 ***	6,23 ***	0,11 n.s.	1,32	7,75
Fehler	663	960,29	1,448		Haupt- und Interaktions-Koeffizienten <sup>a)</sup>			
					$\eta_g^2$	$\eta_e^2$	$\eta_{ge}^2$	
Gesamt	675	4889,84			0.89	0.05	0.04	

<sup>a)</sup> Interaktion Jahr x Genotyp.  $\hat{V}_g$  [%] = 81,6. <sup>b)</sup> Wechselwirkungen Genotyp x Umwelt = Genotyp x Jahr + Genotyp x Inokulationszeitpunkt.

Ebenso wie im Vorscreening zeigten auch im dreijährigen Feldversuch die hocheilresistenten Genotypen *H. salicifolius* sowie die zwei *H. maximiliani* Akzessionen AC M und AC 7 eine große Umweltstabilität hinsichtlich ihrer Läsionslängen. Insbesondere *H. salicifolius* wies innerhalb des Versuchszeitraumes lediglich einen Rangwechsel auf und konnte bezüglich der Myzelausbreitung im Stängelgewebe und Läsionslänge als ausgesprochen resistente und konstante Wildart innerhalb des sekundären Genpools der Gattung *Helianthus* angesprochen werden (siehe dazu auch Abbildung 6).

**Tabelle 11:** Ergebnisse der 1998, 1999 und 2000 durchgeführten Feldresistenzprüfungen von 13 perennierenden *Helianthus*-Wildarten und zwei *H. annuus* HO-Restorerlinien auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Stängelinokulation (Experiment II)

Rang <sup>a)</sup>	Genotyp	Läsionslänge nach 4d [cm]				Sklerotien- Index <sup>c)</sup>	Welke- Index <sup>c)</sup>	Total- Verluste <sup>c)</sup>	Myzel- Wachstum <sup>d)</sup>	Inkubations- Index <sup>c)</sup>
		$\bar{x}$	SCHEFFE-T. <sup>b)</sup>	S <sub>d</sub>	X <sub>min</sub> -X <sub>max</sub>					
1	<i>H. salicifolius</i>	0,71	a	0,44	0,1-1,6	-	-	-	0,22	52 <sup>***</sup>
2	<i>H. maximiliani</i> AC 7	1,03	a	0,43	0,1-2,0	-	-	-	0,24	98 <sup>n.s.</sup>
3	<i>H. maximiliani</i> AC M	1,05	a	0,51	0,1-2,1	-	-	-	0,29	100
4	<i>H. pauciflorus ssp. subrhomboideus</i> R 2	2,68	b	0,86	1,3-4,1	-	-	-	0,62	100
5	<i>H. pauciflorus ssp. pauciflorus</i> P 1745	2,69	b	0,83	1,2-4,1	-	-	-	0,66	100
6	<i>H. pauciflorus ssp. pauciflorus</i> P 1	2,74	b	0,87	1,0-4,4	-	-	-	0,63	100
7	<i>H. pauciflorus ssp. pauciflorus</i> P 1747	2,79	b	0,95	1,4-4,7	-	-	-	0,71	100
8	<i>H. nuttallii</i>	3,37	b	1,01	1,5-5,7	1,9 <sup>n.s.</sup>	3,8 <sup>n.s.</sup>	1,9 <sup>n.s.</sup>	1,04	100
9	<i>H. strumosus</i>	3,70	b	1,07	1,0-5,2	1,9 <sup>n.s.</sup>	1,9 <sup>n.s.</sup>	3,6 <sup>n.s.</sup>	1,09	100
10	<i>H. atrorubens</i>	6,33	c	1,69	2,9-10,1	67,3 <sup>***</sup>	65,4 <sup>***</sup>	51,0 <sup>***</sup>	1,50	100
11	<i>H. grosseserratus</i>	6,92	cd	1,66	3,4-10,4	86,5 <sup>***</sup>	86,5 <sup>***</sup>	64,0 <sup>***</sup>	1,76	100
12	<i>H. giganteus</i>	7,60	d	2,04	4,5-12,1	94,2 <sup>***</sup>	88,5 <sup>***</sup>	84,2 <sup>***</sup>	1,98	100
13	<i>H. tuberosus</i>	7,70	d	1,72	5,0-11,4	100 <sup>***</sup>	88,5 <sup>***</sup>	94,2 <sup>***</sup>	1,98	100
$\bar{X}$	Gesamtversuch	3,79		2,69	0,1-12,1	29,4	28,3	23,0	1,04	96,15
14	<i>H. annuus</i> L. SWS-R1 <sup>e)</sup>	10,54	e	1,39	8,1-12,9	100	91,6	75	3,37	100
15	<i>H. annuus</i> L. SEM-R 1 <sup>e)</sup>	10,88	e	1,69	7,9-13,4	91,6	91,6	66	3,10	100

<sup>a)</sup> Rangbildung entsprechend ANOVA und SCHEFFE-Test, Mittelwerte aus 13 unabhängigen Versuchsdurchführungen (n = 4; N = 692).

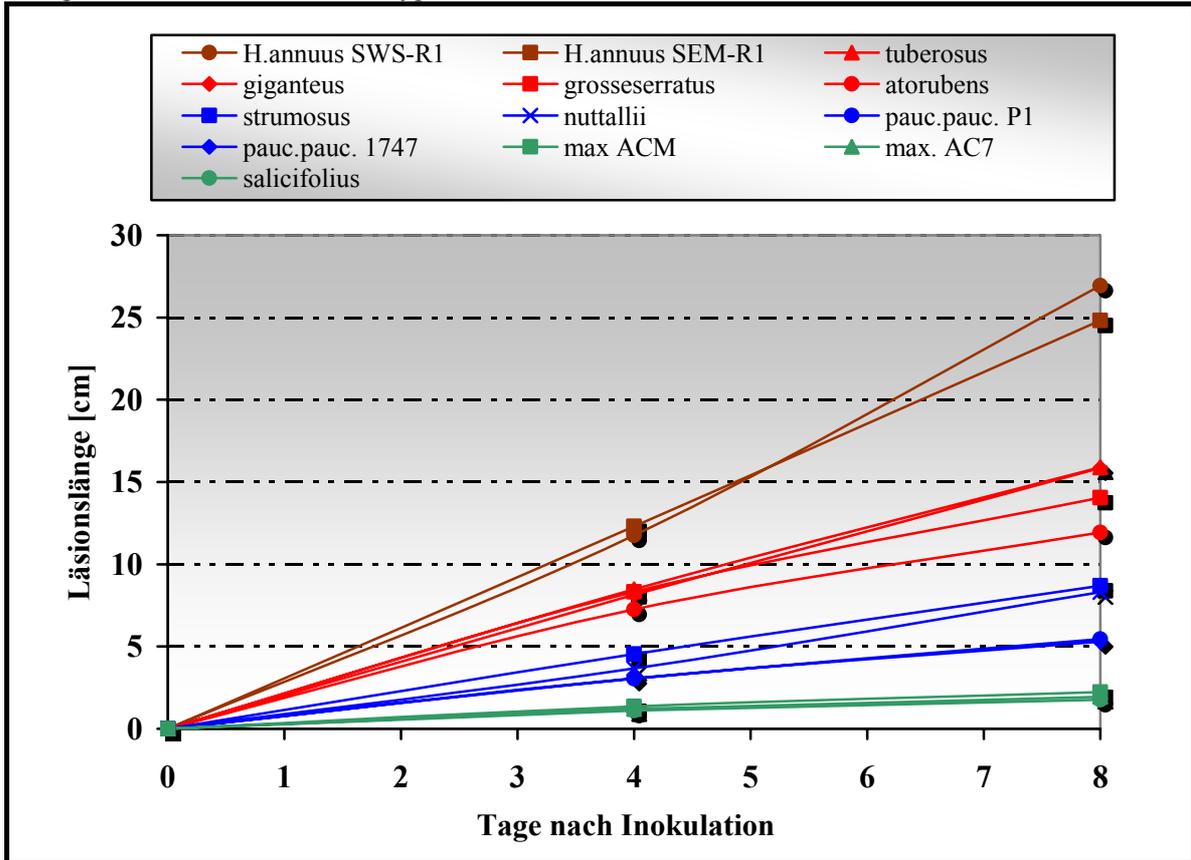
<sup>b)</sup> Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$ ; unterschiedliche Indizes bedeuten signifikante Unterschiede.

<sup>c)</sup> Signifikanzen entsprechend  $\chi^2$ -Test. n.s nicht signifikant, \*\*\* Signifikanz zum Niveau  $\alpha=0,1\%$ .

<sup>d)</sup> Messung bis zum 8. Tag nach Inokulation.

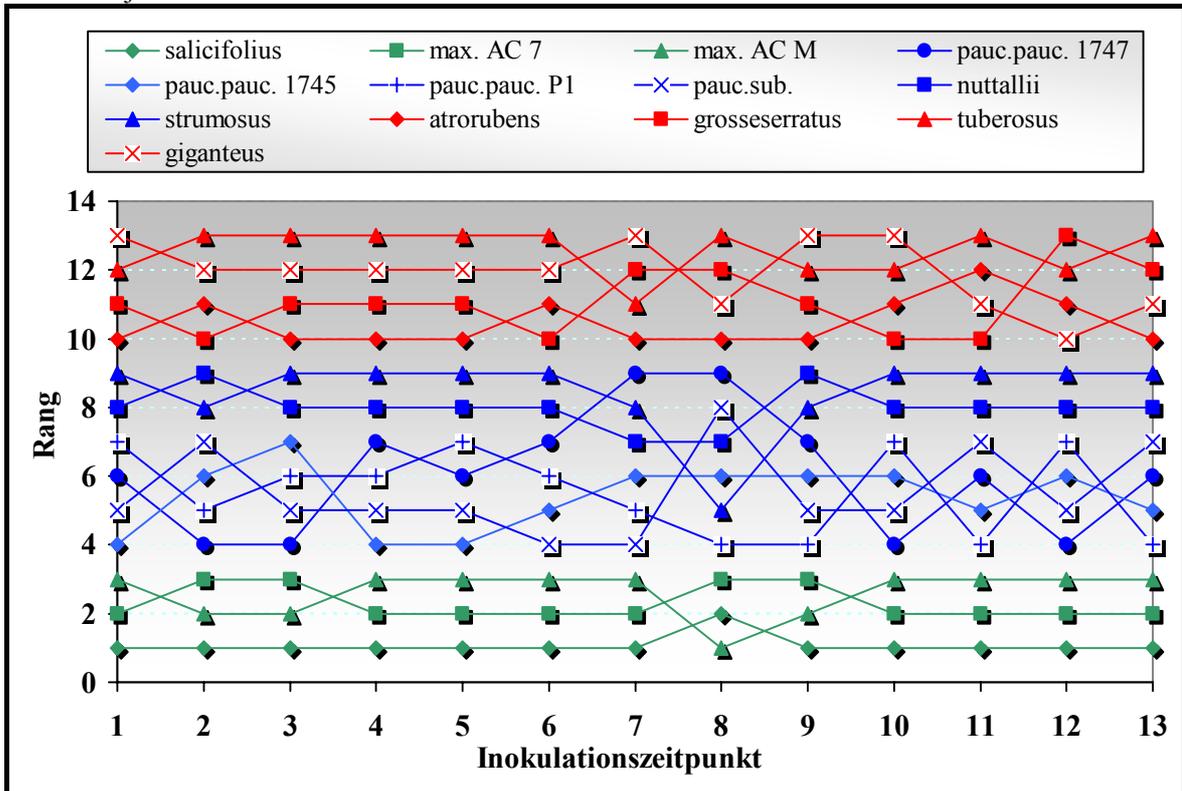
<sup>e)</sup> Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen im Jahr 2000 (N = 12).

**Abbildung 5:** Ausbreitungsmuster des *Sclerotinia*-Myzels in befallenen Sprossachsen ausgewählter *Helianthus* Genotypen <sup>a)</sup>.



<sup>a)</sup> Farbcodierungen: ■ = hohe Partialresistenz; ■ = intermediärer Reaktionstypus; ■ = susceptibler Reaktionstypus; ■ = HO-Inzuchtlinien.

**Abbildung 6:** Umweltstabilität des Merkmals Läsionslänge der Sprossachse (4d) über drei Versuchsjahre <sup>a) b)</sup>



<sup>a)</sup> Farbcodierungen: ■ = erhöhte Partialresistenz; ■ = intermediärer Reaktionstypus; ■ = susceptibler Reaktionstypus. <sup>b)</sup> Inokulationszeitpunkte 1-5 1998, 6-10 1999 und 11-13 im Jahr 2000 evaluiert.

### 3.1.1.2 Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und Korrelation zum Hauptboniturmerkmal Läsionslänge

Durch das Monitoring kausal mit der Pathogenese sowie dem perthotropen Myzelwachstum von *Sclerotinia sclerotiorum* verbundener Parameter sollten potentielle, die Pathogenese inhibierende bzw. verzögernde Eigenschaften der getesteten Wildarten ermittelt werden. Darüber hinaus sollte durch Korrelationen deren Zusammenhang mit der Hauptbonitur Läsionslänge aufgeklärt werden. Diese können als Maß für die Vertrauenswürdigkeit der nach 4 Tagen gemessenen Läsionen dienen. Resistenzphänomene gegenüber der erfolgreichen Besiedlung von Pathogenen können während des gesamten Verlaufs der Pathogenese auftreten (Prell, 1996). Der Verlauf der Pathogenese wird zeitlich in mehrere Abschnitte eingeteilt und umfasst die Infektionszeit, die Inkubationszeit sowie die für epidemiologische Aspekte bedeutsame Sporulationszeit und dessen Dauer (Hoffmann et al., 1994, Prell & Day, 2001). Als Maß für potentielle Penetrationsbarrieren, welches sich in einer verlängerten Inkubationszeit äußert, wurde die Anzahl an Individuen pro Genotyp ermittelt, die 36h postinfektionell charakteristische *Sclerotinia* Symptome aufwiesen. Als charakteristischer Parameter einer vollständig durchlaufenen Pathogenese wurde das Auftreten von melanisierten Sklerotien sowohl auf der Stängeloberfläche als auch im Stängelmark eruiert. Abweichungen der Wildarten hinsichtlich des *Sclerotinia*-Myzelwachstums wurden über die Myzelwachstumsrate, qualitative Unterschiede im befallenen Sprossgewebe über visuelle Welkesymptome und Totalausfälle gesamter Pflanzen bestimmt.

Eine hochsignifikant ( $\alpha = 0,1\%$ ;  $N=28$ ) verzögerte Inkubationszeit in allen Feldversuchen wies *H. salicifolius* auf. Über drei Jahre wiesen lediglich 52% aller inokulierten Pflanzen dieser Wildartpopulation nach 36h *Sclerotinia*-typische Läsionen auf. Vier Tage nach Inokulation zeigten 92% (n. s.) aller *H. salicifolius* Pflanzen eine erfolgreiche Besiedlung durch *Sclerotinia sclerotiorum*. Alle anderen Wildarten zeigten im Mittel mit 96% aller artifiziellen Inokulationen bereits nach 36h sichtbare Läsionen.

Grundsätzlich wiesen alle über die Läsionslänge als suszeptibel evaluierten Genotypen bei 50% der getesteten Individuen Sklerotien im Sprossmark, Welkesymptome und Totalverluste auf. Eine weitgehend behinderte Pathogenese von *Sclerotinia* konnte im Sprossgewebe von *H. salicifolius*, aller Akzessionen von *H. maximiliani* und *H. pauciflorus ssp.* sowie von *H. divaricatus* und *H. microcephalus* detektiert werden. In keinem der genannten Wildarten konnten makroskopisch als auch mikroskopisch die typischen Verbreitungseinheiten von *Sclerotinia sclerotiorum* in Form von melanisierten Sklerotien aufgefunden werden.

Die oben genannten Zusammenhänge zwischen den über die Läsionslänge charakterisierten *Sclerotinia*-Resistenztypen und den auf die Pathogenese bezogenen Charakteristika (Sklerotien, Welkesymptome, Totalverluste und Myzelwachstumsrate) spiegeln sich grundsätzlich in den durchweg hochsignifikanten ( $\alpha = 1\%$  bzw.  $0,1\%$ ) und streng positiven Korrelationen zwischen den nach vier Tagen ermittelten Läsionslängen und diesen Parametern wieder (siehe Tabelle 12).

Die hohen bis sehr hohen Korrelationen wiesen hiermit auf eine vertrauenswürdige Voraussagbarkeit des Resistenzverhaltens über die nach vier Tagen ermittelten Läsionslängen hin.

**Tabelle 12:** Phänotypische Korrelationen für fünf Resistenzparameter der *Sclerotinia* Stängelresistenz über zwei Jahre an 21 *Helianthus* Genotypen evaluiert

Parameter	Läsionslänge (4d p.i.)	Sklerotien- Index	Welke- Index	Totalver- luste
Myzelwachstumsrate	0,98**	0,81**	0,82**	0,77**
Totalverluste	0,88***	0,84***	0,79***	
Welke-Index	0,93***	0,95***		
Sklerotien-Index	0,96***			

\*\* , \*\*\* Signifikanz zu  $\alpha = 1\%$  bzw.  $0,1\%$ .

Somit können schon zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach artifizierlicher Inokulation Aussagen über das Resistenzniveau der Wildarten hinsichtlich *Sclerotinia* Stängelfäule getroffen werden. Ebenso wiesen die Parameter untereinander signifikant hohe bis sehr hohe Korrelationen auf und weisen damit auf deren potentiell kausalen Abhängigkeiten hin.

### 3.1.1.3 Phänologische Charakteristika der Stängelreaktion auf *Sclerotinia sclerotiorum* Inokulation

Auch hinsichtlich der Phänologie der *Sclerotinia*-Stängelreaktion zeigten sich charakteristische genotypische Unterschiede. Grundsätzlich wiesen die teilresistenten Arten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M und AC 7 eng umgrenzte, trockene nekrotische Reaktionen auf. Meist ging diese Reaktion nach zwei bis vier Tagen postinfektionell mit einer starken Melanisierung des betroffenen Gewebes einher. Dagegen zeigten die suszeptiblen Genotypen *H. giganteus*, *H. atrorubens*, *H. tuberosus* und *H. grosseserratus* sowie das HO-Inzuchtmaterial in der Regel wässrige, hell braune Läsionen.

Insbesondere bei *H. tuberosus* und den *H. annuus* Linien SWS-R1 und SEM-R1 konnte lediglich eine marginale visuelle Differenzierung zwischen gesunden und *Sclerotinia* befallenen Internodalabschnitten beobachtet werden. Infiziertes Gewebe war bei diesen *Helianthus* Arten nur an einer wassergesättigten leicht dunkler gefärbten Zone erkennbar. Unter stark bewölkten und / oder feuchten Witterungsbedingungen zeigten diese Genotypen nach Inokulation anthocyanartige Verfärbungen des penetrierten Sprossachsgewebes als auch des angrenzenden gesunden Stängelgewebes (siehe Abbildung 7 t).

Im Hinblick auf die Stängelreaktion der intermediär reagierenden Genotypen zeigten diese in ihrer phänologischen Reaktion auf *Sclerotinia* Inokulation keinen einheitlichen Typus. In Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen zur Infektion wurden unter lichtreichen Bedingungen dunkle Nekrosen vorgefunden. Bei überwiegend hoher Sonneneinstrahlung zu den

Inokulationszeiträumen glichen die induzierten Läsionen mit dunklen Nekrosen damit überwiegend denen der teilresistenten Genotypen. Während zu überwiegend bewölkten Inokulationszeitpunkten mehr wässrige, den suszeptiblen Genotypen ähnliche Reaktionen vorgefunden wurden.

Unterschiede zwischen den evaluierten Arten hinsichtlich der Richtung der Myzelausbreitung längs der Sprossachse bestanden nicht. In allen inokulierten Arten erfolgte die Läsionsausbreitung longitudinal sowohl basal als auch apikal. Jedoch bestanden starke Unterschiede in der radiären Ausbreitung des Myzels. *Sclerotinia* empfindliche Arten zeigten neben der raschen longitudinalen Läsionsvergrößerung eine ebenso rasche radiäre Myzelausbreitung. Im Mittel wiesen über 90% Individuen der suszeptiblen Genotypen vier Tage nach Inokulation am gesamten Sprossumfang mazeriertes bzw. nekrotisiertes Cortexgewebe auf. Eine stängelumfassende Läsion ging bei den Arten *H. giganteus*, *H. atrorubens*, *H. tuberosus* und *H. grosseserratus* in der Regel mit starken Welkesymptomen des oberen Pflanzenteiles einher. Teilresistente Genotypen wiesen dagegen eine stark inhibierte radiäre Myzelausbreitung auf. Eine basale sowie apikale Läsionsvergrößerung dominierte bei diesen Arten gegenüber einer radiären. Stängelumfassende Läsionen traten 8 Tagen nach Inokulation im Mittel bei 5% der evaluierten teilresistenten Wildarten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M und AC 7 auf, jedoch ohne charakteristische Welkesymptome zu zeigen.

Bei hoher Luftfeuchtigkeit zeigten alle suszeptiblen Wildarten sowie *H. strumosus*, *H. decapetalus* und die beiden *H. annuus* Inzuchtlinien starken Oberflächenwuchs von *Sclerotinia*-Myzel auf. Gleichzeitig wiesen diese Genotypen auf der mazerierten Sprossoberfläche makroskopisch sichtbare Sklerotien auf. Insbesondere *H. tuberosus* zeichnete sich bei diesen Witterungsbedingungen durch ein massenhaft auftretendes Oberflächenmyzel aus. Dieses führte im Extremfall zur Reinfektion gesunder Internodalabschnitte durch epiphytisch auf der Sprossepidermis wachsendes *Sclerotinia*-Myzel und zur Entwicklung auffallend großer (> 0,5cm) Oberflächensklerotien.

Extrem trockene und warme Witterung (Tagestemperaturen >25°C, kein Niederschlag) führte häufig zur Termination jeglicher visuellen Myzelaktivitäten und spiegelten sich in einem Stillstand der Läsionsausdehnung wieder. Dieser Effekt war jedoch bei den meisten evaluierten Arten lediglich temporärer Natur. Nach einem Wechsel zu feuchteren und kühleren Witterungsbedingungen konnte durch eine wieder einsetzende Läsionsvergrößerung Myzelaktivität im befallenen Sprossgewebe nachgewiesen werden. Häufig zeigte sich bei einem Witterungswechsel zu feuchteren Bedingungen ein wieder aufkommender, konzentrischer Myzelauswuchs um die Inokulationsstelle (siehe Abb. 5j). Lediglich die partiell resistenten Arten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M und AC 7 zeigten nach solchen Witterungswechseln durch das Fehlen einer wiederaufkommenden Extension der Läsionen eine weitgehende Termination des Myzelwachstums im befallenen Sprossgewebe.

Des Weiteren konnten in allen Populationsakzessionen von *H. pauciflorus ssp.* und *H. salicifolius* prä- als auch postinfektionell Harzausscheidungen an den Internodalsegmenten beobachtet werden. Präinfektionell zeigten sich diese als klare globuläre, 1-20mm große, distinkte Harzkonkremente (siehe dazu Abbildung 7p). Nach *Sclerotinia*-Inokulation zeigten sie sich dagegen als diffuser, die Inokulationsstelle umgebender, braun-schwarzer Film.

**Abbildung 7:** Charakteristische phänotypische Diversität der *Sclerotinia*-Stängelfäule im sekundären *Helianthus* Genpool nach artifizierlicher Inokulation der Internodien\*:

Suzeptibler Reaktionstypus Abb. **a) - h)**:

**a) – c)** zeitlicher Ablauf der Pathogenese bei *H. giganteus* mit **a)** fortgeschrittener, bereits stängelumfassender Läsion 36h nach Inokulation mit stark mazeriertem Rindenparenchym, **b)** 3d postinfektionell und **c)** nach 4d mit kompletter Zerstörung des Stängelgewebes und charakteristischem Abbrechen der Sprossachse an der Inokulationsstelle. **d)** Restorer-Inzuchtlinie SWS-R1 4d postinfektionell mit wässriger, ausgedehnter Läsion und fortgeschrittenem Welkesymptom des apikal inserierten Blattes. **e) – g)** *Sclerotinia*-Stängelfäule an *H. tuberosus* mit **e)** 2d postinfektionell, wässrige, stängelumfassender Läsion, **f)** 3d nach Inokulation mit stark ausgedehnter Läsion und beginnende Welkesymptome der Blätter und **g)** durchschnittlich 4d nach Inokulation erfolgte ein komplettes Absterben der Sprossachse am Inokulationsort, **h)** Umfassende, weit ausgedehnte Stängelfäule bei *H. grosseserratus* 4d nach Inokulation.

Partiell resistenter Phänotyp Abb. **i) - l)**:

**i)** *H. maximiliani* AC 7 4d postinfektionell mit lokal begrenzter, stark melanisierter nekrotischer Reaktion, **j)** *H. maximiliani* AC 7 - 6d nach Inokulation - unter feuchten Witterungsverhältnissen kam es häufig zu temporären, konzentrischen Myzelauswüchsen die jedoch zu keiner Läsionsvergrößerung führten; **k)** *H. salicifolius* 4d nach Inokulation und **l)** *H. maximiliani* AC M 4d postinfektionell.

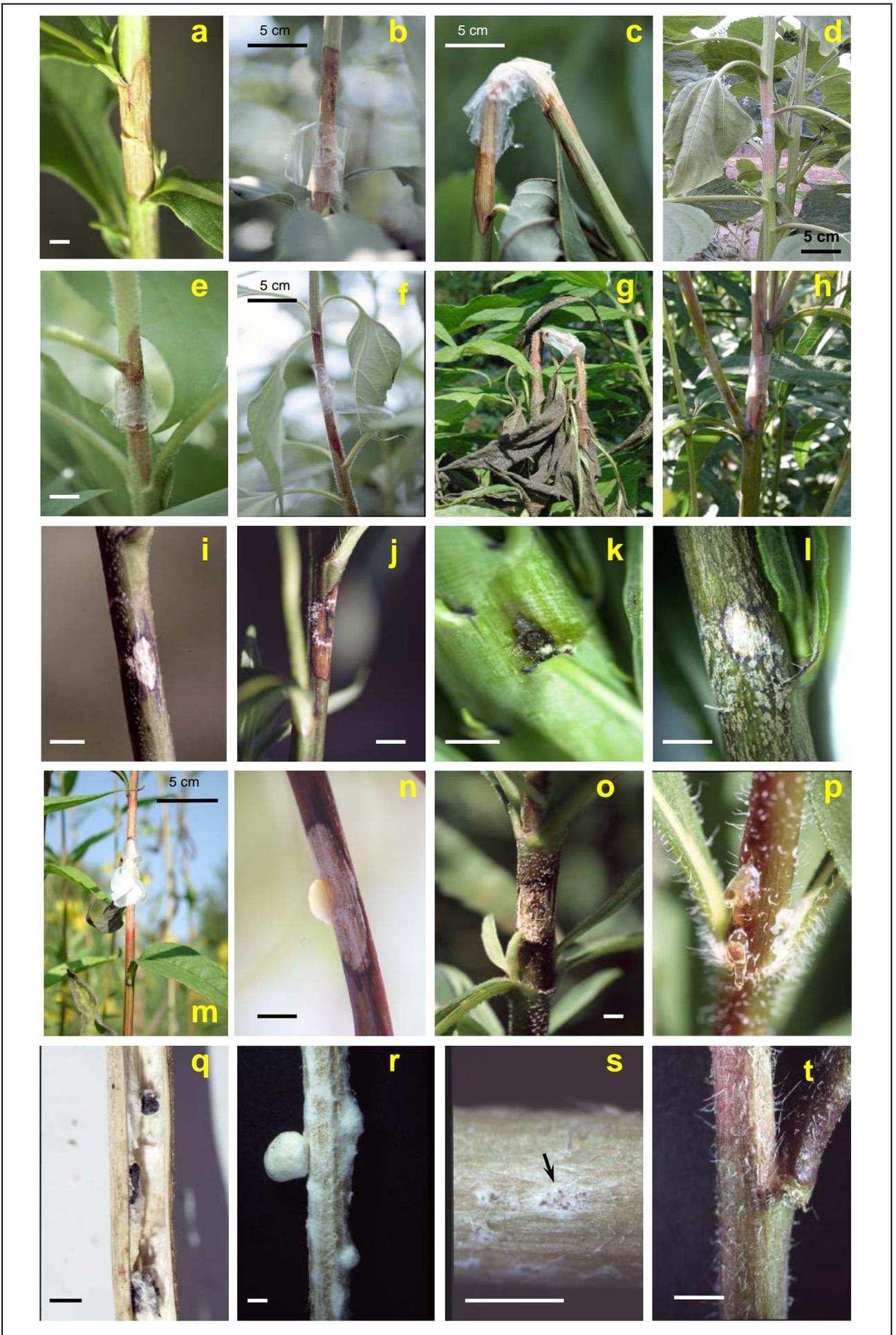
Intermediärer Reaktionstypus Abb. **m) – o)**:

**m – n)** divergenter Resistenz-Phänotyp bei *H. nuttallii* in Abhängigkeit von der Witterung zur Inokulation - **m)** suszeptible Reaktion bei extrem feuchter und kühler Witterung zum Testzeitraum (20 mm Niederschlag, 18°C) 4d nach Inokulation, **n)** partiell resistenter Phänotyp bei trockener, warmer Witterung (0mm Niederschlag, 24°C) 4d postinfektionell; **o)** *H. pauciflorus ssp. subrhomboides* R 1 4d postinfektionell. **p)** charakteristische globuläre Harzausscheidung der Sprossachse von *H. pauciflorus ssp.*

Pathogenese bezogene Parameter der *Sclerotinia*-Infektion Abb. **q) – t)**:

**q)** Sklerotienansammlung im Stängelmark von *H. giganteus*; **r)** starker oberflächlicher Myzelauswuchs mit Sklerotieninitialen >1cm bei *H. tuberosus* 4d nach Inokulation; **s)** Mikrosklerotien (Pfeil) auf einem *H. strumosus* Stängelsegment (Aufnahme: Olympus SZH); **t)** Mikroskopische Nahaufnahme einer suszeptiblen Reaktion von *H. tuberosus* mit anthocyanartiger Verfärbung des penetrierten Gewebes (Aufnahme: Olympus SZH).

\* Größenverhältnisse: Balken entsprechen 0,5cm wenn nicht anders indiziert.



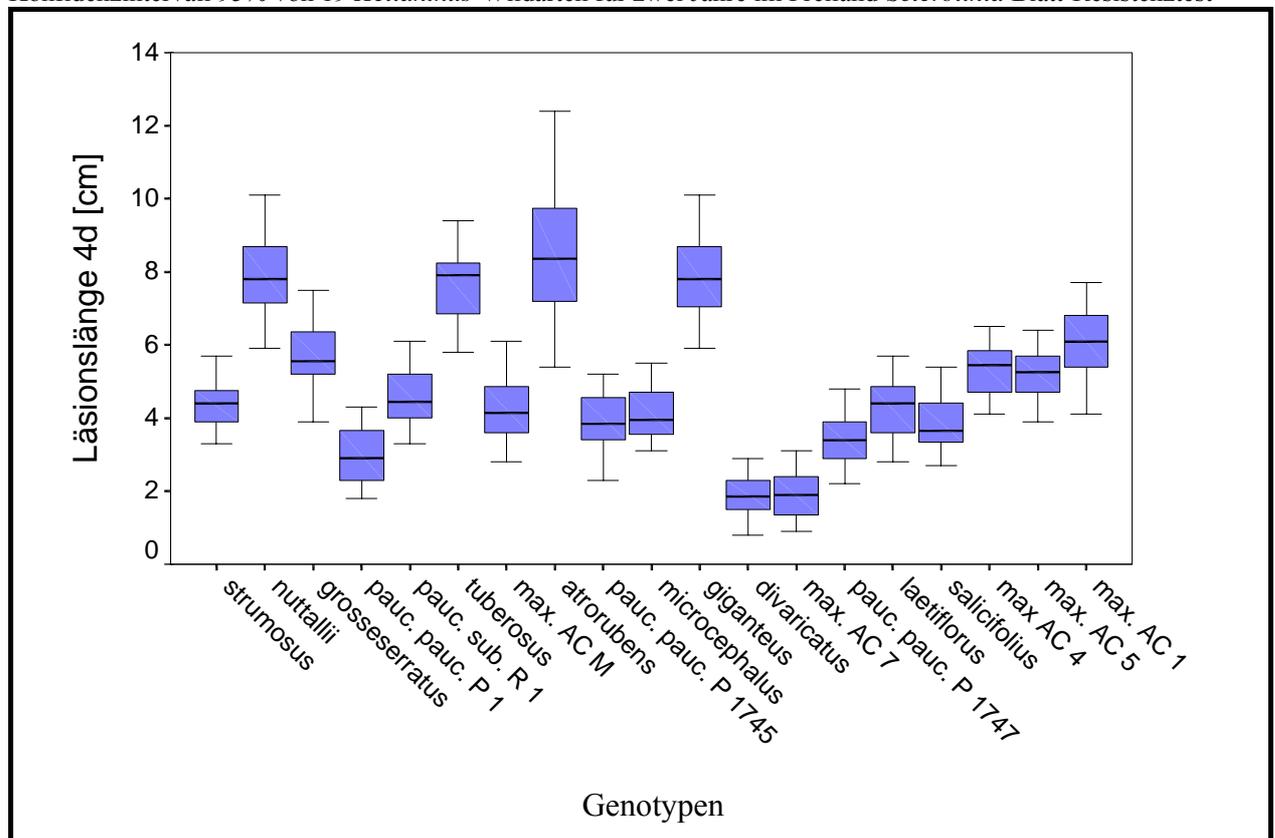
### 3.1.2 *Sclerotinia*-Blattreaktion im Freiland

#### 3.1.2.1 Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Blätter und Umweltkonstanz des Merkmals Läsionslänge

Alle im zweijährigen Feldversuch evaluierten Parameter zur *Sclerotinia* Blattreaktion sowie deren signifikant genotypischen Unterschiede sind in Tabelle 14 aufgezeigt. Die genotypischen Verteilungsparameter der vier Tage postinfektionell gemessenen Blattläsionen über die Versuchsjahre sind graphisch in Abbildung 8 dargestellt.

Hinsichtlich des Infektionserfolges zeigten sich keine signifikanten genotypischen Unterschiede. Zu allen Blatt-Feldresistenztests und an allen evaluierten Wildarten konnten 4 Tage nach Inokulation charakteristische *Sclerotinia*-Blattläsionen visuell erfasst werden.

**Abbildung 8:** BOX-WHISKER-Plot des Resistenzparameters – Läsionslänge nach 4 Tagen - zum Konfidenzintervall 95% von 19 *Helianthus*-Wildarten für zwei Jahre im Freiland-*Sclerotinia* Blatt-Resistenztest



Im Mittel der Jahre und Inokulationen wiesen sich im Screening-Verfahren hochsignifikante ( $\alpha=0,1\%$ ,  $N = 304$ ) Unterschiede der nach 4d ermittelten Blattläsionslänge aus. Die geringsten Blattläsionslängen nach 4d mit 1,86 bzw. 1,91cm und die gleichzeitig niedrigsten Myzelwachstumsraten zeigten mit durchschnittlich 0,45cm/d *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC 7. Die Blätter der *Helianthus* Wildarten *H. atrorubens*, *H. nuttallii*, *H. giganteus* und *H. tuberosus* erwiesen sich dagegen als extrem empfindlich auf *Sclerotinia* Befall. Sie zeigten nach 4 Tagen die größten Blattläsionen (7,64cm-8,44cm) und die schnellsten Myzelwachstumsraten mit 1,61cm/d – 1,85cm/d. Diese Wildarten zeichneten sich im Vergleich zu allen evaluierten

Genotypen durch einen signifikanten ( $\alpha=0,1\%$  bzw.  $1\%$ ) und starken Myzeleinwuchs vom Blatt über die Petiole in die Sprossachse aus und wiesen damit den natürlichen Infektionsverlauf der Stängelfäule im annuellen Genpool der Kultursonnenblume auf. Ein Großteil der Wildarten zeigte hinsichtlich der Blattläsionslänge einen intermediären Typus. Diese Arten waren häufig durch besonders große mittlere Rangwechsel sowohl zwischen den Versuchsjahren als auch Inokulationszeitpunkten charakterisiert (siehe Abbildung 9). Eine typische Alters und/oder Jungendresistenz der Blätter auf *Sclerotinia*-Befall konnte zum Versuchszeitraum ebenso wie zur Stängelinokulation nicht nachgewiesen werden.

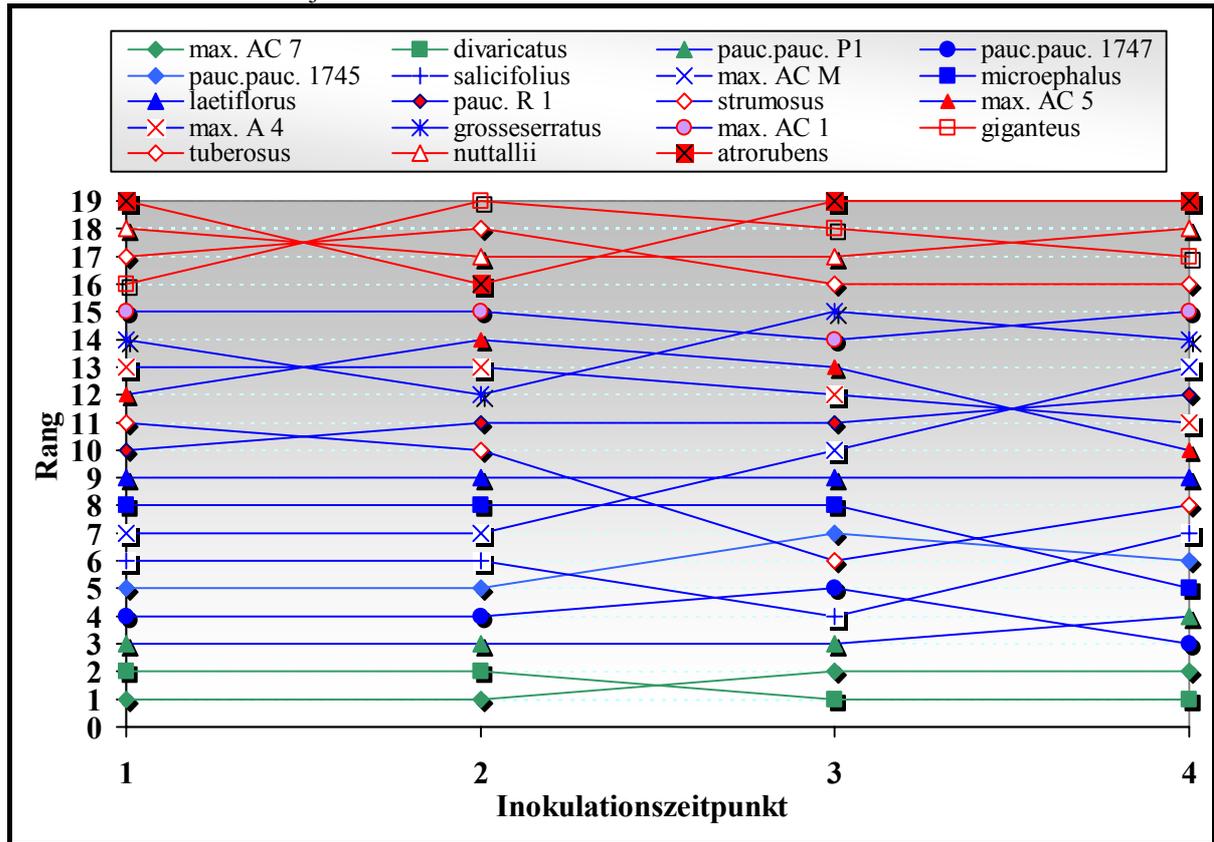
**Tabelle 13:** Varianzanalyse, Interaktionskoeffizienten <sup>a)</sup> und Varianzkomponenten <sup>b)</sup> des zweijährigen *Sclerotinia*-Blatt-Resistenzscreenings im Freiland an 19 *Helianthus* Wildarten

VU	df	SQ	MQ	F	Varianzkomponenten <sup>b)</sup>			
					$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{ge}^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	$\hat{\sigma}_P^2$
Genotyp	18	1095,65	60,86	70,30***	3,73***	0,07**	0,66	4,46
Fehler	285	246,75	0,86		Haupt- und Interaktions-Koeffizienten <sup>a)</sup>			
					$\eta_g^2$	$\eta_e^2$	$\eta_{ge}^2$	
Gesamt	304	1342,41			0.86	0.21	0.11	

<sup>a)</sup> Interaktion Jahr x Genotyp.  $\hat{V}_g$  [%] = 83. <sup>b)</sup> Wechselwirkungen Genotyp x Umwelt = Genotyp x Jahr + Genotyp x Inokulationszeitpunkt.

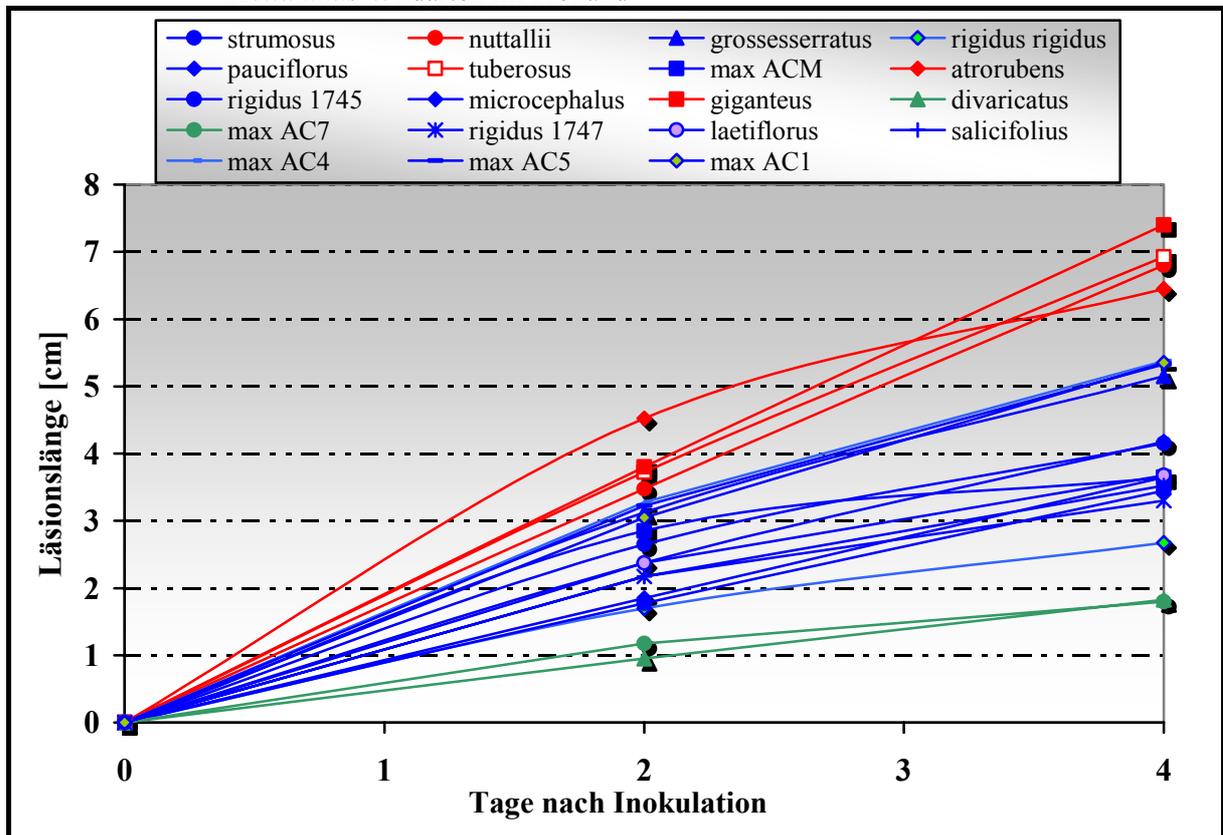
Im Freilandscreening der Blattresistenz zeigten sich sowohl Jahreseffekte ( $\eta_e^2 = 0.21$ ) als auch Wechselwirkungen vom Typ Jahr x Genotypen ( $\eta_{ge}^2 = 0.11$ ). Ebenso konnten sowohl ein signifikanter Einfluss des Inokulationszeitpunktes ( $\eta_e^2 = 0.26$ ) auf die Blattläsionen als auch der Wechselwirkung Inokulationszeitpunkt x Genotyp ( $\eta_{ge}^2 = 0.27$ ) nachgewiesen werden. Die Schätzung der Varianzkomponenten zeigt, dass der weitaus größere Einfluss auf die Variabilität der Läsionslänge über die Variabilität der Genotypen erklärt werden konnte. Der Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Gesamtvarianz der Blattläsionslänge betrug über 80%. Lediglich 2% der Variabilität der Blattläsionen konnten über Schwankungen der Umweltfaktoren erklärt werden. Der Einfluss der Genotypen auf die Variabilität der Blattläsionslänge war somit ebenso wie zum Stängelttest weitaus größer als mikro- (Inokulationszeitpunkte) und jahresklimatische (Jahre) Schwankungen zum Versuchszeitraum. Als besonders umweltstabile Genotypen hinsichtlich der nach 4 Tagen ermittelten Blattläsionen konnten die Genotypen *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC 7 evaluiert werden. Da diese beiden Wildarten darüber hinaus die kleinsten Läsionen und geringsten Myzelwachstumsraten aufwiesen, können sie hinsichtlich der *Sclerotinia*-Feld-Blattreaktion als partiell resistente *Helianthus*-Arten innerhalb des sekundären Genpools angesprochen werden.

**Abbildung 9:** Umweltstabilität des Merkmals Läsionslänge des Blattes im Freiland (4d) über zwei Versuchsjahre <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> Farbcodierungen: ■ = hohe Partialresistenz; ■ = intermediärer Reaktionstypus; ■ = suszeptibler Reaktionstypus. Inokulationszeitpunkte 1 und 2 = 1999, 3 und 4 = 2001 evaluiert.

**Abbildung 10:** Ausbreitungsmuster des *Sclerotinia*-Myzels in befallenen Blättern perennierender *Helianthus* Wildarten im Freiland <sup>a)</sup>



**Tabelle 14:** Ergebnisse der zwei jährigen Feldresistenzprüfungen von 19 perennierenden *Helianthus*-Wildarten auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Blatinokulation

Rang <sup>a)</sup>	Genotyp	Läsionslänge nach 4d [cm]				Sklerotien Index <sup>c)</sup>	nat. Inf. Verlauf <sup>c)</sup>	nat. Ascosporen Infektion <sup>c)</sup>	Myzel- wachstum <sup>d)</sup>	Inkubations- Index <sup>c)</sup>
		$\bar{x}$	TUKEY-T. <sup>b)</sup>	S <sub>d</sub>	X <sub>min</sub> -X <sub>max</sub>					
1	<i>H. divaricatus</i>	1,86	a	0,54	0,8-2,9	-	-	-	0,46	100
2	<i>H. maximiliani</i> AC 7	1,91	a	0,63	0,9-3,1	-	-	-	0,45	100
3	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1	2,96	a	0,79	1,8-4,3	-	-	-	0,67	100
4	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1747	3,43	b	0,74	2,2-4,8	-	-	-	0,83	100
5	<i>H. salicifolius</i>	3,84	bc	0,78	2,7-5,4	-	-	-	0,88	100
6	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1745	3,93	bcd	1,84	2,3-5,2	-	-	-	0,87	100
7	<i>H. microcephalus</i>	4,11	bcd	0,73	3,1-5,5	-	-	-	0,91	100
8	<i>H. x laetiflorus</i>	4,24	cd	0,68	2,8-5,7	-	-	-	0,92	100
9	<i>H. maximiliani</i> AC M	4,29	cde	0,94	2,8-6,1	-	-	-	0,91	100
10	<i>H. strumosus</i>	4,34	cde	0,71	3,3-5,7	-	-	-	1,03	100
11	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>subrhomboideus</i> R 1	4,61	def	0,82	3,3-6,1	-	-	-	1,04	100
12	<i>H. maximiliani</i> AC 5	5,20	efg	0,76	3,9-6,4	-	-	-	1,33	100
13	<i>H. maximiliani</i> AC 4	5,34	fg	0,73	4,1-6,5	12,5 <sup>n.s</sup>	12,5 <sup>n.s</sup>	-	1,34	100
14	<i>H. grosseserratus</i>	5,73	g	0,89	3,9-7,5	37,5 <sup>*</sup>	-	-	1,29	100
15	<i>H. maximiliani</i> AC 1	6,03	g	0,97	4,1-7,7	37,5 <sup>*</sup>	-	-	1,34	100
16	<i>H. tuberosus</i>	7,64	h	1,02	5,8-9,4	87,5 <sup>***</sup>	68,7 <sup>***</sup>	18,75 <sup>*</sup>	1,73	100
17	<i>H. giganteus</i>	7,89	h	1,22	5,9-10,1	75 <sup>***</sup>	68,7 <sup>***</sup>	-	1,85	100
18	<i>H. nuttallii</i>	7,94	h	1,17	5,9-10,1	87,5 <sup>***</sup>	56,25 <sup>***</sup>	-	1,70	100
19	<i>H. atrorubens</i>	8,44	h	1,79	5,4-12,4	87,5 <sup>***</sup>	52 <sup>**</sup>	-	1,61	100
$\bar{X}$	Gesamtversuch	4,93		2,11	0,8-12,4	22,4	13,4	14,3	1,11	100

<sup>a)</sup> Rangbildung entsprechend ANOVA und TUKEY-Test, Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchsdurchführungen (n = 4; N = 304).

<sup>b)</sup> Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$ ; unterschiedliche Indizes bedeuten signifikante Unterschiede.

<sup>c)</sup> Signifikanzen entsprechend  $\chi^2$ -Test. n.s nicht signifikant; \*, \*\*, \*\*\* Signifikanz zum Niveau  $\alpha=5\%$ ; 1% und 0,1%.

<sup>d)</sup> Messung bis zum 4. Tag nach Inokulation.

### 3.1.2.2 Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und Korrelation zum Hauptboniturmerkmal Blattläsionslänge

Hinsichtlich der Inkubationszeit konnte zwischen den Wildarten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen zeigten sie teilweise schon 12 h nach artifizierlicher Inokulation charakteristische Blattläsionen. Eine Penetrationsbarriere der Blätter gegenüber *Sclerotinia* Infektion konnte aus diesem Grund für alle Genotypen ausgeschlossen werden.

Über den gesamten evaluierten sekundären *Helianthus* Genpool zeigten sich durchweg signifikant positive bis stark positive Korrelationen zwischen dem Hauptboniturparameter Läsionslänge und der Myzelwachstumsrate sowie mit dem Auftreten von Sklerotien auf der Blattoberfläche (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Phänotypische Korrelationen für fünf phänotypische Blatt-Resistenzparameter über zwei Jahre an Blättern von 19 *Helianthus* Genotypen im Freiland evaluiert

Parameter	Läsionslänge (4d p.i.)	Sklerotien- Index	nat. Infektions- verlauf	nat. Ascosp. Infektion
Myzelwachstumsrate	0,98**	0,89**	0,83**	0,34 <sup>n.s.</sup>
nat. Ascosporeinfektion	0,17 <sup>n.s.</sup>	0,18 <sup>n.s.</sup>	0,25 <sup>n.s.</sup>	
nat. Infektionsverlauf	0,65***	0,64**		
Sklerotien-Index	0,77***			

\*\* , \*\*\* Signifikanz zu  $\alpha = 1\%$  und  $0,1\%$ ; n.s. = nicht signifikante Korrelation.

Genotypen mit einer hohen Myzelausbreitung im penetrierten Blattgewebe und großen Blattläsionen zeigten ein Überwachsen des Myzels von der Blattspreite über die Blattpetiole in die Sprossachse. Dieser Sachverhalt spiegelte sich dementsprechend in signifikant positiven Korrelationen zwischen Myzelwachstumsraten und Läsionslänge einerseits und dem Auftreten des natürlichen Infektionsverlaufs wieder.

Im Verlauf des Untersuchungsjahres 2001 konnte während beider in diesem Jahr durchgeführten Inokulationen bei *H. tuberosus* eine natürliche Blattinfektion durch Ascosporen festgestellt werden. Hinsichtlich Myzelausbreitung im penetrierten *H. tuberosus* Blattgewebe und induzierter Läsionslänge konnte zwischen natürlicher und artifizierlicher Inokulation kein Unterschied detektiert werden. In beiden Infektionsarten führte ein rasches Myzelwachstum schließlich zum Übergreifen auf die Sprossachse und damit zur Stängelfäule bei *H. tuberosus*.

Unter Berücksichtigung aller evaluierten Wildarten konnten keine Zusammenhänge zwischen der natürlichen Ascosporeinfektion und den zur Feldresistenz der Blätter bestimmten

Parametern Myzelwachstum, Läsionslänge, Auftreten von Sklerotien sowie dem natürlichen Infektionsverlauf erkannt werden.

### 3.1.2.3 Phänologische Charakteristika der Blattreaktion auf *Sclerotinia sclerotiorum* Inokulation im Freiland

Phänologische Unterschiede der im Screening auf Feld-Blattresistenz untersuchten perennierenden Wildarten traten zu einem wesentlich geringeren Ausmaß als zur *Sclerotinia*-Stängelresistenz auf. Lediglich *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC 7 zeigten hinsichtlich der Blattreaktion einen distinkten Phänotyp. Ihre durch *Sclerotinia* induzierten Läsionen zeichneten sich durch eine dunkelbraune Farbe gegenüber gesundem Blattgewebe ab. Häufig zeigte *H. divaricatus* zusätzlich chlorotische Aufhellungen in unmittelbarer Nachbarschaft zur Läsion. In beiden Arten reichte die Läsion lediglich bis zum basalen Drittel der Blattspreite gefolgt von einem Eintrocknen des penetrierten Gewebes. Alle anderen Genotypen wiesen dagegen wassergesättigte und helle Läsionen auf.

Die über die Blattläsionslängen und –Ausbreitung als intermediär charakterisierten Wildarten *H. pauciflorus* ssp., *H. microcephalus*, *H. salicifolius*, *H. x laetiflorus*, *H. strumosus*, *H. grosseserratus* sowie die Akzessionen 1, 4, 5 und M von *H. maximiliani* zeigten ein Fortschreiten der Läsion über die Petiole bis zur Blattachsel. Ein Einwachsen des Myzels in die Sprossachse wurde jedoch in keiner der genannten Arten beobachtet. Dagegen wiesen die als suszeptibel charakterisierten Wildarten *H. tuberosus*, *H. nuttallii*, *H. giganteus* und *H. atrorubens* wie bereits weiter oben erwähnt einen starken Myzeleinwuchs in die Sprossachse auf. Über 50% aller Prüfglieder dieser Genotypen zeigten dieses für *H. annuus* charakteristische und von Lamarque (1985) und Degener et al. (1998) als kausale Ätiologie der *Sclerotinia* Stängelfäule beschriebene Verhalten.

Tendenziell konnten genotypische Differenzen hinsichtlich der Charakteristik der Myzelausbreitung im Blattgewebe festgestellt werden. Im Allgemeinen breiteten sich zunächst die Läsionen stark longitudinal entlang der Blattcosta aus. Erst im weiteren Verlauf der Pathogenese, meist nach kompletter Penetration der Blattmittelrippe bis zur Petiole, fand eine flächenmäßige Besiedlung der Blattspreite durch *Sclerotinia sclerotiorum* statt. Eine von diesem Typus abweichende Myzelausbreitung konnte bei *H. divaricatus* und *H. atrorubens* beobachtet werden. *H. divaricatus* zeichnete sich durch eine geringe Flächenausdehnung der Läsion über die Blattspreite aus. Häufig bestand nur eine schmale nekrotisierte Zone beiderseits der Costa. *H. atrorubens* wies dagegen schon initial nach Erkennen der ersten sichtbaren Symptomen eine ebenso starke Längen als auch Breitenausdehnung der Läsion auf.

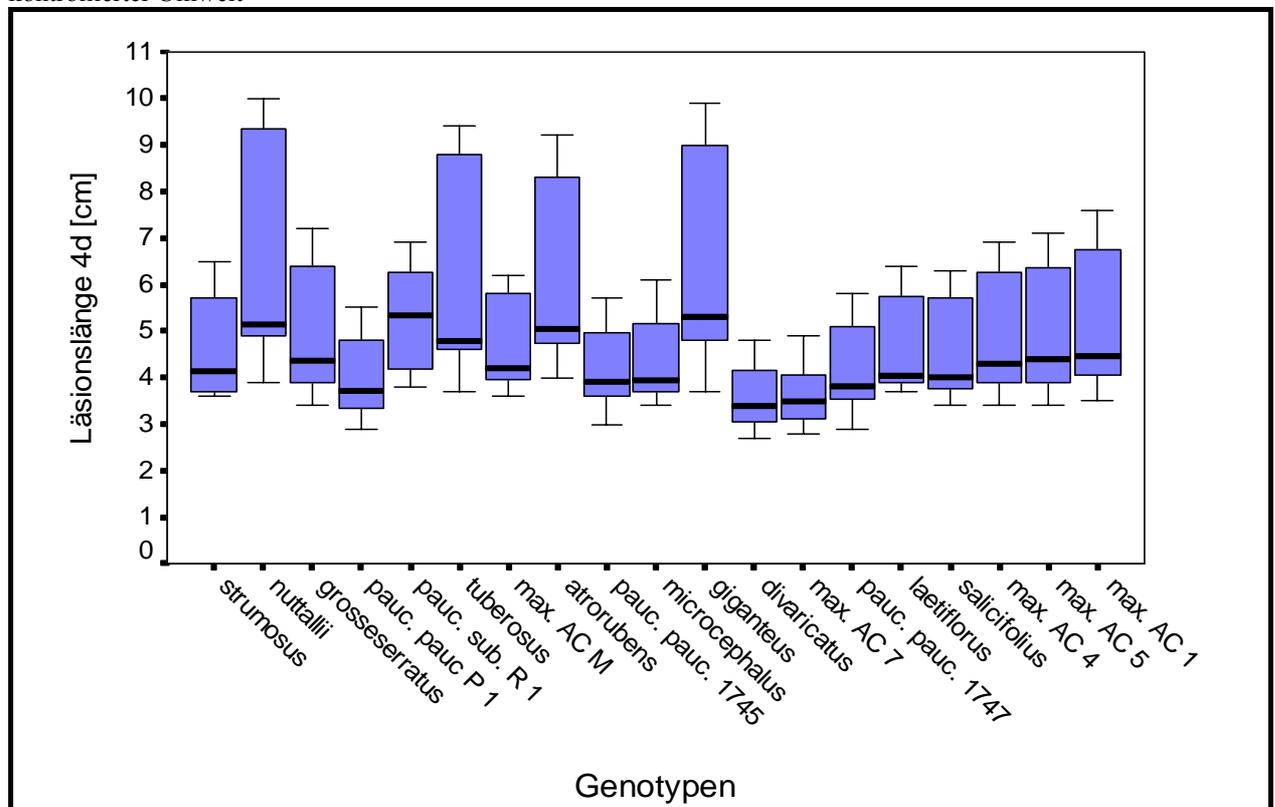
### 3.1.3 *Sclerotinia*-Blattreaktion unter kontrollierten Umweltbedingungen

#### 3.1.3.1 Genotypische Unterschiede im Resistenzverhalten der Blätter unter kontrollierten Umweltbedingungen

Alle im zweijährigen Versuch unter kontrollierter Umwelt evaluierten Parameter zur *Sclerotinia* Blattreaktion sowie deren signifikant genotypischen Unterschiede sind in Tabelle 17 gegeben. Die genotypischen Verteilungsparameter der vier Tage postinfektionell gemessenen Blattläsionen über die Versuchsjahre sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Die Vitalität des verwendeten Blattgutes konnte über den gesamten Versuchszeitraum erhalten werden. Visuell konnten weder Turgeszenzverluste noch Merkmale einer vorzeitigen Seneszenz der Blätter beobachtet werden.

Ebenso wie zum Blatt-Feldresistenztest konnte hinsichtlich der Inkubationszeit zwischen den evaluierten Genotypen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Charakteristische *Sclerotinia* Blattläsionen zeigten sich im Vergleich zur Feldevaluierung wesentlich früher. Häufig zeigten sich bereits nach 6h erste Anzeichen einer erfolgreichen Besiedlung des Blattgewebes durch *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Abbildung 11:** BOX-WHISKER-Plot des Resistenzparameters – Läsionslänge nach 4 Tagen - zum Konfidenzintervall 95% von 19 *Helianthus*-Wildarten für zwei Jahre im *Sclerotinia* Resistenztest unter kontrollierter Umwelt



Im Detached-Leaf-Test zeigten sich äußerst starke Jahreseffekte ( $\eta_e^2 = 0,91$ ) als auch Wechselwirkungen vom Typ Jahr x Genotypen ( $\eta_{ge}^2 = 0,69$ ). Ebenso konnten sowohl ein starker signifikanter Einfluss des Inokulationszeitpunktes ( $\eta_e^2 = 0,94$ ) auf die Blattläsionen als auch der Wechselwirkung Inokulationszeitpunkt x Genotyp ( $\eta_{ge}^2 = 0,78$ ) nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt spiegelte sich auch in der Schätzung der Varianzkomponenten wieder. Der Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Gesamtvarianz der Blattläsionen betrug unter kontrollierten Umweltfaktoren lediglich 50% (siehe Tabelle 16). Über 39% der Läsionsvariabilität konnte durch die Variabilität der Umweltfaktoren Jahr und Inokulationzeitpunkt erklärt werden. Der Einfluss von jahres- und mikroklimatischen Schwankungen auf die Läsionslänge und damit der Blattresistenz gegenüber *Sclerotinia* war somit unter kontrollierten Bedingungen wesentlich größer als unter Freilandbedingungen.

**Tabelle 16:** Varianzanalyse, Interaktionskoeffizienten <sup>a)</sup> und Varianzkomponenten <sup>b)</sup> des zweijährigen *Sclerotinia*-Blatt-Resistenzscreenings im DTL-Test an 19 Helianthus Wildarten

VU	df	SQ	MQ	F	Varianzkomponenten <sup>b)</sup>			
					$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{ge}^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	$\hat{\sigma}_p^2$
Genotyp	18	306,91	17,05	9,23***	0,751***	0,563***	0,134	1,44
Fehler	353	652,03	1,85		Haupt- und Interaktions-Koeffizienten <sup>a)</sup>			
					$\eta_g^2$	$\eta_e^2$	$\eta_{ge}^2$	
Gesamt	371	958,94			0,89	0,91	0,69	

<sup>a)</sup> Interaktion Jahr x Genotyp.  $\hat{V}_g$  [%] = 52. <sup>b)</sup> Wechselwirkungen Genotyp x Umwelt = (Genotyp x Jahr) + (Genotyp x Inokulationszeitpunkt).

Im Versuchsmittel konnten auch im Detached-Leaf-Screening zur Blattresistenz perennierender *Helianthus* Arten signifikante ( $\alpha = 0,1\%$ , N = 372) genotypische Unterschiede aufgedeckt werden. Hierbei wurde im Wesentlichen eine annähernd gleiche Klassifikation der Wildarten in partiell resistente, intermediäre und susceptible Genotypen erhalten wie zum Feldresistenztest. Im Vergleich zu allen evaluierten Wildarten wiesen *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC 7 geringe Läsionslängen (3,6cm) und Läsionsextensionsraten (1,1cm/d) auf. *H. tuberosus*, *H. nuttallii*, *H. tuberosus* und *H. atrorubens* konnten dagegen aufgrund schneller Myzelausbreitung im Blattgewebe (1,7 – 2,3 cm/d) und großer nach 4 Tagen ermittelten Blattläsionen (6,3-6,7cm) als susceptible Genotypen charakterisiert werden. Ebenso wie zum Freilandscreening konnte den Wildarten *H. pauciflorus* ssp., *H. microcephalus*, *H. salicifolius*, *H. x laetiflorus*, *H. strumosus*, *H. grosseserratus* sowie den Akzessionen 1, 4, 5 und M von *H. maximiliani* ein intermediärer Reaktionstypus auf *Sclerotinia* Blattinokulation zugesprochen werden. Auch zum Detached-Leaf-Test zeigten die intermediär reagierenden Spezies zwischen den Inokulationszeitpunkten und Versuchsjahren starke Schwankungen und Rangwechsel hinsichtlich der induzierten Läsionslänge.

**Tabelle 17:** Ergebnisse der zwei jährigen Resistenzprüfungen von 19 perennierenden *Helianthus*-Wildarten auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Blatinokulation unter kontrollierten Bedingungen

Rang <sup>a)</sup>	Genotyp	Läsionslänge nach 4d [cm]				Sklerotien Index <sup>c)</sup> [% Pfl.]	Myzel- wachstum <sup>d)</sup> [cm • d <sup>-1</sup> ]	Inkubations- Index <sup>c)</sup> [% Symptome] nach 36h
		$\bar{x}$	SCHEFFE- T. <sup>b)</sup>	S <sub>d</sub>	X <sub>min</sub> -X <sub>max</sub>			
1	<i>H. divaricatus</i>	3,61	a	0,67	2,7-4,8	-	1,13	100
2	<i>H. maximiliani</i> AC 7	3,63	a	0,62	2,8-4,9	-	1,10	100
3	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1	4,02	ab	0,78	2,9-5,5	-	1,24	100
4	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1745	4,24	abc	0,82	3,0-5,7	-	1,28	100
5	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1747	4,26	abc	0,90	2,9-5,8	-	1,34	100
6	<i>H. microcephalus</i>	4,35	abc	0,84	3,4-6,1	-	1,28	100
7	<i>H. salicifolius</i>	4,58	abc	1,00	3,4-6,3	10 <sup>n.s</sup>	1,43	100
8	<i>H. strumosus</i>	4,65	abc	1,07	3,6-6,5	25*	1,51	100
9	<i>H. x laetiflorus</i>	4,67	abc	1,00	3,7-6,4	10 <sup>n.s</sup>	1,47	100
10	<i>H. maximiliani</i> AC M	4,70	abc	0,98	3,6-6,2	15 <sup>n.s</sup>	1,45	100
11	<i>H. maximiliani</i> AC 4	4,90	bc	1,24	3,4-6,9	25*	1,62	100
12	<i>H. maximiliani</i> AC 5	4,99	bc	1,28	3,4-7,1	30*	1,58	100
13	<i>H. grosseserratus</i>	5,03	bc	1,36	3,4-7,2	45*	1,68	100
14	<i>H. maximiliani</i> AC 1	5,21	cd	1,43	3,5-7,6	65**	1,74	100
15	<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>subrhomboideus</i> R 1	5,31	cd	1,10	3,8-6,9	10 <sup>n.s</sup>	1,79	100
16	<i>H. atrorubens</i>	6,29	de	1,93	4,0-9,2	45*	1,69	100
17	<i>H. tuberosus</i>	6,30	de	2,21	3,7-9,4	95***	2,13	100
18	<i>H. giganteus</i>	6,53	e	2,16	3,7-9,9	95***	2,15	100
19	<i>H. nuttallii</i>	6,68	e	2,34	3,9-10,0	90***	2,29	100
$\bar{\bar{X}}$	Gesamtversuch	4,94		1,61	2,7-10,0	31,98	1,55	100

<sup>a)</sup> Rangbildung entsprechend ANOVA und SCHEFFE-Test, Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchsdurchführungen (n = 4; N = 372).

<sup>b)</sup> Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$ ; unterschiedliche Indizes bedeuten signifikante Unterschiede.

<sup>c)</sup> Signifikanzen entsprechend  $\chi^2$ -Test. n.s nicht signifikant; \*, \*\*, \*\*\* Signifikanz zum Niveau  $\alpha=5\%$ ; 1% und 0,1%.

<sup>d)</sup> Messung bis zum 4. Tag nach Inokulation.

### 3.1.3.2 Genotypische Unterschiede Pathogenese bezogener Parameter und phänologische Charakteristika der Blattreaktion

Ebenso wie unter Freilandbedingungen konnten im Detached-Leaf-Test innerhalb der evaluierten perennierenden *Helianthus*-Wildarten signifikante und stark positive Korrelationen zwischen dem Boniturparameter Läsionslänge und der Myzelwachstumsrate als auch mit dem Aufkommen von Sklerotien auf der Blattspreite detektiert werden (siehe Tabelle 18). Auch unter kontrollierten Umweltfaktoren zeigten die suszeptiblen, durch starke Myzelausbreitungen und große Läsionen charakterisierten Arten, Sklerotien auf ihrer Blattoberfläche. Auffällig war jedoch, dass die Arten *H. salicifolius*, *H. strumosus*, *H. x laetiflorus*, *H. pauciflorus* ssp. *subrhomboides* R 1 sowie *H. maximiliani* AC M und AC 5, welche im Freilandtest keine Sklerotien aufzeigten, unter Umweltkontrollierten Bedingungen diese typischen Dauerorgane von *Sclerotinia* aufwiesen. In der Regel entwickelten sich im Detached-Leaf-Test größere (>0,5cm) und pro Wildartblatt mehr Sklerotien als im Freiland.

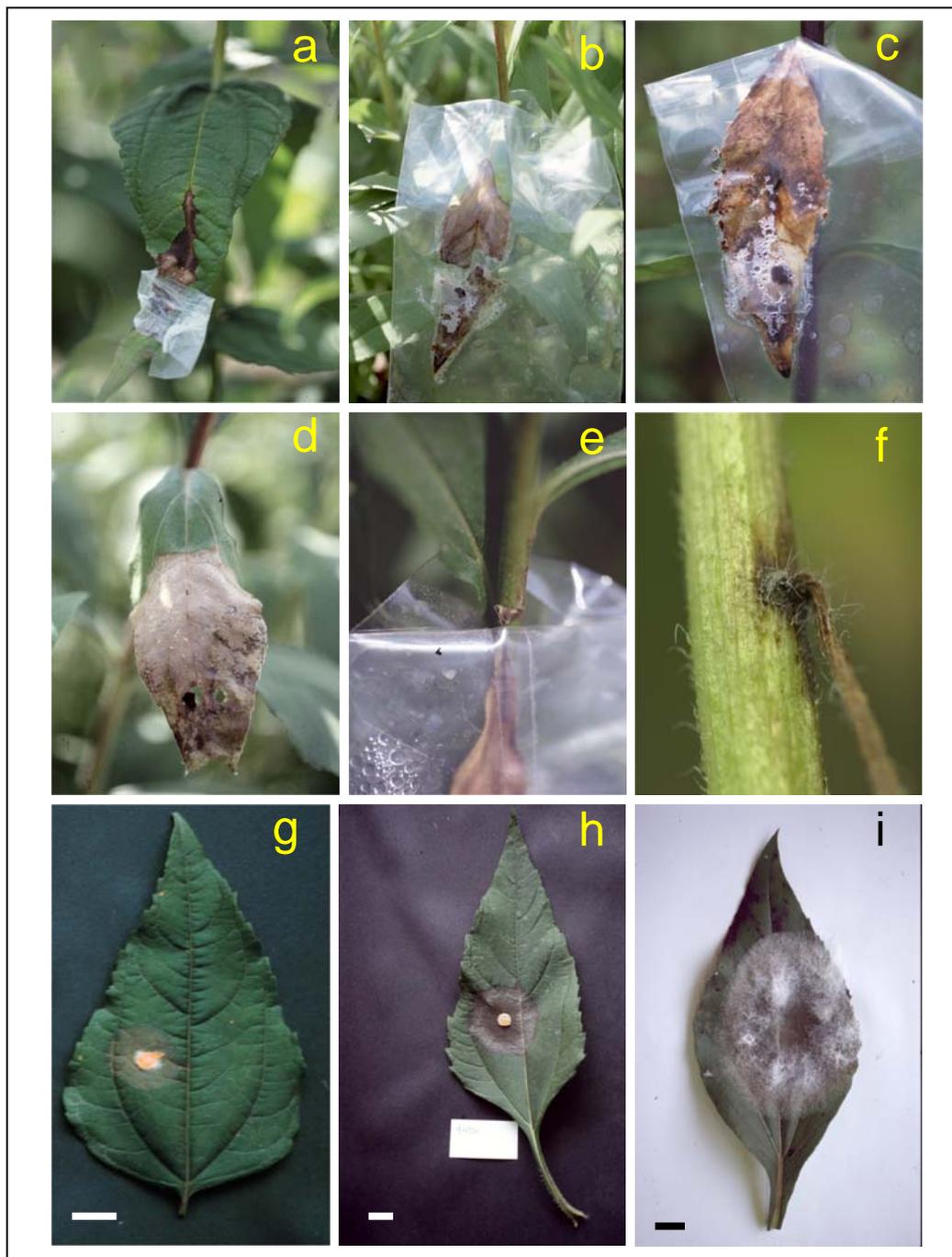
**Tabelle 18:** Phänotypische Korrelationen für drei phänologische Blatt-Resistenzparameter über zwei Jahre an Blättern von 19 *Helianthus* Genotypen unter kontrollierter Umwelt evaluiert

Parameter	Myzelwachstumsrate	Sklerotien-Index
<b>Läsionslänge (4d p.i.)</b>	0,95**	0,89**
<b>Sklerotien-Index</b>	0,92**	

\*\* Signifikanz zu  $\alpha=1\%$ .

Hinsichtlich phänologischer Charakteristika der durch parasitierendes *Sclerotinia*-Myzel erzeugten Läsionen ergaben sich keine Unterschiede. Bei allen Genotypen zeigten sich farblose bis hellbraune Läsionen. Häufig war eine Unterscheidung zwischen gesunden und penetrierten Blattabschnitten nur an einer leicht dunkleren, wassergesättigten Zone der erkrankten Blattgewebe zu erkennen.

Die Extension der Läsion erfolgte im Vergleich zum Freilandversuch rascher und konzentrisch um die primäre Inokulationsstelle. Bei allen Genotypen erfolgte die Myzelausbreitung über den Blattgrund in die Petiole. Die rasche Myzelausbreitung ließ eine vergleichende Untersuchung aller Genotypen nur bis zum 4. Tag nach Inokulation zu, da die Blätter von *H. nuttallii*, *H. giganteus*, *H. tuberosus* und *H. atrorubens* bereits nach 5 Tagen vollständig von *Sclerotinia* besiedelt und mazeriert waren. Zu allen Versuchsdurchführungen und damit unabhängig vom Inokulationszeitpunkt wiesen alle Wildartblätter oberflächlich sichtbares Myzel auf. In der Tendenz zeigten die suszeptiblen Arten *H. tuberosus* und *H. nuttallii* ein dichteres Oberflächenmyzel. Sklerotien wurden häufig in konzentrischen Zonen um die Inokulationsstelle gebildet (siehe Abbildung 12 i).



**Abbildung 12:** *Sclerotinia*-Blattreaktion perennierender *Helianthus*-Arten nach artifizierter Inokulation\*:

**a)-f)** Freilandtest (die PE-Beutel wurde aufgrund der besseren Sichtbarkeit der Symptome teilweise entfernt).

**g)-i)** DTL-Test.

**a)** *H. divaricatus* 4d p.i.; **b)** *H. strumosus* 4d p.i.; **c)** *H. nuttallii* 4d p.i.; **d)** *H. atrorubens* 4d p.i.; **e)** *H. giganteus* 5d p.i. mit komplett penetrierter Petiole und beginnendem Einwachsen in die Sprossachse; **f)** charakteristischer, natürlicher Infektionsverlauf durch Einwachsen des *Sclerotinia*-Myzels in die Sprossachse bei *H. tuberosus* 5d p.i.; **g)** *H. divaricatus* 72h p.i.; **h)** *H. tuberosus* 72h p.i.; **i)** *H. atrorubens* 72h p.i. mit starkem Myzelauswuchs und ersten, konzentrischen Sklerotieninitialen.

\* Größenmaßstab: Balken entspricht jeweils 1cm.

### 3.1.4 Phänotypische Korrelation zwischen den Testverfahren und Evaluierung potentieller Genotypen mit erhöhter Stängel- und Blattresistenz gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* Infektion

Die Ätiologie und Pathogenese des Krankheitskomplexes *Sclerotinia* Stängelfäule innerhalb der Gattung *Helianthus* impliziert die Beteiligung von Resistenzen der Blätter als auch der Sprossachsen am gesamten Resistenzphänomen. Als ein wesentliches Ziel des in dieser Arbeit durchgeführten mehrjährigen *Sclerotinia*-Resistenzscreenings innerhalb des sekundären *Helianthus* Genpools stand - neben der Evaluierung des solitären, genotypisch distinkten Resistenzniveaus von Blättern und Sprossachsen - die Ermittlung von Genotypen mit kumulativen und umweltkonstanten Resistenzen in beiden Organen im Vordergrund.

Ein erster Hinweis auf mögliche Zusammenhänge zwischen Blatt- und Stängelresistenzniveau innerhalb des gesamten charakterisierten perennierenden Genpools konnte über Korrelationen der spezifischen Stängelreaktion mit den entsprechenden Blatttests erhalten werden. Eine grafische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Blatt- und Stängeltests ist in den Abbildungen 13a-c dargestellt. Hierbei zeigten sich zwischen Blatttests (DTL- und Feldresistenztests) und der im Freiland evaluierten Stängelresistenz signifikant positive Korrelationen (siehe auch Tabelle 19). Die Korrelationskoeffizienten lagen dabei zwischen den DTL-Tests und der Stängelreaktion mit 0.65 auf mittlerem Niveau, zwischen der im Freiland gemessenen Blattläsionslänge und der Sprossachse auf annähernd gleichem Niveau bei 0.67. Zwischen der mittleren Blattreaktion der *Sclerotinia* Inokulation zur Basis gemittelter Ränge und der Stängelreaktion ergab sich folglich ebenso eine mittlere positive Korrelation von 0.65.

**Tab. 19.** Phänotypische Korrelation von drei Screening-Verfahren zur Evaluierung des Blatt- und Stängelresistenzpotentials perennierender *Helianthus* Arten auf artifizielle *Sclerotinia sclerotiorum* Infektion <sup>a)</sup>

Screening-Verfahren	Blatt-Feld-Test	Stängel-Test
Detached Leaf Test	0,956**	0,647**
Stängel-Test	0,672**	
gemittelte Blattränge		0,651**

<sup>a)</sup> Berechnungsgrundlage: mittlere Ränge der genotypischen Läsionslängen (4d p.i.) über die Versuchsjahre entsprechend ANOVA und multiplem Mittelwertsvergleich. \*\* Signifikanzniveau zu  $\alpha=1\%$ .

Diese mittlere Korrelation zwischen der ausgeprägten Blatt- und Stängelresistenz gegenüber *Sclerotinia*-Infektion und des daraus resultierenden mittleren Bestimmtheitsmaßes von  $r^2 \approx 0.4$  zeigt indes lediglich einen schwachen phänotypischen Zusammenhang zwischen beiden Resistenzmerkmalen im gesamten untersuchten perennierenden Genpool. Mit einer weniger als 50%igen Übereinstimmung zwischen beiden Resistenzmerkmalen konnte damit auf die Existenz von Genotypen mit signifikant differentiellen Resistenzausprägungen in Blättern und Sprossachsen geschlossen werden. Die genauere Analyse der Datensätze aller Tests unter Berücksichtigung der genotypisch spezifischen Kombination von Blatt- und Stängelreaktion

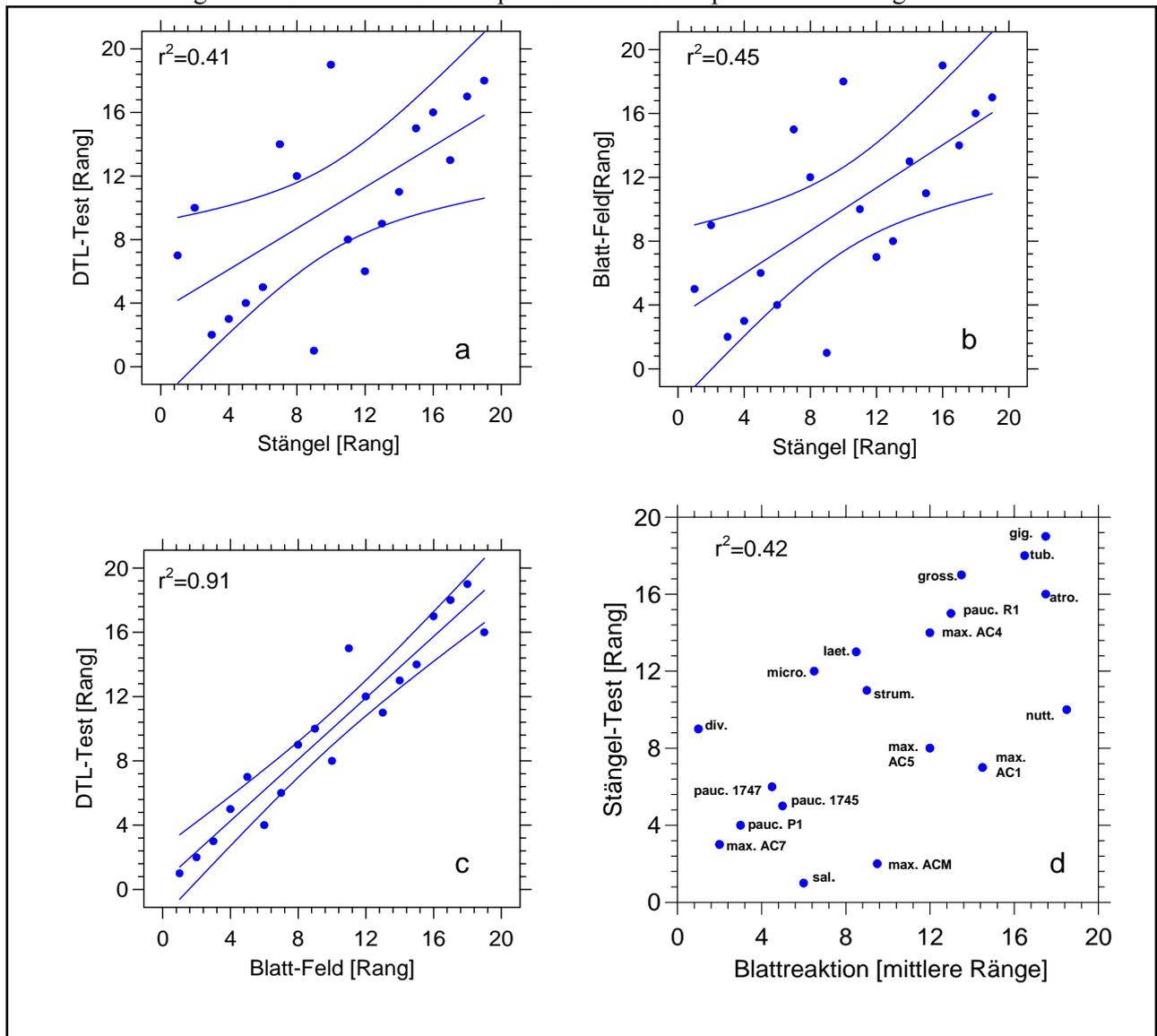
zeigte eine diverse Verteilung der evaluierten Wildartpopulationen und ist in Abbildung 10d dargestellt. Ein Großteil der untersuchten Populationen zeichnete sich durch recht unterschiedliche Resistenzniveaus in Blättern und Sprossachsen aus. Signifikant unterschiedliche Resistenzniveaus zwischen Blättern und Sprossachsen wiesen insbesondere die Populationen von *H. nuttallii*, *H. divaricatus* und *H. maximiliani* AC M auf. Während *H. divaricatus* das höchste und umweltkonstanteste Blattresistenzniveau aller getesteten Wildarten zeigte, wiesen deren Sprossachsen im Mittel lediglich ein intermediäres und stark umweltbeeinflusstes Resistenzniveau auf. Diametral dazu zeigte die *H. nuttallii* Population ein äußerst suszeptibles Verhalten der Blätter auf *Sclerotinia* Inokulation, wiesen dagegen in ihrer mittleren Ausprägung der Stängelresistenz einen intermediären Rang auf.

Ein in beiden Pflanzenorganen geringes Resistenzniveau zeigten die Populationen von *H. giganteus*, *H. tuberosus*, *H. atrorubens* und *H. grosseserratus* und wiesen sich damit als extrem suszeptible Wildarten zur Stängelfäule aus. Als partiell *Sclerotinia* resistente Wildart in beiden Pflanzenorganen konnte dagegen die *H. maximiliani* Akzessionspopulation AC 7 angesprochen werden. Dieser Genotyp zeigte neben der hohen partiellen Blatt- und Stängelresistenz eine stabile Ausprägung dieser beiden phänotypischen Merkmale über alle Versuchsjahre und Inokulationen und damit eine ausgesprochene Umweltkonstanz. Solche Genotypen mit erhöhten und vergleichsweise umweltstabilen Resistenzen in mehreren Pflanzenorganen können als ideale Resistenzquellen für interspezifische Zuchtprogramme zur Verbesserung der *Sclerotinia* Empfindlichkeit von *H. annuus* Zuchtpopulationen angesehen werden. Ein ebenfalls in beiden Pflanzenorganen resistentes Verhalten zeigten auch alle Populationsakzessionen von *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* die damit ebenso als viel versprechende Resistenzquellen in beiden Pflanzenorganen angesehen werden können.

Eine stark positive und hochsignifikante Korrelation von  $r=0.96$  zwischen den mittleren Rangplätzen der Genotypen im DTL-Test und jenen im Freilandblatttest weist auf die bereits in Abschnitt 3.1.3.1 schon erwähnte gleichartige Rang-Klassifikation der Wildarten zu beiden Testverfahren hin. Trotz der in Art und Richtung divergierenden Umweltwechselwirkungen in beiden Testverfahren konnte im Mittel der Versuchsjahre über die Läsionslänge (4d p.i.) als auch über die Läsionsextension eine signifikante und eng positive Übereinstimmung im Ranking der evaluierten Wildarten erhalten werden (siehe dazu auch Abbildung 13c).

Mit einer über 91%igen Prädiktabilität des mittleren genotypischen Feldresistenzniveaus der Blätter durch den DTL-Test kann damit ein *Sclerotinia*-Blattresistenzscreening unter kontrollierten Umweltbedingungen als konfidenter und robuster Test zur Detektion von Blattresistenzen im perennierenden *Helianthus* Genpool erachtet werden.

**Abbildung 13:** Phänotypische Korrelation<sup>a)</sup> von drei Testverfahren zur Evaluation von *Sclerotinia sclerotiorum* Stängel- und Blattresistenzen im perennierenden Genpool<sup>b)</sup> der Gattung *Helianthus*



<sup>a)</sup> Berechnungsgrundlage: SPEARMANNSCHE Rangkorrelation der mittleren genotypischen Ränge nach multiplem Mittelwertsvergleich zum Konfidenzintervall 95%.

<sup>b)</sup> von insgesamt 19 perennierende *Helianthus* Wildarten.

### 3.2 Untersuchung präformierter Blatt-Phenolprofile als potentielle Resistenzmarker der *Sclerotinia sclerotiorum* Myzelausbreitung im Mesophyll perennierender *Helianthus* Wildarten

Die nachfolgend dargelegte Untersuchung diene maßgeblich dazu, genotypische Unterschiede komplexer Blatt-Phenolmuster innerhalb perennierender *Helianthus*-Wildarten zu erfassen und - im Hinblick auf einen interspezifischen Züchtungsansatz - deren Wechselbeziehung zur *Sclerotinia* - Blattresistenz innerhalb des untersuchten Artenspektrums zu evaluieren.

Schwerpunkte der phytochemischen Analytik konstitutiver Inhaltsstoffe der Gattung *Helianthus* lagen bisher, in der Hauptsache aus taxonomischen Fragestellungen heraus, in der Analyse von Acetylenen bzw. Polyacetylenen (Christensen & Lam, 1990) sowie insbesondere diverser Sesquiterpenlactone des annuellen (Spring et al., 1985; Spring & Bienert, 1987; Spring et al., 1987; Spring, 1988; Macias et al., 1993; Chou & Mullin, 1993) als auch perennierenden Formenkreises (Steward et al., 1985; Herz & Kumar, 1981; Spring et al., 1986).

Als konstitutive Phenole wurden bislang bei *Helianthus ssp.* Flavonoide vom Flavon- und Chalcontyp (Wadell, 1973; Harborne & Smith, 1978; Schilling et al., 1981, Schilling, 1983; Melek et al., 1985; Rieseberg et al., 1987; von Bruchhausen et al., 1993; Macias et al., 1997) als auch Hydroxyzimtsäuren sowie deren Ester (Robertson, 1975; Leung et al., 1981; Bazzalo, 1985; Andary et al., 1996; Tourvieille et al., 1997) beschrieben.

Flavonoide treten in Pflanzen hauptsächlich als O-Glycoside auf, während Hydroxyzimtsäuren sowohl an die Zellwandmatrix als auch als einfache Ester (Depside) mit L-Chinasäure oder anderen (Phenol)-Carbonsäuren (Ferulasäure, Äpfelsäure) gebunden vorliegen (Herrmann, 1976; Herrmann, 1989; Harborne, 1999). Um möglichst authentische Phenolfingerprints zu erhalten, wurde besonderer Wert auf eine schonende Probenvorbereitung und Extraktion gelegt. Auf saure bzw. basische Probenextraktionen als auch auf Wärmebehandlung und Einengen der Extrakte wurde bewusst verzichtet, da Flavonolglycoside unter diesen Extraktionsbedingungen häufig in ihre Aglyka gespalten und Depside, insbesondere Mono- und Di-Hydroxyzimtsäure-Chinasäureester sowie deren Derivate intramolekulare Umlagerungen und Isomerisierungen unterliegen (Clifford, et al. 1989; Brand & Weschta, 1991; Sticher, 1999).

Zur Trennung musste somit eine neue Analysemethode mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie entwickelt werden. Sie sollte hierbei a) möglichst viele authentische phenolische Komponenten extrahieren und detektieren, somit eine hohe Trennleistung aufzeigen und b) eine hohe Auflösung (Trennschärfe) bei c) geringer Analysezeit und hoher Reproduzierbarkeit aufweisen. Hierzu wurden zwei Elutionssysteme mit Methanol bzw. Acetonitril als organischer Komponente verwendet und auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Um die Vergleichbarkeit der interspezifischen

Blattphenolmuster zu gewährleisten, sollten dazu stabile und reproduzierbare Retentionszeiten der detektierten Komponenten erzielt werden.

Da die Phenolgehalte im Pflanzenreich in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen (Horner, 1990, Waterman & Mole, 1994, Weisshaar & Jenkins, 1998), insbesondere bezüglich der Lichtintensität und Qualität (Koeppel et al., 1969; Mole et al., 1988, Arcas et al., 2000) als auch alters- und entwicklungsabhängig (Takahama et al., 1999; Kennedy et al., 2000; Estrada et al., 2000) starken Schwankungen unterliegen, wurden die Abweichungen im Phenolgehalt der Blätter über die Versuchsdauer ermittelt. Dabei wurde die Bestimmung der Plastizität und Variabilität der konstitutiv exprimierten Phenolgehalte über den Zeitraum der drei Blätternten als Kontrolle hinsichtlich deren Verwendbarkeit im Hinblick auf die Entwicklung einer markergestützten Selektion durchgeführt.

### **3.2.1 Ermittlung optimaler Extraktions- und Elutionsparameter zur HPLC-Analyse löslicher phenolischer Inhaltsstoffe**

Die Extraktion der Blattproben mit 50%iger methanolischer Lösung stellte einen optimalen Kompromiss zwischen den Löslichkeiten der diversen phenolischen Inhaltsstoffe dar. Mit einer Extraktion in 50% Methanol konnten, unabhängig vom verwendeten Elutionssystem und der Wildartprobe, die meisten Peaks (Substanzen) bei 280 nm detektiert werden. Sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion des Wasseranteils im Extraktionsmedium führte zu einer geringeren Anzahl detektierter Peaks. Zusätzlich konnte bei höheren Methanolanteilen zur Extraktion (> 50% Vol.) tendenziell Peakdeformationen insbesondere hinsichtlich variierender Peakbreiten beobachtet werden, die keinen zuverlässigen Vergleich der Chromatogramme zwischen den Wildarten zuließen.

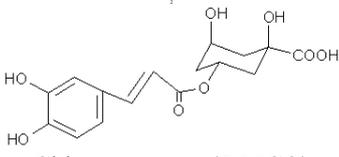
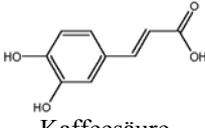
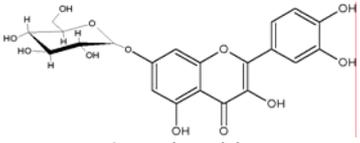
Die Wahl der organischen Phasen Acetonitril und Methanol zur binären Gradientenelution hatte einen erheblichen Einfluss auf Analysezeit, Trennleistung und Trennschärfe sowie auf die Quantität und Qualität der detektierten Peaks. So beinhaltete die Elution mit Methanol eine lange Analysezeit von mehr als 90min, breitere Peaks und führte insbesondere unter lipophileren Elutionsbedingungen zu keiner eindeutigen Trennung der Substanzen. Ebenso zeigten Kaffeesäure und Chlorogensäure mit Methanol als mobiler Phase annähernd gleiches chromatographisches Verhalten. Dieses resultierte häufig in einer Co-Elution dieser beiden Markersubstanzen. Die Verwendung des elutionskräftigeren Acetonitril im Gradienten führte dagegen zu einer verkürzten Analysezeit (< 60min) bei gleichzeitig hoher Trennschärfe der phenolischen Komponenten und annähernd symmetrischen Substanzpeaks über die gesamte Analysezeit. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Acetonitril gegenüber Methanol als Eluent zur Detektion der interspezifischen Blattphenolmuster im perennierenden *Helianthus*-Genpool der Vorzug gegeben.

Als wesentliches Kriterium zur Erzielung stabiler Retentionszeiten erwies sich eine konstante Analysetemperatur der C18-Phase. Chromatogramme, die unter den schwankenden Raumtemperaturen des Labors durchgeführt wurden, zeigten häufig variierende Retentionszeiten, von denen die einzelnen detektierten Peaks und/oder Peakgruppen im unterschiedlichen Ausmaß betroffen waren. Erst die Erwärmung des Säulenmaterials auf konstante 35°C ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ) über einen Säulenthermostaten erbrachte die erwünschte Stabilisierung der Retentionen im C-18 Adsorbens (siehe auch Tabelle 20).

### 3.2.2 Identifikation phenolischer Komponenten, interspezifische Diversität und Variabilität im Polyphenolmuster

Vergleichend konnten insgesamt über alle *Helianthus*-Wildarten 50 Substanzpeaks mit Acetonitril als Eluent detektiert werden. Von diesen konnten über beide Elutionsgradienten (Acetonitril bzw. Methanol) die Hydroxyzimtsäurederivate Chlorogensäure und Kaffeesäure sowie das Flavonol-Glycosid Quercimeritin (Quercetin-7-O- $\beta$ -D-Glucose) authentisch in allen Genotypen co-chromatographisch nachgewiesen werden.

**Tab. 20:** Chromatographisches Verhalten, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit der in *Helianthus ssp.* authentisch detektierten Standards

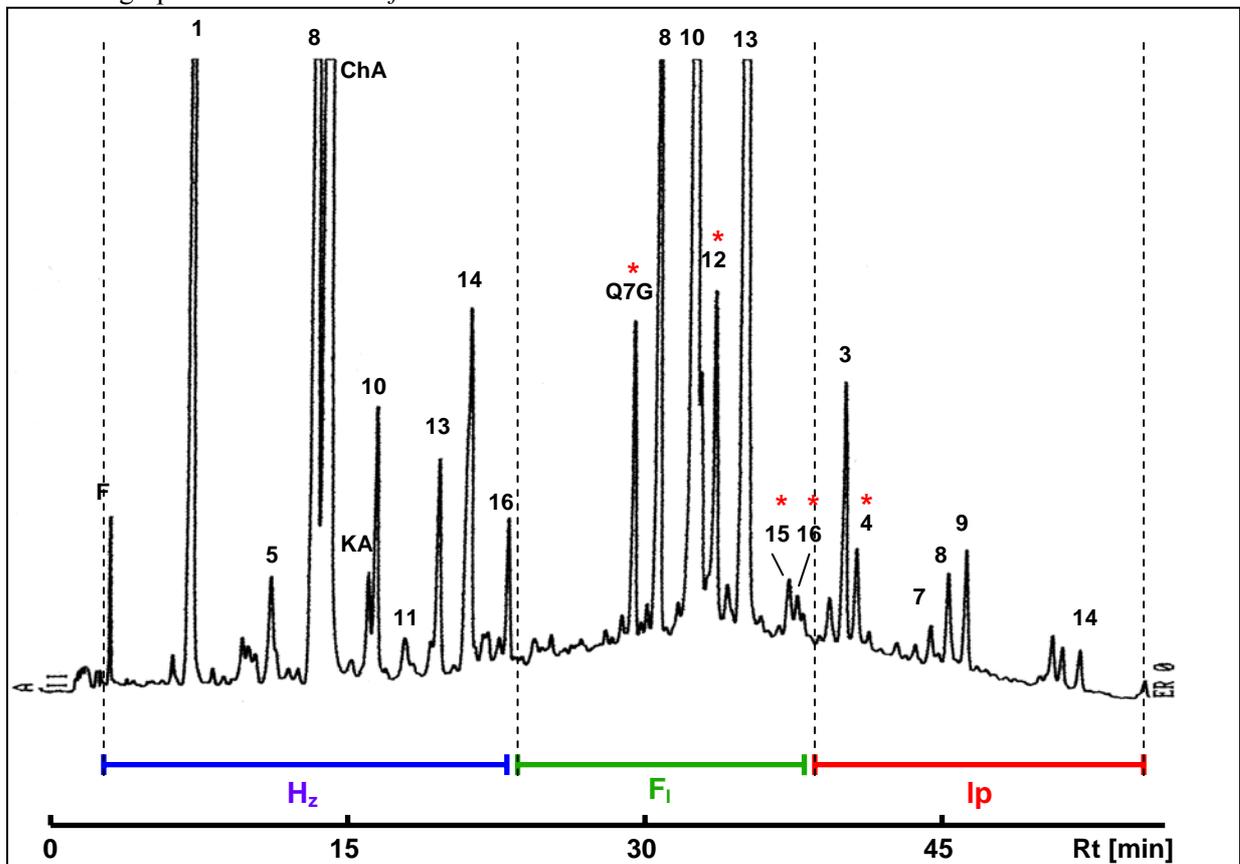
Substanz	Retention <sup>b)</sup>		Empfindlichkeit <sup>a)</sup>	
	R <sub>t</sub> [min]	c <sub>v</sub> [%]	[ng / 10 $\mu$ L] Nachweisgrenze	$\pm 5\%$ Bestimmungsgrenze
 Chlorogensäure (5-MCQ)	13.67	0,68	2.5	6
 Kaffeesäure	15.81	1,03	4	9
 Quercimeritin	29.60	0,76	3 <sup>c)</sup>	8 <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Detektionswellenlänge  $\lambda = 310\text{nm}$  bei durchschnittlich  $2 \cdot 10^{-5}\text{AU}$  Detektorrauschen. <sup>b)</sup> Durchschnitt aus  $n=54$  Messungen. <sup>c)</sup> Ermittelt als Aglycon-Analogon Quercetin.

Gallotannine (p-Hydroxybenzoesäure und Ester) als auch Flavan-3-ole vom Catechin und Epicatechintypus konnten weder über die internen Standards co-chromatographisch noch durch deren charakteristisch reduzierte Absorption bei  $\lambda=310\text{nm}$  in den Wildartblättern nachgewiesen werden. Weitere Strukturen phenolischer Inhaltsstoffe konnten aufgrund fehlender Literaturdaten über komplette authentische Polyphenolmuster in der Gattung *Helianthus* und unzureichender Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen nicht identifiziert werden.

Die Verwendung von drei Detektionswellenlängen ( $\lambda = 280, 310$  und  $380\text{nm}$ ) ließ jedoch semiquantitative Aussagen über deren potentielle Natur zu. Detektierte Komponenten, die in Peakhöhe und Fläche bei  $\lambda = 280$  und  $310\text{nm}$  annähernd gleiches Adsorptionsverhalten aufwiesen, wurden als putative Hydroxyzimtsäuren (Hz) angesprochen. Substanzpeaks, die bei  $\lambda = 380\text{nm}$  nahezu gleiches Adsorptionsverhalten wie bei  $\lambda = 280\text{nm}$  aufwiesen, wiesen auf ein charakteristisches Adsorptionsspektrum hin wie sie für Flavonole und deren Glycoside beschrieben werden (Mabry et al., 1970; Clark & Titus, 1997; Harborne, 1999). Sie wurden dementsprechend als potentielle Flavonole (Flo) klassifiziert. Substanzen die unter höheren Acetonitrilanteilen im Gradienten eluierten wurden einer lipophilen Fraktion (lp) zugeschrieben. Die Klassifikation der einzelnen Peaks im Phenolfingerprint ist in Abbildung 14 zusammenfassend dargestellt.

**Abbildung 14:** Semiquantitative Klassifikation der detektierten Peaks am Beispiel des Phenolfingerprints von *H. x laetiflorus* <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup>  $\lambda = 280\text{nm}$ . \* = potentielles Flavonol (Flo). ChA = Chlorogensäure; KA = Kaffeesäure; Q7G = Quercimeritin. Ziffern indizieren die fortlaufende Nummerierung der Peaks innerhalb der Klassen.

Hinsichtlich der Anzahl der in den einzelnen Genotypen detektierten phenolischen Substanzen zeigte sich innerhalb des sekundären *Helianthus*-Genpools eine diverse Verteilung und ist in Abbildung 15 als binäre Matrix dargestellt. Durchschnittlich konnten im gesamten untersuchten perennierenden Genpool 30 genotypisch distinkte Peaks ermittelt werden. Hierbei zeigten die *H. maximiliani* Populationsakzessionen AC 1 und AC 4 das geringste Spektrum im Polyphenolmuster mit jeweils 19 detektierten Komponenten. Ein großes Spektrum von über 40 nachgewiesenen phenolischen Komponenten wiesen dagegen die Arten *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* P1 und dessen, mit *H. tuberosus* über natürliche Hybridisierung (Heiser et al. 1969) entstandener, interspezifischer Hybrid *H. x laetiflorus* auf.

Ein wesentliches, differenzierendes Merkmal zwischen den genotypischen Phenolmustern stellten die unter lipophileren Elutionsbedingungen chromatographierten Substanzen F1<sub>14</sub> bis Lp<sub>15</sub> dar (siehe dazu auch Abbildung 12). In dieser Fraktion reiche Genotypen stellten insbesondere *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* P1; *H. x laetiflorus*, *H. strumosus* sowie *H. salicifolius* dar. Dagegen wiesen die *H. maximiliani*-Akzessionen AC1, AC 3, AC 4 und AC 5 sowie *H. tuberosus* eine geringe Detektionsrate dieser Komponenten auf.

Hinsichtlich der Plastizität der konstitutiven Phenolspektren über die drei im zweiwöchigen Abstand genommenen Blattproben konnten qualitativ keine Unterschiede festgestellt werden. Auch in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp konnten über alle drei Zeitpunkte der Probennahme keine qualitativen Änderungen im Blatt-Phenolspektrum beobachtet werden. Über den Versuchszeitraum konnten in den Chromatogrammen weder eine unvermittelte Absenz noch die Präsenz neuer Peaks detektiert werden. Somit konnten die komplexen konstitutiven Polyphenolmuster im untersuchten Probenmaterial als qualitativ stabiles, phänotypisches Merkmal angesprochen werden.

Im Hinblick auf die Quantität der ermittelten phenolischen Substanzen zeigten die Gehalte an Chlorogensäure (cv = 25%; n=54), Kaffeesäure (cv = 17%, n=54), sowie Hz<sub>2</sub>, Hz<sub>7</sub>, Hz<sub>8</sub> und Fl<sub>10</sub> (cv. 10%, n=54) über den Probennahmezeitraum die höchste Variabilität. Alle weiteren detektierten Komponenten des Phenolmusters wiesen einen Variationskoeffizienten von cv < 6% auf und zeigten damit über den Versuchszeitraum eine relative Konstanz im beprobten 10-12 Blattpaar.

Abbildung 15: Interspezifische Polyphenolmuster perennierender *Helianthus* Wildarten <sup>a)</sup>

Peak Nr.	R <sub>t</sub> Ø [min]	Genotypen																	
		<i>H. max.</i> AC 1	<i>H. max.</i> AC 3	<i>H. max.</i> AC 4	<i>H. max.</i> AC 5	<i>H. max.</i> AC 7	<i>H. max.</i> AC M	<i>H. microcephalus</i>	<i>H. pauc. pauc.</i> P1745	<i>H. pauc. pauc.</i> P1747	<i>H. pauc. pauc.</i> P1	<i>H. nuttallii</i>	<i>H. giganteus</i>	<i>H. grosseserratus</i>	<i>H. strumosus</i>	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. x laetiflorus</i>	<i>H. salicifolius</i>	<i>H. divaricatus</i>
F	3.0	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 1	6.8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 2	8.6	■	□	□	□	□	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Hz 3	8.9	■	■	■	□	□	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Hz 4	9.3	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□
Hz 5	10.3	□	□	□	■	■	□	■	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	■
Hz 6	10.8	■	□	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■
Hz 7	11.6	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□
Hz 8	12.8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5 - MCQ	13.6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 9	15.1	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Kaffeesäure	15.8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 10	16.5	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Hz 11	17.2	□	■	□	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 12	18.4	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 13	19.4	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 14	21.0	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 15	22.0	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Hz 16	22.8	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
FI 1	23.6	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
FI 2	24.7	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
FI 3	25.6	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 4	26.7	□	■	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■
FI 5	27.0	□	■	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■
FI 6	28.5	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
Quercimeritin	29.6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 8	31.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 9	31.6	□	■	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 10	32.9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 11 (Flo)	34.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 12 (Flo)	34.9	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 13	35.8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 14	37.4	□	□	□	□	□	■	■	■	□	■	□	□	□	■	□	□	■	□
FI 15 (Flo)	38.0	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FI 16 (Flo)	38.5	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lp 1	39.5	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	■	■	■
Lp 2	40.3	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■
Lp 3	41.1	□	■	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lp 4 (Flo)	41.8	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lp 5	43.4	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	■	□	■	■	■
Lp 6	44.6	□	□	□	□	■	□	■	□	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□
Lp 7	45.1	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	■	■	■
Lp 8	45.5	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	■	■	■
Lp 9	46.9	■	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lp 10	47.6	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lp 11	51.3	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■
Lp 12	52.0	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□
Lp 13	52.6	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Lp 14	53.6	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
Lp 15	56.9	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	■	■	□	□	□

<sup>a)</sup> Detektion bei  $\lambda = 280\text{nm}$ . ■ = Peak präsent; □ = Peak absent. Gemittelte Daten aus n=3 Wdh./Genotyp.

### 3.2.3 Zusammenhänge zwischen der qualitativen- und quantitativen Diversität im Phenolmuster und der *Sclerotinia*-Myzelausbreitung im Mesophyll

In der vorangehenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass a) eine hohe Diversität hinsichtlich komplexer Phenolmuster im untersuchten perennierenden *Helianthus* Genpool besteht und b) ein Grossteil der detektierten, präformierten Phenole im Blattmaterial über den Zeitraum der Probenahme eine geringe Plastizität, somit eine annähernde Konstanz aufwies. Basierend auf den ermittelten Phenolmustern des 10 - 12 Blattpaares sollten in den nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, in wie weit qualitative Wesensmerkmale im Phenolspektrum alleine (Absenz bzw. Präsenz einer phenolischen Komponente) oder quantitative Unterschiede einen Einfluss auf das Verhalten des *Sclerotinia*-Myzels im inokulierten Blattmaterial haben.

Die nachfolgende Analyse diene hiermit im Wesentlichen dazu a) potentielle Rückschlüsse über eine mögliche, kausale Inhibition der Pilzaktivität im Mesophyllgewebe zu erhalten und b) eine Evaluierung konstitutiver phenolische Inhaltsstoffe im Hinblick auf einen potentiellen Blattresistenz-Marker für interspezifische Züchtungsansätze im sekundären Genpool durchzuführen.

Qualitative Zusammenhänge zwischen beiden Parametern wurden hierbei durch eine biseriale Korrelationsanalyse und einer hierarchischen Clusteranalyse ermittelt, quantitative Zusammenhänge zur Myzelaktivität über eine Korrelations- und Hauptkomponentenanalyse.

#### 3.2.3.1 *Sclerotinia*-Myzelausbreitung im Mesophyll – Ergebnisse des DTL-Tests

Die zum gleichen Zeitpunkt der Blattprobennahme parallel durchgeführten DTL-Tests wiesen im Wesentlichen das gleiche Ranking im Resistenzverhalten der Wildartblätter wie zum zweijährigen DTL-Test auf (siehe Tabelle 14 Abschnitt 3.1.3.1). Zusammenfassend sind in Tabelle 21 alle erhobenen Parameter zur *Sclerotinia*-Blattresistenz im DTL-Test sowie deren Bonitierung dargestellt.

Hierbei wiesen sich *H. divaricatus* als auch *H. maximiliani* AC 7 mit den geringsten Läsionslängen und Läsionsausdehnungen als partiell resistente Wildarten innerhalb der evaluierten Genotypen aus. Demgegenüber als extrem suszeptible Wildarten bezüglich der Blattresistenz zeigten sich dagegen *H. tuberosus*, *H. giganteus* und *H. nuttallii*. Ein Rangwechsel der Wildarten innerhalb der drei unabhängig durchgeführten DTL-Tests konnte nicht verzeichnet werden. Die phänologischen Charakteristika der Blatt-Resistenzreaktionen auf artifizielle *S. sclerotiorum* Inokulation entsprachen den bereits in Abschnitt 3.1.3.2 beschriebenen Beobachtungen.

**Tabelle 21:** DTL-Ergebnisse, Myzelwachstum und Bonitierung nach artifizierter *S. sclerotiorum* Inokulation

Art	Läsionslänge <sup>a)</sup>		Myzelwachstum		Bonitur Note <sup>c)</sup>
	4d p.i.		[cm/d] <sup>b)</sup>		
	X	S <sub>d</sub>	X	S <sub>d</sub>	
<i>H. divaricatus</i>	3,10	0,43	0,72	0,04	4
<i>H. maximiliani</i> AC 7	3,13	0,46	0,75	0,03	4
<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1	4,01	0,41	1,03	0,15	3
<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1747	4,33	0,39	1,09	0,01	2
<i>H. pauciflorus</i> ssp. <i>pauciflorus</i> P 1745	4,40	0,36	1,10	0,02	2
<i>H. microcephalus</i>	4,48	0,29	1,16	0,05	2
<i>H. salicifolius</i>	4,50	0,49	1,14	0,04	2
<i>H. strumosus</i>	4,70	0,52	1,21	0,03	2
<i>H. x laetiflorus</i>	4,80	0,71	1,21	0,04	2
<i>H. maximiliani</i> AC M	4,80	0,73	1,21	0,03	2
<i>H. maximiliani</i> AC 4	5,15	0,61	1,30	0,04	1
<i>H. maximiliani</i> AC 5	5,33	0,57	1,33	0,05	1
<i>H. grosseserratus</i>	5,50	0,46	1,37	0,03	1
<i>H. maximiliani</i> AC 1	5,53	0,56	1,39	0,03	1
<i>H. maximiliani</i> AC 3	5,73	0,47	1,42	0,02	1
<i>H. tuberosus</i>	6,10	0,47	1,49	0,07	0
<i>H. giganteus</i>	6,67	0,54	1,53	0,13	0
<i>H. nuttallii</i>	6,73	0,51	1,61	0,08	0
<b>Gesamtversuch</b>	4,94	1,09	1,23	0,24	-

<sup>a)</sup> Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchsdurchführungen (n=4; N=216); <sup>b)</sup> Gesamtmittelwert aus drei Versuchsdurchführungen. <sup>c)</sup> Boniturnoten nach STURGES zur Ermittlung der idealen Klassenbreite.

### 3.2.3.2 Qualitative Relationen zwischen interspezifischen Phenolmustern und der Läsionsausdehnung

Die hierarchische Clusteranalyse (UPGMA-Dendrogramm) zwischen den 18 perennierenden *Helianthus* Wildarten über die diversen Phenolmuster zeigte eine Gruppierung der Untersuchten Populationsakzessionen in zwei Hauptcluster (siehe Abbildung 16).

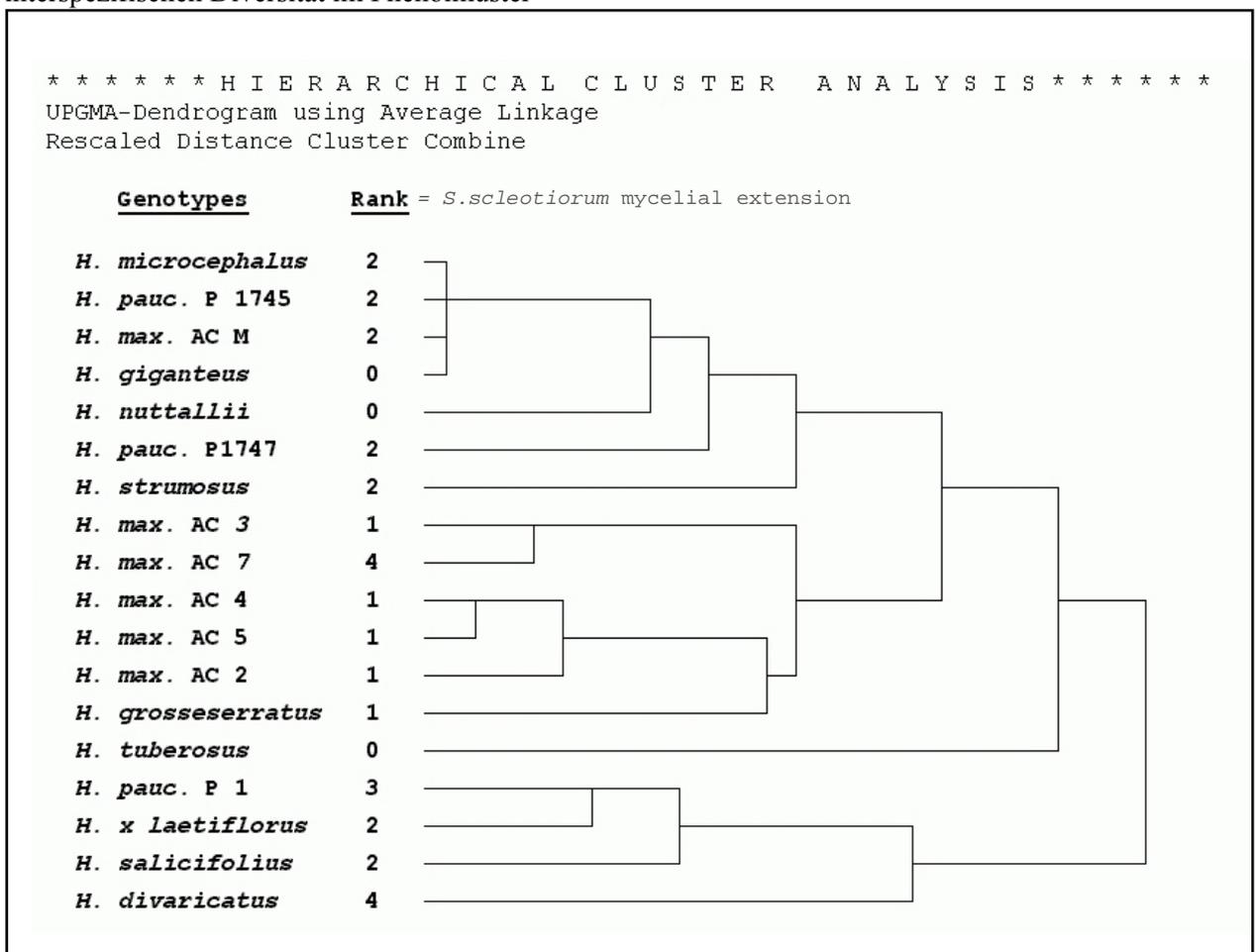
Hierbei zeigten sich die Arten *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* P1, *H. x laetiflorus*; *H. salicifolius* sowie *H. divaricatus* im Phenolmuster ähnlicher als die übrigen Genotypen. *H. tuberosus* wies innerhalb des zweiten Clusters eine isolierte Position auf und zeigte somit im Phenolspektrum nur eine geringe Ähnlichkeit zu den anderen Genotypen dieses Clusters. Nahezu ähnliche Phenolspektren wiesen insbesondere *H. microcephalus*, *H. pauciflorus* ssp. *pauciflorus* P 1745; *H. maximiliani* AC M sowie *H. giganteus* auf. Ebenso gruppierten sich

innerhalb eines Sub-Clusters die *H. maximiliani* Akzessionen AC1, AC3, AC 4, AC 5 und AC 7, zeigten somit annähernd gleichartige Phenolmuster.

Zusammenhänge zwischen hierarchischen Clusterzentren und dem *Sclerotinia*-Myzelverhalten konnten dagegen nicht festgestellt werden. Sowohl in den Haupt- als auch Sub-Clustern gruppierten sich teilweise stark in Läsionslänge als auch Myzelwachstumsraten divergierende Wildarten zusammen. Qualitative Zusammenhänge zwischen dem interspezifischen Phenolspektren und dem Myzelverhalten von *Sclerotinia* konnten somit durch die hierarchische Clusteranalyse nicht detektiert werden. Auch eine biseriale Korrelationsanalyse zwischen der Präsenz bzw. Absenz der 50 distinkten Substanzen (Peaks) im Blattphenolmuster und der Läsionsausdehnung im Inokulierten Blattgewebe verzeichnete nichtsignifikante und äußerst marginale Zusammenhänge ( $r = 0.0 - 0.3^{n.s.}$ ).

Tendenziell wies das Phänogramm der untersuchten Wildarten basierend auf phenolischen Inhaltsstoffen taxonomische Wesensmerkmale innerhalb des sekundären *Helianthus*-Genpools auf.

**Abbildung 16:** Hierarchische Clusteranalyse (UPGMA-Dendrogramm) zwischen 18 perennierenden *Helianthus* Wildarten, basierend auf Ähnlichkeitskoeffizientenmatrizen nach JACCARD der qualitativen, interspezifischen Diversität im Phenolmuster <sup>a)</sup>

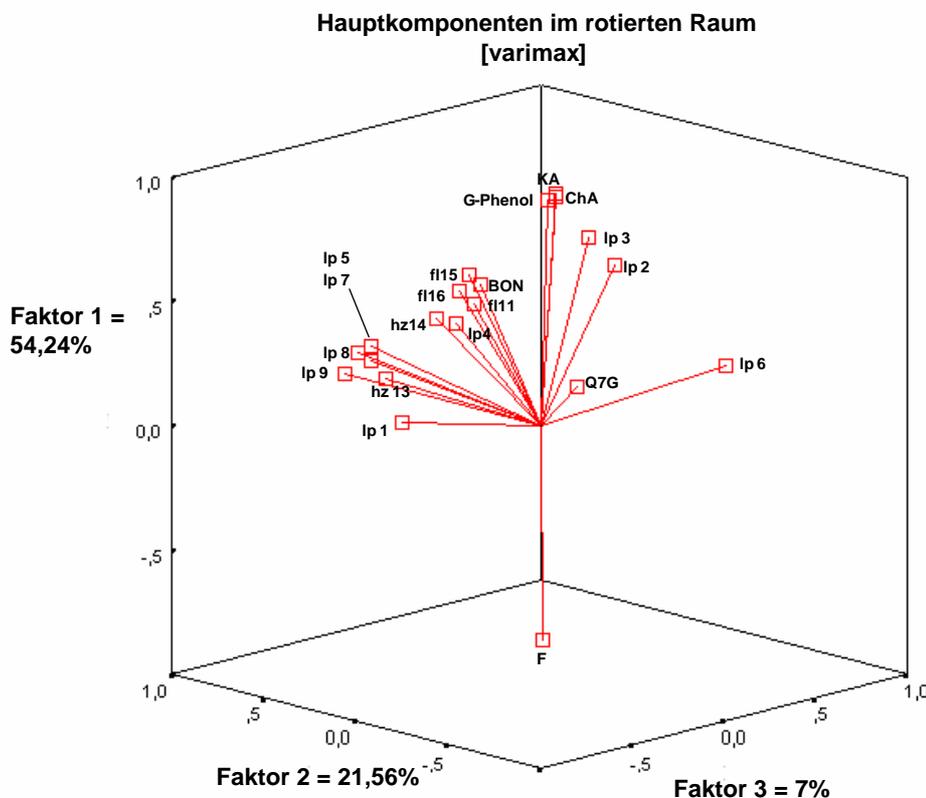


<sup>a)</sup> basierend auf  $\approx 2700$  phenolischen Markern (Peaks). Rank = Boniturnote im DTL-Test.

### 3.2.3.3 Quantitative Relationen zwischen interspezifischen Phenolmustern sowie der Läsionsausdehnung

Im Gegensatz zu den marginalen qualitativen Korrelationen zwischen der Präsenz einzelner Substanzen im Phenolmuster und der Myzelaktivität konnten hinsichtlich deren Quantitäten im Mesophyll starke Interaktionen verzeichnet werden. In der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 17) zeigten die Substratkonzentrationen der Komponenten Fl 11, Fl 15, Fl 16, Ip 4 sowie Hz 14 in den Blättern eine starke Wechselwirkung mit dem Fortschreiten der Läsion (Boniturnote). Insbesondere die Substanzen Fl 11, Fl 15 und Fl 16 wiesen enge und gleichgerichtete Faktorladungen zur Boniturnote auf und deuten damit auf deren potentielle kausal antagonistische Interaktion hin. Dagegen zeigten der Gesamtphenolgehalt, Kaffeesäure, Chlorogensäure sowie ein Grossteil der lipophilen Fraktion einen bedeutend schwächeren Zusammenhang zum Läsionsfortschritt auf. Des Weiteren wiesen die Konzentrationen an Substanz F in den Wildartblättern nahezu gegensätzliche Faktorladungen zur Boniturnote auf und wies damit auf eine potentiell synergistische Wechselwirkung zum Fortschreiten der Läsion im *Sclerotinia* inokulierten Blattgewebe hin.

**Abbildung 17:** Hauptkomponentenanalyse der Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen sowie der Läsionsausdehnung in Blättern perennierender *Helianthus*-Arten <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> nach dem Varimax-Rotationsverfahren. BON = Boniturnote, G-Phenol = Gesamtphenolgehalt, KA = Kaffeesäure; ChA = Chlorogensäure; Q7G = Quercetin-7-*O*- $\beta$ -D-Glucosid. Berechnungsgrundlage: 50 Marker x 18 Genotypen x 3 Wdhg.  $\approx$  2700 phenolische Marker in mg/ g TM.

Insgesamt konnte durch das vorliegende Modell der multifaktoriellen Hauptkomponentenanalyse über 80% der Variabilität der Läsionslängen (4d p.i.) der untersuchten Genotypen erklärt werden.

Die anschließende Korrelationsanalyse bestätigte im Wesentlichen die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Phenolgehalten sowie der Ausbreitung des *Sclerotinia*-Myzels (Boniturnote). Als signifikante, hochkorrelierende phenolische Marker zur Boniturnote konnten die Komponenten Fl 15 ( $r = 0.89$ ;  $p = 0,0$ ), Fl 16 ( $r = 0.85$ ;  $p = 0,0$ ) und lp4 ( $r = 0.84$ ;  $p = 0,0$ ) evaluiert werden. Somit konnte deren potentielle antagonistische Interaktion zur Myzelausbreitung im Mesophyll bestätigt werden. Dabei zeigten alle drei hochkorrelierenden Marker über die drei Detektionswellenlängen das typische Absorptionsverhalten von Flavonolen bzw. Flavonol-Glycosiden.

Der potentiell synergistische Zusammenhang zwischen den Gehalten an Substanz F im Blattgewebe und des *Sclerotinia*-Myzelwachstums konnte ebenso durch die hochsignifikante negative Korrelation zur Boniturnote mit  $r = -0.76$  ( $p = 0,01$ ) bestätigt werden. Zusätzlich konnte hinsichtlich des Gesamtphenolgehaltes im Frischgewicht der Blätter eine schwache negative Interaktion zur Läsionsextension erkannt werden ( $r = 0.62$ ;  $p = 0,01$ ). Alle weiteren detektierten Substanzen wiesen hinsichtlich ihrer Gehalte im Probenmaterial lediglich marginale und nicht signifikante Korrelationen auf.

In Tabelle 22 und 23 sind jeweils die genotypischen Gehalte aller korrelierenden phenolischen Substanzen in Bezug auf die Trockenmasse bzw. auf die Frischmasse des Blattmaterials aufgezeigt. Wesentliche Unterschiede in der Bezugsgröße (Trockenmasse bzw. Frischmasse) bestanden dabei nicht. Ebenso zeichnete sich kein Zusammenhang zwischen den Trockenmassegehalten der einzelnen untersuchten Wildartblätter sowie der Läsionslänge ab.

Abbildung 18 zeigt zusammenfassend den Zusammenhang zwischen den detektierten phenolischen Markersets und den evaluierten Blattresistenztypen am Beispiel einer partiell resistenten (*H. divaricatus*), intermediären (*H. pauciflorus* P 1745) und suszeptiblen (*H. tuberosus*) Wildart.

**Tabelle 22:** Konzentrationen in mg/g TM ausgewählter phenolischer Inhaltsstoffe im Mesophyll perennierender *Helianthus*-Wildarten und deren Korrelation zur *Sclerotinia*-Läsionsextension (Boniturnote) <sup>a)</sup>

Art	phenolische Komponente [mg/g TM] <sup>b)</sup>															
	F	Chlorogen säure	Kaffeesäure	Hz 13	Hz 14	Fl 11	Fl 15	Fl 16	Lp 2	Lp 3	Lp 4	Lp 5	Lp 6	Lp 7	Lp 8	Gesamt- Phenolgehalt
<i>H. divaricatus</i>	0,18	41,32	0,41	3,32	1,64	5,11	2,22	2,61	1,11	2,87	2,94	2,54	0,10	0,84	1,40	144,83
<i>H. maximiliani AC 7</i>	0,17	58,53	0,66	0,89	0,53	1,55	1,94	1,99	0,89	2,29	1,42	0	0,34	0	0	96,30
<i>H. pauc. pauc. P 1</i>	0	68,73	0,74	1,84	3,43	3,37	1,29	1,24	0,96	1,97	2,07	0,59	0,21	0,53	0,54	51,18
<i>H. strumosus</i>	0,17	61,51	0,57	0,48	0,16	1,25	0,65	0,58	0,95	2,49	0,78	0,44	0,52	0	0	62,22
<i>H. maximiliani AC M</i>	0,33	45,72	0,74	0,80	0,64	1,61	0,70	0,65	0,65	2,31	0,68	0	0	0	0	37,58
<i>H. salicifolius</i>	0,49	28,08	0,34	1,64	0,78	0,76	0,55	0,53	0,56	0,27	1,23	0,23	0,58	0,20	0	40,17
<i>H. microcephalus</i>	0,20	51,17	0,53	0,87	0,88	3,52	1,03	1,20	0,99	2,13	1,30	0	1,84	0	0	109,82
<i>H. pauc. pauc. P 1745</i>	0,24	37,78	0,52	0,56	0,49	0,84	0,47	0,38	0,26	1,51	0,40	0	0	0	0	62,94
<i>H. pauc. pauc. P 1747</i>	0,16	59,50	0,74	0,72	0,50	1,47	0,39	0,40	0,64	0,65	0,21	0	0	0	0	74,15
<i>H. x laetiflorus</i>	0,30	47,39	0,57	1,35	2,79	2,78	0,88	0,88	0,83	1,05	0,49	0,54	0,41	0,55	0,06	175,36
<i>H. maximiliani AC 1</i>	0,33	27,57	0,33	0	0	0,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140,99
<i>H. maximiliani AC 4</i>	0,39	27,39	0,54	0,32	0,31	1,31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150,34
<i>H. maximiliani AC 3</i>	0,40	18,48	0,24	0,32	0,24	0,75	0	0	0	0,28	0	0	0	0	0	131,27
<i>H. maximiliani AC 5</i>	0,79	18,29	0,28	0,31	0,16	0,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	105,89
<i>H. grosseserratus</i>	0,43	27,56	0,31	0,93	0,48	0	0,35	0,27	0	0,95	0,11	0	0	0	0	189,30
<i>H. tuberosus</i>	0,71	29,71	0,38	1,67	1,28	1,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	131,89
<i>H. giganteus</i>	0,46	78,96	0,64	0,38	0,20	0,43	0,24	0,27	0,32	0,85	0	0	0	0	0	148,96
<i>H. nuttallii</i>	0,42	47,92	0,51	0,14	0,25	1,72	0	0	0,68	0,42	0,20	0	0	0	0	122,55
<b>r <sup>c)</sup></b>	-0,77**	0,34 <sup>ns</sup>	0,46 <sup>ns</sup>	0,54*	0,53*	0,50*	0,89**	0,85**	0,64**	0,54*	0,84**	0,58*	0,51*	0,53*	0,52*	0,46 <sup>ns</sup>

<sup>a)</sup> Mittelwerte aus drei Unabhängigen Blattproben/Wildart.

<sup>b)</sup> Konzentrationsangaben in Kaffeesäureequivalenten.

<sup>c)</sup> Korrelationskoeffizient nach Spearman. \*,\*\* = Signifikanzniveau zu 1% bzw. 0,1%. n.s. = nicht signifikant.

**Tabelle 23:** Konzentrationen in mg/g FM ausgewählter phenolischer Inhaltsstoffe im Mesophyll perennierender *Helianthus*-Wildarten und deren Korrelation zur *Sclerotinia*-Läsionsextension (Boniturnote) <sup>a)</sup>

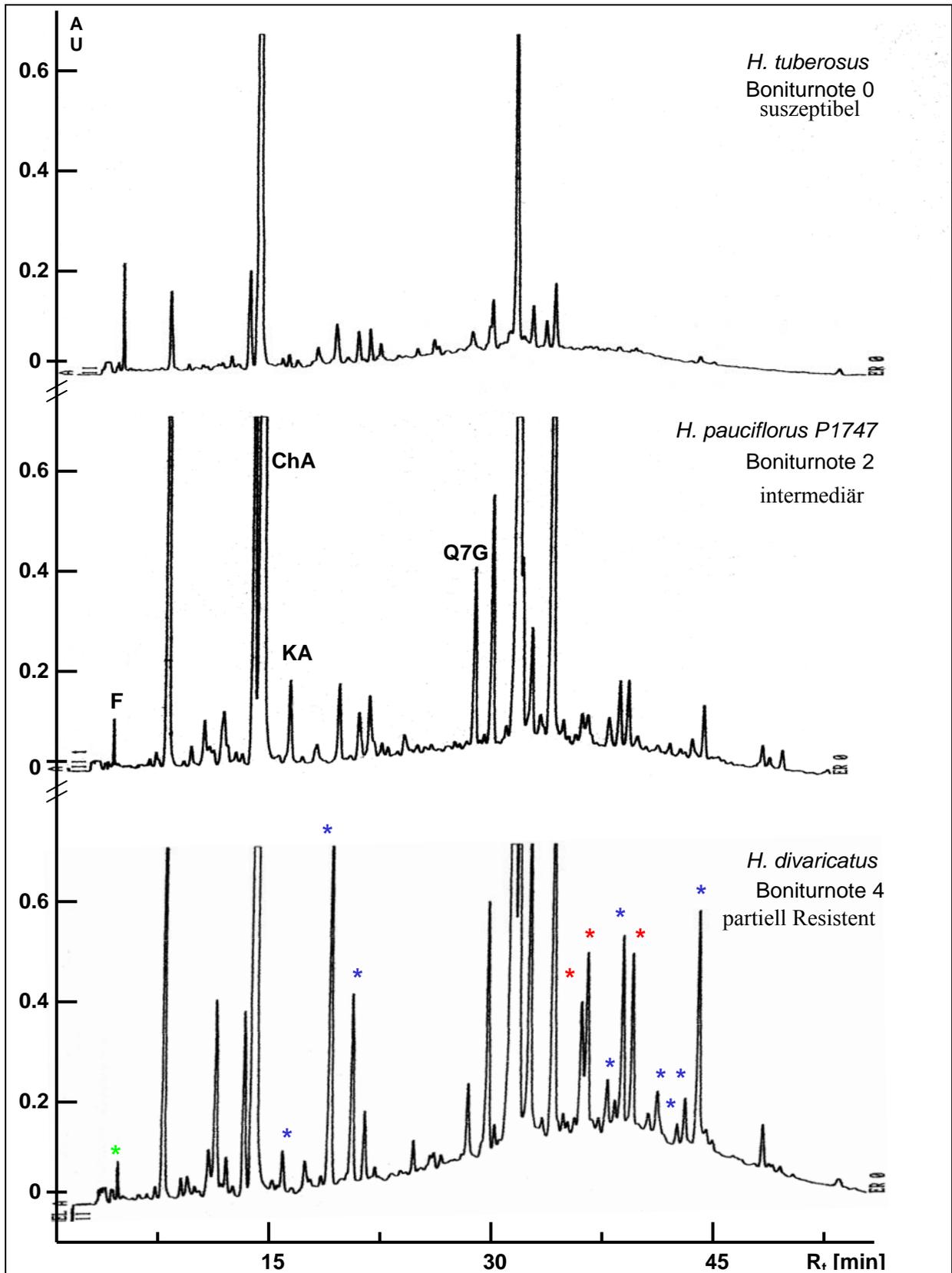
Art	phenolische Komponente [mg/g FM] <sup>b)</sup>														Gesamt-Phenolgehalt	
	F	Chlorogen säure	Kaffeensäure	Hz 13	Hz 14	Fl 11	Fl 15	Fl 16	Lp 2	Lp 3	Lp 4	Lp 5	Lp 6	Lp 7		Lp 8
<i>H. divaricatus</i>	0,07	16,69	0,16	1,34	0,67	2,06	0,89	1,06	0,45	1,16	1,18	1,03	0,08	0,34	0,57	56,96
<i>H. maximiliani AC 7</i>	0,05	18,49	0,21	0,22	0,46	0,49	0,53	0,49	0,21	0,72	0,33	0	0,11	0	0	41,48
<i>H. pauc. pauc. P 1</i>	0	18,35	0,19	0,49	0,91	0,90	0,34	0,33	0,26	0,52	0,55	0,16	0,06	0,14	0,14	50,55
<i>H. strumosus</i>	0,05	19,50	0,18	0,15	0,05	0,39	0,20	0,17	0,30	0,79	0,15	0,13	0,16	0	0	45,91
<i>H. maximiliani AC M</i>	0,10	13,80	0,22	0,24	0,19	0,48	0,21	0,19	0,21	0,69	0,28	0	0	0	0	33,17
<i>H. salicifolius</i>	0,14	8,39	0,10	0,49	0,24	0,22	0,16	0,15	0,11	0,08	0,49	0,07	0,17	0,06	0	22,17
<i>H. microcephalus</i>	0,06	16,48	0,17	0,28	0,28	1,13	0,37	0,43	0,69	1,00	0,45	0	0,59	0	0	56,46
<i>H. pauc. pauc. P 1745</i>	0,06	10,08	0,14	0,15	0,10	0,22	0,16	0,08	0,07	0,41	0,10	0	0	0	0	28,27
<i>H. pauc. pauc. P 1747</i>	0,05	19,40	0,24	0,23	0,17	0,48	0,13	0,13	0,21	0,21	0,06	0	0	0	0	42,99
<i>H. x laetiflorus</i>	0,08	13,51	0,16	0,38	0,79	0,79	0,25	0,37	0,52	0,30	0,14	0,15	0,12	0,16	0,02	42,45
<i>H. maximiliani AC 1</i>	0,12	9,65	0,12	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17,91
<i>H. maximiliani AC 4</i>	0,11	7,53	0,15	0,09	0,08	0,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17,11
<i>H. maximiliani AC 3</i>	0,10	4,67	0,06	0,08	0,06	0,19	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	9,50
<i>H. maximiliani AC 5</i>	0,23	5,32	0,08	0,09	0,04	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,69
<i>H. grosseserratus</i>	0,10	6,48	0,07	0,22	0,11	0	0,09	0,06	0	0,22	0,02	0	0	0	0	14,79
<i>H. tuberosus</i>	0,17	7,16	0,09	0,40	0,30	0,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23,21
<i>H. giganteus</i>	0,12	21,00	0,17	0,10	0,05	0,11	0,06	0,07	0,08	0,22	0	0	0	0	0	39,99
<i>H. nuttallii</i>	0,14	16,01	0,17	0,04	0,08	0,91	0	0	0,22	0,80	0,10	0	0	0	0	40,93
<b>r <sup>c)</sup></b>	-0,76**	0,43 <sup>ns</sup>	0,52*	0,62*	0,54*	0,46 <sup>ns</sup>	0,89**	0,87**	0,62**	0,54*	0,84**	0,58*	0,51*	0,54*	0,52*	0,62**

<sup>a)</sup> Mittelwerte aus drei Unabhängigen Blattproben/Wildart.

<sup>b)</sup> Konzentrationsangaben in Kaffeesäureequivalenten.

<sup>c)</sup> Korrelationskoeffizient nach Spearman. \*,\*\* = Signifikanzniveau zu 1% bzw. 0,1%. n. s. = nicht signifikant.

**Abbildung 18:** Interspezifische Phenolmuster im sekundären *Helianthus*-Genpool und *Sclerotinia*-Blattresistenz am Beispiel susceptibler (*H. tuberosus*), intermediärer (*H. pauciflorus*) und Teilresistenter (*H. divaricatus*) Genotypen



a) Detektionswellenlänge 280nm: \* synergistische Interaktion zur Läsionsextension. \* = mittlere, antagonistische Interaktion ( $r \approx 0,5$ ), \* = hochkorrelierende antagonistische Interaktion ( $r > 0,8$ ;  $p < 0,01$ ).

### 3.3 Prä- und postinfektionelle Charakteristik der *Sclerotinia* Stängel-Resistenzreaktion

#### 3.3.1 Histochemische Untersuchung prä- und postinfektioneller Strukturen

##### 3.3.1.1 Präformierte morphologische Eigenschaften der Sprossachsen

Im Allgemeinen zeigten die nicht infizierten Stängelquerschnitte des 4.-6. Internodiums die wesentlichen Charakteristika der sekundären Sprossachse auf. Alle Genotypen wiesen eine einzellige Epidermis gefolgt von einer mehrzelligen Hypodermis aus collenchymatischem Gewebe auf. Im Anschluss daran folgte ein aus mehreren Zelllagen bestehendes Rindenparenchym sowie eine Stärkescheide, welche bei den meisten Wildarten endodermale Ausprägung mit sekundären Zellwandveränderungen aufwies. Das Rindenparenchym zeichnete sich insbesondere bei den suszeptiblen Wildarten *H. tuberosus* und *H. giganteus* durch einen großlumigen Zellverband mit zahlreichen Interzellularen aus. Ein kompaktes, kleinzelliges Rindenparenchym war dagegen für die teilresistenten Wildarten *H. salicifolius* und *H. maximiliani* AC 7 charakteristisch. Das Markparenchym des Zentralzylinders präsentierte sich in allen Genotypen mit großlumigen Parenchymzellen.

Starke genotypische Unterschiede wiesen die Arten hinsichtlich ihres Anteils an lignifizierten Strukturen im Zentralzylinder auf und sind in Abbildung 19a-e vergleichend dargestellt. Diese konnten dabei eindeutig den einzelnen Resistenzreaktionen zugeordnet werden. Die partiell resistenten Genotypen *H. maximiliani* AC 7 (Abb. 19a), *H. maximiliani* AC M sowie *H. salicifolius* (Abb. 19 d) zeigten sowohl die größte Ausdehnung des Gefäßsystems als auch die größte Anzahl an eingeschalteten Leitbündeln aller untersuchten Spezies. Dementsprechend wiesen diese Genotypen auch den höchsten Anteil lignifizierten Gewebes auf. Dieser zeigte sich in einer Phloroglucin-HCl vermittelten Rotfärbung des xylematischen Anteils als auch des für *Helianthus* charakteristischen Perizykelsklerenchyms (Metcalf & Chalk 1965) parallel zu den Leitbündeln. Die radiäre Ausdehnung des lignifizierten Xylemgewebes bei diesen Arten betrug bis zu 300µm. Durch die große Anzahl an eingeschalteten Leitbündeln zeigten sie in den histologischen Untersuchungen keine primären Markstrahlen. Demgegenüber wiesen die intermediär hinsichtlich der *Sclerotinia*-Stängelresistenz reagierenden Arten *H. pauciflorus* P1 (Abb. 19b); *H. strumosus* und *H. nuttallii* als auch die suszeptiblen Genotypen *H. tuberosus* (Abb. 19c), *H. giganteus* und *H. grosseserratus* aufgrund der reduzierten Anzahl eingeschalteter Leitbündeln jeweils primäre Markstrahlen auf. Deren tangentielle Ausdehnung betrug im Schnitt bei *H. pauciflorus* P1; *H. strumosus* und *H. nuttallii* 19µm ( $s_d$  8.7, n=25) bei *H. tuberosus*, *H. giganteus* und *H. grosseserratus* 86µm ( $s_d$  33; n=25).

Des Weiteren zeigte *H. salicifolius* von allen evaluierten Genotypen die mächtigste Cuticula (Abb. 19f). Sie betrug im Schnitt 7.8µm ( $s_d$  0.2; n = 20), alle anderen Genotypen wiesen Dicken von 2µm und weniger auf (Abb. 19g-h). Die epidermalen Cutinauflagerungen konnten

in der Regel fluoreszenzmikroskopisch an ihrem blau emittierenden Signal nach UV-Anregung erkannt werden (Abb. 19j). *H. maximiliani* AC M zeigte keine Sudan IV bedingte Rotfärbung der Epidermis, wies dagegen jedoch alternierende Suberineinlagerungen in den epidermalen und der daran anschließenden ersten hypodermalen Zellschicht auf (Abb. 19i).

Alle Genotypen zeigten die für einige Formenkreise der Asteraceen charakteristischen corticalen Harzgänge (Metcalf & Chalk, 1965) in deren Lumen sich durch Sudan IV Färbung rote, lipidähnliche Substanzen nachweisen ließen. Abweichend wiesen *H. salicifolius* und *H. pauciflorus* ssp. P1 wesentlich größere Lumina dieser corticalen Harzgänge als auch faszikuläre und medulläre Lokalisationen dieser sekretorischen Kavitäten auf.

Die histochemische Detektion von Flavonoiden ergab keine Unterschiede zwischen den untersuchten Wildarten und beschränkte sich bei allen Genotypen auf deren Lokalisation in Epidermis und Hypodermis. Kondensierte Tannine hingegen wurden in keiner Wildart detektiert.

### 3.3.1.2 Makroskopische und histopathologische Beobachtungen nach *Sclerotinia*-Inokulation

Schon durch die makroskopische Untersuchung der für die Resistenzphänomene charakteristischen *Sclerotinia*-induzierten Nekrosen konnten im langwelligen UV-Licht ( $\lambda=366\text{nm}$ ) deutliche Unterschiede in deren Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Mit den stark nekrotisierten Läsionen des partiellen Resistenz-Types von *H. maximiliani* ACM, AC 7 sowie von *H. salicifolius* ging eine intensive weiß-blaue Fluoreszenz einher (siehe dazu Abbildung 20a und b). Diese fluoreszierenden Zonen zeigten häufig eine über die eigentliche nekrotisierte Zone hinausgehende Ausbreitung und konnte durch die intakte Epidermis beobachtet werden. Zum intermediären Reaktionstypus zeigten *H. pauciflorus* P1 und *H. strumosus* umweltabhängig bei stark nekrotisierten Reaktionen ebenfalls eine weiß-blaue Fluoreszenz die jedoch eine reduzierte Intensität aufwies und nur lokal begrenzt um die Inokulationsstelle auftrat. Ausgedehnte fluoreszierende Zonen traten bei diesen Genotypen nicht auf. *H. nuttallii* sowie die suszeptiblen Genotypen *H. tuberosus*, *H. giganteus* und *H. grosseserratus* wiesen bei keiner durch *Sclerotinia* induzierten Läsion Fluoreszenzen auf.

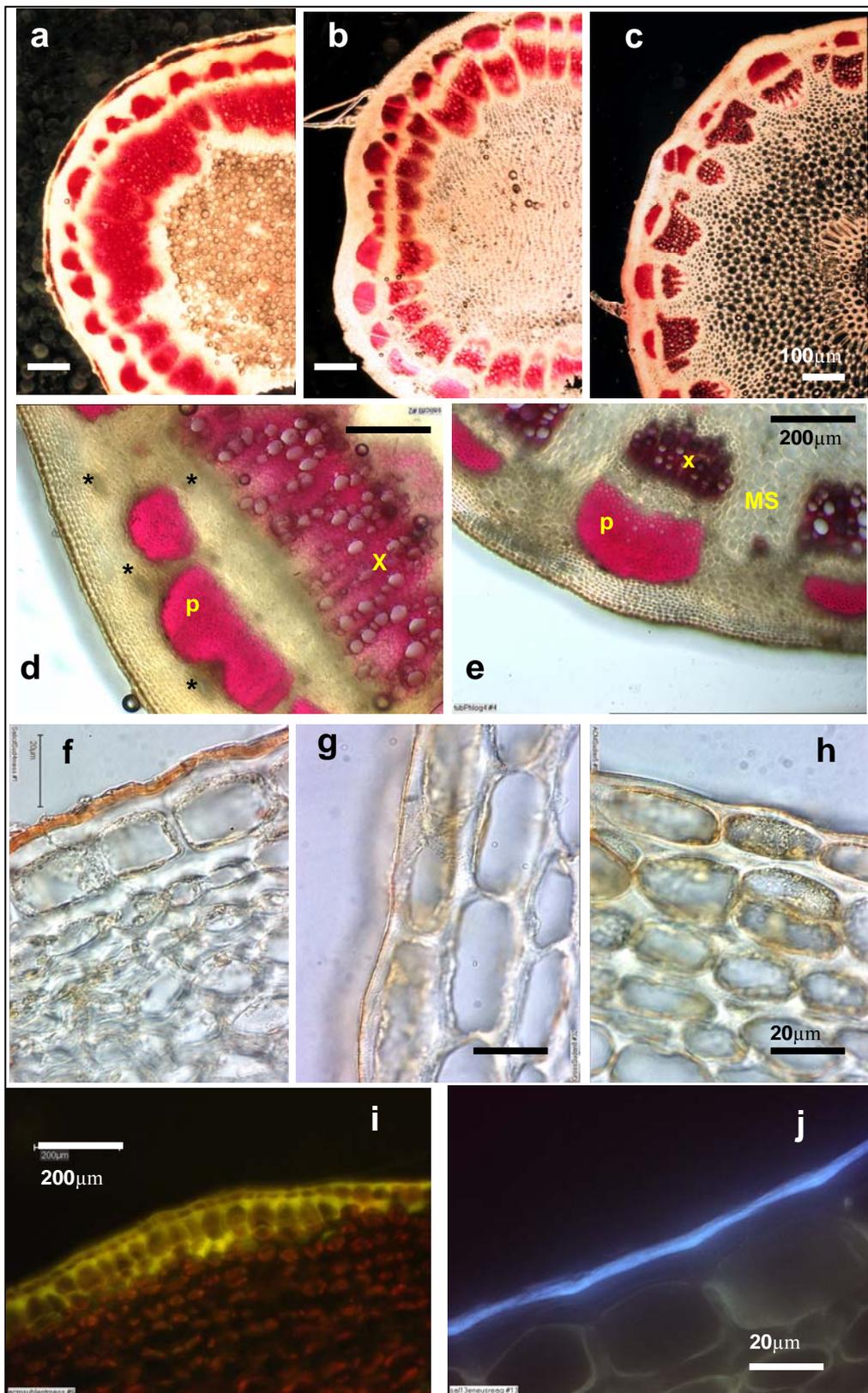
Die oben genannten makroskopischen Beobachtungen konnten durch Epifluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Während die Autofluoreszenzsignale bei Anregung im langwelligen UV-Licht ( $\lambda \approx 365\text{nm}$ ) sowie im blauen Licht ( $\lambda \approx 460\text{nm}$ ) über die Detektionswellenlängen ( $\lambda = 435\text{-}485\text{nm}$ ;  $\lambda = 515\text{-}555\text{nm}$ ) in der gesunden Kontrolle aller Genotypen die gleiche Intensität aufwiesen und in der Hauptsache auf die lignifizierte Gewebe beschränkt waren, zeigten sich nach *Sclerotinia*-Inokulation erhebliche genotypische Unterschiede in der Signalstärke. Bei *Sclerotinia*-Infektion wiesen die partiell resistenten Genotypen bei beiden Anregungen in der Hauptsache ein im Perizykelsklerenchym, xylematischen Gewebe sowie im Cortexparenchym

lokalisiertes, verstärktes Fluoreszenzsignal auf (Abb. 20c, d). Hierbei lieferten die in unmittelbaren Kontakt zum nekrotischen Gewebe liegenden lignifizierten Elemente als auch parenchymatische Gewebe ein stärkeres Autofluoreszenzsignal auf als entfernter lokalisierte. Ähnlich verstärkte Autofluoreszenzsignale konnten bei den intermediären Wildarten nur selten beobachtet werden. Suszeptible Wildarten zeigten histologisch zu keiner Inokulation solche Fluoreszenzsignale. Das vom *Sclerotinia*-Myzel nach zwei Tagen bereits mazerierte corticale Parenchym zeigte bei den suszeptiblen Arten bei keinem Genotyp eine Signalverstärkung der Fluoreszenz.

Die partiell resistenten Wildarten *H. maximiliani* ACM, AC 7 sowie *H. salicifolius* wiesen nach *Sclerotinia*-Infektion zusätzlich zu den bereits geschilderten Autofluoreszenzsignalen bei  $\lambda_{em}$  im blauen ( $\lambda = 435-485\text{nm}$ ) und grünen ( $\lambda = 515-555\text{nm}$ ) Frequenzbereich ein weiteres nur bei diesen Genotypen nach Inokulation beobachtetes Signal bei Anregung im blauen und Detektion im roten Licht ( $\lambda_{ex} = . 450-490$ ;  $\lambda_{em}$  600-660) auf (siehe dazu Abbildung 20e und f). Diese im roten Licht detektierte fluoreszierende Zone erschien hierbei im Protoxylem, Xylemparenchym sowie in der Sklerenchymscheide des Gefäßbündels.

Eine verstärkte Lignifizierung konnte nach *Sclerotinia*-Inokulation mittels Phloroglucin-HCl in keinem der evaluierten Genotypen detektiert werden.

Mazeriertes, von *Sclerotinia* im Verlauf der Pathogenese enzymatisch degradiertes Gewebe bestand bei allen Genotypen aus nicht lignifizierten Strukturen. Lignifizierte Zellen und Gewebetypen zeigten dabei keine Anzeichen der Lysis. Bei allen Wildarten erfolgte eine komplette Mazeration des Rindenparenchyms sowie des Phloem und des Phloemparenchyms. Bei starker Präsenz des Perizykelsklerenchyms in annähernd konzentrischer Anordnung, wie sie von *H. salicifolius* ausgebildet wurde, erfolgte die enzymatische Degradation lediglich im Rindenparenchym, ein invasives Wachstum des *Sclerotinia* Myzels über das Rindenparenchym hinaus konnte dann nicht beobachtet werden (Abb. 20 g, h). Im Allgemeinen konnte eine Lysis des Markparenchyms bei keiner teilresistenten Wildart beobachtet werden, wurde dagegen bei den intermediären und suszeptiblen Genotypen zu jeder Inokulation beobachtet. Das Einwachsen des *Sclerotinia*-Myzels in das Markparenchym erfolgte hierbei stets durch die primären Markstrahlen. Vollkommen mazerierte Sprossquerschnitte charakterisierten sich durch keine erkennbaren Zellstrukturen, lediglich lignininkrustiertes Gewebe konnte *in toto* beobachtet werden.



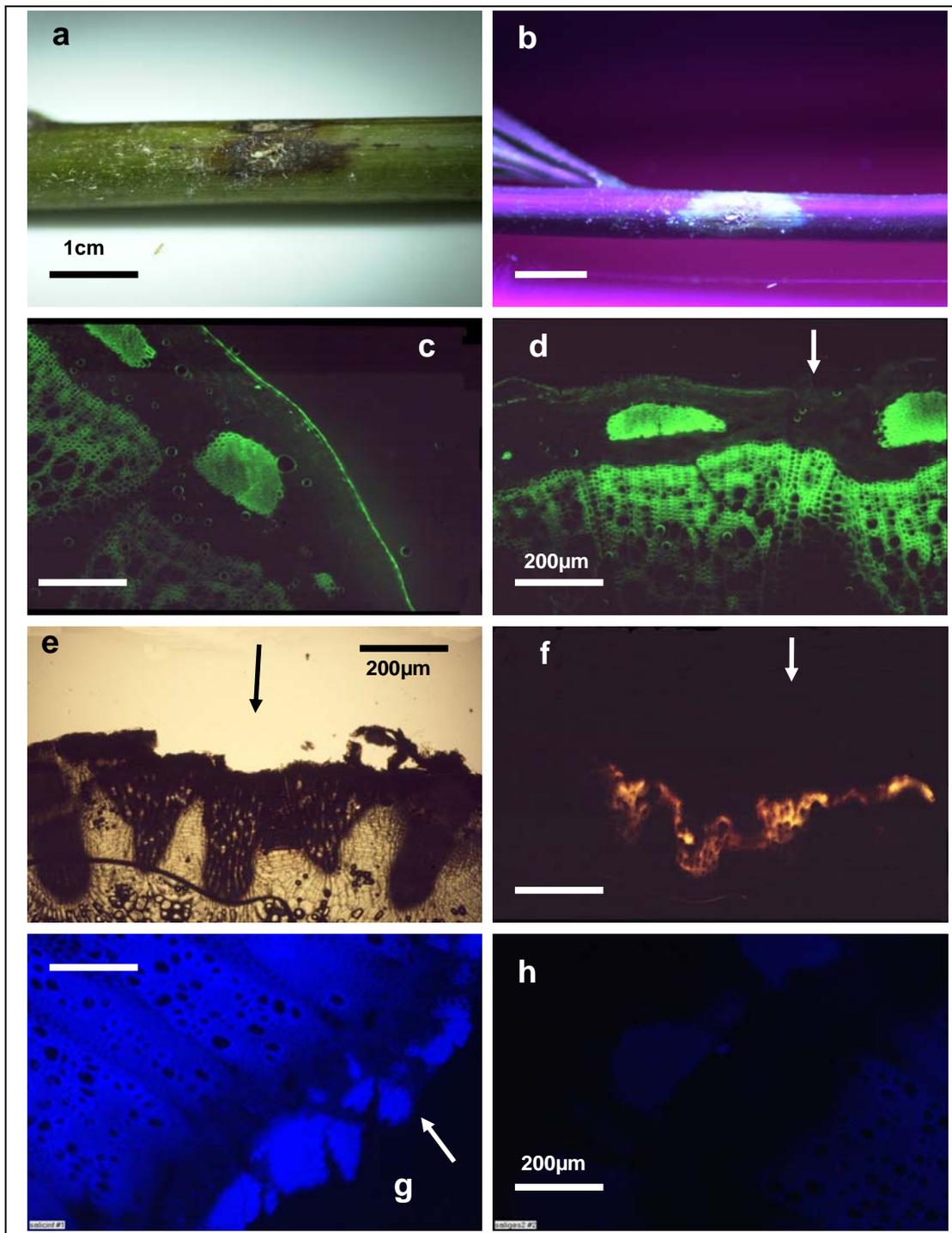
**Abbildung 19:** Histochemische Nachweise struktureller Resistenzfaktoren in *Helianthus*  
 Detektion lignifizierter Strukturen mittels Phloroglucin-HCl:

**a)** *H. maximiliani* AC M; **b)** *H. pauciflorus* ssp. P1; **c)** *H. tuberosus*; Vergrößerung 40x.

**d)** *H. salicifolius*; **e)** *H. tuberosus*; Vergrößerung 100x; p = Perizykel-Sklerenchym; x = Xylem; MS = prim. Markstrahl.; \* = cortikale und faszikuläre Harzgänge. Vergrößerung 100x.

Sudan VI-Färbung: **f)** *H. salicifolius*; **g)** *H. tuberosus*; **h)** *H. maximiliani* AC M; Vergrößerung 1000x.

Fluoreszenzmikroskopische Detektion von sekundärem - **i)** Suberineinlagerung bei *H. maximiliani* AC M ( $\lambda_{ex}$ =340-380nm;  $\lambda_{em}$ =520nm; pH > 9) und primärem **j)** Cutinauflagerung bei *H. salicifolius* Epidermis ( $\lambda_{ex}$ =340-380nm;  $\lambda_{em}$ =435-485nm) – Abschlussgewebe.



**Abbildung 20:** Histopathologische Charakteristika nach *Sclerotinia*-Infektion teilresistenter *Helianthus*-Wildarten<sup>\*)</sup>

**a)** *H. maximiliani* AC 7 2d p.i. Originalgröße; **b)** gleiches Objekt wie a) bei  $\lambda = 366\text{nm}$ ; 0.7fach.

**c)** *H. maximiliani* AC M präinfektionelle Autofluoreszenz und **d)** postinfektionell (2d p.i.) mit  $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{-}380\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 515\text{-}555\text{nm}$ . Vergrößerung 100fach.

**e)** *H. maximiliani* AC 7 Hellfeldaufnahme 2d. p.i.; **f)** gleiches Objekt wie e) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{-}490\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}660\text{nm}$ . Vergrößerung 100fach.

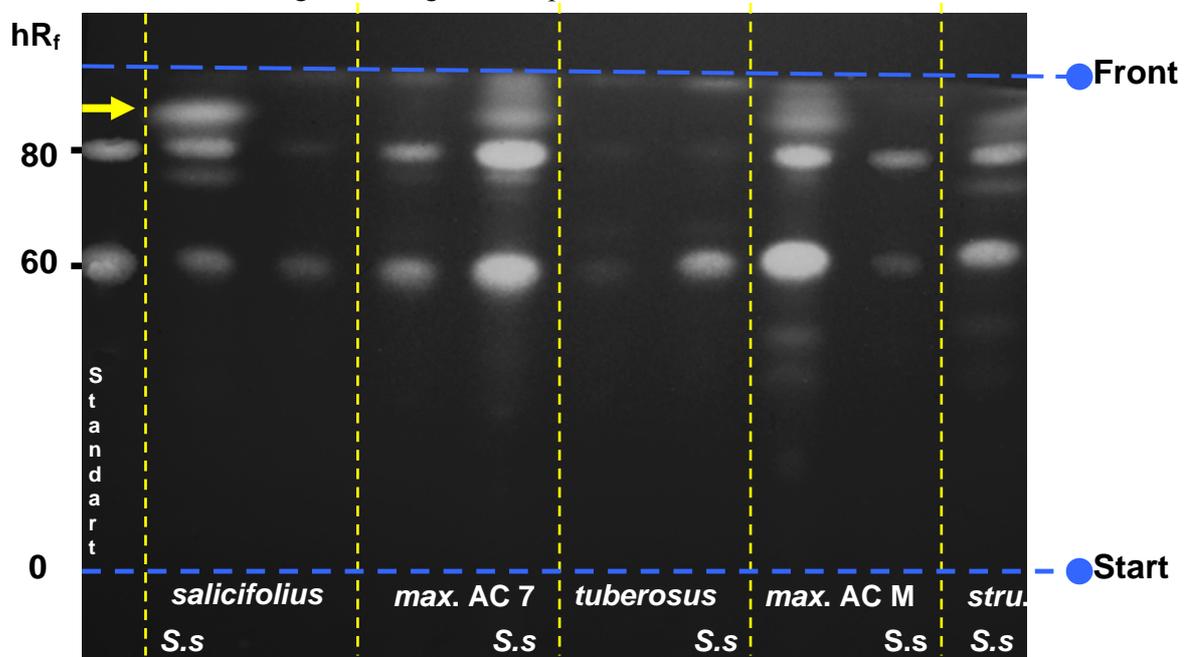
**g)** *H. salicifolius* 2 d. p.i.; **h)** *H. salicifolius* präinfektionell. Vergrößerung 100fach, Integrationszeit jeweils 1s.

<sup>\*)</sup> Pfeil = *Sclerotinia*-Inokulationsort.

### 3.3.2 Dünnschichtchromatographie resistenzbegleitender Inhaltsstoffe

Präinfektionell ließ sich nach Behandlung mit Naturstoffreagenz A auf den HPTLC-Chromatogrammen im Laufmittelsystem I bei allen Genotypen im langwelligen UV-Licht eine grau-blaugrün fluoreszierende Hauptzone beobachten, die bei  $hR_f = 60$  mit dem in gleicher Farbe fluoreszierenden Standard Chlorogensäure coeluierte. Des Weiteren konnte bei  $hR_f = 80$  eine, mit der weiß-blau fluoreszierenden Kaffeesäure, coeluiierende orange-gelb fluoreszierende Zone erkannt werden die Rückschlüsse auf deren flavonoide Struktur zuließ (Geiger, 1985; Andary et. al., 1996; Valette et al., 1998). Wesentliche chromatographische Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden präinfektionell jedoch nicht (siehe auch Abbildung 21).

**Abbildung 21:** Differentielle Akkumulation resistenzbegleitender hydrophiler Inhaltsstoffe im HPTLC-Chromatogramm ausgewählter perennierender *Helianthus*-Wildarten <sup>a)</sup>



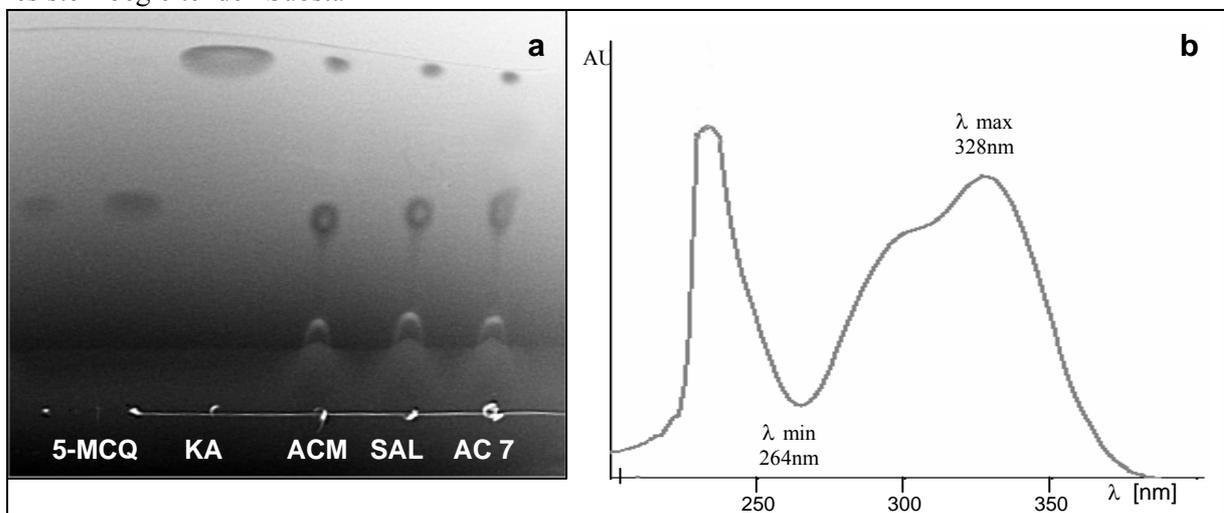
<sup>a)</sup> mobile Phase: Ethylacetat : H<sub>2</sub>O : Ameisensäure – 67 : 20 : 13. Standard: Chlorogensäure ( $hR_f = 60$ ) und Kaffeesäure ( $hR_f = 80$ ). S.s. = *Sclerotinia* Inokulierte Sprossachse. stru. = *H. strumosus*. Der Pfeil zeigt die resistenzbegleitende Substanzzone an. Aufnahme bei  $\lambda = 366\text{nm}$  nach Naturstoffreagenz A Behandlung.

Nach *Sclerotinia*-Infektion der Sprossachse zeigten sich dagegen starke Unterschiede in den Chromatogrammen der partiell resistenten, intermediären und suszeptiblen Genotypen. Im Allgemeinen wiesen alle inokulierten Sprossachsen nach *Sclerotinia*-Inokulation eine vergrößerte Zone der Chlorogensäure sowie der flavonoiden Zone auf.

Als gemeinsames Merkmal zeigten die *Sclerotinia* infizierten, partiell resistenten Sprossachsen von *H. maximiliani* AC 7 und AC M sowie *H. salicifolius* jedoch darüber hinaus jeweils nach Infektion eine weitere, oberhalb der flavonoiden Zone bei  $hR_f = 0.92$  eluierende, blau fluoreszierende Zone (siehe Abbildung 21). Auffallend starke resistenzbegleitende Akkumulationen dieser neuen Substanzzone zeigte *H. salicifolius*. Selbst geringe Läsionen von

< 0,5 cm führten zu den größten Substanzzonen in den Chromatogrammen und übertraf alle anderen partiell resistenten Wildarten. Bei Behandlung mit Naturstoffreagenz A erfolgte ein Farbwechsel in der Fluoreszenz nach intensiv weiß-blau wie sie für Depside der Kaffeesäure (Di-Caffeoyl-Ester) spezifisch sind (Bauer et al., 1986; Bauer et al., 1988; Andary et al., 1996). Des Weiteren coeluierte diese Substanzzone in selber Fluoreszenzfarbe mit der unter identischen chromatographischen Bedingungen (mobile und feste Phase) in *Echinacea purpurea* detektierten Chicoriensäure (2,3-O-Dicaffeoyl-Weinsäure) (Hahn-Deistrop & Bauer, 1999). Neben den partiell resistenten Genotypen wiesen diese Zone bei  $hR_f = 0,92$  ebenso die *Sclerotinia* inokulierten Sprossachsen von *H. strumosus* und *H. pauciflorus* P1 auf. Die anschließende spektralphotometrische Messung der präparativen DC-Aufarbeitung dieser Substanzzone zeigte für alle Genotypen das gleiche Absorptionsspektrum. Diese war bei  $\lambda = 264\text{nm}$  durch ein lokales Minimum und bei  $\lambda = 328\text{nm}$  durch ihr lokales Maximum charakterisiert und zeigte damit gleiches Absorptionsverhalten wie Isochlorogensäuren (Hausermann & Brandenberger, 1961; Hanson & Zucker, 1963; Colonna, 1970). Nach saurer Hydrolyse der präparativ aufgearbeiteten Substanzzone konnte jeweils Kaffeesäure cochromatographisch bei  $hR_f = 0,95$  und Chlorogensäure bei  $hR_f = 0,57$  im langwelligen UV – Licht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

**Abbildung 22:** HPTLC der sauren Hydrolyseprodukte a) und Absorptionsspektrum b) der resistenzbegleitenden Substanz \*



\* 5-MCQ = Chlorogensäure; KA = Kaffeesäure. Inversaufnahme bei  $\lambda = 366\text{nm}$ . ACM = *H. maximiliani* AC M; SAL = *H. salicifolius*; AC 7 = *H. maximiliani* AC 7.

Die gegenüber *Sclerotinia* Stängelfäule suszeptiblen Genotypen *H. giganteus*, *H. tuberosus* *H. grosseserratus* sowie die intermediär reagierende Wildart *H. nuttallii* zeigten diese induzierten Substanzzonen zu keiner *Sclerotinia* Inokulation. Bei diesen Genotypen zeigte sich lediglich eine gesteigerte Akkumulation der Chlorogensäure die an deren vergrößerten, bei  $\lambda = 366\text{nm}$  grau-grün fluoreszierenden Substanzzone erkannt werden konnte.

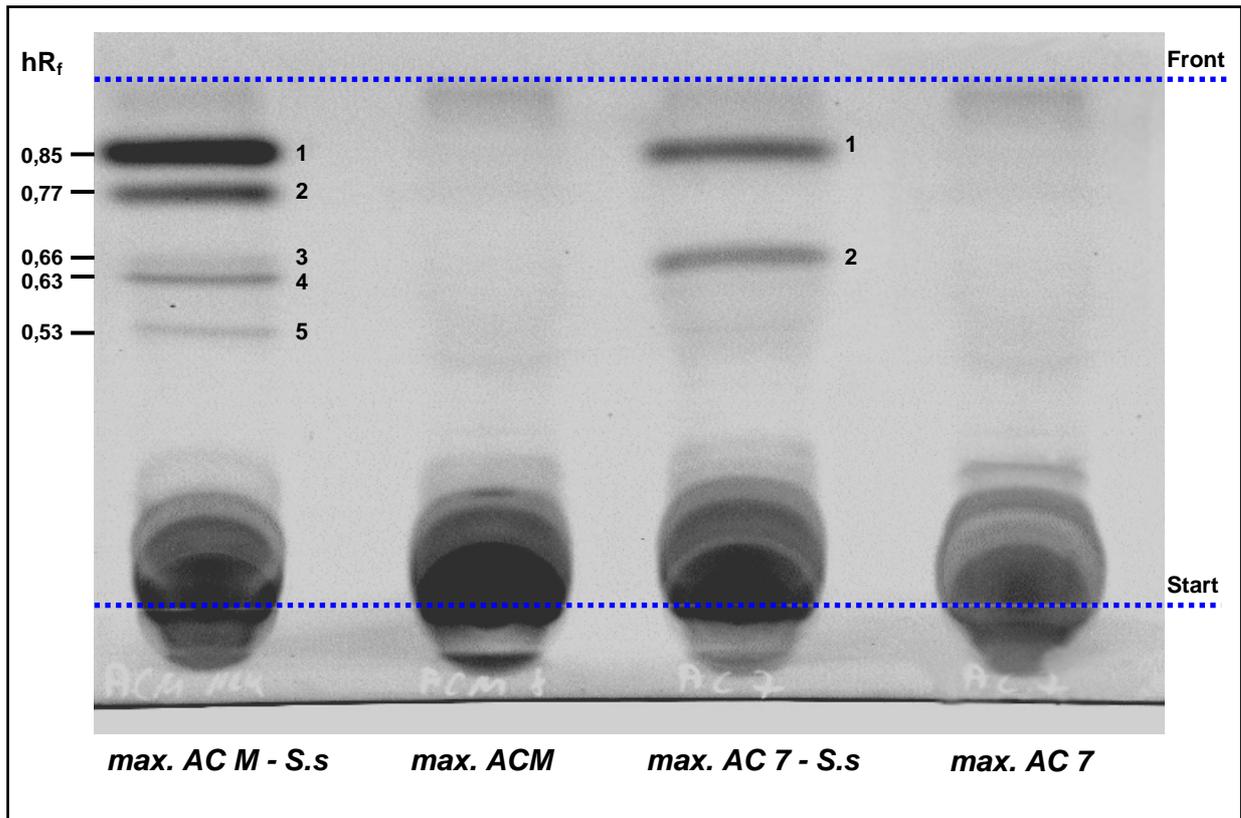
In einem zweiten Laufmittelsystem für hydrophobere Inhaltsstoffe sollte für die untersuchten Genotypen überprüft werden, in wie weit Cumarine die in *Helianthus* bei biotischem (Tal &

Robeson, 1986a; Tal & Robeson, 1986b; Olsen & Roseland, 1991; Serghini et al., 2001) und abiotischem Stress (Gutiérrez et al., 1995; Gutiérrez-Mellado et al., 1996; Cabello-Hurtado et al., 1998) als Phytoalexine beschrieben worden sind, resistenzbegleitend zur *Sclerotinia* Stängel-Resistenz auftreten.

Die unter dem Laufmittelsystem II getesteten Cumarine des Standards zeigten sich bei  $\lambda=366\text{nm}$  als stark fluoreszierende Zonen in den Chromatogrammen und eluierten wie folgt: Esculetin bei  $\text{hR}_f = 50$  mit blauer Fluoreszenz; Scopoletin mit weiß-blauer Fluoreszenz bei  $\text{hR}_f = 59$  sowie Umbelliferon mit hellblauer Fluoreszenz bei  $\text{hR}_f = 63$ . Chlorogensäure eluierte mit dieser mobilen Phase nicht und verblieb am Startpunkt, Kaffeesäure eluierte bei  $\text{hR}_f = 41$ . Charakteristische differenzielle Unterschiede bestanden auch in diesem Laufmittelsystem zwischen den gesunden Kontrollen nicht. Jedoch auch nach *Sclerotinia*-Inokulation zeigten sich zwischen sieben der neun evaluierten Wildarten keine neuen Substanzzonen.

Stark differenzielle Unterschiede wiesen jedoch die zwei teilresistenten *H. maximiliani* Akzessionen AC M und AC 7 nach *Sclerotinia*-Inokulation auf. *H. maximiliani* zeigte nach Inokulation fünf distinkte bei  $\lambda = 366\text{nm}$  schwach blau bis blau-violett fluoreszierende Zonen die bei  $\text{hR}_f = 53 - 85$  eluierten (siehe Abbildung 23). AC 7 wies nach *Sclerotinia* Infektion in den Chromatogrammen zwei neue bei  $\lambda = 366\text{nm}$  blau-violett fluoreszierende Substanzzonen auf. Aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzfarbe bei  $\lambda = 366\text{nm}$  konnte keines der differenziell nach *Sclerotinia* Infektion auftretenden Substanzen als Cumarin angesprochen werden. Bei Betrachtung im kurzwelligen UV-Licht ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) zeigte lediglich Zone 1 von AC 7 (siehe Abbildung 23) auf den fluoreszenzmarkierten HPTLC-Platten eine Fluoreszenzauslöschung und beinhaltet damit ein Benzenchromophor. Zusätzlich färbte sich Zone 1-AC 7 nach Behandlung mit Vanillin-HCl-Lösung violett und wies sich als Phenol mit dem Substitutionsmuster des Resorcins oder Phloroglucins aus (Sticher, 1999). Alle weiteren differenziell nach *Sclerotinia*-Inokulation auftretenden Substanzzonen bei AC M und AC 7 zeigten keine charakteristischen phenolischen Stoffeigenschaften auf. Zusätzlich konnte weder durch saure noch alkalische Hydrolyse eine Verseifung der Komponenten erreicht werden.

**Abbildung 23:** Differentielle Akkumulation resistenzbegleitender hydrophober Inhaltsstoffe im HPTLC-Chromatogramm zweier partiell resistenter *H. maximiliani* Sprossachsen 2d nach *Sclerotinia*-Inokulation<sup>a)</sup>



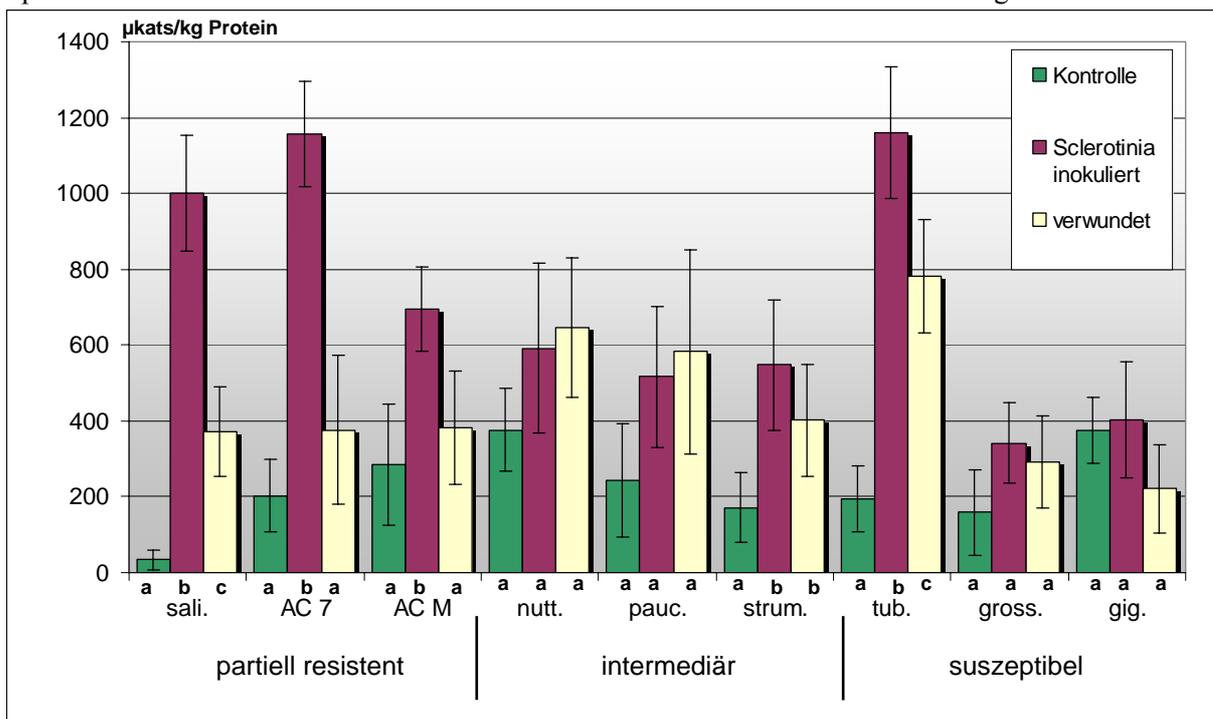
<sup>a)</sup> mobile Phase: Chloroform : Aceton : Ameisensäure – 130 : 53 : 17. S.s. = *Sclerotinia* Inokulierte Sprossachse. Inversaufnahme bei  $\lambda = 366\text{nm}$ .

### 3.3.3 Induzierbarkeit der PAL-Aktivität bei abiotischem (Verwundung) und biotischem (*Sclerotinia* Inokulation) Stress

Tendenziell spiegelten sich in den untersuchten Genotypen sowohl eine mechanische Verwundung als auch die *Sclerotinia* Inokulation der Sprossachsen im Vergleich zur gesunden Kontrolle in einer gesteigerten spezifischen PAL-Aktivität wieder. Im Durchschnitt aller Genotypen führte ein biotischer Stress der Pilzinfektion hierbei zu einer in der Tendenz stärkeren Induktion des initialen Phenolstoffwechsels als der abiotischer Reiz einer mechanischen Verletzung der Sprossachse. Für die einzelnen Genotypen ergaben sich jedoch hinsichtlich der Stärke der Induktion hochsignifikante Unterschiede für die beiden Stimuli im Vergleich zur intakten Sprossachse (siehe Abbildung 24).

Signifikante ( $p = 0.02$ ;  $N = 8$ ) und stark erhöhte spezifische PAL-Aktivitäten zur *Sclerotinia*-Inokulation wiesen im Vergleich zur gesunden Kontrolle die Sprossachsen der teilresistenten Wildarten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC 7 sowie des suszeptiblen Genotyps *H. tuberosus* auf. Mit über 1000  $\mu\text{kats/kg}$  Protein zeigten diese Genotypen darüber hinaus die höchsten induzierten PAL-Aktivitäten aller evaluierten Wildarten auf. Ebenfalls signifikante ( $p = 0.04$ ;  $N = 8$ ) PAL-Stimulationen der Pilzinfektion zeigten *H. maximiliani* AC M sowie *H. strumosus* auf. Zu allen weiteren Genotypen induzierte eine *Sclerotinia*-Inokulation in der Tendenz zwar eine erhöhte PAL-Aktivität die sich jedoch als nicht signifikant charakterisierte ( $p = 0.1 - 0.9$ ;  $N = 8$ ).

**Abbildung 24:** Differenzielle Induzierbarkeit der spezifischen PAL-Aktivität in Sprossachsen perennierender *Helianthus*-Wildarten nach *Sclerotinia* Infektion bzw. Verwundung <sup>a)</sup>

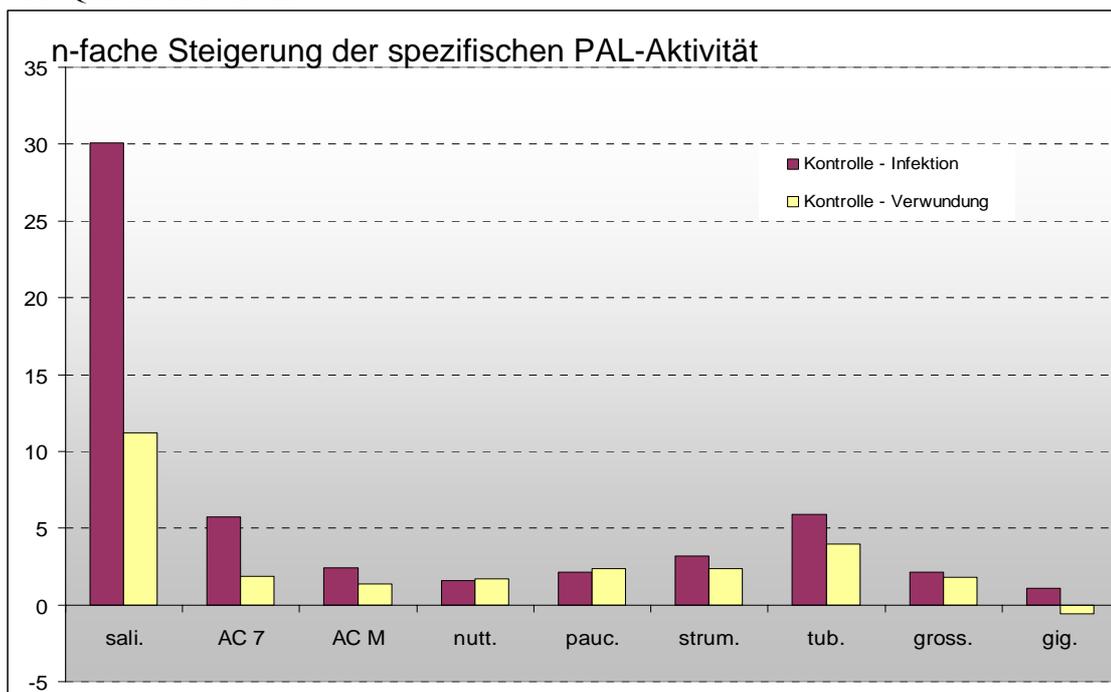


<sup>a)</sup> unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ) nach MANN-WHITNEY U-Test. Ergebnisse aus vier unabhängigen Freilanduntersuchungen.

Ein abiotischer Stimulus in Form einer Verwundung der Sprossachse wies sich im Durchschnitt der Untersuchung als schwächerer Induktor des initialen Phenolstoffwechsels aus als der biotische Reiz der *Sclerotinia*-Infektion. Die intermediär auf die *Sclerotinia*-Stängelfäule reagierenden Genotypen *H. nuttallii*, *H. strumosus* und *H. pauciflorus ssp. P1* als auch die suszeptiblen Arten *H. giganteus* und *H. grosseserratus* zeigten zum Signifikanzniveau  $p < 0.05$  keine differenzielle Induktion ihres primären Phenolstoffwechsels in Abhängigkeit von der Qualität des Reizes. Einen stark differenziellen und signifikanten Einfluss auf die Stimulierung der spezifischen PAL-Aktivität in Abhängigkeit von der Qualität des Reizes zeigten dagegen die partiell resistenten Wildarten sowie *H. tuberosus*.

Unter Berücksichtigung der Induktionsstärke des biotischen Reizes „*Sclerotinia*-Infektion“ in Relation zur PAL-Grundaktivität wies *H. salicifolius* mit einer 30fachen Aktivierung der spezifischen Enzymaktivität die stärkste Induzierbarkeit des initialen Phenylpropanstoffwechsels aller evaluierten Genotypen auf (siehe Abbildung 25). Eine ebenso erhöhte Aktivierung der PAL im Vergleich zur Grundaktivität konnte bei *H. maximiliani* AC 7 (5.7-fach) sowie *H. tuberosus* (5.9-fach) nachgewiesen werden. Die Sprossachsen von *H. pauciflorus* und *H. nuttallii* reagierten nach einem abiotischen Reiz im Hinblick auf die PAL-Aktivität stärker als zum biotischen Reiz der Pilzinfektion. Dagegen wies *H. giganteus* als einzige Wildart nach Verwundung der Sprossachse eine reduzierte PAL-Aktivität im Vergleich zur gesunden Kontrolle auf.

**Abbildung 25:** Induzierbarkeit der PAL-Aktivitäten in Abhängigkeit vom Genotyp und der Qualität des Reizes <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> Ergebnisse aus vier unabhängigen Freilanduntersuchungen.

### 3.3.4 Induzierbarkeit der POX-Aktivität durch *Sclerotinia* Inokulation

Tendenziell konnte in den *Sclerotinia* inokulierten Sprossachsen der untersuchten Wildarten in den drei sequenziell extrahierten POX-Fractionen eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Hinsichtlich Art und Umfang dieser Induktion ergaben sich auffallende Unterschiede sowohl in den einzelnen Fraktionen als auch in Abhängigkeit vom Genotyp.

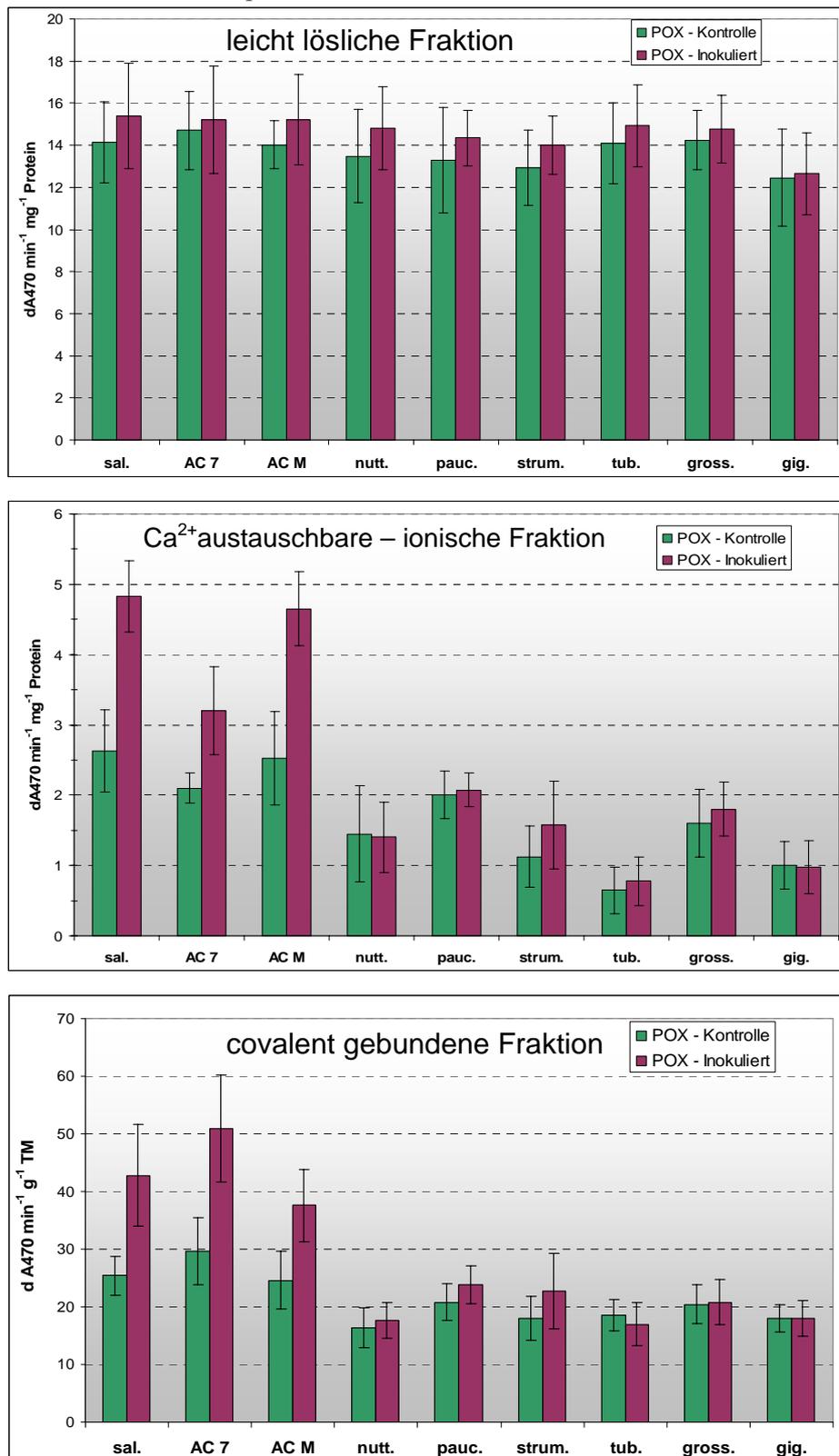
Tendenziell führte eine Pilzinfektion des Stängels zu einer Aktivitätssteigerung in der mit schwachem Na Phosphatpuffer extrahierten, leicht löslichen POX-Fraktion. Signifikante Unterschiede bestanden jedoch weder zwischen den Genotypen ( $p = 0.84$ ;  $N = 36$ ) noch innerhalb der einzelnen Arten zwischen der Inokulation und der gesunden Kontrolle ( $p > 0.6$ ;  $n = 4$ ). Hochsignifikante genotypische Unterschiede bestanden jedoch in der Induzierbarkeit der  $\text{Ca}^{2+}$  austauschbaren ionisch- sowie covalent- zellwandgebundenen POX-Fractionen (siehe Abbildung 26). In beiden Fraktionen führte die *Sclerotinia* Infektion in den Sprossachsen der teilresistenten Genotypen *H. salicifolius* sowie den beiden *H. maximiliani* Akzessionen zu einer signifikant ( $p < 0.01$ ;  $n = 4$ ) erhöhten POX-Aktivität. Eine *Sclerotinia* Infektion induzierte bei den teilresistenten Wildarten eine über 50%ige Steigerung der ionisch- und covalent gebundenen POX-Aktivitäten (siehe Tabelle 24 und Abbildung 26). In der Tendenz wiesen die intermediär reagierenden Genotypen als auch die suszeptiblen Genotypen in diesen Fraktionen ebenfalls zur *Sclerotinia* Inokulation eine erhöhte Aktivität auf, die sich jedoch als marginal und nicht signifikant charakterisierte.

**Tabelle 24:** Differentielle, genotypische Aktivitätssteigerung der leicht löslichen, ionisch- und covalent gebundenen Peroxidase-Fractionen in Sprossachsen von 9 perennierender *Helianthus*-Wildarten nach *Sclerotinia*-Inokulation <sup>a)</sup>

Wildart	POX-Fraktion		
	leicht löslich [%]	ionisch gebunden [%]	covalent gebunden [%]
<i>H. salicifolius</i>	8,6 <sup>n.s.</sup>	83,8 *	68,5 *
<i>H. maximiliani</i> AC 7	3,4 <sup>n.s.</sup>	84,1 *	71,6 *
<i>H. maximiliani</i> AC M	8,3 <sup>n.s.</sup>	52,3 *	52,7 *
<i>H. nuttallii</i>	9,8 <sup>n.s.</sup>	0 <sup>n.s.</sup>	7,9 <sup>n.s.</sup>
<i>H. pauciflorus</i> ssp. P1	7,8 <sup>n.s.</sup>	3,8 <sup>n.s.</sup>	14,9 <sup>n.s.</sup>
<i>H. strumosus</i>	8,3 <sup>n.s.</sup>	40 <sup>n.s.</sup>	26,8 <sup>n.s.</sup>
<i>H. tuberosus</i>	6,0 <sup>n.s.</sup>	19,3 <sup>n.s.</sup>	- 8,3 <sup>n.s.</sup>
<i>H. grosseserratus</i>	3,6 <sup>n.s.</sup>	12,5 <sup>n.s.</sup>	1,9 <sup>n.s.</sup>
<i>H. giganteus</i>	6,1 <sup>n.s.</sup>	- 2,5 <sup>n.s.</sup>	- 0,3 <sup>n.s.</sup>
<b>Gesamtversuch</b>	6,8	41,1	30

<sup>a)</sup> n.s. = nicht signifikant ( $p > 0.05$ ), \* signifikanter Anstieg gegenüber der gesunden Kontrolle ( $p < 0.05$ ). Mittelwerte aus vier unabhängigen Untersuchungen.

**Abbildung 26:** Einfluss einer artifiziellen *Sclerotinia*-Infektion des Stängels auf die Aktivitäten der löslichen, ionisch sowie covalent gebundenen Peroxidasen von neun perennierenden *Helianthus*-Wildarten <sup>a)</sup>



<sup>a)</sup> Mittelwerte aus vier Unabhängig durchgeführten Feldinokulationen.

## 4 Diskussion

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary ist weltweit neben *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt. Cvet. et al. (Lamarque & Perny, 1985; Vigiúé et al., 1999) und *Plasmopara halstedii* Berl. & de Toni (Rashid, 1995; Rozynek & Spring, 2000) einer der Hauptpathogene der Kultursonnenblume (Masirevic & Gulya, 1992; Gulya et al., 1997). Der Ascomycet befällt in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen alle Pflanzenteile und resultiert in starken Schädigungen die bis zum 100%igen Totalausfall der Ernte führen können (Sackston, 1992). In humiden bis semihumiden Anbaugeländen mit annähernd gleichmäßig verteilten Niederschlägen über die Vegetationsperiode überwiegt die Infektion über Ascosporen. Unter diesen Bedingungen sind insbesondere die Blätter und Blütenkörbe von der Ascosporen-Landung und Keimung betroffen (Abawi & Grogan, 1979; Lamarque et al., 1985). Über windbürtige Ascosporen infizierte Bestände weisen hierbei Blatt- und nachfolgend Stängelfäule sowie Knospen- und Kopffäule auf. Unter mitteleuropäischen Klimabedingungen überwiegen die Stängelfäule zwischen dem Beginn der generativen Phase und der Vollblüte (Degener et al., 1998) sowie die Korbfäule zwischen der Vollblüte und der Abreife des Bestandes (Hugger, 1989). Auf klimatischen Grenzstandorten für den Sonnenblumenanbau ist die *Sclerotinia*-Fäule einer der Hauptdeterminanten zur Produktion eines ertragssicheren Ölertrags/Fläche und damit zur Erzielung konkurrenzfähiger Deckungsbeiträge, insbesondere im Vergleich zur Ölpflanze Raps (Graf et al., 1999).

Der vorherrschenden Gebrauch des *pet1-cms* Cytoplasmas (Leclercq, 1969) zur F<sub>1</sub>-Hybriderzeugung und die daraus resultierende eingeeengte genetische Variabilität des Zuchtmaterials werden als wesentliche Ursache der marginalen *Sclerotinia*-Resistenz aktueller Kultursorten gesehen. Aufgrund ihrer erheblich größeren genetischen Diversität (Seiler & Rieseberg, 1997; Sossey-Alaoui et al., 1999) wird hingegen den annualen als auch perennierenden Wildarten der Gattung *Helianthus* ein großes Potential an verfügbaren jedoch bislang nicht evaluierten Resistenzquellen bzw. Mechanismen zugeschrieben (Škoric, 1987; Seiler, 1988; Škoric & Rajčan, 1992; Seiler, 1992; Seiler et al., 1993; Degener et al., 1999b; Fauré et al., 1999). Evaluierung und Nutzung dieser Resistenzquellen erfolgten jedoch aufgrund bestehender Kreuzungsbarrieren mit perennierenden Wildarten (Chandler & Beard, 1978; Bohorova & Atanassov, 1990) im Wesentlichen aus dem annualen (primären) Genpool. Neu entwickelte biotechnologische Ansätze zur Überwindung existenter Kreuzungsbarrieren (Jan, 1997; Sukno et al., 1999; Binsfeld, 1999; Binsfeld et al., 2000; Schnabl et al., 2002) und die Erzeugung fertiler interspezifischer Nachkommen (Henn et al., 1998; Binsfeld et al., 2001; Gavrilova et al., 2000; Binsfeld & Schnabl, 2002; Jan et al., 2002; Pérez-Vich et al., 2002) ermöglichen mittlerweile die Integration genetischen Materials aus dem sekundären Genpool in die Kultursonnenblume und rücken damit den perennierenden Formenkreis zunehmend in das allgemeine Züchtungsinteresse (Hahn et al., 2001).

Daten zur Erschließung des sekundären perennierenden Genpools im Hinblick auf dessen *Sclerotinia* Resistenzpotential sind kaum vorhanden. Hierbei fehlen mehrjährige Resistenzevaluierungen im Freiland und insbesondere unter mitteleuropäischen Klimabedingungen. Sie sind jedoch unter Berücksichtigung des ausgesprochen perithrophen und umweltabhängigen Verhaltens (Kurnik et al., 1978) von *Sclerotinia sclerotiorum* eine wesentliche Voraussetzung zur Ermittlung robusten Datenmaterials zur Erschließung von Resistenzkomponenten und zur Selektion resistenter Genotypen für interspezifische Züchtungsansätze. Darüber hinaus sind für den sekundären Genpool in *Helianthus* essentielle Informationen zu potentiellen konstitutiven als auch induzierten strukturellen sowie biochemischen Resistenzcharakteristika der Interaktion mit *Sclerotinia sclerotiorum* nicht vorhanden. Sie können jedoch als Indikator für die am Resistenzphänomen potentiell beteiligten Gene bzw. Mechanismen dienen und sind somit wesentliche Grundlage für den gezielten Transfer neuer Resistenzeigenschaften in die Kultursonnenblume.

#### 4.1 Effizienz der artifiziellen Inokulationen

Als eine unerlässliche Voraussetzung zu den differenzierenden histologischen und biochemischen Untersuchungen wurde in dieser Arbeit eine mehrjährige Feldevaluierung des *Sclerotinia*-Resistenzverhaltens von Blättern und Stängeln perennierender *Helianthus*-Wildarten vollzogen. Diese wurden unter Verwendung von artifiziellen Inokulationen durchgeführt die in der Hauptsache zur Detektion physiologischer Resistenzen konzipiert sind. Hierbei weisen *Sclerotinia* Resistenzevaluierungen unter Freilandbedingungen die auf artifiziellen Ascosporen- sowie Myzel-Inokulationen basieren, in Abhängigkeit vom Testverfahren und der vorherrschenden Witterungsbedingungen, eine große Variabilität auf. Bei warmer und trockener Witterung können sowohl ein Austrocknen des Myzels im bereits penetrierten Wirtsgewebe, eine Inhibierung des primären Infektionsprozesses über Myzelexplantate als auch eine unzureichende Nährstoffversorgung des zunächst saprophytisch wachsenden Myzels auftreten (Abawi & Grogan, 1975; Singh et al., 1985). Sie können dann Scheinresistenzen vortäuschen, die im untersuchten Pflanzengut originär nicht vorhanden sind. So konnte Kurnik et al. (1978) mit einem artifiziellen Myzeltest an Sonnenblumenkörben bei warmer und trockener Witterung einen geringen Infektionserfolg von < 20% nachweisen, der bei hohen Niederschlägen auf annähernd 100% anstieg. Achbani et al. (1994) und Tourvieille & Vear (1984) konnten mit artifiziellen Ascosporentests zur Evaluierung von Korb- sowie Knospenresistenz lediglich mit einer Zusatzberechnung des Bestandes hohe Korrelationen zur natürlichen Ascosporeinfektion erhalten.

Die Ermittlung konfidenter Daten zum Feld-Resistenzniveau sind jedoch die entscheidende Basis zur Detektion veritabler physiologischer Resistenzen und somit für einen hohen Selektionserfolg und impliziert hohe Infektionsraten als dessen wesentliche Grundlage.

Zusätzlich wird mit der Forderung zur Erzielung hoher Infektionserfolge der beobachteten 100%igen Infektionsrate unter natürlichen und günstigen Infektionsbedingungen zur *Sclerotinia* - Infektion Rechnung getragen. Aufgrund dieser Forderungen wurde auf artifizielle Inokulationstechniken der aktuellen Züchtungsforschung zur Erschließung vom Blatt- und Stängelresistenzen (Castaño et al., 1992, Castaño et al., 1993; Achbani et al., 1994; Degener et al., 1998, Köhler & Friedt, 1999) in *Helianthus annuus* zurückgegriffen. Beide Testverfahren berücksichtigen dabei die Feuchte- und Temperaturansprüche von *Sclerotinia sclerotiorum* zur erfolgreichen Infektion (Venette, 1998) und weisen bei *H. annuus* Hybriden und Linien im Blatttest hohe Korrelationen zum natürlichen Infektionsverlauf (Degener, 1998) sowie im Stängeltest zum erwartenden Ertragsverlust auf (Sala, 1994).

Die artifiziellen Feld-Inokulationen zeigten im untersuchten perennierenden *Helianthus*-Genpool sowohl im Stängeltest als auch im Blatttest jeweils hohe Infektionsraten. Die über die Versuchsjahre wiederholt hohen Penetrationserfolge von durchschnittlich 96% im Stängeltest sowie 100% zum Blatttest können dabei als Qualitätskriterium der durchgeführten Inokulationstechniken gewertet werden. Sie sind sowohl auf die Wasserapplikationen als auch auf die Maßnahmen zur Feuchtretenion in den Testverfahren zurückzuführen. Insbesondere der Verwendung von Polyethylenbeuteln zum Feldblatttest kann eine Bedeutung zur Bereitstellung der erforderlichen humiden Bedingungen zur Infektion und zum Myzelwachstum von *Sclerotinia* beigemessen werden. So verwendeten Castaño et al. (1992) zum *Sclerotinia*-Blatttest wasserdurchlässige Aluminiumfolie und konnten erst durch eine tägliche Beregnung des Testbestandes von >5mm hohe Infektionsraten von > 90% erreichen. Durch die hohen Infektionsraten im untersuchten Artenspektrum konnte somit eine konfidente Datenerhebung zur Detektion des *Sclerotinia* Resistenzverhaltens von *Helianthus*-Wildarten unter natürlichen und günstigen Umweltbedingungen zur *Sclerotinia* Infektion gesichert werden.

In vergleichbaren Untersuchungen an *H. annuus* konnten Achbani et al. (1994) im Myzel – Stängel - Test und Degener et al. (1998 & 1999a) sowie Castaño et al. (1992) im Blatttest ebenfalls hohe Infektionsraten > 90% erreichen die erst hierdurch zur robusten Evaluierung von Selektionskriterien resistenter Inzuchtlinien führte. Dadurch gelang die Aufdeckung hoher Heritabilitäten einzelner phänotypischer Resistenzmerkmale in den Nachkommenschaften und damit ein angemessener Selektionserfolg für Resistenzen unter natürlichem *Sclerotinia*-Infektionsdruck.

Zusätzlich lassen die hohen Infektionsraten in beiden Pflanzenorganen im untersuchten sekundären *Helianthus*-Genpool auch auf dessen potentielle Basiskompatibilität zur *Sclerotinia* Anfälligkeit schließen. Dieses lässt sich sowohl auf den hohen Infektionsdruck der artifiziellen Inokulationen als auch auf die nicht vorhandene Wirtsspezifität von *Sclerotinia sclerotiorum* sowie dessen nicht vorhandenen spezifischen thigmotropen bzw. chemosensorischen Erkennungsvorgängen zur Infektion zurückführen (Lumsden, 1979). Das breite Wirtspflanzenspektrum des Ascomyceten lässt ihn unter hohem Infektionsdruck selbst

monokotyle Pflanzen, denen im allgemeinen eine geringe Basiskompatibilität für *Sclerotinia* *ssp.* zugesprochen wird (Boland & Hall, 1994), parasitieren und konnte z.B. von Ahmad und Mirza (1987) für Mais unter natürlichen Feldbedingungen beobachtet werden.

#### 4.2 Selektionskriterien der Blatt- und Stängelresistenz gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*

Ein wesentliches Ziel der durchgeführten Resistenztests lag in der Ermittlung geeigneter Selektionskriterien der *Sclerotinia*-Resistenz im perennierenden *Helianthus* Genpool für den bisher solche phänologischen Resistenzmarker nicht erhoben worden sind. Durch die ausgesprochen komplexe Ätiologie der Stängelfäule in *Helianthus* mit der Beteiligung von Blättern und Stängeln konnte bislang ein globales Resistenzmerkmal zur Beschreibung des gesamten Resistenzphänomens nicht ermittelt werden (Miller & Fick, 1997; Degener et al., 1998). Vielmehr wird die effektive Ermittlung resistenter Genotypen über robuste Selektionskriterien herangezogen an die folgende Forderungen gestellt werden: a) eine einfache Datenerhebung, b) ein frühes Auftreten während der Pathogenese, c) eine ausreichende genetische Variabilität des Markers in den getesteten Populationen und d) eine möglichst hohe Korrelationen mit anderen Resistenzmarkern während der Pathogenese (Waller & Lenné, 2002).

Als robuster phänotypischer *Sclerotinia* Resistenzmarker konnte im perennierenden Genpool sowohl in den Blatttests als auch Stängeltests die Läsionslänge vier Tage nach Inokulation ermittelt werden. Hierbei wiesen die nach vier Tagen ermittelten Läsionslängen in beiden Pflanzenorganen die wesentlichen Charakteristika eines konfidenten *Sclerotinia*-Resistenzmarkers auf und zeigten sich sowohl in der hohen genotypischen Varianz für dieses Merkmal als auch in den signifikant positiven bis stark positiven Korrelationen zu den wesentlichen Parametern der Pathogenese. Der außerordentlich frühe Zeitpunkt zu dem signifikante Unterschiede zwischen den Läsionen der Genotypen auftraten, lässt damit ein effektives, kostengünstiges und frühes Screening blatt- bzw. stängelresistenter perennierender Wildarten zu. Das häufige Fehlen jeglicher Selektionskriterien in vergleichbaren Untersuchungen in *Helianthus annuus* zur Ermittlung *Sclerotinia* resistenter Genotypen weist darüber hinaus auf prinzipielle Unterschiede zum sekundären Genpool hin. Sie ließen auf ein erhöhtes Resistenzpotential von Genotypen der perennierenden Wildarten schließen.

Besonders auffallend waren die mit den Blatt- als auch Stängelläsionslängen einhergehenden signifikant hohen phänotypischen Korrelationen zur Anzahl gebildeter Sklerotien. Partiiell resistente Genotypen zeichneten sich im Besonderen durch ein stark reduziertes Myzelwachstum des bereits penetrierten Blatt- bzw. Sprossachsengewebes parallel zu einer gestörten Ausbildung von Sklerotien aus und zeigten somit die für eine quantitative Resistenz typische Inhibition der Pathogenese (Prell & Day, 2001). Die durchweg hohen Korrelationen zwischen der Myzelausbreitung im penetrierten Gewebe und der Ausbildung der melanisierten

Verbreitungsstrukturen von *Sclerotinia sclerotiorum* konnten damit im sekundären *Helianthus* Genpool als zusätzlicher, robuster Marker einer quantitativen partiellen Resistenz in Blättern und Sprossachsen evaluiert werden.

Der Besatz mit Sklerotien wird bislang in der Züchtung *Sclerotinia* resistenter Kultursonnenblumen nicht berücksichtigt, könnte jedoch aus phytosanitären und epidemiologischen Erwägungen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung gewinnen, da das Auftreten der *Sclerotinia* Fäule direkt von der Sklerotiidichte im Boden abhängt (Huang & Hoes, 1980; Holley & Nelson, 1986; Wegulo et al., 1999). Dagegen haben überwinterte *Sclerotinia*-Myzelreste in infizierten Sonnenblumenstängeln nach Untersuchungen von Huang & Kozub (1993) keine Bedeutung als Inokulum zur Infektion, da deren Vitalität nach der Vegetationsruhe inhibiert ist. Stark von *Sclerotinia* – Fäule befallene Sonnenblumen können ein beachtliches, epidemiologisch bedeutsames und multiplikatorisches wirksames Vermehrungspotential für *Sclerotinia* –Sklerotien darstellen. Nach Untersuchungen von Enisz weisen sie (1986) bei basalem Wurzelbefall 50-100 Sklerotien/Pflanze auf, sie steigt jedoch bei *Sclerotinia* - Stängel- sowie Kopffäule auf die fünffache Menge/Pflanze an. Resistente Genotypen, deren Resistenzmechanismen bzw. Faktoren eine Inhibierung der Sklerotisierung beinhalten, könnten damit aktiv zur Herabsetzung der Inokulumdichte und somit zu einer nachhaltigen Reduktion der Primärinfektionen beitragen. Berücksichtigt wird die Sklerotisierung dagegen in der Resistenzzüchtung der ebenfalls stark von *Sclerotinia* befallenen Leguminosen Sojabohne (*Glycine max*) (Grau, 1988; Kim et al., 1999; Workneh & Yang, 2000) und Erdnuss (*Arachis hypogaeae*) (Marinelli et al., 1998; Melouk & Shokes, 1995). So konnten Melouk et al. (1992) mit einer artifiziellen Stängelinokulation zur Evaluierung von *Sclerotinia* - Resistenzen in Erdnusspopulationen drei distinkte Resistenzreaktionen ermitteln. Hierbei wiesen die partiell resistenten Genotypen keine oder jeweils in ihrer Größe reduzierte Sklerotien auf. Zusätzlich zeigten die an den resistenten Genotypen gebildeten Sklerotien eine reduzierte Vitalität und/oder keimten auf artifiziellen Nährmedien nicht mehr aus.

Als Sklerotien induzierende Faktoren werden für *Sclerotinia ssp.* ein zunächst kräftiges Myzelwachstum mit hoher Assimilataneignung und anschließendem Nährstoffmangel, meist durch ein erweitertes C/N-Verhältnis, erwogen (Corsini & Le Tourneau, 1973; Chet & Henis, 1975; Willetts & Bullok, 1990). Das primäre Induktionssignal beinhaltet dabei die Änderung des cytosolischen cAMP Spiegels im Myzel (Hadar et al., 1983; Rollins & Dickmann, 1998). Unterschiede in der Nährstoffaneignung des parasitierenden Myzels in Abhängigkeit von den infizierten und parasitierten Genotypen könnten auch in der vorliegenden Untersuchung die Ursache für den unterschiedlichen und vom Resistenzniveau abhängigen Sklerotienbesatz sein. Belege dafür lassen sich auch im engen Zusammenhang zwischen dem starken Myzelauswuchs der suszeptiblen Genotypen und der nachfolgend starken Sklerotienbildung finden (siehe dazu auch Abbildung 7r sowie 12i). Offensichtlich weisen die suszeptiblen Genotypen eine hohe (homologe) Basiskompatibilität mit *Sclerotinia sclerotiorum* auf, welche zunächst dem Pilz

eine ungehinderte und starke Myzelausbreitung mit hoher Assimilataneignung ermöglicht, jedoch rasch zu einer Nährstoffverarmung und nachfolgend zur Induktion von Sklerotien führt. Konträr dazu weist die reduzierte bzw. inhibierte Ausbildung von Sklerotien in den partiell resistenten Genotypen damit auf eine gestörte Assimilataneignung des *Sclerotinia* Myzels während der gesamten Parasitierungsphase hin. Offensichtlich reicht die Nährstoffaneignung aus diesen Genotypen nicht zur Bildung ausreichender Myzelmassen aus die zur Induktion von Sklerotien benötigt werden. Hinweise dafür lassen sich auch in Untersuchungen von Sedun & Brown (1989) finden. In ihren Studien zur Wurzel- und basaler Stängelfäule der Kultursonnenblume konnten sie Sklerotien nur an Wurzeln auffinden, die erst mit einem Durchmesser  $> 1,5\text{mm}$  ein adäquaten Nährstoffreservoir zum sichtbaren Myzelwachstum und zur Sklerotisierung aufwiesen.

Durch die ausgesprochen enge und hochsignifikante Korrelation der nach vier Tagen ermittelten Läsionslängen der Sprossachsen mit wesentlichen Parametern der Pathogenese wie dem Aufkommen von Sklerotien, den Welkesymptomen sowie dem Totalausfall lassen damit zu einem frühen Zeitpunkt Stängelresistente Genotypen selektieren die auch zu einem späteren Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs Resistenzen aufweisen. Durch die erfolgreiche Introgression solcher Resistenzen in die Kultursonnenblume könnten dann wesentliche epidemiologische Aspekte der Stängelfäule beinhalten und vermögen somit über physiologische als auch epidemiologische Wirkungsmechanismen die Primärinfektionsrate zu mindern sowie die Ausbreitung im bereits infizierten Gewebe zu reduzieren.

#### **4.3 Unterschiede zwischen Blatt- und Stängelresistenzniveaus und Umweltabhängigkeit der Resistenz**

Hinsichtlich des Resistenzniveaus von Blättern und Sprossachsen konnten bei der Mehrzahl der evaluierten Genotypen divergierende Resistenzniveaus ermittelt werden. Die unterschiedliche Ausprägung der Resistenz in den Pflanzenorganen bei einem Grossteil der untersuchten *Helianthus*-Wildarten zeigte damit ähnliche Verhältnisse wie im annuellen, kultivierten Genpool. Auch in diesem werden häufig keine korrelierenden Resistenzniveaus von verschiedenen Pflanzenorganen wie Wurzeln, Blätter, Stängel und Körben innerhalb eines Genotyps detektiert (Thuault & Tourvieille, 1988; Tourvieille & Vear, 1990). Dieses Phänomen wird nach Tourvieille & Vear (1984) sowie Robert et al. (1987) als ein partieller Aspekt der quantitativen, auf multiplen Allelen beruhenden Resistenz erwogen. Das unterschiedliche *Sclerotinia*-Resistenzniveau in Pflanzenorganen eines Genotyps wird hierbei als nicht-kumulativer Effekt unabhängiger und differenziell wirksamer Gene angenommen. Ihre Genwirkungen führen in den einzelnen Pflanzenteilen zu unterschiedlichen morphologisch-anatomischen und physiologischen Eigenschaften, die damit zum differenziellen *Sclerotinia*-Resistenzniveau beitragen und unabhängig vererbt werden. Mestries et. al. (1998) konnten in einer auf RFLP - Markern basierenden genetischen Kartierung

segregierender *Helianthus* Populationen unterschiedliche und unabhängige genomische Regionen (*QTL- Loci*) für die Myzelausbreitung im Korb und Blatt identifizieren, lediglich eine genomische Region schien mit beiden phänotypischen Markern schwach assoziiert zu sein. Auf Grund dessen ist die Präsenz von Genotypen mit kumulativen Resistenzen in den annuellen Zuchtpopulationen selten und erfordert zum Auffinden solcher Individuen das zeit- und kostenintensive Screening großer Populationen (Gulya et al., 1986; Škoric, 1988). In Folge dessen muss ein erheblicher züchterischer Aufwand betrieben werden um blatt- und stängelresistente Hybriden zu erzeugen und impliziert das getrennte Screening als auch der Aufbau zunächst Blatt- oder Stängelresistenter Populationen. So konnten Degener et al. (1998) in einem zweijährigen Screeningverfahren zur *Sclerotinia* - Stängelfäule von 90 Inzuchtlinien diverser Provenienzen lediglich in zwei Genotypen kumulative *Sclerotinia* - Resistenzen in Blättern und Sprossachsen ermitteln. In ihren Untersuchungen konnten sie darüber hinaus eine signifikante, jedoch geringe phänotypische Korrelation von  $r = 0.44$  zwischen den Blatt- und Stängelläsionslängen in den untersuchten Populationen nachweisen. Im Vergleich dazu konnte in dem vorliegenden Freiland - Screeningverfahren eine signifikant positive Korrelation von 0.67 zwischen den Läsionslängen der Blätter und Sprossachsen innerhalb des sekundären Genpools aufgedeckt werden, die auf die wesentlich größere Diversität des Untersuchungsgutes und der mit ihr verbundenen Resistenzfaktoren begründet sein könnte. Im Screeningverfahren zeigte sich insbesondere die *H. maximiliani* Akzession AC 7 mit einer hohen, umweltkonstanten und kumulativen partiellen Resistenz in beiden Pflanzenorganen die für die Pathogenese der *Sclerotinia* - Stängelfäule von Bedeutung sind. Diese Populationsakzession stellt somit einen prädestinierten Genotyp für interspezifische Züchtungsvorhaben dar und könnte entscheidend zur Akkumulation von diversen Resistenzkomponenten der *Sclerotinia* Stängelfäule in der Kultursonnenblume beitragen.

Über den gesamten untersuchten Genpool wurde sowohl für die im Freiland ermittelten Blatt- als auch Stängelläsionen eine hohe Variabilität nachgewiesen werden. Hierbei konnten im zweijährigen Screening 73% der Variabilität der Stängelläsionen sowie 83% der Variabilität der Blattläsionslängen über die genotypische Variabilität des untersuchten Artenspektrums erklärt werden. Die Umwelteffekte über den gesamten sekundären Genpool betrachtet waren demgegenüber gering und nur zum Freilandblatttest signifikant. Somit konnte in dieser Arbeit eine außerordentlich große Variabilität des sekundären Wildartenspektrums der Gattung *Helianthus* bezüglich dessen *Sclerotinia* Blatt- und Stängel - Resistenzpotentials erschlossen werden. Diese Ergebnisse stehen damit konträr zu Untersuchungen von Thompson et al., (1978) die in den damals bereits in Kollektion befindlichen annuellen und perennierenden Wildarten Nordamerikas eine der Kultursonnenblume ähnliche *Sclerotinia* - Empfindlichkeit ermittelten.

Trotz der über den gesamten Genpool betrachteten geringen Umweltinteraktion zeigten sich unter Berücksichtigung der einzelnen Wildarten jedoch signifikante Unterschiede hinsichtlich

der umweltabhängigen Ausprägung ihrer Läsionslängen. Insbesondere die als intermediär hinsichtlich der Läsionslänge klassifizierten Wildarten wiesen starke Rangwechsel zwischen den Inokulationszeitpunkten und Versuchsjahren auf. Da jedoch alle Genotypen im Ranking mindestens einen Wechsel zwischen den Versuchsjahren und / oder Inokulationszeitpunkten aufwiesen, konnte in den untersuchten *Helianthus*-Wildarten ein ebenfalls für quantitative (horizontale) Resistenzen charakteristisches Merkmal der umweltvariablen, konditionalen Ausprägung von Resistenzen erkannt werden (Agrios, 1997). Bei quantitativen Resistenzen wird hierbei davon ausgegangen, dass die Genwirkungen der einzelnen konstitutiv als auch induziert exprimierten Resistenzgene zur Resistenz minimal sind (*minor genes*) und in *Helianthus* erst bei entsprechender günstiger additiver Kumulation in einem Genotyp adäquate Resistenzniveaus bewirken (Agrios, 1997; Prell, 1996, Gulya et al., 1997; Prell & Day, 2001). Unterschiede im Ranking der Genotypen zwischen den Inokulationszeitpunkten und Versuchsjahren könnten auf ein unterschiedliches Repertoire an Resistenzfaktoren der einzelnen Arten zur *Sclerotinia* - Resistenz hinweisen, welches durch wechselnde Umweltfaktoren zur Inokulation differenziell beeinflusst wird. Das in der Regel umweltkonstantere Verhalten der in Blatt- bzw. Stängelreaktion partiell resistenten Genotypen lässt hingegen darauf schließen, dass bei diesen Wildarten umweltunabhängigere konstitutive als auch induzierte Resistenzgene bzw. Mechanismen vertreten sind.

Das hoch korrelierende und nahezu gleichartige Ranking der untersuchten Wildarten zwischen der Feldresistenz der Blätter und unter kontrollierten Bedingungen (DTL-Test) weist darüber hinaus auf eine ausreichende Variabilität im Resistenzpotential der Wildart-Blätter zur *Sclerotinia* Resistenz hin. Die unter kontrollierten Umweltbedingungen durchgeführten Resistenztest mit isolierten Pflanzenteilen stellen häufig einen scharfen, jedoch in vielen Resistenzevaluierungen, deren Resistenzen partieller Natur sind, einen nicht immer reproduzierbaren sowie zu den Feldresistenzniveaus konformen Test dar. So konnten Roderick & Clifford (1995) in dem auf quantitativen Resistenzen beruhenden Wirt - Pathogen System Hafer - *Erysiphe graminis* keine Assoziation im Ranking der Genotypen zwischen einem DTL-Test und der Freilandresistenz feststellen. Auch für *Sclerotinia* Resistenzevaluierungen unter kontrollierten Bedingungen werden häufig keine Zusammenhänge zu den tatsächlichen Resistenzniveaus im Freiland ermittelt und konnte von Chappell et al. (1995) bei Erdnusspopulationen sowie von Wegulo et al. (1998) und Kim et al. (2000) an Sojabohnenpopulationen gezeigt werden. Die mangelnde Konformität dieser Testverfahren mit Freilandevaluierungen wird hierbei auf nicht vorhandene bzw. eine stark reduzierte Variabilität der in den untersuchten Genotypen bzw. Populationen vorhanden Resistenzniveaus zurückgeführt. Die unter kontrollierten Umweltfaktoren vorherrschenden, verschärften Testbedingungen wie erhöhte Luftfeuchtigkeiten, Temperaturen sowie geänderte Lichtqualitäten und Quantitäten lassen dann eine Diskriminierung von marginalen Resistenzniveaus nicht zu. Durch die ausgesprochen hohe Korrelation von  $r = 0.95$  zwischen

den Läsionslängen der Feldevaluierung und jenen im DTL-Test erscheint auch zur Blattresistenz die Diversität der in dieser Arbeit evaluierten perennierenden Wildartblätter sowie der ihr zugrunde liegenden differenziellen Resistenzpotentiale eine ausreichende Variabilität zu beinhalten. Sie können dann unter kontrollierten Umweltbedingungen detektiert werden. Das reproduzierbare hohe genotypische Ranking zwischen DTL-Test und Feldevaluierung ermöglicht damit ein arbeitssparendes, kostengünstiges und effektives Screening von Blattresistenzen im perennierenden *Helianthus* Genpool. Es könnte damit sowohl als systematisches Screeningverfahren zur Ermittlung von physiologischen *Sclerotinia* – Blattresistenzen einer größeren Anzahl der bisher nur marginal untersuchten perennierenden Akzessionspopulationen als auch für weitergehende physiologisch - biochemische und / oder molekularbiologische Charakterisierungen des *Sclerotinia* - Blattresistenzphänomens herangezogen werden.

#### **4.4 Ermittlung von Partialkomponenten der *Sclerotinia* - Resistenz in Sprossachsen und Blättern perennierender Wildarten**

Resistenzphänomene gegenüber phytopathogenen Pilzen vermögen grundsätzlich auf habituellen, morphologischen und / oder physiologisch - biochemischen Resistenzfaktoren beruhen und können während der gesamten Pathogenese auftreten. Ein Teilziel dieser Arbeit bestand in der Determination wesentlicher Komponenten der *Sclerotinia* - Resistenz zur Charakterisierung des Resistenzphänomens perennierender Wildarten am gesamten Krankheitskomplex der Stängelfäule. Die Evaluierung partieller Resistenzkomponenten ist dabei eine wesentliche Grundlage zum Aufbau neuer interspezifischer Züchtungsprogramme, die auf der Introgression neuartiger, jedoch bislang unbekannter Resistenzen beruhen. Darüber hinaus sind die aus ihr ermittelten Komponenten eine unabdingbare Voraussetzung zur Determination des Selektions- und Integrationserfolges in den interspezifischen Nachkommenschaften (Škoric, 1992).

Der untersuchte perennierende *Helianthus*-Genpool wies sowohl im Stängeltest als auch im Blatttest eine große Variabilität hinsichtlich aller phänotypisch evaluierten Resistenzparameter auf. Deren wesentlichen Charakteristika sind zusammenfassend in Tabelle 25 dargestellt.

Im Wildartmaterial zeigten sich dabei in beiden Pflanzenorganen hoch - teilresistente, intermediäre als auch extrem *Sclerotinia* empfindliche Genotypen bzw. Akzessionen. Diese große phänotypische Variabilität in der Resistenzreaktion der Wildarten konnte hierbei als ein erster Hinweis auf potentielle, in den einzelnen Arten differentiell vorliegenden Resistenzkomponenten bzw. Mechanismen gewertet werden. Die phänotypisch erhobenen Daten im untersuchten Wildartspektrum als auch die phänologische Beobachtung ihrer Resistenzreaktionen zur Blatt- und Stängelinokulation wiesen hierbei alle Wesenszüge einer quantitativen Resistenz auf. Quantitative (horizontale) Resistenzphänomene verhindern hierbei einen Krankheitsbefall nicht vollständig, sondern charakterisieren sich in der Regel durch a)

verzögerte Inkubationszeiten, b) reduzierte bzw. verlangsamte Ausbreitung des Pathogens im Wirtsgewebe sowie c) partielle bzw. vollkommen inhibierte Pathogenese des Parasiten welches im Extremfall zum Verlust seiner Verbreitungseinheiten (Sporangienträger, Sklerotien, Chlamydosporen) führt (van der Planck, 1963 & 1968; Hoffmann et al, 1994; Agrios, 1997). Durch die phänologischen Beobachtungen der Resistenzreaktion einzelner, in ihrem Resistenzniveau signifikant unterscheidbaren Wildarten, konnten hierbei erste Rückschlüsse auf die Beteiligung konstitutiver als auch induzierter Abwehrmechanismen geschlossen werden.

**Tabelle 25:** Wesentliche phänotypische Charakteristika des *Sclerotinia*-Resistenzphänomens artifiziell inokulierter Blätter- und Stängel des perennierenden *Helianthus* Genpools \*

Art	Stängelresistenz			Blattresistenz		
	Typ	Sklerotien	Welke	Typ	Sklerotien	natürlicher Infektionsverlauf
<i>H. salicifolius</i>	R	□	□	I	□	□
<i>H. maximiliani</i> AC M	R	□	□	I	□	□
<i>H. maximiliani</i> AC 7	R	□	□	R	□	□
<i>H. pauciflorus</i> ssp. sub. R 2	I	□	□	I	□	□
<i>H. pauciflorus</i> ssp. pauc. P 1	I	□	□	I	□	□
<i>H. pauciflorus</i> ssp. pauc. P 1745	I	□	□	I	□	□
<i>H. pauciflorus</i> ssp. pauc. P 1747	I	□	□	I	□	□
<i>H. maximiliani</i> AC 1	I	□	□	I	■	□
<i>H. maximiliani</i> AC 5	I	□	□	I	□	□
<i>H. divaricatus</i>	I	□	□	R	□	□
<i>H. nuttallii</i>	I	□	□	S	■	■
<i>H. strumosus</i>	I	□	□	I	□	□
<i>H. microcephalus</i>	I	□	□	I	□	□
<i>H. x laetiflorus</i>	I	□	□	I	□	□
<i>H. maximiliani</i> AC 4	I	□	□	I	□	□
<i>H. pauciflorus</i> ssp. sub. R 1	I	□	□	I	□	□
<i>H. decapetalus</i>	I	■	■	n.e.	n.e.	n.e.
<i>H. atrorubens</i>	S	■	■	S	■	■
<i>H. grosseserratus</i>	S	■	■	I	■	□
<i>H. tuberosus</i>	S	■	■	S	■	■
<i>H. giganteus</i>	S	■	■	S	■	■

\* R =resistent, I = intermediär, S = Suszeptibel. ■ = vorhanden; □ = nicht vorhanden. n.e. = nicht evaluiert.

Durch die ausgesprochen graduelle Ausprägung des Resistenzphänomens über die getesteten Genotypen und Pflanzenorgane sowie deren mit der Pathogenese verbundenen Parametern lassen hierbei auf Komponenten des partiellen Resistenzmerkmals innerhalb der perennierenden Wildarten schließen.

Obwohl das Screeningverfahren durch Einsatz von artifiziellen Myzelexplantaten primär zur Detektion physiologischer Resistenzen konzipiert war, konnten durch die im Versuchsjahr 2001 beobachteten natürlichen Infektionen von *Sclerotinia sclerotiorum* habituelle Resistenzfaktoren im sekundären Genpool ermittelt werden. Die in der randomisierten Versuchsanlage lediglich von den *H. tuberosus* Prüfgliedern gezeigte natürliche Ascosporeninfektion der Blätter, die bei 40% der Individuen zur Stängelfäule führte zeigt, dass *H.*

*tuberosus* höchstwahrscheinlich als einzige perennierende Wildart eine natürliche Wirtspflanze für *Sclerotinia sclerotiorum* Stängelfäule darstellt. Durch habituelle Charakteristika wie einer großen Blattfläche, parenchymreicher Petiolen und gleichartiger, flacher Insertionswinkel der Blätter (Heiser et al., 1969) weist *H. tuberosus* damit in wesentlichen und zur *Sclerotinia* Ascosporeninfection bedeutsamen Merkmalen Ähnlichkeiten zur annuellen Kultursonnenblume auf. Die schmalen lanzettlichen Blattmorphologien sowie die meist größere Blattinsertionswinkel der übrigen untersuchten Wildarten lassen bei diesen auf einen habituellen Resistenzcharakter schließen, der einen primären Kontakt zwischen Parasit (Ascosporen) und Wirtspflanze minimiert oder gar ganz ausschließt. Offensichtlich bieten diese schmale Blattmorphologien eines Großteils der evaluierten Wildarten keine ausreichende Fläche zur *Sclerotinia* - Ascosporenlung bzw. zu deren Retention. Darüber hinaus berichten Rapilly (1991) und Venette (1998), dass die erfolgreiche *Sclerotinia* Ascosporeninfection zunächst eine kritische, von der infizierten Pflanzenart abhängige Dichte erreichen muss. Vereinzelt auf Blattflächen retinierte Ascosporen scheinen dabei nicht zur Primärinfektion befähigt zu sein, sondern unterliegen einer synergistischen Wechselwirkung für eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanze (Purdy, 1958).

Diese habituellen und passiven Resistenzen werden in der Literatur mit *Escape*- bzw. *Avoidance* - Mechanismen umschrieben und sind häufig charakteristisch für Wildartpopulationen (Prell, 1996; Odenbach & Sacristan, 1997; Prell & Day, 2001). Berichte über natürliche *Sclerotinia* Infektionen im perennierenden *Helianthus* Genpool liegen bisher nicht vor, können jedoch nach Seiler (pers. Mitteilung) äußerst selten auf autochthonen Standorten beobachtet werden. Lediglich für *H. tuberosus* sind bislang von Cassells & Deadmann (1993) natürliche Infektionen über *Sclerotinia* Ascosporen beschrieben worden die zur Stängelfäule führten. Sie bestätigen damit die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur natürlichen Ascosporen - Anfälligkeit dieser Wildart.

Da mit einem interspezifischen Züchtungsansatz ungeachtet der realisierten Transfertechnik grundsätzlich alle heritablen Charakteristika einer zwischenartlichen Introgression zugänglich sind, könnten auch habituelle Resistenzkomponenten der *Sclerotinia* Resistenz in die Kultursonnenblume übertragen werden. Insbesondere in agro-klimatischen Regionen in denen die Ascosporeninfection wie in weiten Teilen Mitteleuropas prävalent ist (McCartney & Lacy, 1991; McCartney & Lacy, 1992; Degener et al., 1998) könnten in die Kultursonnenblume eingelagerte habituelle (Resistenz-) Eigenschaften zur Reduktion der Primärinfektionen beitragen. Obwohl auch in der Kultursonnenblume Unterschiede in der natürlichen Ascosporen - Infektionsrate zur Korb- und Stängelfäule mit habituellen Resistenzmechanismen verbunden werden (Tourvieille et al., 1992; Achbani et al., 1994; Achbani et al., 1996), konnte eine vergleichende Untersuchung von Castaño et al. (1993) an 20 Inzuchtlinien diverser Herkünfte zwar eine große Variabilität hinsichtlich zahlreicher morphologisch - habituellem Charakteristika ermitteln, jedoch standen diese in keinem Wirkungszusammenhang zur

natürlichen *Sclerotinia* Anfälligkeit. Die Bedeutung von *Avoidance* - bzw. *Escape* - Mechanismen zur Reduktion der *Sclerotinia* Anfälligkeit konnte dagegen jüngst von Jiang et al., 2001 an Raps (*Brassica napus*) mit blütenblattlosen Formen gezeigt werden. Bei dieser Ölpflanze stellt die *Sclerotinia*-Infektion der seneszenten Petalen das kausale Ereignis der Weißstängeligkeit bei Raps dar (Krüger, 1975; Lefol & Morrall, 1996; Heran et al., 1999) und konnte durch die Verwendung von apetalen *B. napus* - Formen, bei annähernd gleichen Befruchtungsverhältnissen und Erträgen (Jiang & Becker, 2001), signifikant reduziert werden. Ebenso konnten *Avoidance*-mechanismen zur reduzierten Anfälligkeit der *Sclerotinia*-Stängelfäule in diversen Populationen der Erdnuss-, Sojabohne und in *Phaseolus* - Bohnen nachgewiesen werden deren *Sclerotinia* - Stängelfäulekomplex eine vergleichbare Ätiologie wie in *Helianthus* aufweist (Chun et al., 1987). Sie wurden in diesen Leguminosen in einem aufrechtem Wuchs, geringen primären Verzweigungen sowie in der Wuchshöhe ermittelt und konnten durch ihre hohen Heritabilitäten erfolgreich in der Züchtung *Sclerotinia* toleranter Sorten integriert werden (Coffelt et al., 1982; Coffelt & Porter, 1982; Boland & Hall, 1987; Kim & Diers; 2000; Cruickshank et al., 2002; Kolkman & Kelly, 2002).

Eine signifikant niedrigere Inkubationszeit zur Stängelinokulation lässt auf eine primäre und konstitutive Penetrationsbarriere zur Infektion von *Sclerotinia* zurückschließen. Signifikante Unterschiede in der Inkubationszeit zur Stängelinokulation konnte im untersuchten sekundären Genpool in *H. salicifolius* ermittelt werden. So zeigten lediglich 50% der *H. salicifolius* Individuen 36h nach Inokulation eine für *Sclerotinia* charakteristische Läsion an deren Sprossachsen. In den Blatinokulationen konnte dagegen in keinem untersuchten Genotyp eine signifikant verzögerte Inkubationszeit ermittelt werden. Alle artifiziellen Myzelinokulationen der Blätter wiesen im Freiland sowie im DTL-Test bereits 12h nach Inokulation durch makroskopisch sichtbare Läsionen deutliche Anzeichen einer erfolgreichen Penetration und Parasitierung durch *Sclerotinia* auf. Penetrationsbarrieren des primären Infektionsortes zur *Sclerotinia* - Stängelfäule konnten auf Grund dessen nicht als Resistenzkomponenten des partiellen Resistenzphänomens im sekundären Genpool ermittelt werden.

Das für die Pathogenese der Stängelfäule charakteristische Einwachsen des *Sclerotinia*-Myzels über die Blattpetiolen in die Sprossachse wiesen die Wildarten *H. tuberosus*, *H. nuttallii*, *H. giganteus* sowie *H. atrorubens* auf. Alle weiteren Wildarten zeigten entweder eine Termination des Myzelwachstums bereits auf der Blattspreite (*H. divaricatus*; *H. maximiliani* AC 7) oder, trotz der schon parasitierten Petiole, kein typisches Einwachsen des Myzels in die Sprossachse. Die Bedeutung von partiellen Resistenzmechanismen in den Blattpetiolen zur Stängelfäule Resistenz konnte bereits im Screening von Degener et al. (1998) für annuelle Inzuchtpopulationen nachgewiesen werden und kann durch die vorliegende Untersuchung auch im perennierenden Genpool der Sonnenblume angenommen werden. Durch die große Diversität der Petiolenanatomie und Morphologie des untersuchten Wildartenspektrums und der verwendeten Inokulationstechnik können hier jedoch umweltrelevante Wechselwirkungen

angenommen werden die im Testverfahren nicht berücksichtigt wurden. Durch die in Abhängigkeit vom Genotypen und dessen Blattlänge bereits benötigten Penetrationszeit des Myzels vom Inokulationsort „Blattspitze“ bis zum Erreichen der Petiolenbasis lässt ein Austrocknen des Myzels in den Petiolen möglich erscheinen und konnte von Degener et al. (1998) bereits ermittelt werden. Trotz der Verwendung von PE-Beuteln zur Feuchteretention wurden diese zum ungehinderten Gasaustausch nach oben hin offen gehalten, womit ein Austrocknen des wachsenden *Sclerotinia* - Myzels möglich erscheint. Zur genaueren Untersuchungen der differenziellen Beteiligung von Resistenzkomponenten der Blattpetiolen am gesamten Krankheitskomplex müssten hierfür Ganzpflanzenversuche unter kontrollierten Bedingungen (Gewächshaus) durchgeführt werden.

Die bereits als primäres Selektionskriterium der *Sclerotinia*- Blatt- und Stängelresistenz ermittelten Läsionslängen und der mit ihr signifikant korrelierenden Myzelwachstumsraten wiesen in beiden Pflanzenorganen auf starke physiologische Resistenzkomponenten hin. Partiiell resistente Genotypen der Blatt- sowie Stängelresistenz wiesen nach 4 Tagen signifikant geringere Läsionslängen sowie ein eingeschränktes Myzelwachstum auf. Darüber hinaus zeigten die partiiell stängelresistenten Genotypen *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC M sowie *H. maximiliani* AC 7 meist nach 8 bis 10 Tagen eine Termination der Myzelextension. Da die Sprossachse das entscheidende und mit dem Blütenkorb das die Ertragskomponente beinhaltende Pflanzenorgan darstellt, wurden in dieser Arbeit die ihr zugrunde liegenden genotypisch distinkten Resistenzfaktoren besonders berücksichtigt.

Den partiiell resistenten, intermediären und suszeptiblen Resistenzausprägungen der Wildart - Sprossachsen konnten signifikant distinkte Charakteristika zugeordnet werden. Einhergehend mit einer geringen Myzelausbreitung von 0,1 – 0,3 cm/d in partiiell stängelresistenten Genotypen konnte gleichzeitig eine starke und scharfe, vom gesunden Gewebe abgegrenzte Nekrotisierung des parasitierten Gewebes beobachtet werden. Die intermediär stängelresistenten Arten zeichneten sich ebenfalls durch eine verlangsamte Myzelausbreitung von 0,6 – 1 cm/d aus, gleichzeitig jedoch durch umweltabhängige Nekrotisierungen aus. Suszeptible Wildarten zeigten dagegen weder reduzierte Myzelwachstumsraten (1,5 – 2cm/d) noch distinkte Abgrenzungen zwischen infiziertem und gesundem Gewebe. Sie glichen damit in wesentlichen phänologischen Resistenzkriterien der Sprossachsen den *Sclerotinia* - empfindlichen Inzuchtlinien SWS-R1 und SEM-R1.

Diese statistisch signifikanten distinkten Resistenztypen der *Sclerotinia*-Stängelresistenz des sekundären *Helianthus* – Genpools sind hierbei in dieser Variabilität in der Kultursonnenblume bisweilen nicht ermittelt worden. Sie gleichen in ihrer physiologischen und phänologischen Erscheinung jedoch heritablen *Sclerotinia trifoliorum* Resistenzphänomenen von Luzernesprossachsen (*Medicago sativa* L.). Hierbei führte die rekurrente phänotypische Selektion der Ausgangspopulationen über die Läsionslängen (Pratt & Rowe, 1991) zur erhöhten Stängelresistenz der Nachkommenschaften (Pratt & Rowe, 1994; Halimi et al., 1994)

und zur Registrierung einer *Sclerotinia* – Resistenten Zuchtpopulation (Pratt & Rowe, 1996). Erst weitergehende Untersuchungen zum Resistenzphänomen zeigten dabei zwei distinkte Resistenztypen (Halimi & Rowe, 1998a), die sich ebenso wie in der vorliegenden Studie hinsichtlich Myzelausbreitung im Stängelgewebe signifikant unterschieden. Die Stängelresistenz zeigte sich dabei entweder in einer Termination jeglicher Myzelaktivität 8d nach Inokulation einhergehend mit einer starken Nekrotisierung und scharfen Abgrenzung zum gesunden Gewebe oder eine verlangsamten Läsionsausdehnung ohne klare Grenze zu gesunden Sprossabschnitten (Halimi & Rowe, 1998a). Heritabilitätsstudien konnten darüber hinaus aufklären, dass es sich hierbei höchstwahrscheinlich um zwei differenzielle physiologische Reaktionen handelt die keiner komplementären Genwirkung unterliegen, sondern vielmehr polygenen Mechanismen mit epistastischen Effekten unterliegen (Halimi & Rowe, 1998b). In wie fern eine komplementäre Genwirkung der verschiedenen physiologischen Stängelresistenzen im sekundären Genpool vorliegen, konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, sondern muss durch populationsgenetische Heritabilitätsuntersuchungen seggregierender interspezifischer und in ihrer Stängelresistenz unterscheidbaren Nachkommenschaften ermittelt werden.

Ein ähnlich phänologisches Erscheinungsbild im Resistenzscreening zur *Sclerotinia* - Stängelfäule konnte bislang im annualen kultivierten *Helianthus* Genpool nicht ermittelt werden. So berichten Sedun & Brown (1989) in ihren Untersuchungen zur basalen Stängelfäule, dass 95% der evaluierten Testpflanzen von F<sub>1</sub>-Hybriden und Inzuchtlinien trotz Unterschieden in der Myzelausbreitung die gleichen gebleichten, hellbraunen Läsionen aufwiesen. Eine Termination des Myzelwachstums konnten sie dagegen nicht verzeichnen. Lediglich bei 5% der getesteten Pflanzen beobachteten sie nekrotische Läsionen mit stark reduzierter Läsionsausbreitung. Dieses Resistenzphänomen wurde von den Autoren jedoch nicht einer physiologischen Resistenzkomponente zugeschrieben, sondern wurde vielmehr in einer bodenbürtigen Kontamination der Läsionen mit dem Nahrungskonkurrenten *Alternaria alternata* und dem Hyperparasiten *Coniothyrium minitans* erkannt. Häufig kam es trotz dieses biotisch - antagonistischen Potentials in den Läsionen zum spontanen Auftritt einer rapiden Läsionsextension. Die in dieser Arbeit durchgeführten bodenfernen Inokulationen der Wildarten schließen eine Kontamination weitestgehend aus, so dass die ermittelten partiellen Stängelresistenzen auf veritablen - physiologischen - Resistenzkomponenten der Sprossachsen beruhen.

Aus Untersuchungen von Bazzalo et al. (1991) zur basalen Stängelfäuleresistenz von *H. annuus* Inzuchtlinien geht hervor, dass sowohl konstitutive als auch induzierte Resistenzfaktoren der basalen Sprossachse Wirkungszusammenhänge mit der Läsionslänge und deren phänologischen Ausprägungen aufweisen. Sie konnte von den Autoren in einer postinfektionellen Phenolakkumulation sowie im lignifizierten Xylemanteil der Stängelquerschnitte ermittelt werden. Aufgrund dessen wurden in weitergehenden Studien wesentliche

anatomische und physiologische Bestimmungsfaktoren der distinkten *Sclerotinia* - Stängelresistenzen ausgewählter perennierender *Helianthus* – Wildarten erarbeitet und sollen nachfolgend diskutiert werden.

#### 4.5 Erschließung von konstitutiven *Sclerotinia* - Resistenzfaktoren der Sprossachsen

Eine für quantitative Resistenzen charakteristisch verzögerte Inkubationszeit zeigte *H. salicifolius* zur *Sclerotinia* Stängelinokulation. Dieses wies sich in der signifikant später erfolgten Symptomausprägung aus. Über den dreijährigen Versuchszeitraum zeigten lediglich die Hälfte der inokulierten *H. salicifolius* Sprossachsen nach 36h charakteristische *Sclerotinia* Symptome. Die verzögerte Inkubation kann dabei höchstwahrscheinlich als ein Grund für die von dieser Wildart im dreijährigen Mittel geringsten Stängelläsionen aller evaluierten Genotypen erwogen werden. Alle anderen Genotypen zeigten weder zur Blatt- noch zur Stängelinokulation eine signifikant verzögerte Inkubationszeit.

Verlängerte Inkubationszeiten können häufig bei quantitativen Resistenzen als ein Aspekt der multiplen Abwehrmechanismen beobachtet werden und werden im Allgemeinen strukturellen Resistenzkomponenten zugeschrieben (Agrios, 1997). Dieser strukturelle Resistenzfaktor in *H. salicifolius* Sprossachsen kann in der im Vergleich zu allen anderen Wildarten ( $\approx 2\mu\text{m}$ ) signifikant dickeren, vierfach mächtigeren ( $7.8\ \mu\text{m}$ ) Cutinschicht der Sprossachscuticula gesehen werden. Die Cuticula stellt die primäre pflanzliche Barriere zur *Sclerotinia* Penetration dar, ihr Verlust durch mechanische oder chemische Behandlung führt hierbei zu einer signifikant erhöhten *Sclerotinia*-Infektionsrate (Lumsden, 1979). Nach Untersuchungen von Dillard & Cobb (1995) weisen Weißkohlpflanzen (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) sowohl nach mechanischer Blattverletzung als auch nach minimalen Fraßverletzungen durch Lepidopterenlarven (*Plutella xylostella*) eine signifikant erhöhte Befallsrate mit *Sclerotinia sclerotiorum* auf. Eine dickere Cuticula kann im Allgemeinen durch a) eine mechanische Penetrationsbarriere (Howard et al., 1991), b) eine verlängerte Degradationszeit der vom Pilz sezernierten Cutinasen (Kolattukudy, 1981 & 1985) als auch c) durch Reduktion der Permeabilität für pflanzliche Assimilate (Martin, 1964; Marschner, 1995) und damit über einen Nährstoffmangel für initial saprophytisch lebende Phytopathogene, zur verstärkten Resistenz beitragen.

Die Penetration von *Sclerotinia sclerotiorum* Infektionshyphen erfolgt nach Untersuchungen von Lumsden & Dow (1973) ausschließlich durch Aufbau eines internen Turgors in Kombination mit stark melanisierten Hyphenspitzen und somit durch mechanische Kräfte. Bei ihren Untersuchungen an Bohnen-Hypokotyl konnten sie keine lytischen und somit für Cutinasen charakteristische Veränderungen der Cuticula und epicuticulären Wachsen erkennen. Auch bei Sonnenblumen konnten Witt & Heller (2000) in ihren Studien der frühen Infektionsstadien von *Sclerotinia sclerotiorum* an der Inzuchtlinie HA 89 lediglich eine

mechanische Penetration der Cuticula beobachten. Darüber hinaus scheinen die phytopathogenen Vertreter der Gattung *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*; *S. minor*, *S. trifoliorum*) eine hohe Präferenz zur mechanischen Penetration ihrer Wirte zu besitzen (Lumsden, 1979). Untersuchungen früher Infektionsphasen von *Sclerotinia minor* an Erdnussprossachsen resistenter sowie anfälliger Genotypen (Melouk et al., 1988) zeigten jeweils einen geringeren Penetrationserfolg der kissenartigen Infektionsstrukturen des Pilzes am resistenten Genotyp. Dieses wird von den genannten Autoren mit einer strukturellen Resistenz über den festeren Zellverband der Epidermis erklärt. Eine mechanische Penetrationsbarriere kann somit auch für das Wirt-Pathogen-System *H. salicifolius* - *Sclerotinia ssp.* als Resistenzfaktor in betracht gezogen werden. Unterschiede in der Beschaffenheit der Cuticula werden darüber hinaus auch zur *Sclerotinia* - Blattresistenz in *Helianthus* erwogen. So berichten Achbani et al., (1996) von einer vermehrten natürlichen *Sclerotinia* - Ascosporen Infektion der jungen Blattspitzen die von den genannten Autoren in der an dieser Stelle nicht vollkommen ausgebildeten Cuticula erwogen werden.

Bislang wurden keine Untersuchungen über die potentiell beteiligten Resistenzmechanismen bzw. Faktoren der Interaktion *Helianthus* – *Sclerotinia sclerotiorum* durchgeführt. Penetrationsbarrieren werden darüber hinaus in der aktuellen Resistenzzüchtung der Kultursonnenblume nicht berücksichtigt. Aufgrund des äußerst geringen Resistenzniveaus der Zuchtpopulationen liegt das Hauptaugenmerk auf der Myzelausbreitung im bereits penetrierten Gewebe und somit auf der Detektion physiologischer Resistenzen (Degener, 1998). Berichte über primäre mechanische Penetrationsbarrieren im annualen Genpool liegen darüber hinaus lediglich für zwei Inzuchtlinien vor (Pirvu et al.; 1985). In ihren Untersuchungen konnten sie in beiden Inzuchtlinien ein rezessives Gen  $s_1$  determinieren welches für die mechanische Resistenz der primären Penetration von *Sclerotinia* in den Spross verantwortlich ist. Obwohl die Sprossachse nicht der prävalente Infektionsort der *Sclerotinia* Stängelfaule ist und nur durch Ascosporenkontamination der Blattachsen vorliegt, könnte eine Penetrationsbarriere derselben sowohl zur Reduktion der basalen *Sclerotinia* Fäule als auch der häufigen Kontaktinfektionen gesunder durch bereits infizierte Pflanzen bei den heute üblichen hohen Bestandesdichten von 50.000-80.000 Pflanzen/ha (Hoes & Huang, 1976; Lamarque, 1985; Hoes & Huang, 1985; Huang & Hoes, 1980) beitragen. Für beide Infektionsarten besteht ein direkter Kontakt zwischen Pilz-Inokulum und der Stängel - Cuticula.

Als eine wesentliche phänotypische und charakteristische Resistenzkomponente wies sich in beiden infizierten Pflanzenorganen die Myzelausbreitung aus. Insbesondere der zur Stängelinokulation beobachtete starke Zusammenhang zwischen der Läsionsausdehnung und den Welkesymptomen sowie Totalverlusten ganzer Pflanzen und die ausgesprochene Präferenz zur longitudinalen Läsionsausdehnung im Cortex der Sprossachsen teilresistenter Wildarten ließen auf partiell wirksame, strukturelle Barrieren im penetrierten Gewebe schließen. Im Verlauf der histochemischen Untersuchung der Wildartstängel konnte dabei ein enger

Zusammenhang zwischen der quantitativen und qualitativen Lignifizierungsmustern der sekundären Sprossachsen und deren phänotypischer *Sclerotinia* – Resistenz nachgewiesen werden. Partiiell resistente Wildarten zeichneten sich durch signifikant mächtigeres xylematisches Gewebe, einer größeren Anzahl eingeschalteter Leitbündel und damit auch durch eine höhere Anzahl des lignifizierten Perizykelsklerenchyms gegenüber Stängelfäule suszeptiblen Arten aus. Der Lignifizierungsgrad der Sprossachsen zeigte hierbei sowohl einen engen Zusammenhang zum Läsionsfortschritt, zur Richtung der Läsionsvergrößerung und zu den Welkesymptomen bzw. zum Totalverlust der untersuchten Genotypen. So wiesen die suszeptiblen Arten *H. tuberosus*, *H. giganteus* und *H. grosseserratus* im dreijährigen Freilandversuch signifikant erhöhte Welkesymptome (> 85% der Individuen), Totalverluste (> 60 - 90% der Individuen) sowie eine annähernd synchronen longitudinalen als auch radiären Läsionsfortschritt auf und zeigten gleichzeitig den geringsten Lignifizierungsgrad ihrer Sprossachsen. Dieser war besonders durch eine geringe Anzahl an Leitbündeln und somit einer hohen Anzahl primärer Markstrahlen mit großen tangentialen Ausdehnungen von >80µm gekennzeichnet. Die partiiell resistenten Genotypen *H. salicifolius* und die *H. maximiliani* Akzessionen M und AC 7 zeigten dagegen keine Welkesymptome oder Totalverluste, einen fast ausschließlich longitudinalen Läsionsfortschritt und waren durch einen konzentrisch lignifizierten Zentralzylinder gekennzeichnet. Intermediär Stängelresistente Wildarten zeigten sowohl variierende Resistenzniveaus als auch in der konstitutiven Lignifizierungsmuster ihrer Sprossachsen variierende Ausprägungen.

Als einen partiellen Resistenzfaktor zur *Sclerotinia* – Stängelresistenz kann damit das genotypisch distinkte Lignifizierungsmuster in den Sprossachsen des perennierenden Genpools angenommen werden. Ähnliche Zusammenhänge zwischen dem Ligninanteil der Sprossachsen und der *Sclerotinia* – Resistenz konnten bereits von Bazzalo et al. (1991) ermittelt werden. In ihren zweijährigen Untersuchungen zur basalen Stängelfäuleresistenz von *H. annuus* Inzuchtlinien konnten sie einen höheren lignifizierten Xylemanteil einer geringeren Läsionslänge und reduzierten Totalverlusten der partiiell resistenten Linien zuordnen, wobei dieser Zusammenhang jedoch lediglich in einem Versuchsjahr evident war.

Die Bedeutung einer konstitutiven Lignifizierung zur *Sclerotinia* Resistenz lassen sich hierbei auch in der erhöhten *Sclerotinia* - Stängeltoleranz früh gesäeter Sonnenblumenbestände erkennen die von Orellana (1975) in der verlängerten Photoperiode und einer damit einhergehenden verstärkten Lignifizierung der Sprossachse begründet werden. Eine konstitutive Lignifizierung verhindert darüber hinaus den erfolgreichen Einsatz von *Sclerotinia sclerotiorum* als Mycoherbizid gegen den in Neuseeland neophytischen Hahnenfuss *Ranunculus acris* L. (Grenn et al., 1994; Green et al., 1998). Hierbei konnte die *Sclerotinia* Resistenz auf morphologisch - anatomische Eigenschaften der basalen Rosette zurückgeführt werden und wurde insbesondere in dem lignifizierten und konzentrisch angelegten vasculären Systems ermittelt welches eine weitere Penetration des *Sclerotinia* - Myzels verhinderte (Green

et al., 1998). Auch Hall et al., (2002) konnten eine weitgehende Penetrationsresistenz für das *Sclerotinia* Myzel in partiell lignifizierten *Vitis vinifera* Sprossachsen feststellen und diese war zusätzlich eng mit einer reduzierten Läsionsvergrößerung assoziiert. Die weitgehende Penetrationsresistenz eines konzentrisch angelegten Gefäßsystems konnte ebenso bei den partiell resistenten *Helianthus* Wildarten postinfektionell ermittelt werden. Es verhinderte dabei das weitere invasive Myzelwachstum zum Markgewebe und kann damit als eine partielle Charakteristik der *Sclerotinia* Stängelresistenz dieser Wildarten angesehen werden.

Die Eigenschaft von lignifiziertem Gewebe als Resistenzfaktor gegenüber phytopathogenen Pilzen wird hauptsächlich in einer physikochemischen Barriere für den pilzlichen Parasitismus gesehen. Die Einlagerung des covalent an Hemizellulosen der sekundären Zellwand gebundenen Lignins kann dabei über eine behinderte Diffusion für lytische Enzyme und Toxine sowie als chemische Barriere des für viele Pilze nicht degradierbaren phenolischen Makromoleküls zur verstärkten Resistenz beitragen (Agrios, 1997; Dickison, 2000; Donaldson, 2001; Leonowicz et al., 2001). Der Resistenzvermittelnde Effekt einer verstärkten Lignifizierung gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* kann in beiden physikochemischen Eigenschaften gesehen werden. Für den Ascomyceten ist keine Ligninase – Aktivität nachgewiesen worden (Lumsden, 1979) und kann auch an der Phänologie *Sclerotinia* infizierter Kulturpflanzen erkannt werden, da im vollständig von *Sclerotinia* mazerierten Gewebe lediglich die lignifizierten Leitbündel und Fasern als intakte Strukturen erhalten bleiben (Tourvieille & Vear, 1984; Lamarque, 1985). Zusätzlich konnten Wegulo et al. (1998) eine reduzierte Diffusion des *Sclerotinia* - Toxins Oxalsäure in bereits partiell lignifizierten Sojabohnenkeimlingen feststellen. Die Bedeutung einer reduzierten Diffusionsrate dieser Dicarbonsäure im pflanzlichen Gewebe zur *Sclerotinia* - Resistenz konnte dabei von Tu (1989) in *Phaseolus vulgaris* – Blättern mit <sup>14</sup>C markierter Oxalsäure gezeigt werden. *Sclerotinia* tolerante Genotypen zeichneten sich hier durch eine reduzierte Diffusionsgeschwindigkeit der markierten Oxalsäure im Mesophyll aus. Neben der destruktiven Aktivität lytischer Enzyme von *Sclerotinia* wird auch der Oxalsäure eine Beteiligung am Welkesymptom zugeschrieben. Die Welkesymptome sind dabei Folge einer Präzipitation von Calciumoxalatkristallen in den konduktiven Xylemelementen (Tracheen, Tracheiden) womit die kontinuierliche Wasser und anorganische Nährstoffversorgung übergeordneter Pflanzenteile unterbrochen wird (Maxwell et al., 1970; Noyes & Hancock, 1981; van Alfen, 1989; Jung et al., 1995). Die Bedeutung der genotypisch unterschiedlichen konstitutiven Lignifizierung perennierender Wildarten zur Degradierbarkeit für *Sclerotinia* und zur Diffusionsrate der Oxalsäure scheint damit eine partielle Bedeutung zum resistenzvermittelnden Effekt zu haben. Indirekte Hinweise auf die reduzierte Degradierbarkeit der partiell stängelresistenten Wildarten für *Sclerotinia* lassen sich auch in der mangelnden Sklerotisierung erkennen. Offensichtlich bieten diese Genotypen aufgrund ihrer starken Lignifizierung nur ein reduziertes Nährstoffangebot für *Sclerotinia*,

welches lediglich durch den parenchymatischen Cortex repräsentiert wird und nicht zur Sklerotisierung der Hyphen ausreicht.

Obwohl zur histochemischen Analyse sekundäre Sprossachsen gleichen Alters mit annähernd gleichen Durchmessern untersucht wurden, zeigten diese eine beachtliche genotypische Variabilität hinsichtlich ihres Lignifizierungsmusters. Durch diese große Variabilität der Anordnung des vasculären Systems im Sprossquerschnitt scheinen im sekundären *Helianthus* Genpool diverse Unterschiede in Art und Zeitpunkt des sekundären Dickenwachstums zu bestehen. Im allgemeinen folgt das sekundäre Dickenwachstum in *Helianthus ssp.* einem für die Gattung charakteristischen Muster und wird erst nach vorheriger Einschaltung von Zwischenleitbündeln im Markstrahlenbereich initiiert (Braune et al., 1999). Zusätzlich wird Art und Umfang der im Sprossquerschnitt enthaltenen Leitbündel in *Helianthus annuus* durch die Anzahl der oberhalb des Querschnitts liegenden Blätter (Phyllotaxis) bestimmt (Esau, 1945; Eschrich, 1995). Für beide Charakteristika scheint in den perennierenden Wildarten eine große Variabilität zu bestehen, deren züchterische Nutzung zur *Sclerotinia* Stängelresistenz möglich erscheint.

Als weitere konstitutive Resistenzfaktoren perennierender Wildarten konnte bereits Ellers (2002) eine konstitutiv höhere Expression von PR-Proteinen in Sprossachsen der partiell stängelresistenten Wildart *H. maximilani* AC M im Vergleich zum wesentlich empfindlicheren HO-F<sub>1</sub>-Hybriden Olbaril ermitteln. Diese Wildart wies in ihren Sprossachsen eine zweifach erhöhte konstitutive Chitinaseaktivität im Vergleich zu Olbaril auf und zeigte darüber hinaus eine konstitutive  $\beta$ -1,3-Glucanaseaktivität die im annualen Hybriden absent war. In wie weit die konstitutive Expression von PR – Proteinen in den weiteren perennierenden Wildarten vorliegen ist bislang nicht evaluiert worden und müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### 4.6 Induzierte Resistenzmechanismen der Sprossachsen auf einen *Sclerotinia* Befall

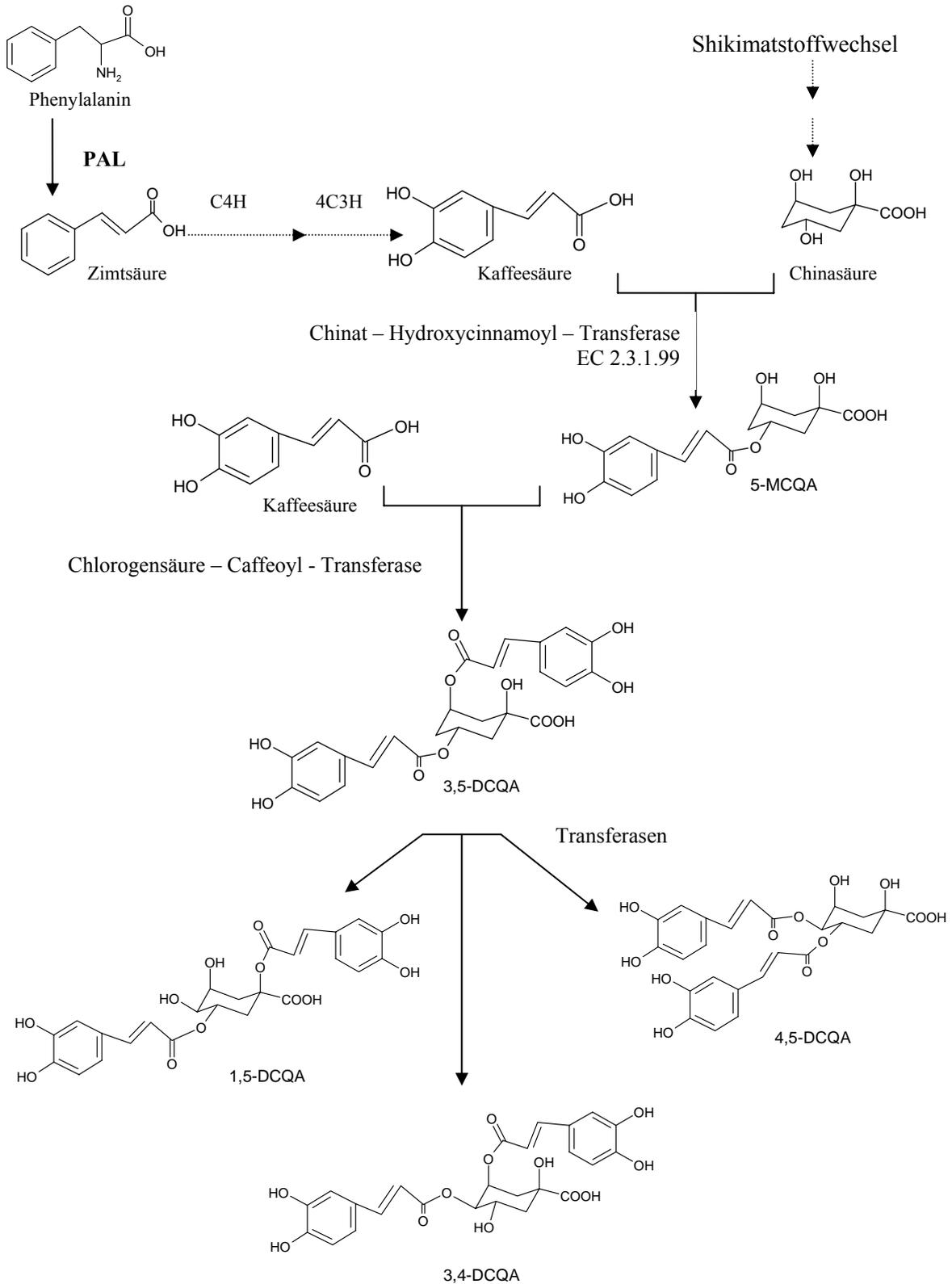
Die starke Nekrotisierung der Stängelläsionen in partiell Resistenten Wildarten und die damit verbundene Inhibition der Läsionsvergrößerung ließen Rückschlüsse auf pathogensensitive biochemische Resistenzmechanismen zu. Partiiell resistente Genotypen zeigten zu dieser Resistenzreaktion unter langwelligen UV – Licht bereits makroskopisch sichtbar eine starke weiß-blaue Autofluoreszenz der lokalen Läsion. Die epifluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte hierbei, dass sowohl parenchymatische Cortezellen als auch lignifiziertes Gewebe eine starke Zunahme in ihrer Autofluoreszenz erfuhren. Suszeptible Wildarten wiesen dagegen keine verstärkten Autofluoreszenzen ihrer Sprossachsen nach *Sclerotinia* Inokulation auf. Diese Beobachtungen ließen bereits auf einen differenziell vom Resistenztyp (Genotyp) abhängigen induzierten Phenolmetabolismus schließen, der sich meist in der Akkumulation autofluoreszenter Komponenten infizierter Gewebe zeigt. In der weitergehenden dünschichtchromatographischen Analyse konnte jeweils in den infizierten Sprossachsen mit partiell resistantem Läsionstypus resistenzbegleitend eine neue blau fluoreszierende Substanzzone im langwelligen UV Licht detektiert werden. Die für Stängelfäule suszeptible Wildarten sowie suszeptible Läsionstypen intermediär resistenter Wildarten zeigten dagegen nach Infektion keine neue Substanzzone. Die resistenzbegleitende Substanzzone zeigte in ihrem chromatographischen Verhalten, im Fluoreszenzverhalten vor und nach Naturstoffreagenz A Behandlung und in ihrem Absorptionsspektrum die für Isochlorogensäuren in der Literatur angegebenen physikochemischen Eigenschaften (Bauer et al., 1988; Andary et al., 1996; Hanson & Zucker, 1963; Carini et al., 1998). Zusätzlich zeichnete sie sich durch die nach ihrer sauren Hydrolyse chromatographisch nachgewiesenen Kaffeesäure und Chlorogensäure als Caffeoylchinasäureester aus. Eine annähernd identische histologische Resistenzreaktion konnte in der *Sclerotinia* - Blatttoleranten perennierenden Wildart *H. resinosus* gefunden werden (Mondolot-Cosson & Andary, 1994; Andary et al., 1996). Auch hier zeigten sich nach *Sclerotinia* Inokulation der Blattspreite starke Autofluoreszenzsignale im parenchymatischen und besonders im lignifizierten, der Penetrationsstelle nahe liegenden Gewebezonen. Zusätzlich konnten die Autoren im infizierten Gewebe das 3,5 - Isomer der Isochlorogensäure (3,5 Dicaffeoylchinasäure) als das autofluoreszierende, resistenzbegleitende Phytoanticipin nachweisen. Eine genaue Strukturaufklärung der in dieser Arbeit resistenzbegleitend detektierten Substanz steht aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen noch aus. Die oben dargelegten physikochemischen Ähnlichkeiten so wie die große Übereinstimmung mit den pathohistologischen Befunden an *H. resinosus* lassen die resistenzbegleitende Akkumulation von Isochlorogensäure im sekundären *Helianthus* Genpool jedoch hochwahrscheinlich werden.

Isochlorogensäure stellt ein Gemisch aus den verschiedenen Stellungsisomeren der DicaFFEoylchinasäure (DCQA) dar die in Asteraceen ubiquitär nachweisbar sind (Merfort, 1992; Scholz et al., 1993; Amimoto & Fukui, 1996; Abdel-Malek et al., 1996; Miketova et al., 1999; Clifford, 1999; Pedrosa et al., 2000; Carnat et al., 2000). Ihre Biosynthese in Pflanzen erfolgt über den Phenylpropanoidstoffwechsel und den vorgelagerten Shikimisäurestoffwechsel und ist in Abbildung 27 dargestellt. Sie stellen die Grundbausteine Kaffeesäure und Chinasäure bereit die durch eine Chinat – Hydroxycinnamoyl - Transferase nachfolgend zu 5-Monocaffeoylchinasäure (5-MCQA, Chlorogensäure) kondensiert werden (Stokigt & Zenk, 1974; Villegaas & Kojima, 1985; Ding et al., 2001). Durch Anlagerung einer weiteren Kaffeesäure in 3-Position an Chlorogensäure über Chlorogensäure - Caffeoyl - Transferase wird 3,5 – DCQA gebildet (Kuhnl et al., 1987; Ky et al., 1999). Weitere Transesterifizierungen der 3,5 – DCQA über noch unbekannte wahrscheinlich unspezifische Transesterasen führen zu den diversen DCQA – Isomeren (Friedmann, 1997).

Obwohl die direkte fungizide Wirkung der DCQA als schwach eingestuft wird (Grayer & Kokubun, 2001), konnten Bazzalo et al. (1985) eine *in vitro* Hemmung der Myzelaktivität von *Sclerotinia sclerotiorum* nachweisen. In ihren Arbeiten an einer isogenen *H. annuus* Linie konnten sie darüber hinaus einen engen Zusammenhang zwischen nekrotisch - melanisierenden Resistenzreaktionen und der Akkumulation von Isochlorogensäuren in der nekrotischen Läsion nachweisen. Ebenso konnte für die Interaktion des nekrotrophen Phytopathogens *Alternaria alternata* mit *Pyrus pyrifolia* ein resistenzvermittelnder Effekt der induzierten 3,5-DCQA ermittelt werden und bedingte eine reduzierte Ausbildung von Infektionshyphen des Pilzes, geringere Penetrationserfolge und kleinere Läsionen der befallenen Blätter (Kodoma et al., 1998). Der genaue Wirkungsmechanismus der DCQA zur biologischen Aktivität gegenüber phytopathogenen Pilzen ist dabei weitgehend nicht geklärt. Ihre direkte Beteiligung an Resistenzphänomenen sind darüber hinaus lediglich für die oben genannten nekrotrophen Pilzinteraktionen mit der Gattung *Helianthus* ssp. und der Rosacee *Pyrus* ssp. nachgewiesen. Aus der Literatur ist jedoch deren antioxidatives Potential bekannt, welches sich in einer starken Inhibierung der über freie Radikale induzierten Lipidperoxidation sowie in der Detoxifikation (*quenching*) freier Radikale zeigt (Scholz et al., 1993; Peluso et al., 1995; Matsushige et al., 1996; Carini et al., 1998). Ihre antioxidative Aktivität übertrifft dabei jenes der Ascorbinsäure und Tocopherole um ein vielfaches (Maruta et al., 1995; Slanja et al., 1999). Insbesondere die antioxidativen Eigenschaften der DCQA könnten einen resistenzvermittelnden Beitrag zur *Sclerotinia* Resistenz leisten.

In der phytopathologischen Literatur mehren sich in jüngster Zeit Hinweise, dass nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis cinera* und *Sclerotinia sclerotiorum* den oxidativen Burst und dessen signalvermittelnden Beitrag zum hypersensitiven (programmierten, apoptotischen) Zelltod aktiv zur erfolgreichen Besiedlung der Pflanze ausnutzen und beschleunigen und sich damit

konträr zu biotrophen Pathogenen verhalten (Govrin & Levine, 2000, Muckenschnabel et al., 2001; Mayer et al., 2001; Muckenschnabel et al., 2002).



**Abbildung 27:** Biosynthese der Isochlorogensäuren in Pflanzen. C4H: Zimtsäure 4-hydroxylase; 4C3H: 4-Cumarat 3-hydroxylase.

Dickman et al. (2001) konnten an transgenen Tabakpflanzen, die antiapoptotisch wirksame humane, bakterielle und tierische Gensequenzen exprimierten, zeigen, dass weder ein oxidativer Burst vorhanden war noch *Sclerotinia sclerotiorum* in der Lage war ein stabiles Wirt – Parasit -Verhältnis zu etablieren, sondern lediglich saprophytisch die Blattoberfläche besiedeln konnte. Daneben scheint die erhöhte Konzentration an freien Radikalen im Gewebe die Empfindlichkeit der Pflanze für *B. cinera* und *S. sclerotiorum* zu erhöhen (Tonneijck & Leone, 1993) und Behandlungen der Pflanzen mit Radikalfängern wie Ascorbinsäure eine erhöhte Resistenz der Pflanzen für diese Pathogene zu bewirken (Elad, 1992). Zusätzlich ist die Bildung von Sklerotien eng mit einer Lipidperoxidation über die aktive Freisetzung von Sauerstoffradikalen des Myzels gekoppelt (Georgiu, 1997) und kann ebenfalls durch antioxidativ wirksame Radikalfänger effektiv unterdrückt werden (Georgiu et al., 2000). Die antioxidativen Eigenschaften von Hydroxycinnamylsäureestern wie DCQA werden dabei von Rice-Evans et al. (1997) insbesondere in ihrer protektiven Funktion für Lipide gegenüber deren Lipidperoxidation gesehen. Eine pathogensensitive Akkumulation von antioxidativ hochwirksamen DCQA, wie sie in den untersuchten partiell resistenten Wildarten hochwahrscheinlich ist, könnte somit einen wesentlichen Beitrag zum Resistenzphänomen leisten. Insbesondere die hohe Korrelation zwischen den Läsionslängen und der behinderten Sklerotisierung von *Sclerotinia* in partiell stängelresistenten Wildarten könnte durch eine frühzeitige, sensitive und dauerhafte Induktion dieser Phytoanticipine erklärt werden.

Scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycumarin) und Ayapin sowie deren postulierten intermediären Vorstufen Esculetin und Umbelliferon (Murray et al., 1982; Cabello-Hurtado, 1998; Prats-Preres et al., 2000b) konnten dagegen zu keiner Infektion und in keinem Genotyp nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen damit die in der Literatur bislang für die Interaktion *Sclerotinia* – *Helianthus* nicht beschriebene Induktion von Cumarinen. Zudem ist die Syntheseleistung von mechanisch und biotisch elicierten Sonnenblumen hinsichtlich der Scopoletin- und Ayapinakkumulation stark vom Pflanzenorgan und Alter abhängig (Gutierrez et al., 1995; Gutierrez-Mellando et al., 1996). Zusätzlich unterliegt Scopoletin in *Helianthus* in Folge seines Einflusses auf den Auxinmetabolismus sowie seiner starken Autotoxizität einem regulativen und raschen Abbau durch Scopoletinoxidase (Kupidlowska et al., 1994; Benz, 1995; Benz & Spring, 1995; Edwards et al., 1997). Die Induktion von Cumarinen im untersuchten sekundären Genpool der Sonnenblume scheint damit keine Relevanz zur *Sclerotinia* - Stängelresistenz zu haben.

Das zur Detektion putativer Cumarine eingesetzte hydrophobe Trennsystem führte jedoch zur Aufdeckung distinkter und nach *Sclerotinia* Inokulation auftretender UV- fluoreszierender Substanzzonen bei den *H. maximiliani* Akzessionen M und AC 7. Dabei zeigte *H. maximiliani* AC M fünf und *H. maximiliani* AC 7 zwei nach *Sclerotinia* Inokulation induzierte Substanzzonen die sich hinsichtlich Retention und Fluoreszenzfarbe deutlich unterschieden. In den weiteren differenzierenden chromatographischen Untersuchungen zeigte dabei lediglich

eine Substanzzone der *H. maximiliani* Akzession 7 eine Phenolcharakteristik. Eine genaue Aufklärung ihrer chemischen Charakteristik konnte bislang nicht durchgeführt werden und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die distinkte Akkumulation von Inhaltsstoffen nach *Sclerotinia* Inokulation innerhalb einer Art des sekundären Genpools kann jedoch als Indiz für die große Variabilität und das divergent induzierbare phytochemische Potential der *Helianthus* Wildarten dienen.

Obwohl Zusammenhänge zwischen dem Phenolmetabolismus und dem Resistenzniveau von Sprossachsen annueller Sonnenblumenlinien und Hybriden bestehen, sind diese meist nicht eng und häufig nur für ein Versuchsjahr signifikant (Bazzalo et al., 1991). Die ausgesprochen geringe Variabilität der Kultursonnenblume in ihrer *Sclerotinia* - Resistenz lässt damit die Präsenz von sensitiven Erkennungsmechanismen für den nekrotrophen Pathogen innerhalb der annuellen kultivierten Populationen marginal erscheinen. Die Koinzidenz der resistenzbegleitenden, putativen Isochlorogensäure mit der partiellen Resistenzreaktion der Sprossachsen ließ bereits tendenziell einen *Sclerotinia* sensitiven phenolischen Metabolismus innerhalb der untersuchten Wildarten erkennen. Die weiterführenden Untersuchungen zur Ermittlung der *Sclerotinia* sensitiven Induktion des Phenolstoffwechsels über dessen Schlüsselenzym PAL zeigten ein differenzierendes Bild. Signifikante Unterschiede der absoluten PAL – Aktivität zwischen der gesunden Kontrolle und der *Sclerotinia* Infektion zeigten sowohl die partiell Stängelresistenten Arten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC 7 und AC M, die intermediär reagierende Wildart *H. strumosus* sowie die suszeptible Wildart *H. tuberosus*. Alle anderen untersuchten Genotypen wiesen im zweijährigen Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen Infektion und gesunder Kontrolle auf. Hohe absolute spezifische PAL Aktivitäten von über 1mkats/kg Protein zeigten hierbei sowohl die partiell resistenten Wildarten *H. salicifolius*, *H. maximiliani* AC 7 als auch *H. tuberosus*. Mit Ausnahme von *H. tuberosus* und *H. pauciflorus* konnte damit ein Zusammenhang zwischen der *Sclerotinia* induzierten PAL Aktivität und der resistenzbegleitend detektierten putativen Isochlorogensäure ermittelt werden. Keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Verwundung und *Sclerotinia* Inokulation zeigten die intermediär Stängelresistenten Arten *H. pauciflorus* und *H. nuttallii* sowie die suszeptiblen Arten *H. giganteus* und *H. grosseserratus*. Diese Ergebnisse zeigen damit einen diversen und höchstwahrscheinlich polymorph vorliegenden Induktionsmechanismus der PAL- Aktivität im sekundären *Helianthus* Genpool. Die PAL liegt in ihrer funktionellen Form als tetramerer Komplex vor und weist in ihrem Aufbau der vier Untereinheiten eine hohe Diversität und Polymorphismus im Pflanzenreich auf (Richter, 1996). Für ihre Codierung ist eine von der Pflanzenart unterschiedliche Anzahl von Genen (Gen-Familien) verantwortlich deren differenzielle Expression von zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren abhängig ist. Insbesondere die Lichtqualität und Quantität, abiotische und biotische Elicitoren, Salizylsäure sowie volatile Jasmonate und Ethylen können hierbei zu ihrer differenziellen Expression führen (Dixon et al., 2002). Die im untersuchten

sekundären *Helianthus* Genpool zeigte differenzielle Induktion der PAL durch den biotischen und abiotischen Reiz könnten hierbei auf unterschiedliche Elicitoren, Rezeptoren und / oder Signaltransduktionsmechanismen zur PAL-Aktivierung hinweisen. Verwundungen oder Insektenfraß induzieren hierbei häufig einen stressbedingt veränderten Linol- und Linolensäurestoffwechsel der Plasmamembran. Dieser führt über eine Lipidoxygenase (*lox*) gesteuerte Lipidperoxidation (Schaller, 2001) als auch durch Aktivitätssteigerung einer Phospholipase (Narvaez-Vasquez, et al., 1999) zur Freisetzung von Jasmonaten welche eine direkte Genaktivierung und Expression von PAL - Isoformen bewirken kann (Seo et al., 1997; Karban & Baldwin, 1997; Creelman & Mullet, 1997; Walling, 2000). In jüngster Zeit mehren sich hierbei Hinweise, dass Resistenzmechanismen gegenüber nekrotrophen Pathogenen ähnlich einer Verwundung über eine Jasmonat abhängige Signalkaskade erfolgen könnten und damit Unterschiede zur rassenspezifischen Resistenz gegenüber biotrophen Phytopathogenen vorhanden sind. So zeigte die in ihrem Jasmonat - Stoffwechsel inhibierte Arabidopsismutante *coil* eine erhöhte Anfälligkeit für die nekrotrophen Pilze *Botrytis cinera* und *Alternaria brassicicola* bei gleichzeitiger rassenspezifischer Resistenz gegenüber dem biotrophen Parasit *Peronospora parasitica*. Die Resistenz gegenüber den Nekrotrophen konnte dabei durch Methyl-Jasmonat Behandlung der Pflanzen wiederhergestellt werden (zitiert in Hammond-Kosack & Jones, 2000). Die annähernd gleichartig induzierten PAL-Enzymaktivitäten in *H. nuttallii*, *H. pauciflorus*, *H. grosseserratus* und *H. giganteus* zum biotischen und abiotischen Reiz könnten damit einen Hinweis geben, dass die Signalerkennung in diesen Genotypen für beide Reize gleichgerichtet und die Signalperzeption über das Wundsignal, damit die Pathogenerkennung Folge des destruktiven Wachstums des Pathogens im Gewebe ist.

Einen weitgehend *Sclerotinia* induzierbaren und sensitiven initialen Phenolstoffwechsel zeigten die partiell stängelresistenten Wildarten und *H. tuberosus* durch signifikante Unterschiede in der absoluten PAL Aktivität zwischen abiotisch und biotischem Reiz. Bei diesen Arten scheinen durch direkte Interaktion mit *Sclerotinia* pathogensensitive Mechanismen bzw. Erkennungsstrukturen vorzuliegen die zur erhöhten PAL Aktivität im befallenen Gewebe führen. Hohe, durch das Pathogen induzierte Enzymaktivitäten müssen jedoch nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Resistenz führen. Dieses wird am Vergleich der Genotypen *H. salicifolius* und *H. tuberosus* ersichtlich. Beide zeigen jeweils zur *Sclerotinia* Inokulation hohe absolute PAL Aktivitäten, unterscheiden sich jedoch in ihrer *Sclerotinia* Resistenz fundamental. Offensichtlich erfolgt die pathogensensitive Umsteuerung ihres Phenylpropanoidstoffwechsels höchst divers und in multipler Weise an verschiedenen Schlüsselpositionen des Phenolmetabolismus, welches jedoch lediglich bei *H. salicifolius* zur Resistenz beiträgt. Hinweise darauf lassen sich in der von *H. tuberosus* gezeigten Anthocyanakkumulation nach *Sclerotinia* Infektion erkennen. Anthocyane werden über die Aktivierung der Chalcon-Synthase (CHS), dem Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese induziert (Deikman & Hammer, 1995; Chalker-Scott, 1999) die ähnlich der PAL nach

Pathogenbefall *de novo* eine erhöhte Aktivität aufweist (Wingender et al., 1989; Steimle et al., 1994, Gläßgen et al., 1998). Ihre Induktion hat jedoch lediglich bei Pflanzen eine resistenzvermittelnde Bedeutung, deren fungitoxisch bzw. fungistatisch wirksamen Phytoalexine oder Phytoanticipine auf der Flavonoidstruktur beruhen wie z. B. die Pterocarpane, Isoflavane und Isoflavanone der Leguminosen (Barz, 1997; Dixon & Steele, 1999). So wird in der *Sclerotinia* Resistenzzüchtung der Sojabohne die Anthocyanakkumulation nach Pilzinokulation und Oxalsäurebehandlung als früher phänotypischer Marker einer Resistenz erwogen und in einem Wirkungszusammenhang zum pathogensensitiv stimulierten Flavonoidstoffwechsel gesehen (Wegulo et al., 1998). Der pathogensensitive Phenolstoffwechsel in *H. tuberosus* scheint dagegen in einer für die *Sclerotinia* - Resistenz bedeutungslosen Anthocyanakkumulation zu resultieren. Eine koordinierte Umsteuerung des Phenolstoffwechsels nach Pathogenbefall könnte dagegen bei *H. salicifolius* zur erhöhten partiellen *Sclerotinia* Resistenz beitragen. Eine über 30fache Steigerung der PAL Aktivität nach *Sclerotinia* Infektion in den *H. salicifolius* Sprossachsen könnte darüber hinaus auf ein hochspezifisches Erkennungsmuster für den Pathogen hinweisen. Des Weiteren zeigte diese Wildart den stärksten Zusammenhang zwischen der resistenzbegleitenden Akkumulation der putativen Isochlorogensäure und der spezifischen Pathogen induzierten PAL-Aktivierung. Die hohe pathogensensitive PAL Aktivierung in *H. salicifolius* Sprossachsen ist hierbei vergleichbar mit jener der rassenspezifischen Resistenz in Kulturpflanzen gegenüber biotrophen Pathogenen. So konnten in mit *Phytophthora*- Zellwand – Glucanen elicitierten *Solanum tuberosum* Zellkulturen eine bis zu 50fache Steigerung der PAL – Aktivität ermittelt werden die mit der Biosynthese von resistenzvermittelnden Hydroxycinnäurederivaten verbunden war (Fritzmeier et al., 1987; Jos & Hahlbrock, 1992; Schmidt et al., 1998). In wie fern in der resistenten Interaktion *Helianthus ssp.* – *Sclerotinia* Zellwandfragmente des Pilzes oder die vom Pathogen sezernierte hydrolytische Enzyme oder gar die Oxalsäure das induzierende Signal darstellen muss in weiteren Untersuchungen erörtert werden. Bislang liegt für elicitoraktive Fraktionen von *Sclerotinia* lediglich eine Untersuchung von Bertinetti & Ugalde (1996) vor, die in *Daucus carota* Zellkulturen erhöhte PAL – Aktivitäten induzierten und durch ein Mannose - reiches Glucan der Myzelzellwand charakterisiert war. Untersuchungen zeigen für *Helianthus annuus* eine eher spezifisch durch das *Sclerotinia* Myzel bedingte Induktion des dem Phenolstoffwechsel vorgelagerten Shikimisäurestoffwechsels, obwohl auch das oxalsäurereiche Kulturfiltrat von *Sclerotinia* alleine induzierend wirkte (Tahmasebi-Enferadi et al., 2000).

Einen bedeutenden Beitrag zur schnellen und effektiven Induktion pathogensensitiver Stoffwechselveränderungen stellen konstitutive als auch induzierte hydrolytisch aktive PR - Proteine der Wirtspflanze dar. Die von Ellers (2002) bereits für die *H. maximiliani* Akzession M in fünf divergenten Isoformen beschrieben Chitinasen sowie die konstitutive  $\beta$ -1,3-Glucanaseaktivität in deren Sprossachsen könnten einen wesentlichen Beitrag zur frühen

Pathogenerkennung leisten. Die direkte hydrolytische Aktivität von  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen gegenüber peritrophen Phytopathogenen wie *Sclerotinia ssp.*, *Alternaria ssp.* und *Botrytis cinera* ist dabei gering (Broeckhaert et al., 1988; Verburg & Huynh, 1991), ihre resistenzvermittelnde Bedeutung scheint vielmehr in einer hochspezifischen Freisetzung von Glucan - Elicitoren der pilzlichen Zellwand zu liegen (Kurosaki et al., 1987). Konstitutive als auch pathogeninduziert exprimierte Glucanasen und Chitinasen könnten damit als synergistisch wirksame Abwehrstrategien ebenfalls in *Helianthus* erwogen werden. In wie weit konstitutive als auch die induzierte Expression von PR – Proteinen in den weiteren perennierenden Wildarten vorliegen ist bislang nicht evaluiert worden und müsste Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

Hinsichtlich der durch den Pathogenbefall induzierten Peroxidase zeigten die partiell stängelresistenten Wildarten eine signifikant erhöhte Enzymaktivität. Hierbei wurde in diesen Wildarten die covalent an die Zellwand gebundene POX – Fraktion um durchschnittlich 73% und die ionisch gebundene POX Fraktion um 64% gegenüber der nicht infizierten Kontrolle signifikant erhöht. Intermediär resistente als auch suszeptible Wildarten erfuhren lediglich eine nicht signifikante Aktivitätserhöhung um 12% der ionischen Fraktion bzw. um 7 % in der covalent an die Zellwandmatrix gebundenen POX – Fraktion. Die leicht extrahierbare, im Zellaufschluss durch ionenschwachen Na-Phosphatpuffer lösliche POX – Fraktion erfuhr in keiner Wildartssprossachse nach Inokulation eine signifikante Aktivitätserhöhung. Das nach Ranieri et al. (2000a) für *Helianthus annuus* entwickelte Isolationsprotokoll beinhaltet dabei in seiner leicht löslichen POX – Fraktion sowohl symplastische als auch apoplastische POX – Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Sie besteht dabei sowohl aus Ascorbatperoxidasen (APX), Glutathionperoxidasen (GPX) als auch aus so genannten unspezifischen Peroxidasen in unterschiedlichen Anteilen. Ihre Funktion wird im Wesentlichen in der oxidoreduktiven Detoxifizierung (*scavenging*) radikalischer Sauerstoffspezies ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{O}_2^-$ ) und / oder hieraus spontan gebildeter Peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $\text{R}_2\text{O}_2$ ) unter Oxidation der jeweiligen Elektronendonatoren erwogen (Asada 1997; Takahama & Oniki, 1997; Takahama et al., 1999; Ranieri et al., 2000b). Hierbei wird insbesondere in der Reduktion dieser antioxidativen Enzymaktivität während sehr früher Phasen der Interaktion mit biotrophen Pilzen eine Bedeutung zur Resistenz gesehen und soll zur effektiven Reizweiterleitung des über den oxidativen Burst vermittelten hypersensitiven, programmierten Zelltod erfolgen (Grant & Loake, 2000; Mittler et al., 1999; Vranova et al., 2002). Die im Apoplasten lösliche Peroxidaseisoformen weisen meist eine geringe Spezifität für Elektronendonatoren auf und setzen diese bei Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  spontan um. Häufig wird dabei die unspezifische Polymerisierung der während der Resistenzreaktion synthetisierten phenolischen Inhaltsstoffen beobachtet die auch penetrierende Pilzhyphen erfassen kann. Hierdurch wird eine gestörte Nährstoffaneignung des Thallus bedingt, die zur Resistenz beiträgt (Agrios, 1997). Tendenziell zeigten zwar alle untersuchten Genotypen nach *Sclerotinia* Infektion eine Erhöhung der

leichtlöslichen POX – Fraktion, ihre resistenzvermittelnde Bedeutung zur *Sclerotinia* – Stängelresistenz der Wildarten scheint aber von marginaler Bedeutung zu sein. Neben der ebenfalls detoxifizierenden Funktion aktivierter Sauerstoffspezies wird den ionisch und covalent Zellwandgebundenen POX – Fraktionen im Wesentlichen eine spezifische Funktion zur Lignifizierung der Zellwand zugeschrieben (Penel et al., 1999). Ihre Expressionsmuster in Zucchiniensämlingen zeigen hierbei ihre Beteiligung an der Polymerisierung phenolischer Komponenten zu Lignin und / oder Suberin der sekundären Zellwand auf (Carpin et al., 1999). Ihre Expressionsmuster in adulten Zucchini und Tabakpflanzen weisen darüber hinaus zusätzlich auf deren teils starke Assoziation zum vasculären, parenchymatischen Gewebe hin (Carpin et al., 1999; Klotz et al., 1998).

Die in den partiell Resistenten Wildarten pathogeninduziert erhöhten POX – Aktivitäten zeigten dabei eine starke Koinzidenz mit einer zweiten, histologischen Akkumulation autofluoreszenter phenolischer Inhaltsstoffe in deren Xylemparenchym. Die unter blauem Licht angeregte orange Fluoreszenz des Xylemparenchyms sowie angrenzender Zellen wies hierbei auf die Anwesenheit von Ligninvorstufen (Protolignine) hin (siehe Abbildung 20 e und f). Die resistenzbegleitende Erhöhung der POX – Aktivitäten der Wildarten *H. maximiliani* AC M und AC 7 sowie von *H. salicifolius* könnten damit im Xylemparenchym dieser Wildarten lokalisiert sein und für deren verstärkten Autofluoreszenzsignale verantwortlich sein. Eine weitere, pathogensensitive Ligninakkumulation im Xylemparenchym der Sprossachsen partiell resistenter Wildarten könnte damit eine weitere physikochemische Barriere für *Sclerotinia* zur vollständigen Mazeration der Sprossachse darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zusätzlich starke Ähnlichkeiten zur wundinduzierten Expression zellwandgebundener Peroxidasen in Reis, Tabak und Arabidopsis (Nishiuchi et al., 1999, Ito et al., 2000; Sasaki et al., 2002). In ihren Expressionsstudien zur Wundinduzierbarkeit einer anionisch, zellwandgebundenen Peroxidase konnten z.B. Sasaki et al. (2002) in transgenen Tabaklinien deren ausgesprochen hohes Expressionsmuster im Xylemparenchym von Stängeln und Petiolen ermitteln. Zusätzlich konnten sie mit den für Wundsignale charakteristischen Induktoren wie Jasmonaten und Ethylen eine *de novo* Proteinsynthese der Peroxidase im Gefäßsystem induzieren. In wie fern in den partiell resistenten Wildarten pathogenspezifische Signale (Elicitoren) oder Wundsignale die Akkumulation von phenolischen Inhaltsstoffen im Xylemparenchym bedingen muss in weitergehenden Untersuchungen ermittelt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der induzierten histologischen und biochemischen Veränderungen in Folge eines *Sclerotinia* Befalls weisen jedoch erhebliche Unterschiede der einzelnen Wildarten auf einen Befall hin und sind bislang für die Interaktion *Sclerotinia* – *Helianthus* in dieser Diversität nicht beschrieben worden. Die höchstwahrscheinlich auf der genotypisch unterschiedlichen Akkumulation pathogensensitiver und / oder verwundungssensitiver Erkennungsmechanismen beruhenden induzierten Resistenzen lassen

die Beteiligung diverser Resistenzgene oder Cluster zu, die zur Amelioration der *Sclerotinia* - Empfindlichkeit der annualen Kultursonnenblume einen erheblichen Beitrag leisten könnten.

#### **4.7 Wirkungszusammenhänge präformierter Blattphenolfingerprints zur *Sclerotinia* Resistenz**

Die unterschiedlichen Resistenzniveaus von Blättern und Sprossachsen gegenüber einem *Sclerotinia* Befall ist durch unabhängige und organspezifisch divergente morphologische und physiologische Faktoren der beiden Pflanzenorgane bedingt. Die für die Stängelresistenz postulierte resistenzvermittelnde Beteiligung von Isochlorogensäure konnte dabei für die Blattresistenz weder in Populationen kultivierter annualer noch perennierende *Helianthus* Arten ermittelt werden (Tourvieille et al., 1997).

Untersuchungen zum Wirkungszusammenhang zwischen pflanzlichen Inhaltsstoffen und deren Resistenzbeteiligung bedingen dabei zunächst das Vorliegen von adäquaten Resistenzen in den untersuchten Populationen. Feldresistenzuntersuchungen von Castaño et al. (1992) an *Helianthus annuus* - cms-Inzuchtlinien und Restorern sowie deren F<sub>1</sub>-Nachkommen zeigten dabei sowohl für *Sclerotinia* induzierte Blattläsionen als auch für die Myzelwachstumsraten signifikante genotypische Unterschiede. Von den genannten Autoren wird sowohl die Blattläsionslänge als auch die Myzelausbreitung im Blattgewebe als zuverlässiges und robustes Merkmal zur Selektion auf *Sclerotinia*-Blattresistenzen erachtet. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten in den Blatttestverfahren über zwei Umwelten (Feldtest, DTL) innerhalb der perennierenden *Helianthus* - Populationen gleichgerichtete und hochsignifikante genotypische Unterschiede hinsichtlich der Läsionslänge und der Wachstumsgeschwindigkeit des *Sclerotinia*-Myzels ermittelt werden. In den parallel durchgeführten biochemischen Untersuchungen konnten Castaño et al. (1992) dagegen keinen Zusammenhang zwischen der Blattresistenz und der postinfektionellen Phenolakkumulation detektieren. Die Resistenz der Blätter war dagegen positiv mit dem Phenolgehalt vor Infektion korreliert. Gleiche Ergebnisse berichten auch Hemery-Tardin et al. (1998) für fünf in ihrer Blattresistenz signifikant unterscheidbaren F<sub>1</sub> – Hybriden. Obwohl Unterschiede in einzelnen Komponenten der chromatographischen Phenolfingerprints zwischen anfälligen und resistenten Genotypen nach *Sclerotinia* Befall vorhanden waren, korrelierte die Blattresistenz enger mit den Phenolmustern vor Infektion. Um die Beteiligung präformierter Blattphenole des sekundären *Helianthus* Genpools am Resistenzniveau genauer zu untersuchen, wurde zunächst ein chromatographisches System auf Grundlage der HPLC entwickelt.

Die für annuelle Populationen und Sorten bereits ermittelten Zusammenhänge zwischen präformierten Phenolen und den Blattresistenzniveaus konnte dabei im untersuchten perennierenden Genpool bestätigt werden. Hierbei zeigte sich in der Wirkungsbezogenen hierarchischen Clusteranalyse sowie Hauptkomponentenanalyse, dass Wirkungszusammenhänge zwischen den phenolischen Inhaltsstoffen und der Myzelausbreitung im Blatt quantitativer

Natur sind. Durch Abwesenheit bzw. Präsenz einzelner phenolischer Substanzen zwischen den einzelnen Wildarten ließ sich damit nicht deren signifikant divergierendes Resistenzniveau erklären. Dagegen zeigte die multifaktorielle Hauptkomponentenanalyse starke quantitative Wirkungszusammenhänge zwischen einzelnen Komponenten im Phenolmuster und dem *Sclerotinia* Myzelverhalten im Mesophyll. Insgesamt konnte durch das vorliegende quantitative Modell der Hauptkomponentenanalyse über 80% der Variabilität der Läsionslängen (4d p.i.) des untersuchten sekundären Genpools erklärt werden. Dabei zeigten sich in der Regel für die wesentlichen Komponenten der interspezifischen Phenolmuster geringe Schwankungen innerhalb des Versuchszeitraums. Starke Schwankungen im Gehalt zwischen den einzelnen Probennahmezeitpunkten bestanden jedoch in den Gehalten an Chlorogensäure und Kaffeesäure. Dieses lässt sich in der Hauptsache durch deren starke Beteiligung als Ausgangssubstrat für zahlreiche Biosynthesen innerhalb des Phenolstoffwechsels erklären. Insbesondere Chlorogensäure und Kaffeesäure sind dabei in der Gattung *Helianthus* als Hauptspeicherphenole bekannt (Prats-Pérez et al., 2000b) die je nach physiologischem Bedarf stark mobilisiert oder akkumuliert werden können und durch Schwankungen der Umweltfaktoren in ihren absoluten Gehalten stark variieren (Koeppel et al., 1967).

Annähernd gleiche Faktorladungen zur Boniturnote und damit eine hohe potentiell antagonistische Wechselwirkung zur Läsionsextension zeigten in der Hauptkomponentenanalyse phenolische Inhaltsstoffe die das charakteristische Absorptionsverhalten von Flavonolen bzw. deren Glykosiden aufwiesen. Auch in den einzelnen Korrelationen konnte dieser Zusammenhang im Wesentlichen durch die signifikanten und höchsten Korrelationskoeffizienten von 0,84 – 0,89 für die Komponenten Fl 15; Fl 16 und Lp 4 bestätigt werden. Untersuchte Wildarten, die im Mesophyll bezogen auf Trocken- und Frischgewicht höhere Gehalte an diesen Inhaltsstoffen aufwiesen, zeigten tendenziell geringere *Sclerotinia* - Myzelausbreitung im Blatt. Sowohl der Gesamtphenolgehalt als auch der Chlorogensäuregehalt scheint dagegen in den Blättern eine geringere Bedeutung zur Blattresistenz zu besitzen. Die ausgesprochen quantitative Natur im Wirkungszusammenhang zwischen den präformierten phenolischen Substanzen und der *Sclerotinia* Myzelausbreitung lässt dagegen keinen qualitativen Zusammenhang zwischen singulären Phenolkomponenten und dem Resistenzniveau der Blätter erkennen. Vielmehr scheint hier die Kombination distinkter phenolischer Inhaltsstoffe im Mesophyll deren komplexeren Zusammenhang zur Blattresistenz zu erklären. Insbesondere die gleichgerichteten Faktorladungen von Inhaltsstoffen mit flavonoiden Absorptionseigenschaften könnten auf synergistische biologische Aktivitäten im Mesophyll gegenüber *Sclerotinia* bezogen sein.

Ebenso wie Isochlorogensäure weisen Flavonoide und insbesondere Flavonole strukturabhängig starke antioxidative und die Lipoxygenase inhibierende Eigenschaften auf (Sichel et al., 1991; Elstner et al., 1994; Dixon & Steele, 1999; Narayana et al., 2001). Höhere Gehalte an

diesen effizienten Radikal - Scavengern könnten dabei einen Beitrag zur partiellen Resistenz der Blätter gegenüber *Sclerotinia* Infektion leisten wie bereits von Elad (1992) mit natürlichen und künstlichen Antioxidantien am System *Sclerotinia - Lactuca sativa* gezeigt werden konnte. Insbesondere in der antioxidativen Kapazität des infizierten Gewebes wird eine wesentliche Bedeutung zur Prädisposition und Empfindlichkeit der Pflanze für die nekrotrophen Parasiten *Botrytis cinera* und *Sclerotinia sclerotiorum* gesehen (Elad, 1997).

Epidermale und subepidermale Flavonoide wurden auch von Andary et. al. (1996) für die *Sclerotinia* - Blattresistenz in einer *H. resinosus* Akzession in Erwägung gezogen und konnten in ihren Untersuchungen jedoch nicht in *H. annuus* Blättern nachgewiesen werden. Zusätzlich stellen Hemery-Tardin et al. (1998) im *H. annuus* Material ein in der Flavonoidfraktion relativ armes Blattphenolprofil fest. In ihren Untersuchungen zum Wirkungszusammenhang von prä- und postinfektionellen Blattphenolfingerprints zur *Sclerotinia* – Blattresistenz konnten sie lediglich einem putativen Zimtsäureester eine geringe Bedeutung zur Resistenz beimessen.

## 5. Zusammenfassung

*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary ist weltweit einer der bedeutendsten Pathogene der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) und bedingt durch Wurzel, Stängel und Korbfäule hohe wirtschaftliche Verluste in der Produktion dieser Ölpflanze. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals eingehende mehrjährige Untersuchungen zur Feld-Resistenz der in der Züchtung der Sonnenblume bislang nicht berücksichtigten perennierender *Helianthus* – Wildarten gegenüber dem Krankheitskomplex der *Sclerotinia* - Stängelfäule durchgeführt.

Hierbei wurden 21 perennierende Wildarten mit Hilfe von artifiziellen Myzelinokulationen hinsichtlich ihrer Stängel- und Blattresistenz im Freiland als auch mittels eines Detached – Leaf Tests unter kontrollierten Umweltbedingungen untersucht. Als robustes phänotypisches Resistenzmerkmal konnten in beiden Pflanzenorganen die Läsionslängen vier Tage nach *Sclerotinia sclerotiorum* Inokulation erschlossen und zu den Resistenztests herangezogen werden. Dabei konnten in zwei Populationsakzessionen von *H. maximiliani* sowie in *H. salicifolius* annähernd umweltstabile Stängelresistenzen ermittelt werden. In *H. divaricatus* sowie einer *H. maximiliani* Akzession konnten erhöhte Blattresistenzen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* aufgedeckt werden. In der *H. maximiliani* Akzession 7 konnte eine Populationsakzession mit hohen umweltkonstanten Resistenzen in beiden Pflanzenorganen ermittelt werden. Eine natürliche Anfälligkeit für die *Sclerotinia* Ascosporeninfection konnte lediglich für *H. tuberosus* nachgewiesen werden.

In den weitergehenden histologischen Untersuchungen zur Resistenz der Stängel konnte als wesentlicher präformierter Resistenzfaktor das Lignifizierungsmuster in den Sprossachsen der Wildarten ermittelt werden. Zusätzlich konnte eine verstärkte Cuticula in *H. salicifolius* als Resistenzfaktor detektiert werden die sich für eine signifikant verzögerte Inkubationszeit in dieser Wildart verantwortlich zeichnete.

Zur pathogeninduzierten Resistenz wurde in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die resistenzbegleitende Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe detektiert, welche chromatographisch als Hydroxyzimtsäureester (Di-Caffeoyl ester) nachgewiesen werden konnte.

Untersuchungen zum *Sclerotinia* induzierten initialen Phenolstoffwechsel über die Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) zeigte über das untersuchte Wildartenspektrum eine stark vom Genotypen abhängige Induzierbarkeit. Zusammenhänge zwischen der induzierten PAL - Enzymaktivität und dem Resistenzniveau der Wildarten konnten dabei nicht ermittelt werden. Sowohl die Stängelresistenten Arten *H. maximiliani* AC 7, ACM und *H. salicifolius* als auch die in der Stängelreaktion susceptible Wildart *H. tuberosus* wiesen eine signifikant erhöhte PAL – Aktivität nach Pathogenbefall auf. Eine stark erhöhte und pathogensensitive 30fache Steigerung der PAL – Aktivität im Vergleich zur gesunden Kontrolle konnte jedoch in *H. salicifolius* ermittelt werden. Starke Zusammenhänge

zur Phenolakkumulation nach Pathogenbefall ließen bei dieser Wildart auf eine direkte resistenzvermittelnde Bedeutung der PAL - Enzymaktivierung schließen.

Resistenzbegleitend konnte in den partiell stängelresistenten Wildarten eine erhöhte Enzymaktivität zellwandgebundener Peroxidasen ermittelt werden deren Bedeutung als potentielle Markerenzyme der partiellen *Sclerotinia* Stängelresistenz damit innerhalb des sekundären *Helianthus* Genpools möglich erscheint.

Zur Untersuchung des wirkungsbezogenen Zusammenhangs zwischen präformierten Blattphenolen der perennierenden *Helianthus* Wildarten und deren Bedeutung zur *Sclerotinia* - Blattresistenz wurde zunächst ein chromatographisches Verfahren zur Detektion kompletter Blattphenolfingerprints in *Helianthus* entwickelt. In der anschließenden multivariaten Analyse konnte ein starker quantitativer Zusammenhang zwischen potentiell flavonoiden Inhaltsstoffen und der *Sclerotinia* Myzelausbreitung im Mesophyll erkannt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abawi, G. S. & Grogan, R. G. (1975):** Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia Sclerotium*. *Phytopathology* **65**: S. 300-309.
- Abawi, G. S., Polach, F. J., & Molin, W. T. (1975):** Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **65**: S. 673-678.
- Abawi, G. S. & Grogan, R. G. (1979):** Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: S. 899-904.
- Abawi, G. S. & Widmer, T. L. (2000):** Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology* **15**: S. 37-47.
- Abdel-Malek, S., Bastien, J. W., Mahler, W. F., Jia, Q., Reinecke, M. G.; Robinson, W. E. Jr., Shu, Y.-H. & Zalles-Asin, J. (1996):** Drug leads from the Kallaway Herbalists of Bolivia; 1. Background, Rationale, Protocol and Anti-HIV Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **50**: S. 157-166.
- Able, A. J., Guest, D. I. & Sutherland, M. W. (2001):** Relationship between ion movements, production of reactive oxygen species and the hypersensitive response during the challenge of tobacco suspension cells by zoospores of *Phytophthora nicotinae*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **58**: S. 189-198.
- Achbani, El H., Tourvieille de Labrouhe, D & Vear, F. (1994):** Methods of determining the reaction of sunflower genotypes to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. *Agronomie* **2**: S. 195-203.
- Achbani, el H., Tourvieille de Labrouhe, D & Vear, F. (1996):** Resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *European Journal of Plant Pathology* **102**: S. 421-429.
- Acimovic, M. (1988):** Sunflower disease mapping in Europe and some countries outside Europe in the period 1984-1986: *Helia* **11**: S. 41-49.
- Adams, R. B. & Ayers, W. A. (1979):** Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: S. 896-899.
- Adams, P. B. & Ayers, W. A. (1981):** *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. *Phytopathology* **71**: S. 90-93.
- Adams, P. B. & Ayers, W. A. (1983):** Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of two *Sclerotinia* species by two mycoparasites. *Phytopathology* **73**: S. 1072-1076.
- Agrios, G. N. (1997):** Plant Pathology. 4<sup>th</sup> Edition, Academic Press.
- Aha, B, Haase, B., Hermann, J., Machmüller, G., Waldinger, C. & Schneider, M. (1998):** Biologisch abbaubare Tenside aus heimischen Ölen. In: FNR (Hrsg.): Chemische Nutzung heimischer Pflanzenöle. Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ No. 12. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., D-18276 Gülzow. S. 13-49.
- Ahmad, Y. & Mirza, M. S. (1987):** Sclerotinia blight of maize caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pakistan Journal of Agricultural Research* **8** (4): S. 474-476.
- Anascenko, A. V. (1982):** Centers of genomic origin and centers of the greatest diversity of *Helianthus* species. Vestnik sel'skochozjajstvennoj nauki, Moskau.
- Amimoto, K. & Fukui, H. (1996):** Quantitative differences in biological active components among hydroponically cultured lettuce and endive cultivars. *Acta Horticulturae* **440**: S. 338 – 343.

- Andary, C.; Mondolot-Cosson, L. & Dai, G. H. (1996):** *In situ* detection of Polyphenols in plant microorganism interactions. S. 43-53. *In:* Nicole, M. & Gianinazzi-Pearson, V. (Ed.): Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Anderson, A. J. (1991):** Phytoalexins and plant resistance. *In:* Sharma, R. P. & Salunkhe, D. K. (Eds.): Mycotoxins and Phytoalexins. CRC – Press, Boca Raton, FL, USA. S. 569-594.
- Arcas, M. C., Botia, J. M. Ortuño, A. M. & Del Rio, J. M. (2000):** UV irradiation alters the level of flavonoids involved in the defense mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *European Journal of Plant Pathology* **106**: S. 617-622.
- Arias, D. M. & Rieseberg, H. (1995):** Genetic relationship among domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany* **49**: S. 239-248.
- Asada, K. (1997):** The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. *In:* Scandalios, J. G. (Ed.): Oxidative stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Press, New York. S. 715 – 735.
- Attridge, T. H, Stewart, G. R & Smith, H (1971):** End-product inhibition of *Pisum* phenylalanine ammonia-lyase by the *Pisum* flavonoids. *FEBS Lett.* **17**: 84-86.
- Avila, F. J. (1984):** The role of phenolic compounds in the resistance of sunflowers to *Sclerotinia sclerotiorum*. Creative Component. University of Iowa: 108 S.
- Backhaus, K.; Erichson, B., Plinke, W. & Weber, R. (2000):** Multivariate Analysemethoden. Neunte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer Verlag – Berlin, Heidelberg, New York.
- Barber, M. S., McConnell, V. S. & de Caux, B. S. (2000):** Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry* **54**: S. 53-56.
- Barz, W. (1997):** Phytoalexins. *In:* Hartleb, H.; Heitefuss, R. & Hoppe, H. H. (Ed.): Resistance of Crop Plants against fungi. S. 183-201. Gustav Fisher Verlag D-Jena, Stuttgart, Ulm.
- Bateman, D. F. & Beer, S. V. (1965):** Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **55**: S. 204-211.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. & Elkind, Y. (1994):** Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: S. 7608-7612.
- Batz O., Logemann E., Reinold S. & Hahlbrock K (1998):** Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol. Chem.* **379**: S. 1127-1135.
- Bauer, R., Kahn, I. & Wagner, H. (1986):** *Echinacea*-Drogen – Standardisierung mittels HPLC und DC. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **126**: S. 1065-1070.
- Bauer, R., Kahn, I. & Wagner, H. (1988):** TLC and HPLC Analysis of *Echniacea pallida* and *E. angustifolia* Roots. *Planta Medica* **54**: S. 426-430.
- Bazzalo, M. E.; Heber, E. M.; Delpero Martinez, M. A. & Caso, O.H. (1985):** Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on this fungus. *Phytopathol. Z.* **112**: S. 322-332.
- Bazzalo, M. E.; Heber, E. M. & Caso, O. H. (1987):** Factores físicos y localización anatómica de compuestos fenólicos en relación con la tolerancia del tallo del girasol (*Helianthus annuus*) frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, causal de la podredumbre basal. *Bolletín Soc. Bot. Arg.* **25**: S. 197-212.

- Bazzalo, M. E.; Dimarco, P.; Martinez, F. & Daleo, G. R. (1991):** Indicators of resistance of sunflower plant to basal stalk rot (*Sclerotinia sclerotiorum*): Symptomatological, biochemical, anatomical and morphological characters of the host. *Euphytica* **57**:S. 195-205.
- Bazzalo, M. E., Bridges, I., Galella, T., Grondona, M., Leon, A., Bidney, D., Cole, G., D’Hautefeuille, J-L., Lu, G., Mancl, M., Scelonge, C., Soper, J., Sosa-Dominguez, G. & Wang, L. (2000):** *Sclerotinia* Head rot Resistance conferred by wheat oxalate oxidase gene in transgenic sunflower. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. K60-K65.
- Bent, A. F. (1996):** Plant disease resistance Genes: Function meets structure. *The Plant Cell* **8**: S. 1757-1771.
- Ben-Yephet, Y., Genizi, A. & Siti, E. (1993):** Sclerotial survival and apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum* following outbreaks of lettuce drop. *Phytopathology* **83**: S. 509-513.
- Benz, A. (1995):** Der falsche Mehltau der Sonnenblume – Krankheitsbedingte Proteine und ihre Bedeutung im Wirt-Pathogen-System. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 179 S.
- Benz, A. & Spring, O. (1995):** Identification and characterization of an auxin degrading enzyme in downy mildew infected sunflower. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**: S. 163 – 175.
- Bernards, M. A. und Lewis, N. G. (1998):** The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry* **47**: S. 915-933.
- Bertinetti, C. & Ugalde, R. A. (1996):** Studies on the Response of Carrot Cell to a *Sclerotinia sclerotiorum* Elicitor: Induction of the Expression of an Extracellular Glycoprotein mRNA. *Molecular Plant – Microbe Interactions* **9** (7): S. 658 – 663.
- Bertrand, F. & Tourvieille de Labrouhe, D (1987) :** *Phomopsis* du tournesol: tests de sélection. *Inf. Tech. Cetiom* **98**: S. 12-18.
- Binsfeld, P. C. (1999):** Interspecific transgenic plants in the genus *Helianthus*. 1 ed. Cuvillier Verlag. 166 S.
- Binsfeld, P. C., Wingender, R. & Schnabl, H. (2000):** Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion of sunflowers. *Theor. Appl. Genet.* **101**: S. 1250-1258.
- Binsfeld, P. C., Wingender, R. & Schnabl, H. (2001):** Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. *Theor. Appl. Genet.* **102** (8): S. 1280-1285.
- Binsfeld, P.C. & Schnabl, H. (2002):** Molecular and cytogenetic constitution of *Helianthus annuus* - *Helianthus maximiliani* somatic hybrids. *Plant Cell Reports* **21**: S. 58-62.
- Block, C.C. (1992):** Screening for *Alternaria* leaf blight resistance in the USDA germplasm collection. In: Proc. Sunflower Research Workshop, Fargo, North Dakota, 16 – 17 Jan., National Sunflower Association (NSA), Bismarck, North Dakota, USA: S. 64 – 66.
- Blount, J. W., Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1993):** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors: Implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**: S. 333-349.
- Bohorova, N. E. & Atanassov, A. I. (1990):** Sunflower (*Helianthus annuus* L.): In vitro Interspecific Hybridization. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed): Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 10: Legumes and Oilseed Crops I. Springer Verlag – Berlin – Heidelberg. S. 452-471.
- Boland, G.J., and Hall, R. (1987):** Evaluating Soybean Cultivars For Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* Under Field Conditions. *Plant Disease* **71**: S. 934-936.

- Boland, G. J. & Hall, R. (1994):** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**: S. 93-108.
- Boller, T. (1995):** Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: S. 189-214.
- Bolwell, G. P., Gerrish, C. & Salaun, J. P. (1997):** Changes in enzymes involved in suberization in elicitor treated French bean cells. *Phytochemistry* **45**: S. 1351-1357.
- Bolwell, G. P., Bindschneider, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. & Minibayeva, F. (2002):** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Experimental Botany* **53**: S. 1367-1376.
- Bostock, R. M., Laine, R. A. & Kuc, J. A. (1982):** Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentanoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiol.* **70**: S. 1417-1424.
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**: S. 248-254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. & Lamb, C. J. (1992):** Elicitor and wound induced oxidative cross-linking of proline rich plant cell wall proteine: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: S. 21-30.
- Brand, N. & Weschta, H. (1991):** Die analytische Bewertung der Artischocke und ihrer Präparate. *Z. Phytotherapie* **12**: S. 15-21.
- Braune, W., Leman, A. & Taubert, H. (1999):** Pflanzenanatomisches Praktikum I. 8., durchgesehene Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin.
- Brewer, G. J. & Charlet, L. D. (1995):** Mechanisms of resistance to the red sunflower seed weevil in sunflower accessions. *Crop Protection* **14** (6): S. 501-503.
- Broekhaert, W. F., Van Parijs, J., Allen, A. K. & Peumans, W. J. (1988):** Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**: S. 319 – 331.
- Brownlee, H. E.; McEuen, A. R.; Hedger, J. & Scott, I. M. (1990):** Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches broom pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **36**: S. 39-48.
- BSA, Bundessortenamt (2001):** Beschreibende Sortenliste 2001, Getreide, Mais, Ölf Früchte, Leguminosen und Hackfrüchte. Landbuch-Verlag, Hannover.
- Burdon, J. J. & Thrall, P. H. (1999):** Spatial and Temporal Patterns in Coevolving Plant and Pathogen Associations. *The American Naturalist* **153** (Supplement): S. 15-33.
- Cabello-Hurtado, F., Durst, F., Jorrin, J. V. & Werck-Reichert, D. (1998):** Coumarines in *Helianthus tuberosus*: Characterization, Induced Accumulation and Biosynthesis. *Phytochemistry* **49** (4): S. 1029-1036.
- Carini, M., Maffei Facino, R., Aldini, G., Calloni, M. & Colombo, L. (1998):** Characterization of phenolic antioxidants from Maté (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**: S. 1813 – 1819.
- Callahan, F. E. & Rowe, D. E. (1991):** Use of a host-pathogen interaction system to test whether oxalic acid is the sole pathogenic determinant in the exudates of *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* **81**: S. 1546-1550.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. & Goodway, G. W. (2001):** The Fungi. Second Edition. Academic Press – San Diego, USA.

- Carnat, A., Heitz, A., Fraisse, D., Carnat, A-P. & Lamaison, J-L. (2000):** Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. *Fitoterapia* **71**: S. 587 – 589.
- Carpin, S., Crevecoeur, M., Greppin, H. & Penel, C. (1999):** Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic Peroxidase in Zucchini. *Plant Physiol.* **120**: S. 799-810.
- Casal, J. J., Mella, R. A., Ballare, C. L. & Maldonado, S. (1994):** Phyto-chrome mediated effects on extracellular peroxidase activity, lignin content and bending resistance in etiolated *Vicia faba* epicotyls. *Physiol. Plant.* **92**: S. 555-562.
- Casale, W. L. & Hart, L. P. (1986):** Influence of four herbicides on carpogenic germination and apothecium development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **76**: S. 980-984.
- Cassells, A. C. & Deadmann, M. (1993):** Multiannual, multilocational trials of Jerusalem artichoke in the south of Ireland: soil, pH and potassium. In: Fuchs, A. (Ed.): Inulin and Inulin-containing crops. Elsevier - Publishers, Amsterdam, Netherlands. S. 21-28.
- Castaña, F.; Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (1989):** L'utilisation de plusieurs tests simultanés dans la sélection pour la résistance du tournesol vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Information Techniques CETIOM* **107**: S. 14-20.
- Castaña, F.; Hémerly-Tardin, M. C.; Tourvieille de Labrouhe, D & Vear, F. (1992):** The inheritance and biochemistry of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* leaf infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* **58**:S. 209-219.
- Castaña, F.; Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (1993):** Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* **68**:S. 85–98.
- Castaña, F.; Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (2001):** The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* measured by mycelium infections combined with ascospore tests. *Euphytica* **122**: S. 373-380.
- Chalker-Scott, L. (1999):** Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology* **70** (1): S. 1- 9.
- Chandler, J. M. & Beard, B. H. (1978):** Sunflower interspecific hybridisation using embryo culture. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., 23-27 July 1978; Minneapolis MN; USA. Int. Sunflower Association (ISA), Paris, France: S. 510-515.
- Chandler, J. M. & Jan, C. C. (1984):** Identification of salt-tolerant germplasm sources in the *Helianthus* species. In: Agronomy Abstracts. ASA, Madison, Wisconsin, USA: S. 16.
- Chappell, G. F., Shew, B. B., Ferguson, J. M. & Beute, M. K. (1995):** Mechanisms of resistance to *Sclerotinia minor* in selected peanut genotypes. *Crop Science* **35**: S. 692-696.
- Cheres, M. T. & Knapp, S. J. (1998):** Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: coancestry analysis of public germplasms. *Crop Science* **38**: S. 1476-1482.
- Chet, I., & Henis. Y. (1975):** Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**: S. 169–192.
- Christensen, L. P. & Lam, J. (1990):** Acetylenes and related compounds in Heliantheae. *Phytochemistry* **30** (1): S. 11-49.
- Chou, J-C. & Mullin, A. (1993):** Phenologic and Tissue Distribution of Sesquiterpene Lactones in Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *J. Plant Physiol.* **142**: S. 657-663.
- Chun, D., Kao, L. B., Lockwood, J. L. & Isleib, T. G. (1987):** Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **71**: S. 811-815.

- Clark, D. W. & Titus, G. P. (1997):** Applications in Flavonoid Research. In: Dashek, W.V. (Ed.): Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton – New York. S. 217-227.
- Clarke, R. G., Porter, I. J., & Woodroffe, M. (1992):** Effect of sowing date on the incidence of Sclerotinia stem rot (*Sclerotinia minor*) and yield of sunflowers. Proceedings of the Australian Sunflower Association 9th Workshop, Yeppon, Australia: S. 69-71.
- Clifford, M. N. (1974):** Specificity of acidic phloroglucinol reagents. *J. Chromatography* **94**: S. 321.
- Clifford M. N., Kellard B. & Birch G.G. (1989):** Characterization of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.* **33**: S. 115-123.
- Clifford, M. N. (1999):** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **79**: S. 362 – 372.
- Cober, E. R., Rioux, S., Rajcan, I., Donaldson, P. A. & Simmonds, D. H. (2003):** Partial Resistance to White Mold in a Transgenic Soybean Line. *Crop Science* **43**: S. 92-95.
- Coffelt, T. A. & Porter, D. M. (1982):** Screening peanuts for resistance to *Sclerotinia* blight. *Plant Disease* **66**: S. 385-387.
- Coffelt, T. A., Porter, D. M. & Mozingo, R. W. (1982):** Registration of Virginia 81 Bunch peanut. *Crop Science* **22**: 1085-1086.
- Colonna, J.-P. (1970):** Quelques faits essentiels concernant les propriétés et la bio - synthèse de l'acide chlorogénique. *Cah. ORSTOM, ser. biol.* **13** (11): S. 3 – 24.
- Connor, D. J. & Hall, A. J. (1997):** Sunflower Physiology. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 113-182.
- Corsini, D. L., & Le Tourneau, D. (1973):** Organic acid metabolism in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arch. Mikrobiol.* **90**: S. 59–64.
- Cronn, R., Brothers, M., Klier, K., Bretting, P. K. & Wendel, J. F. (1997):** Alloenzyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* **95** (4): S. 532-545.
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997):** Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **48**: S. 355 – 381.
- Cruickshank, A. W., Cooper, M. & Ryley, M. J. (2002):** Peanut resistance to *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Aust. J. Agric. Res.* **53**: S. 1105-1110.
- Dangl, J. L., Dietrichs, R. A. & Richberg, M. H. (1996):** Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: S. 1793-1807.
- Danley, M. E. & Walker, D. A. (1978):** Comparison of the kinetic properties of ribulose biphosphate carboxylase in chloroplast of spinach, sunflower, and four other reductive pentose phosphate-pathway species. *Biochem. J.* **171**: S. 477-482.
- Davin, L. B. & Lewis, N. G. (1992):** Phenylpropanoid Biosynthesis of monoligninols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In: Stafford, H. A. & Ibrahim, R. K. (Eds.): Phenolic Metabolism in Plants. Plenum Press, New York, USA : S. 325-375.
- Deikman, J. & Hammer, P. E. (1995):** Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**: S. 47 – 57.
- Degener, J., Melchinger, A. E. Gumber, R. K. & Hahn, V. (1998):** Breeding for *Sclerotinia* resistance in sunflower: A modified screening test and assessment of genetic variation in current germplasm. *Plant Breeding* **117**: 367-372.

- Degener, J., Melchinger, A. E. & Hahn, V. (1999b):** Optimal allocation of resources in evaluating current sunflower inbred lines for resistance to *Sclerotinia*. *Plant Breeding* **118** (2): S. 157-160.
- Degener, J., Melchinger, A. E. & Hahn, V. (1999a):** Interspecific hybrids as source of resistance to *Sclerotinia* and *Phomopsis* in Sunflower breeding. *Helia* **22** (30): S. 49-60.
- de Wit, P. J. G. M. (1992):** Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the applications of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopath.* **30**: S. 391-418.
- de Wit, P. J. G. M. (1995):** Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unrevealing the molecular basis of gene-for-gene interactions. *Adv. Bot. Res.* **21**: S. 147-185.
- Dickison, W. C. (2000):** Integrative Plant Anatomy. Harcourt/Academic Press, San Diego, USA.
- Dickman, M. B., Park, Y. K., Oltersdorf, T. Li, W., Clemente, T. & French, R. (2001):** Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (5): S. 6957-6962.
- Dignum, M. J. W., Kerler, J. & Verpoorte, R. (2001):**  $\beta$ -Glucosidase and Peroxidase Stability in Crude Enzyme Extracts from Green Beans of *Vanilla planifolia* Andrews. *Phytochemical Analysis* **12**: S. 174-179.
- Dillard, H. R. & Cobb, A. C. (1995):** Relationship between leaf injury and colonization of cabbage by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Protection* **14** (8): S. 677-682.
- Ding, C.-K., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y. & Wang, C. Y. (2001):** Metabolism of Phenolic Compounds during Loquat Fruit Development. *J. Agric. Food Chem.* **49**(6): S. 2883 - 2888.
- Dingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1995):** Basic plant pathology methods. Second Edition. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1990):** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: S. 339-367.
- Dixon, R. A., Chouhary, A. D., Dalkin, D., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., Harrison, M. J., Lamb, C. J., Loake, G. J., Maxwell, C. A., Orr, J. & Paiva, N. L. (1992):** Molecular biology of stress induced phenylpropanoid and isoflavone biosynthesis in alfalfa. In: Stafford, H. A. & Ibrahim, R. K. (Eds.): Phenolic Metabolism in Plants. Plenum Press, New York, USA : S. 91-138.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995):** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**: S. 1085-1097.
- Dixon, R. A. & Steele, C. L. (1999):** Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4** (10): S. 394 - 400.
- Dixon, R. A., Achnine, L.; Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. & Wang, L. (2002):** The phenylpropanoid pathway and plant defense - a genomic perspective. *Molecular Plant Pathology* **3** (5): S. 371 - 390.
- Donaldson, L. A. (2001):** Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**: S. 859 - 873.
- Dorrell, G. D. & Vick, B. A. (1997):** Properties and Processing of Oilseed Sunflower. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 709 - 745.
- Dutton, M. V. & Evans, C. S. (1996):** Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* **42**: S. 881 - 895.

- Ebel, J. & Mithöfer, A. (1998):** Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: S. 335-348
- Ebel, J. & Scheel, D. (1997):** Signals in host-parasite interactions. In: *The Mycota* (Esser, K & Lemke, P. A. Eds.): Plant Relationships **Vol. VI.**; Springer Verlag Berlin. S. 85 – 105.
- Edwards, R. & Kessmann, H. (1992):** Isoflavonoid phytoalexins and their biosynthetic enzymes. In: Gurr, S. J., McPherson, M. J. & Bowels, D. J. (Eds.): Molecular Plant Pathology. Vol I. A Practical Approach. IRL Press – Oxford – New York – Tokyo. S. 54 – 55.
- Edwards, R., Stones, S. M., Gutierrez-Mellando, M-C. & Jorrin, J. (1997):** Characterization and inducibility of a Scopoletin-degrading Enzyme from Sunflower. *Phytochemistry* **45**: S. 1109 – 1114.
- Eierdanz, H (1996):** Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie. Verlag Chemie Weinheim (VCH), Verlagsgesellschaft.
- Ekins, M.G., Aitken, E. A. B. & Goulter, K. C. (2002):** Carpogenic germination of *Sclerotinia minor* and potential distribution in Australia. *Australasian Plant Pathology* **31**: S. 259 – 265.
- Elad, Y. (1992):** The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinera*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. *Plant Pathology* **41**: S. 417 – 426.
- Elad, Y. (1997):** Responses of plants to infection by *Botrytis cinera* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev.* **72**: S. 381 – 422.
- Ellers, S. (2002):** Veränderungen im Proteinmuster in der Gattung *Helianthus* nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*. Diplomarbeit, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität Bonn. 86 S.
- Ellis, J., Dodds, P. & Pryor, T. (2000):** Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. In Plant Biology* **3**: S. 278 – 284.
- Elstner, E. (1990):** Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus, Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- Elstner, E. F., Oßwald, W., Volpert, R. & Schemp, H. (1994):** Phenolic Antioxidants. *Acta Horticulturae* **381**: S. 304 – 335.
- Elstner, E. F., Oßwald, W. & Schneider, I. (1996):** Phytopathologie. Allgemeine und Biochemische Grundlagen. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford.
- El-Tarabily, K. A., Soliman, M. H., Nassar, A. H., Al-Hassani, H. A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. & Hardy, J. (2000):** Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* **49**: S. 573 – 583.
- Enisz, J. (1986):** *Sclerotium* production of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in sunflower. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **21**: S. 261 – 266.
- Esau, K. (1945):** Vascularization of the vegetative shoots of *Helianthus* and *Sambucus*. *Amer. J. Botany* **32**: S. 18-29.
- Escande, A. R. , Laich, F. S. & Pedraza, M. V. (2002):** Field testing of honeybee-dispersed *Trichoderma* spp. to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Plant Pathology* **51** (6): S. 346 – 357.
- Eschrich, W. (1995):** Funktionelle Pflanzenanatomie. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York.
- Estrada, B., Bernal, J. D. Pomar, F. & Merino, F. (2000):** Fruit Development in *Capsicum annum*: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns. *Journal Agric. Food Chem.* **48**: S. 6234 – 6239.

- FAO (2002):** World Agricultural Information Centre, FAOSTAT – Statistical Databases - Agricultural Production. <http://apps.fao.org/>.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. & Rossmann, A. Y. (1989):** Fungi on plants and plant products in the USA. APS-Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Fauré, N., Quillet, M. C., Serieys, H., Tersac, M., Bervillé, A. & Kaan, F. (1999):** Wild *Helianthus annuus* for sunflower improvement. *Helia* **22** (30): S. 37 – 48.
- Favoron, F., Perotto, R., Bonfante, P. & Alghini, P. (1993):** Differential absorption and localization of two *Sclerotinia sclerotiorum* endo-polygalacturonases in soybean hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **43**: S. 353 – 364.
- Fernández-Martínez, J., Meloro-Vara, J., Muñoz-Ruz, J., Ruso, J. & Dominguez, J. (2000):** Selection of Wild and Cultivated Sunflower for Resistance to a New Broomrape Race that Overcomes Resistance of the *Or<sub>5</sub>* Gene. *Crop Science* **40**: S. 550 – 555.
- Ferrar, P. H. & Walker, J. R. L. (1993):** *o*-Diphenol oxidase inhibition – an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **43**: S. 415 – 422.
- Fersht, A. (1999):** Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. W. H. Freeman and Company – New York.
- Flor, H. H. (1942):** Inheritance of Pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: S. 653 – 669.
- Flor, H. H. (1956):** The complementary genetic systems in flax rust. *Adv. Genet.* **8**: S. 29 – 54.
- Farassinet-Tachet, L. Reymond-Cotton, P. & Fèvre, M. (1995):** Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* **29**: S. 96 – 99.
- Freytag, S. & Hahlbrock, K. (1992):** Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pilzbefall. *Biologie in unserer Zeit* **22** (3): S. 135 – 142.
- Fried, B. & Sherma, J. (1996):** Practical Thin- Layer Chromatography. A Multidisciplinary Approach. CRC Press - Boca Raton, Florida, USA.
- Friedman, M. (1997):** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* **45** : S. 1523 - 1540.
- Fritzemeyer, K. H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D. & Hahlbrock, K. (1987):** Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA Ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant. Physiol.* **85**: S. 34 – 41.
- Fock, H., Klug, K., & Canvin, D. T. (1979):** Effect of carbon dioxide and temperature on photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake and photorespiratory CO<sub>2</sub> evolution in sunflower leaves. *Planta* **145**: S. 219 – 223.
- Foré, S. A. & Guttman, S. I. (1999):** Genetic structure of *Helianthus occidentalis* (Asteraceae) in a preserve with fragmented habitat. *Am. J. Bot.* **86**: S. 988-994.
- Gabriel, D. & Rolfe, B. (1990):** Working models of specific recognition in plant – microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathology* **28**: S. 365-391.
- Gahan, P. B. (1984):** Plant histochemistry and cytochemistry - an introduction. Academic Press, London.
- Gavrilova, V., Nizova, G., Tolstyá, T., Tavalzhansky, N., Akhtulova, E. & Slyusar, E. (2000):** Production, Study and Utilization of Sunflower Interspecific Hybrids. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. O7 - O12.

- Geiger, H. (1985):** The identification of phenolic compounds by colour reactions. *In:* van Sumere, C. F. & Lea, P. J. (Eds.): Annual proceedings of the Photochemical Society of Europe. Vol. 25: The biochemistry of plant phenolics. Clarendon, Oxford – UK. S. 45 – 56.
- Geisler, G. (1983):** Ertragsphysiologie von Kulturarten des gemäßigten Klimas. Verlag Paul Parey – Hamburg, Berlin.
- Geisler, G. (1988):** Pflanzenbau – Biologische Grundlagen und Technik der Pflanzenproduktion. Verlag Paul Parey – Hamburg, Berlin.
- Georgiou, C. D. (1997):** Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfsii*: a new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi. *Mycol. Res.* **101** (4): S. 460 – 464.
- Georgiou, C. D., Tairis, N. & Sotiropoulou, A. (2000):** Hydroxyl radical scavengers inhibit sclerotial differentiation and growth in *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.* **104**: S. 1191 – 1196.
- Gerlagh, M., van Goosen de Geijn, H. M., Fokkema, N. J. & Vereijken, P. F. G. (1999):** Long-term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-infected crops. *Phytopathology* **89**: S. 141 – 147.
- Gianessi, L. P., Silvers, C. S., Sankula, S. & Carpenter, J. E. (2002):** Fungal resistant Sunflower. *In:* (NCFAP) National Center for Food & Agriculture Policy (Ed.): Plant Biotechnology: Current potential Impact for improving pest management in U.S. Agriculture An Analysis of 40 Case Studies. Washington DC, USA. S. 2 – 8.
- Giczey, G., Kerenyi, Z., Fülöp, L. & Hornok, L. (2001):** Expression of *cmg1*, an Exo –  $\beta$  - Glucanase Gene from *Coniothyrium minitans*, Increases during Sclerotial Parasitism. *Applied Environmental Microbiology* **67** (2): S. 865 – 871.
- Gläßgen, W. E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J. & Seitz, H. U. (1998):** Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* **204**: S. 490 – 498.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B., & Dam, R. (1990):** Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**: S. 179 – 191.
- Goodman, R. N. & Novacky, A. J. (1994):** The hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. A Resistance Phenomenon. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Gorham, J. (1995):** The Biochemistry of the Stilbenoides. Chapman & Hall, London, UK.
- Goulas, S. J., Moya, I. & Schmuck, G. (1990):** Time-resolved spectroscopy of the blue fluorescence of spinach leaves. *Photosyn. Res.* **25**: S. 299 – 307.
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000):** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinera*. *Current Biology* **10**: S. 751 – 757.
- Graf, T., Wurl, G. & Biertümpfel, A. (1999):** Chancen und Möglichkeiten der Bereitstellung maßgeschneiderter Pflanzenöle. Symposium BUGA'99 (Magdeburg): Gülzower Fachgespräche – Lacke und Farben aus nachwachsenden Rohstoffen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR); D-18276 Gülzow. S. 18 – 32.
- Grant, J. J. & Loake, G. L. (2000):** Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signalling in Disease Resistance. *Plant Physiology* **124**: S. 21 – 29.
- Grau, C. R. (1988):** *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. *In:* Wyllie, T. D. & Scott, D. H. (Eds): Soybean Diseases of the North Central Region. APS-Press – American Phytopathological Society. S. 56 – 66.

- Grayer, R. J. & Kokubun, T. (2001):** Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56**: S. 253 – 263.
- Green, S., Bourdôt, G. W., Field, R. J. & Harvey, I. C. (1994):** Resistance of *Ranunculus acris* crown tissue enables survival after infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proc. 47th N.Z. Plant Prot. Conf.*:S. 58 – 61.
- Green, S., Gaunt, R. E., Harvey, I. C. & Bourdôt, G. W. (1998):** Histopathology of *Ranunculus acris* infected by a mycoherbicide, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Australasian Plant Pathology* **27** (2): S. 73-79.
- Greenberg, J. T. (1997):** Programmed cell death in plant – pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: S. 525 – 545.
- Grezes-Besset, B.; Tourande, G.; Arnould, O., Urs, P., George, P., Castellanet, P. & Toppan, A. (1994):** A Greenhouse Method to Assess Sunflower Resistance to *Sclerotinia* Root and Basal Stem Infections. *Plant Breeding* **112**: S. 215 – 222.
- Grisson, R. & Pilet, P. E. (1985):** Cytoplasmatic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**: S. 189 – 199.
- Guerra D., Anderson A. J., Salisbury F. B. (1985):** Reduced phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities and lignin synthesis in wheat grown under low pressure sodium lamps. *Plant Physiol.* **78**: S. 126 – 130.
- Gulya, T. J. (1985):** Evaluation of sunflower germplasm for resistance to *Sclerotinia* stalk rot and race 3 Downy Mildew. In: Proc. 11<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina. Int. Sunflower Association, Paris, France: S. 349 – 352.
- Gulya, T. J.; Rashid K. Y. & Masirevic, S. M. (1997):** Sunflower Diseases. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, USA, 1997, S.: 263 – 379.
- Gulya, T. J., Vick, B. A. & Nelson, B. D. (1986):** *Sclerotinia* head rot of sunflower in North Dakota, 1986: Incidence, effect on yield and oil components, and sources of resistance. *Plant Disease* **73**: S. 504 – 507.
- Gutierrez, C-M., Parry, A., Tena, M., Jorrin, J. & Edwards, R. (1995):** Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* **38** (5): S. 1185 – 1191.
- Gutierrez-Mellado, M-C., Edwards, R., Tena, M., Cabello, F., Serghini, K. & Jorrin, J. (1996):** The production of Coumarin Phytoalexins in different plant organs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Physiol.* **149**: S. 261 – 266.
- Hadar, Y., Pines, M., Chet, I. & Y. Henis (1983):** The regulation of sclerotium initiation in *Sclerotium rolfsii* by glucose and cyclic AMP. *Can. J. Microbiol.* **29**: S. 21 – 26.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1987):** Biochemical responses of plants to pathogen. In: Chet, I. (Ed.): Innovative approaches to plant diseases control, John Wiley & Sons, New York, USA. S. 229 – 254.
- Hahlbrook, K. & Scheel, D. (1989):** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biology* **40**: S. 347 – 369.
- Hahn, V. (2000):** Wirtschaftliche Bedeutung der Sonnenblume und aktuelle phytopathologische Probleme. In: Spring, O.: Pathogene der Sonnenblume – Biologie und Bekämpfungsstrategien. 1. Symposium der DFG-Forschergruppe - “ Wirt – Pathogen - Interaktionen ”. 11. Februar 2000, Universität Hohenheim. S. 5 – 7.
- Hahn, V., Gröne, I., Brahm, L. & Schnabl, H. (2001):** Reactions of progenies of interspecific hybrids from protoplast fusions to artificial infection with *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Proc. 5<sup>th</sup>

European Conf. on Sunflower Biotechnology, Nov. 4-8 - 2001, San Giuliano Terme (PI) – Italy. S. 40.

- Hahn-Deistrop, E. (1997):** Dünnschichtchromatographie, Praktische Durchführung und Fehlervermeidung. Wiley-VCH Verlag – Weinheim.
- Hahn-Deistrop, E. & Bauer, R. (1999):** *Echinacea* – Chromatographischer Nachweis einer Kreuzung von *E. purpurea* und *E. angustifolia*. *Bio Forum* **3/99**: S. 109 – 114.
- Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L. & Black, W. C. (1998):** Multivariate Data Analysis, 5<sup>th</sup> Edition, Prentice-Hall, Upper Saddle River, USA.
- Häkinnen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, M. I., Mykkänen, H. M. & Törrönen, R. A. (1998):** HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. *J. Sci. Food Agric.* **77**: S. 543 – 551.
- Halimi, E. S., Rowe, D. E. & Aung, M. (1994):** Divergent selection in alfalfa for resistance to *Sclerotinia* crown rot. *Crop Science* **34**: S. 1140 – 1142.
- Halimi, E. S. & Rowe, D. E. (1998a):** Stem-Tip inoculation of Alfalfa with *Sclerotinia trifoliorum* I: Development of Necrosis on Resistant and Susceptible Selections. *Crop Science* **38**: S. 20 – 22.
- Halimi, E. S. & Rowe, D. E. (1998b):** Stem-Tip inoculation of Alfalfa with *Sclerotinia trifoliorum* II: Performance of S1 and F1 Progenies from Resistant and Susceptible Selections. *Crop Science* **38**: S. 23 – 26.
- Hall, B. H., McMahon, R. L. & Wicks, T. J. (2002):** First report on *Sclerotinia sclerotiorum* on grape (*Vitis vinifera*) in South Australia. *Australasian Plant Pathology* **31**: S. 417 – 418.
- Hammerschmidt, E., Nuckels, E. M. & Kuc, J. (1982):** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* **20**: S. 73 – 79.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996):** Resistance gene-dependent plant defence responses. *Plant Cell* **8**: S. 1773 – 1791.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996):** Responses to Plant Pathogens. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, J. D. G. (Eds.): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland, USA: S. 1102-1156.
- Hanson, K. R. & Zucker, M. (1963):** The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. *J. Biol. Chem.* **238**: S. 1105 – 1115.
- Harborne, J. B. & Smith, D. M. (1978):** Anthochlors and other flavonoids as honey guides in the Compositae. *Biochem. Syst. Ecol.* **6**: S. 287 – 291.
- Harborne, J. B. (1985):** Phenolics and plant defence. In: Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europe. S. 393-408. Clarendon, Oxford, UK.
- Harborne, J. B. (1993):** Introduction to Ecological Biochemistry. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press Limited.
- Harborne, J. B. (1999):** The comparative biochemistry induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**: S. 335 – 367.
- Harborne, J. B. & Baxter, H. (1999):** The Handbook of Natural Flavonoids. 1<sup>st</sup> Edition - John Wiley & Sons.
- Hariri, B., Salle, G. & Andary, C. (1991):** Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma* **162**: S. 20 – 26.
- Harlan, J. R. (1971):** Agricultural origins: Centers and noncenters. *Science* **174**: S. 469 – 474.

- Harlan, J. R. (1992):** Crops and Man. American Society of Agronomy (ASA) & Crop Science Society of America (CSSA); Madison, WI, USA.
- Hausermann, M. & Brandenberger, M. (1961):** Über phenolische Pflanzeninhaltsstoffe IV: Spektrophotometrische Bestimmungsmethode für Chlorogensäure und ihre Anwendung auf pflanzliche Extrakte. *Z. Lebensmittel Unters. Forsch.* **115**: S. 516 – 523.
- Havir, B. A. (1987):** L-Phenylalanine Ammonia-Lyase from Soybean Cell Suspension Cultures. *Methods in Ezymology* **142**: S. 248 – 252.
- Heath, M. C. (1985):** Implication of nonhost resistance for understanding the host-parasite interaction. In: Groth, J. V. & Bushnell, W. R. (Eds.): Genetic basis of biochemical mechanisms of plant diseases. APS-Press, St. Paul, Minnesota. S. 25 – 42.
- Heath, M. C. (2000):** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: S. 315 – 319.
- Heiser, C. B. Jr.; Smith, D. M.; Clevenger, S. B. & Martin, W. C. (1969):** The North American Sunflowers (*Helianthus*). Memories of The Torrey Botanical Club (Memoir). Vol. 22. No. 2. New Heaven, Connecticut, USA.
- Held, V. M. & Haenseler, C. M. (1953):** Cross-inoculations with New Jersey isolates of *S. sclerotiorum*, *S. minor*, and *S. trifoliorum*. *Plant Disease Reporter* **37**: S. 515 – 517.
- Hemery, M. C. (1987):** Recherche de marqueurs phénoliques pour la résistance du Tournesol au Sclerotinia. Dissertation E. A. de phytomorphogenese. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Hemery-Tardin, M. C.; Tourvieille de Labrouhe, D.; Jay, M.; Ledoigt, G. & Vear, F. (1998):** Effect of infection by *Sclerotinia spp.* on the phenolic metabolism of sunflower capitula and leaves. *Helia* **21**: S. 19 – 32.
- Henn, H. J., Wingender, R. & Schnabl, H. (1998):** Regeneration of fertile interspecific hybrids from cell fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. *Plant Cell. Rep.* **18**: S. 220 – 224.
- Heran, A., McCartney, H. A. & Li, Q. (1999):** The effect of petal characteristics, inoculum density and environmental factors on infection of oilseed rape by *Sclerotinia sclerotiorum*. In: “New Horizons for an old crop”. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 1999. <http://www.regional.org.au/au/gcisc/3/index.htm>
- Herath, I. H. M. H. B.; Stodda, F. L. & Marshall, D. R. (2001):** Evaluating faba beans for rust resistance using detached leaves. *Euphytica* **117**: S. 47 – 57.
- Herrmann, K. (1976):** Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* **11**: S. 433 – 488.
- Herrmann, K. (1989):** Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **28**: S. 315 – 347.
- Herrmann, K. M. (1995):** The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* **7**: S. 907 – 919.
- Herz, W. & Kumar, N. (1981):** Sesquiterpene Lactones from *Helianthus grosseserratus*. *Phytochemistry* **20**: S. 99 – 104.
- Hervé, D., Fabre, F., Flores Berrios, E., Leroux, N., Al Chaarani, G., Planchon, C., Sarrafi, A. & Gentzittel, L. (2001):** QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany* **52** (362): S. 1857 – 1864.
- Hiraga, S., Sasaki, K, Ito, H. Ohashi, Y. & Matsui, H. (2001):** A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* **42**: S. 462 – 468.

- Hoes, J. A. & Huang, H. C. (1976):** Importance of disease to sunflower in Manitoba in 1975. *Can. J. Plant Dis. Surv.* **56**: S. 75 – 76.
- Hoes, J. A. & Huang, H. C. (1985):** Effect of between-row and within-row spacing on development of *Sclerotinia* wilt and yield of sunflower. *Can. J. Plant Pathol.* **7**: S. 98 – 102.
- Hoes, J. A., Putt, E. D. & Enns, H. (1973):** Resistance to verticillium wilt in collections of wild *Helianthus* in North America. *Phytopathology* **63**: S. 1517 – 1520.
- Hoffmann, G. M.; Nienhaus, F.; Schönbeck, F.; Weltzien, H. C. & Wilbert, H. (1994):** Lehrbuch der Phytomedizin. Blackwell Wissenschaft, 3. Auflage. 1994.
- Holley, R. C. & Nelson, B. D. (1986):** Effect of plant population and inoculum density on incidence of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Phytopathology* **86**: S. 71 – 74.
- Horner, J. D. (1990):** Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**: S. 211 – 213.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. & Money, N. P. (1991):** Penetration of hard substances by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Nat. Acad. Sci. Amer.* **88**: S. 11281 – 11284.
- Hsieh, S. P. Y. (1974):** Improved techniques for evaluation resistance to stem rot of rice plants. *Plant Prot. Bull. (Taiwan)*. **16**: S. 20ff.
- Huang, H. C. (1980):** Control of sclerotinia wilt of sunflower by hyperparasites. *Can. J. Plant Pathol.* **2**: S. 26 – 32.
- Huang; H.C.; & Hoes, J. A. (1976):** Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Can. J. Bot.* **54**: S. 406 – 410.
- Huang, H. C. & Hoes, J. (1980):** Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Plant Dis.* **64**: S. 81 – 84.
- Huang, H. C. & Dorrell, D. G. (1978):** Screening sunflower seedlings for resistance to toxic metabolites produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Sci.* **58**: S. 1107 – 1110.
- Huang, H. C. & Kozub, G. C. (1991a):** Monocropping to sunflower and decline of sclerotinia wilt. *Botanical Bulletin Academia Sinica* **32**: S. 163 – 170.
- Huang, H. C. & Kozub, G. C. (1991b):** Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Bot. Bul. Acad. Sinica* **32**: S. 279 – 286.
- Huang, H. C. & Kozub, G. C. (1993):** Survival of Mycelia of *Sclerotinia sclerotiorum* in Infected Stems of Dry Bean, Sunflower, and Canola. *Phytopathology* **83** (9): S. 937 – 940.
- Hugger, H. (1989):** Sonnenblumen: Züchtung, Anbau, Verarbeitung. Eugen Ulmer Verlag; Stuttgart.
- Huguet, N. I. & Heiland, P. (2000):** Analysis of a severe attack of *Sclerotinia* head rot of sunflower in Argentina (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary). In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. 190 – 195.
- Hutcheson, S. W. (1998):** Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: S. 59 – 90.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, L., Weissenböck, G. & Schnitzler, J-P. (1998):** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Botany* **49** (323): S. 953 – 965.

- Ibrahim, R. K. & Barron, D. (1989):** Phenylpropanoids. *In:* Dey, P. M. & Harborne, J. B. (Eds.): Methods in plant biochemistry. Vol I. Plant phenolics. Academic Press, New York. S. 197 – 235.
- Iiyama, K., Thibach-Tuyet, L. & Stone, B. A. (1994):** Covalent cross links in the cell wall. *Plant Physiology* **104**: S. 315 – 320.
- Ingham, J. L. (1973):** Disease Resistance in Plants: The Concept of Preinfectious and Postinfectious Resistance. *Phytopath. Z.* **78**: S. 314 – 335.
- Inoué, S. & Spring, K. R. (1997):** Low light level cameras. *In:* Inoué, S. & Spring, K. R. Video Microscopy: The Fundamentals. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press – New York. S. 327 – 366.
- ISA; International Sunflower Association (2000):** Nouveaux usages. Workshop B. *In:* Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. I: S. B1-B108.
- Ito, H., Hiraga, S., Tsugawa, H., Matsui, H., Honma, M., Otsuki, Y., Murakami, T. & Ohashi, Y. (2000):** Xylem-specific expression of wound inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science* **155**: S. 85 -100.
- Jackson, P. A. P., Galinha, C. I. R., Pereira, S. C., Fortunato, A. Soares, N. C., Amancio, S. B. Q. & Ricardo, P. P. C. (2001):** Rapid deposition of Extensin during the Elicitation of Grapevine Callus Cultures is specifically Catalysed by a 40-kilodalton Peroxidase. *Plant Physiology* **127**: S. 1065-1076.
- Jan, C. C. (1997):** Cytology and Interspecific Hybridization. *In:* Schneiter, A. A. (Ed.): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 497-558.
- Jan, C. C. & Chandler, J. M. (1985):** Transfer of powdery mildew resistance from *Helianthus debilis* Nutt. to cultivated sunflower. *Crop Science* **25**: S. 664-666.
- Jan, C. C. & Fernandez-Martinez, J. M. (2002):** Interspecific hybridization, gene transfer and the development of resistance to the broomrape race F in Spain. *Helia* **25** (36): S. 123-136.
- Jellis, G. J., Smith, D. B., and Scott, E. S. (1990):** Identification of *Sclerotinia* spp. on *Vicia faba*. *Mycological Research* **94**: S. 407-409.
- Jiang L. & Becker, H. C. (2001):** Effect of apetalous flowers on crop physiology in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *In:* Jiang, L. (2001): A mutant with apetalous flowers in oilseed rape (*Brassica napus*): Mode of inheritance and influence on crop physiology and *Sclerotinia* infection. Doctoral Dissertation; Georg-August-University Göttingen. S. 75-91.
- Jiang L., Becker, H. C., Zhao, Q. & Wolf, G. (2001):** Influence of apetalous flowers on infection of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *In:* Jiang, L. (2001): A mutant with apetalous flowers in oilseed rape (*Brassica napus*): Mode of inheritance and influence on crop physiology and *Sclerotinia* infection. Doctoral Dissertation; Georg – August – Universität Göttingen. S. 91-113.
- Jones, D. (1976):** Infection of plant tissue by *Sclerotinia sclerotiorum*: a scanning electron microscope study. *Micron*. **7**: S. 275-279.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. & Jones, J. D. G. (1994):** Isolation of tomato CF-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **26**: S., 789-793.
- Joos, H.-J. & Hahlbrock, K. (1992):** Phenylalanine ammonia lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Eur. J. Biochem.* **204**: S. 621 – 629.
- Jork, H., Funk, W. & Fischer, W. (1993):** Thin-Layer Chromatography, Vol.1A & 1B: Physical and Chemical Detection Methods. Verlag Wiley/VCH, Weinheim.

- Jung, J. L., Maurel, S., Fritig, B. & Hahne, G. (1995):** Different pathogenesis – related – proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. *J. Plant Physiol.* **145**: S. 153 – 160.
- Kaiser, H. F. (1956):** The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* **23**: S. 187 – 200.
- Karban, R. & Baldwin, I. T. (1997):** Induced Responses to Herbivory. The University of Chicago Press, USA.
- Kedera, J. (1997):** Plant Diseases – Oil Seed Plants. *Review of Kenyan Agricultural Research* Vol. **30**. S. 34-36.
- Keen, N. T. (1990):** Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: S. 447-463.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A. & Waterhouse, A. L. (2000):** Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **55**: S. 77-85.
- Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A. & Datta, A. (2000):** Oxalate Decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular Cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *J. Biol. Chem.* **275** (3): S. 7230 - 7238.
- Kim, H. S., Sneller, C. H. & BW Diers (1999):** Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments. *Crop Sci.* **39**: S. 64-68.
- Kim, H. S. & Diers, B. W. (2000):** Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in Soybean. *Crop Science* **40**: S. 55-61.
- Kim, H. S. Hartman, G. L. Manandhar, J. B. Graef, G. L. Steadman, J. R. & Diers, B. W. (2000):** Reaction of Soybean Cultivars to *Sclerotinia* Stem Rot in Field, Greenhouse, and Laboratory Evaluations. *Crop Science* **40**: S. 665-669.
- Kirchner, J. (1978):** Thin Layer Chromatography. John Wiley & Son's - New York.
- Kirk, R. E. (1995):** Experimental design: Procedures for the behavioural sciences (3rd ed.). Brooks & Cole Publishing, Pacific Grove, California, USA.
- Kleingartner, L. W. (1997):** The World Oilseed Environment. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 809-824.
- Klotz, K. L., Liu, T-T. Y., Liu, L. & Lagrimi, M. (1998):** Expression of the tobacco anionic peroxidase gene is tissue-specific and developmentally regulated. *Plant Molecular Biology* **36** (4): S. 509-520.
- Kobayashi, A; Koguchi, Y., Kanzaki, H., Kajiyama, S. & Kawazu, K. (1994):** A new type of antimicrobial phenolics produced by plant Peroxidase and its possible role in the chemical defence system against plant pathogens. *Zeitschrift für Naturforschung* **49** (c): S. 411-414.
- Kodoma, M.; Wada, H.; Otani, H., Kohomoto, K. & Kimura, Y. (1998):** 3,5-Di-O-Caffeoylquinic Acid, an infection-inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* **47** (3): S. 371- 373.
- Koepe, D. E., Rohrbaugh, L. M. & Wender, S. H. (1967):** The effect of varying U.V. intensities on the concentration of scopoletin and caffeoylquinic acids in tobacco and sunflower. *Phytochemistry* **8**: S. 889-886.
- Köhler, W.; Schachtel, G. & Voleske, P. (1996):** Biostatistik. 2. Auflage. Springer Verlag Berlin – Heidelberg – New York.

- Köhler, H. & Friedt, W. (1999):** Genetic variability as identified by AP-PCR and reaction to Mid-Stem Infection of *Sclerotinia sclerotiorum* among interspecific sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid progenies. *Crop Science* **39** (9-10): S. 1456-1463.
- Kohn, L. M. (1979a):** A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* **9**: S. 365-444.
- Kohn, L. M. (1979b):** Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**:S. 881-886.
- Kolattukudy, P. E. (1981):** Structure, biosynthesis and degradation of cutin and suberin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: S. 539-567.
- Kolattukudy, P. E. (1985):** Enzymatic penetration on the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **23**: S. 223-250.
- Kolkman, J. M. & Kelly, D. J. (2002):** Agronomic Traits Affecting Resistance to White Mold in Common Bean. *Crop Science* **42**: 693-699.
- Kombrink, E. & Somssich, I. E. (1995):** Defense responses of Plants to Pathogens. *Advances in Botanical Research* **21**: S 1-33.
- Kraus, L., Koch, A. & Hoffstetter-Kuhn, S. (1999):** Dünnschichtchromatographie, Labor-Manual. Springer Verlag – Berlin – Heidelberg – New York.
- Krüger W. (1975):** Die Beeinflussung der Apothezien- und Ascosporen- Entwicklung des Rapskrebserregers *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary durch Umweltfaktoren. *Pfl. Krankh.* **2**: S. 101-108.
- Kubezceka, K-H. & Bohn, I. (1985):** Radix Pimpinellae und ihre aktuelle Verfälschungen. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **125**: 399-402.
- Kuc, J. & Rush, J. S. (1985):** Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* **136**: S. 455-472.
- Kuhnl, T., Koch, U., Heller, W. & Wellmann, E. (1987):** Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinic acid 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys.* **258** (1): S. 226 – 232.
- Kupidlowska, E., Kowalec, M., Sulkowski, G. & Zobel, A. M. (1994):** The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristematic cell protoplasts. *Annals Botany* **73**: S. 525 – 530.
- Kurle, J. E., Grau, C. R., Oplinger, E. S. & Mengistu A. (2001):** Tillage, Crop Sequence, and Cultivar Effects on Sclerotinia Stem Rot Incidence and Yield in Soybean. *Agron. J.* **93** (9): S. 973 - 982.
- Kurnik, E., Leranth, J., Parragh, J. & Voros, J. (1978):** “Pseudoresistance” phenomenon to head rot in Hungary. Proc. 8th Int. Sunflower Conf., Mineapolis. S. 271-78.
- Kurosaki, F. Tashiro, N. & Nishi, A. (1987):** Induction, purification and possible function of chitinases in cultured carrot cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **31**: S. 201 – 210.
- Ky, C.-L., Louarn, J., Guyot, B., Charrier, A., Hamon, S. & Noirot, M. (1999):** Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea libericavar* ‘dewevrei’. *Theor. Appl. Genet.* **98**: S. 628-637.
- Lagravere, T., Lacombe, S., Surel, O., Kleiber, D., Berville, A. & Dayde, J. (2000):** Oil composition and accumulation of fatty acids in new high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. I: S. A25-A30.

- Lamarque, C. (1985):** Maladies et Accidents Culturels du Tournesol: Elements de Reconnaissance des Maladies et Accidents Culturels du Tournesol Rencontre en France. Institut National De La Recherche Agronomique (INRA), 75007 Paris, France.
- Lamarque, C., Leconte, M., Berrier, J. & Jaunet, A. (1985):** Recherche de sites de contamination du capitule de tournesol par les ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. C.E.T.I.O.M. - *Informations Techniques* **92**: S. 27-35.
- Lamarque, C. & Perny, R. A. (1985):** Nouvelle maladie du tournesol: le phomopsis. *Cultivar* **179**: S. 57-59.
- Lamey, A. (1998):** Fungicides for Canola and Sunflower. In: Proc. *Sclerotinia* Workshop, January 21, 1998, Fargo ND, Minnesota / North Dakota - In Service Extension Workshop: S. 21.
- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997):** The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: S. 251-275.
- Lamotte, L. R. (1973):** Quadratic estimation of variance components. *Biometrics* **29**: 311-330.
- Leclercq, P. (1969):** Une stérilité mâle cytoplasmique chez les tournesol. *Ann. Amélior. Plantes* **19**: S. 99-106.
- Leela, D. & Ganeshan, G. (1993):** Herbicides and plant disease interactions: a review. *Advances in Horticulture and Forestry* **3**: S.1-48.
- Lefol C. & Morrall, R. A. A. (1996):** Immunofluorescent staining of *Sclerotinia* ascospores on canola petals. *Canadian Journal of Plant Path.* **18**: S. 237-241
- Lefol, C. & Morrall, R. A. A. (1997):** Dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* in canopies of flowering canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: S. 113.
- Leite, M. V. B. C. R., de Olivera, F. M. & Castiglioni, V. B. R. (2000):** Occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* rot in sunflower fields sowed after harvesting of summer crops, in the state of Parana, Brazil. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. I7-I4.
- Lentz, D. L., Pohl, M. E. D., Pope, O. & Wyatt, A. R. (2001):** Prehistoric Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Domestication in Mexico. *Economic Botany* **55** (3): S. 370-376.
- Leonowicz, A., Cho, N-S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. & Rogalski, J. (2001):** Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiology* **41** (3-4): S. 185 – 227.
- Leung, J., Fenton, T. W. & Clandinin, D. R. (1981):** Phenolic components of sunflower flour. *J. Food Science* **46**: S. 1386-1388.
- Liang, X. W., Dron, M., Cramer, C. L., Dixon, R. A. & Lamb C. J. (1989):** Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* **264**: S. 14486-14492.
- Lithourgidis, A. S., Tzavella-Klonari, K., & Roupakias, D. G. (1989):** Methods of inoculation of Faba bean plants with *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Phytopathology* **127**: S. 123-128.
- Lofgren, J. R. (1997):** Sunflower for Confectionary Food, Bird Food, and Pet Food. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 747-764.
- Logemann, E., Parniske, M. & Hahlbrook, K. (1995):** Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Nat. Acad. Sci. Am.* **92**: S. 5905 – 5909.

- Lorenzini, G., Medeghini Bonatti, P., Nali, C. & Baroni Fornaserio, R. (1994):** The protective effect of rust infection against ozone, sulphur dioxide and paraquat toxicity symptoms in brad beans. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **45**: S. 263-279.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998):** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag –Heidelberg – Berlin.
- Low, P. S. & Merida, J. R. (1996):** The oxidative burst in plant defence: Function and signal transduction. *Physiol. Plant.* **96**: S. 533-542.
- Lu, G., Bidney, D., Bao, Z., Hu, X., Wang, J., Vortherms, T., Scelonge, C., Wang, L. Shao, A., Bruce, W. & Duvick, J. (2000):** Constitutive promoters and *Sclerotinia* disease resistance in sunflower. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. K72-K77.
- Lumsden, R. D. (1976):** Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. *Canadian Journal of Botany* **54**: S. 2630-2641.
- Lumsden, R. D. (1979):** Histology and Physiology in Plant Diseases Caused by *Sclerotinia* Species. *Phytopathology* **69** (8): S. 891-896.
- Lumsden, R. & Dow, R. L. (1973):** Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. *Phytopathology* **63**: S. 708-715.
- Lumsden, R. D. & Wergin, W. P. (1980):** Scanning-electron microscopy of infection of bean by species of *Sclerotinia*. *Mycologia* **72**: S. 1200-1209.
- Mabry, T. J.; Merkham, M. B. & Thomas, M. B. (1970):** The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York.
- Macias, A. M., Varela, M. R., Torres, A. & Molinillo, J. M. G. (1993):** Potential Allelopathic Guaianolides from Cultivar Sunflower Leaves, Var. SH-222. *Phytochemistry* **34** (3): S. 669-674.
- Macias, F. A., Molinillo, J. M. G., Torres, A., Varela, R. M. & Castellano, D. (1997):** Bioactive Flavonoids from *Helianthus annuus* Cultivars. *Phytochemistry* **45** (2): 683-687.
- Magro, P., Marciano, P., & Di Lenna, P. (1988):** Enzymatic oxalate decarboxylation in isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* **49**: S. 49-52.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1994):** Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: S. 7802-7806.
- Marciano, P., Di Lenna, P. & Magro, P. (1983):** Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* **22**: S. 339-345.
- Marinelli, A., March, G. J., Ragos, A. & Giugga, J. (1998):** Assessment of crop loss in peanut caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* and *Sclerotium rolfsii* in Argentina. *Int. J. Pest Management* **44**(4): S. 251-254.
- Marschner, H. (1995):** Mineral Nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press – London, San Diego, New York.
- Martel, M-B., Létoublon, R. & Fèvre, M. (1998):** Purification and characterization of two endopolysaccharuronases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* **158**: S. 133- 138.
- Martin, J. T. (1964):** Role of the cuticle in the defense against plant disease. *Ann. Rev. Phytopath.* **2**: S. 81 – 100.

- Maruta, Y., Kawabata, J. & Niki, R. (1995):** Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *J Agric Food Chem.* **43** (10): 2592-2595.
- Marum, P., Smith, R. R. & Grau, C. R. (1994):** Development of procedures to identify red clover resistant to *Sclerotinia trifoliorum*. *Euphytica* **77**: S. 257-261.
- Masirevic, S. & Gulya, T. J. (1992):** *Sclerotinia* and *Phomopsis*-two devastating sunflower pathogens. *Field Crop Research*, **30**: S. 271-300.
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A. J. (1996):** Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**: S. 203-212.
- Matsushige, K., Basnet, P., & Kadota, S. (1996):** Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. *J Trad Med.* **13**: S. 217-228.
- Mayer, A. M., Staples, R. C. & Gil-ad, N. (2001):** Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**: S. 33 – 41.
- Mayr, U; Michalek, S; Treuttner, D & Feucht,W. (1997):** Phenolic compounds of apple and their relationship to Scab resistance. *J. Phytopathology* **145**: S. 69-75.
- Mazeyrat, F., Mouzeyar, S., Coubou, I., Badaoui, S., Roeckel-Drevet, P., Tourvieille de Labrouhe, D. & Ledoigt, G. (1999):** Accumulation of defense related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* **105**: S. 333-340.
- Maxwell, D. P. & Lumsden, R. D. (1970):** Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology* **60**: S. 1395 – 1398.
- McCartney, H. A. & Lacey, M. E. (1991):** The relationship between the release of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*, infection and disease in sunflower plots in the United Kingdom. *Grana* **30**: S. 486-492.
- McCartney, H.A. & Lacey, M. E. (1992):** Release and dispersal of *Sclerotinia* ascospores in relation to infection. In: Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases, 1992, British Crop Protection Council: S. 109-116.
- McQuilken, M. P., Budge, S. P. & Whips, J. M. (1997):** Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by film-coating *Coniothyrium minitans* on sunflower seed and sclerotia. *Plant Pathology* **46**: S. 919-929.
- Melek, F. R., Ahmed, A. A. & Mabry, T. J. (1985):** 6-Methoxylated flavones from *Helianthus hirsutus* and *H. gracilentus*. *Revista Latinoamericana Quimica* **16**: S. 27.
- Melouk, H. A., Aboshosha, S. S. & Akem, C. N. (1988):** Early stages of infection of peanut by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology* **78**: S. 629.
- Melouk. H. A., Akem, C. N. & Bowen, C. (1992):** A detached shoot technique to evaluate the reaction of peanut genotypes to *Sclerotinia*. *Peanut Science* **19**: 58-62.
- Melouk, H. A. & Shokes, F. M. (1995):** Peanut Health Management. APS-Press – American Phytopathological Society.
- Melzer, M. S., Smith, E. A., and Boland, G. J. (1997):** Index of plant hosts of *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: S. 272-280.
- Merfort, I. (1992):** Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chammossonis*. *Phytochemistry* **31**: S. 2111 – 2113.
- Merrien, A. (1986):** Cahier technique Tournesol: physiologie. CETIOM, Paris.

- Metcalf, C. R. & Chalk, L. (1965):** Anatomy of the Dicotyledons. Leaves, Stem, and Wood in relation to Taxonomy. Vol II: Compositae. Oxford University Press.
- Mestries E.; Gentzbittel, L.; Tourvieille de Labrouhe, D.; Nicolas, P. & Vear, F. (1998):** Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding* **4**: 215-226.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S. Sobral, B. W. & Young, N. D. (1999):** Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* **20**: S. 317-332.
- Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913):** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**: S. 333-369.
- Miketova, P., Schram, K. H., Whitney, J., Kearns, E. H. & Timmermann, B. N. (1999):** Mass spectrometry of 3,5- and 4,5-Dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. *Journal of Mass Spectrometry* **34**: S. 1240 – 1252.
- Miljanović, T., Boža, P., Atlagič, J. & Škoric, D. (2000):** Morphological variability of *H. giganteus* L. and *H. maximiliani* Sch. populations. *Helia* **23** (32): S. 45-52.
- Miller, J. F. (1987):** Principles of cultivar development. II. Crop Species. In: Fehr, W. R. (ed): Sunflower. McMillan Publish., New York, NY, USA: S. 626-669.
- Miller, J. F. (1993):** Breeding and genetic inheritance of salt tolerance in sunflower. In: Proc. Sunflower Research Workshop, Fargo, North Dakota, 14-15 Jan, National Sunflower association (NSA), Bismarck, North Dakota, USA: S. 119-123.
- Miller, J. F. & Fick, G. N. (1997):** The Genetics of Sunflower. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, USA, 1997, S.: 441-495.
- Miller, J. F., Seiler, G. J. & Jan, C. C. (1992):** Introduced germplasm use in sunflower inbred and hybrid development. In: Shands, H. L. & Wiesner, L. E. (Eds.): Use of plant introductions in cultivar development. Part 2. CSSA Special Publication no. 20. CSSA – Madison, Wisconsin, USA. S. 151-166.
- Miller, J. F., Zimmermann, D. C. & Vick, B. A. (1987):** Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Science* **27**: 923-926.
- Miller, P. M. (1955):** V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* **45**: S. 461-462.
- Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G. L., & Ausubel, F. M. (1994):** The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**: S. 1089-1099.
- Mitriu-Radulescu, P., Serganescu-Jitariu, N. G. & Anghulata, R. M. (1981):** Anatomie des tiges de certain hybrides de tournesol et leur résistance a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Anal. Univ. Bucharest Biol.* **30**: S. 33-42.
- Mittler, R., Hallak-Herr, E., Orvar, L. B., van Camp, W., Willekens, H., Inze, D. & Ellis, E. (1999):** Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96** (24): S. 14165 – 14170.
- Monardes, N. (1574):** Primera, Segunda y Tercera Parte de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en medicina. Sevilla [1ª. Parte: Anime y Copal / Palo aromático; 2ª. Parte: Tabaco / Ambar gris; 3ª. Parte: Canela de las Indias / Bálsamo de Tolú]. Edición Facsimil 1988 - Biblioteca Padilla - Sevilla.
- Mondolot-Cosson, L. & Andary, C. (1994):** Resistance factors of a wild species of sunflower *Helianthus resinosus*, to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Horticulturae* **381**: S. 642-645.

- Mondolot-Cosson, L.; Andary, C.; Dai, G. H. & Roussel, J. (1997):** Histolocalisation de substances phénoliques intervenant lors d'interaction plante pathogène chez le tournesol et la vigne. *Acta Botanica Gallica* **144**: 353-362.
- Mole, S., Ross, J. A. M. & Waterman, P. G. (1988):** Light induced variation in phenolic levels in foliage of rain forest plants. I. Chemical changes. *Journal of Chemical Ecology* **14**: S. 1-21.
- Moore-Landecker, E. (1996):** Fundamentals of the Fungi. 4<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Morrall, R. A. A., Duczek, L. J., & Sheard, J. W. (1972):** Variations and correlations within and between morphology, pathogenicity, and pectolytic activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. *Canadian Journal Botany* **50**: S. 767-786.
- Morris, J. B., Yang, S. M. & Wilson, L. (1983):** Reaction of *Helianthus* species to *Alternaria helianthi*. *Plant Disease* **67**: S. 539-540.
- Morrison, R. H. & Thorne, J. C. (1978):** Inoculation of detached cotyledons for screening soybeans against two races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Crop Sci.* **18**: S. 1089.
- Muckenschnabel, I., Williamson, B., Goodmann, B. A., Lyon, G. D., Steward, D. & Deighton, N. (2001):** Markers for oxidative stress associated with soft rots in french beans (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Botrytis cinera*. *Planta* **212**: S. 376 – 381.
- Muckenschnabel, I., Goodmann, B. A., Williamson, B., Lyon, G. D. & Deighton, N. (2002):** Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinera*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Botany* **53**: S. 207 – 214.
- Murray, R. D. H., Méndez, J. & Brown, S. A. (1982):** The Natural Coumarins: Occurrence Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Narayana, K. R., Reddy, S. M., Chaluvadi, M. R. & Krishna, D. R. (2001):** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* **33**: S. 2-16.
- Narocon Innovationsberatung Dr. Harald Käb (2001):** Marktanalyse: Industrielle Einsatzmöglichkeiten von High Oleic Pflanzenölen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow (Hrsg.). Gülzower Fachgespräche, Band 19.
- Narvaez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J. & Ryan, C. A. (1999):** Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharid elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: S. 2249 – 2260.
- Natel, P. & Gagnon, D. (1999):** Variability in the dynamics of northern peripheral versus southern populations of two clonal plant species, *Helianthus divaricatus* and *Rhus aromatica*. *Journal of Ecology* **87** (5): S. 748-754.
- Naton, B., Hahlbrock, K. & Schmelzer, E. (1996):** Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.* **112**: S. 433-444.
- Nelson, L. A. & Hartman, J. R. (1987):** Plant-diseases; epidemiology. Techniques, experimental designs, field-experimentation in plant-pathology. *In*: Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases, 1987, No.2. American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota, USA.
- Nelson, B. & Lamey, A. (2000):** Sclerotinia diseases of Sunflower. North Dakota State University Extension Service Publication. PP 840.  
<http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/rowcrops/pp840w.htm>.
- Neu, A. (1956):** A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* **43**: S. 83.

- Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, S. & Iba, K. (1999):** Wound induced expression of the FAD 7 gene is mediated by different regulatory of its promoter in leaves/stems and roots. *Plant Physiol.* 121: S. 1239 – 1246.
- Nicholson, J. R. & Hammerschmidt, R. (1992):** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: S. 369-389.
- Noyes, R. D. & Hancock, J. G. (1981):** Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* 18: S. 123-132.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1995):** High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: S. 449-460.
- NDSU, North Dakota State University (2000):** Row Crops Publications PP840: *Sclerotinia* Diseases of Sunflower. NDSU Extension Service, Fargo, ND, USA.
- Odenbach, W. & Sacristan, M. D. (1997):** Anpassungen der Kulturpflanze an ihre Umwelt. In: Odenbach, W. (Ed.): Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. Verlag Paul Parey, Berlin. S. 81-96.
- Oertel, B. (1994):** HPLC-method to determine complete phenolic patterns in Rosaceous plants containing ellagitannins. *Acta Horticulturae* 381: S. 775-781.
- Oertel, B.; Keutgen, N. & Lenz, F. (2001):** Responses of Strawberry to Long-Term Elevated Atmospheric Ozone Concentrations. II. Changes of Soluble Phenol Contents in Leaves. *Gartenbauwissenschaft* 66: S. 164-171.
- Olsen, M. M. & Roseland, C. R. (1991):** Induction of the coumarins scopoletin and ayapin in sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding of sunflower beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Environmental Entomology* 20: S. 1166-1172.
- Oku, H. & Shiraishi, T. (1994):** Phytoalexins and host specificity in plant diseases. In: Daniel, M. & Purkayastha, R. P. (Eds.): Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. Marcel Dekker, New York, USA. S. 41-60.
- Orellana, R. G. (1975):** Photoperiod influences on the susceptibility of sunflower to *Sclerotinia* stalk rot. *Phytopath.* 65: S. 1293 – 1298.
- Osbourne, A. E. (1996):** Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plant Cell* 8: S. 1821-1831.
- Oßwald, W. (1995):** Die Wirt – Parasit - Beziehungen – Bakterien und Pilze als Parasiten. In: Hock, B. & Elstner, E. F. (Hrsg.): Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford. S. 315-369.
- Park, C. S., Marx, G. D., Moon, Y. S., Wiesenborn, D., Chang, K. W. S. & Hofman, V. (1997):** Alternative Uses of Sunflower. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 765 - 808.
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1991):** An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant Microbe Interaction* 4: S. 19-27.
- Parker, J. E. und Coleman, M. J. (1997):** Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends Biochem Sci.* 22: S. 291-296.
- Patterson, C. L. & Grogan, R. G. (1985):** Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Disease* 69: S. 766-770.

- Payen, D. (1983):** Modélisation de l'épidémiologie de *Sclerotinia sclerotiorum* sur tournesol. *Bull. Org. Europ. Plant Protection* **13**: S. 277-281.
- Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., Garcia-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Ayet, G. & Robredo, L. M. (2000):** Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *J. Sci. Food Agric.* **80**: S. 459 – 464.
- Peluso, G., De Feo, V., De Simone, F., Bresciano, E. & Vutto, M. L. (1995):** Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *J. Nat. Prod.* **58**: S. 639 – 646.
- Penel, C., Carpin, S., Crevecoeur, M., Simon, P. & Greppin, H. (1999):** Binding of peroxidases to Ca<sup>2+</sup> - Pectate: possible significance for peroxidase function in cell wall. In: Lagrimi, L. M. : Proc. Int. Symposium for Plant Peroxidases – Peroxidase 99, Columbus – Ohio, USA, July 17 – 21, 1999: <http://www.unige.ch/LABPV/newsletters/news114/> Plant Peroxidase Newsletter 14: S. 33 – 40.
- Péres, J. & Regnault, Y. (1985):** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Recherche de moyens chimiques permettant de limiter la production d'inoculum par traitement du sol. In: Proc. 11<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina. Int. Sunflower Association, Paris, France: S. 363-368.
- Péres, A., Allard, L. M. & Regnault, Y. (1991):** *Sclerotinia sclerotiorum* du bourgeon terminal du tournesol: Etude de la protection fongicide. 3<sup>ème</sup> Conf. Int. Sur les maladies des plantes, Bordeaux, 3. – 5- Dec. 1991: S. 401-405.
- Peres, A., Regnault, Y. & Allard, L. M. (1989):** *Sclerotinia sclerotiorum*: incidence de cinq facteurs agronomiques sur l'intensité des attaques sur tournesol. *CETIOM Information Techniques* **107**: S. 7-13.
- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B. & Muñoz-Ruz, J. (2002):** Inheritance of resistance to a highly virulent race of *Orobanche cumana* Wallr. In a sunflower line derived from interspecific amphiploids. *Helia* **25** (36): S. 137-144.
- Philippeau, G. (1986):** Comment interpréter les résultats d'une analyse en composants principales. L'Institut Technique de Céréales et des Fourrages. Publication Stat-ITCF 01/01/1986-Paris: S. 5-63. [www.itcf.fr](http://www.itcf.fr).
- Piazza, G.J. & Foglia, T. A. (2001):** Rapeseed oil for oleochemical uses. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**: S. 405-454.
- Pirvu, N, Vranceanu, A. V. & Stoenescu, F. (1985):** Genetic mechanisms of sunflower resistance to white rot (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De By.). *Z. Pflanzenzüchtung* **95**: 157-163.
- Porter, I. J. & Clarke, R. G. (1992):** *Sclerotinia* stem rot of sunflowers: the disease in perspective. Proceedings of the Australian Sunflower Association 9th Workshop, Yeppon, Australia: S. 64-68.
- Potter, J. R. & Breen, P. J. (1980):** Maintenance of high photosynthetic rates during the accumulation of high leaf starch levels in sunflower and soybean. *Plant Physiol.* **66**: 528- 531.
- Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rascle, C., & Fèvre, M. (2001):** Regulation of *acp1*, encoding a non aspartyl acid protease, expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiol UK.* **147**: S. 717–726.
- Pratt, R. G. & Rowe, D. E. (1991):** Differential responses of alfalfa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. *Plant Disease* **75**: S. 188-191.
- Pratt, R. & Rowe, D. E. (1996):** Registration of Mississippi *Sclerotinia*-resistant (MSR) alfalfa germplasm. *Crop Science* **36**: 821 – 822.
- Prats-Pérez, E.; Bazzalo, M. E.; León, A. & Jorriñ-Novo, J. V. (2000b):** Agronomic aspects of the sunflower 7-hydroxylated simple coumarines. *Helia* **23** (33): S. 105-112.

- Prats-Pérez, E.; Bazzalo, M. E.; León, A. & Jorriñ-Novó, J. V. (2000a):** Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June 2000, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris – France. S. K35-K41.
- Prell, H. P. (1996):** Interaktion von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen: Parasitierung und Resistenz, Genetik und molekulare Phytopathologie. Gustav Fischer Verlag, Jena; Stuttgart.
- Prell, H. P. & Day, P. (2001):** Plant fungal pathogen interaction: a classical and molecular view. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.
- Prioletta, S. & Bazzalo, M. E. (1998):** Sunflower Basal Stalk Rot (*Sclerotinia sclerotiorum*): It's Relationship with some Yield Components Reduction. *Helia* **21** (29): S. 33-44.
- Prousky, D. & Keen, N. T. (1993):** Involvement of Preformed Antifungal Compounds in the Resistance of Subtropical Fruits to Fungal Decay. *Plant Disease* **77**: S 114-117.
- Purdy, L. H. (1958):** Some factors affecting penetration and infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **48**: 605 – 609.
- Purdy, L. H. (1979):** *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* **69**: S. 875-880.
- Pustovoit, G. V. & Gubin, I. A. (1974):** Results and prospects in sunflower breeding for group immunity by using the interspecific hybridization method. In: Proc. 6<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., Bucharest, Romania. Int. Sunflower Assoc., Toowoomba, Australia: S. 373-381.
- Pustovoit, G. V. & Krasnokutskaya, O. N. (1976):** Wild species of *Helianthus* as initial forms in sunflower breeding for immunity. In: Proc. 7<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Krasnodar, Russia, 27 June – 3 July, Vol 1: S. 401-408.
- Pustovit, G. V., Ilatovsky, V. P. & Slyusar, E. L. (1976):** Results and prospects of sunflower breeding for group immunity by interspecific hybridization. In: Proc. 7<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Krasnodar, Russia, 27 June – 3 July: Vol I S. 193-204.
- Putt, E. D. (1965):** Sunflower variety Pedrovik. *Can. J. Plant Sci.* **45**: S. 207.
- Putt, E. D. (1997):** Early History of Sunflower. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America; USA, 1997, S.: 1-19.
- Quersch, Z., Jan, C. C. & Gulya, T. J. (1993):** Resistance of sunflower rust and its inheritance in wild sunflower species. *Plant Breeding* **110**: S. 297-306.
- Radke, V. L. & Grau, C. R. (1986):** Effects of herbicides on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **70**: S. 19-23.
- Ranieri, A., Petacco, F., Castagna, A. & Soldatini, G. F. (2000a):** Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone. *Plant Science* **159**: S. 159-167.
- Ranieri, A., Castagna, A. & Soldatini, G. F. (2000b):** Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower planta. *J. Plant Physiol.* **156**: S. 266 – 271.
- Ranty, B. & Cavalié, G. (1982):** Purification and properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from sunflower leaves. *Planta* **155**: 388-391.
- Rapilly, F. (1991):** L'épidémiologie en pathologie végétal, mycoses aériennes. Publication INRA, Paris. 317S.
- Rashid, K. Y. (1993):** *Sclerotinia* head-rot and mid-stem infection of sunflower in Manitoba. In: Proc. 15<sup>th</sup> Sunflower Research - Workshop, Fargo, ND, 16-17 January 1993; Nat. Sunflower association, Bismarck, ND, USA.: S. 10-11.

- Rashid, K. Y. (1995):** Sunflower down mildew – a comeback in 1994. Proc. of the 17<sup>th</sup> Sunflower Research Workshop, Fargo, North Dakota, 12-13 January, 1995. Int. Sunflower Association. Bismarck, ND, USA. S. 73-75.
- Rashid, K. Y. & Dedio, W. (1994):** Differences in the reaction of sunflower hybrids to *Sclerotinia* head-rot. In: Proc. 16<sup>th</sup> Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, 14-15 January. NSA, National Sunflower Association, Bismarck, North Dakota, USA. S. 88-91.
- Rashid, K. Y. & Platford, R. G. (1990):** Survey of sunflower diseases in Manitoba in 1989. *Can. J. Plant Dis. Surv.* **70**: S. 85-86.
- Rao, C. R., (1971):** Minimum variance quadratic unbiased estimation of variance components. *Journal of Multivariate Analysis* **1**: 445-456.
- Ratkos, J. & Nagy, J. (1992):** A study on the sporogenesis and pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Helia* **15** (16): S. 59-72.
- Reuveni, R. (1995):** Biochemical markers as a tool for screening resistance against plant pathogens. In: Reuveni, R. (Ed.): Novel approaches to Integrated Pest Management. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Reuveni, R., Shimoni, M & Karchi, Z. (1990):** A rapid assay for monitoring peroxidase activity in Melon as a marker for resistance to *Pseudoperonospora cubensis*. *J. Phytopathology* **129**: S. 333-338.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997):** Antioxidative properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**: S. 152 – 159.
- Richard-Forget, F. C. & Gaillard, F. A. (1997):** Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *J. Agric. Food Chem.* **45**: S. 2472-2476.
- Richter, G. (1996):** Biochemie der Pflanzen. Thieme Verlag, Stuttgart – New York.
- Richter, T., and Ronald, P. (2000):** The evolution of disease resistance genes. *Plant Molec. Biol.* **42**: S. 195-204.
- Ride, I. P. (1985):** Nonhost resistance to fungi. In: Fraser, R. S. S. (Ed.): Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Martinus Nijhoff - Dr. W. Junk, Publishers, Dordrecht, Netherlands. S. 29-79.
- Riou, C., Freyssinet, G. & Fevre, M. (1991):** Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: S. 1478-1484.
- Rieseberg, L. H. (1991):** Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *Am. J. Bot.* **78**: S. 1218-1237.
- Rieseberg, L. H., Soltis, D. E. & Arnold, D. (1987):** Variation and Localization of Flavonoid Aglycones in *Helianthus annuus* (Compositae). *Amer. J. Bot.* **74** (2): S. 224-233.
- Rieseberg, L. H. & Seiler, G. J. (1990):** Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany* **44** (3): S. 79-91.
- Rieseberg, L. H., Beckstrom-Sternberg, S. M. & Doan, K. (1990):** *Helianthus annuus* ssp. *texanus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: S. 593-597.
- Rieseberg, L. H., Beckstrom-Sternberg, S. M., Liston, A. & Arias, D. M. (1991):** Phylogenetic and systematic interferences from chloroplast DNA and isoenzyme variation in *Helianthus* Section *Helianthus* (Asteraceae). *Syst. Bot.* **16**: S. 50-70.

- Robert, N., Vear, F. & Tourvieille, D. (1987):** L'hérédité de la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary chez le tournesol. I. Etude de réactions à deux tests mycéliens. *Agronomie* **7**: S. 423-429.
- Robertson, J. A. (1975):** Use of sunflower seed in food production. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **6**: S. 201-240.
- Roderick, H. W. & Clifford, B. C. (1995):** Variation in adult plant resistance to powdery mildew in spring oats under field and laboratory conditions. *Plant Pathology* **44**: S. 366 – 373.
- Rogers, C. E. (1992):** Insect pests and strategies for their management in cultivated sunflower. *Field Crops Research* **30**: S. 301-332.
- Rozynek, B & Spring, O. (2000):** Pathotypes of sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia* **23** (32): S. 27-34.
- Ruzin, S. E. (1999):** Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press – New York – Oxford.
- Ryan, C. A. & Farmer, E. E. (1991):** Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **42**: S. 651-674.
- Sackston, W. E. (1978):** Sunflower disease mapping in Europe and adjacent Mediterranean countries. In: Proc. 8<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., 23 – 27 July, Minneapolis, MN, USA. Int. Sunflower Association, Paris, France. S. 7-29.
- Sackston, W. E. (1992):** On a treadmill: Breeding sunflowers for resistance to disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: S. 529-551.
- Sakurai, N., Katayama, Y., Yamaya, T. (2001):** Overlapping expression of cytosolic glutamine synthetase and phenylalanine ammonia-lyase in immature leaf blades of rice. *Physiol. Plant.* **113**: S. 400-408.
- Sala, C. A., Vasquez, A. N. de Romano, A. B. & Piubello, S. (1998):** *Sclerotinia* Mid-Stalk Rot of Sunflower: Effect of Yield Components and Oil Content. *Helia* **17** (21): S. 41-44.
- Sanchez, G. D. & Elizondo, S. G. (1995):** Distribution of *Helianthus*, *Viguiera* and *Tithona* genera in Mexico. *Helia* **18** (23): S. 27-40.
- Sanlaville, C., Jay, M. & Guiard, J. (1988):** Utilisation des composés phénoliques pour le marquage de pools génétique de Tournesol cultivé. *Agronomie* **8** (4): S. 341-345.
- Sarkar, S. K. & Howarth, R. E. (1976):** Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food. Chem.* **24**: S. 317-320.
- Sarma A. D., Sreelakshmi. Y., Sharma, R. (1998):** Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry* **49**: S. 2233-2243.
- Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H. Seo, S., Matsui, H. & Ohashi, Y. (2002):** A wound inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiology* **43**: S. 108 – 117.
- Says-Lesage, V. & Tourvieille, D. (1988):** Recherche de sites de pollution et d'infection des fleurons de tournesol *in situ*, par les spores de *Sclerotinia sclerotiorum*. C.E.T.I.O.M. - *Informations Techniques* **102**: S. 3-13.
- Scelonge, C., Wang, L., Bidney, D., Lu, G., Hastings, C., Cole, G. Mancl, M., D'Hautefeuille, J-L., Sosa-Dominguez, G. & Coughlan, S. (2000):** Transgenic *Sclerotinia* resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. K66-K71.

- Schaller, F. (2001):** Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* **52**: S. 11 – 23.
- Sharp, J. K., Valent, B. & Albersheim, P. (1984):** Purification and partial characterization of a  $\beta$ -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**: S. 11312-11320.
- Scheel, D. (1998):** Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol.* **1**: S. 305-310.
- Schilling, E. E. (1983):** Flavonoids in *Helianthus* series *Angustifolii*. *Biochem. Syst. Ecol.* **11**: S. 341-344.
- Schilling, E. E. & Heiser, C. B. (1981):** Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon* **30**: S. 393-403.
- Schilling, E. E. (1997):** Phylogenetic analysis of *Helianthus* (Asteraceae) based on chloroplast DNA restriction site data. *Theor. Appl. Genet.* **94**: S. 925-933.
- Schilling, E. E., Linder, C. R., Noyes, R. & Rieseberg, L. H. (1998):** Phylogenetic relationships in *Helianthus* (Asteraceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer data. *Syst. Bot.* **23**: S. 177-187.
- Schilling, E. E. & Marbry, T. J. (1981):** Flavonoids in *Helianthus* series *Corona-Solis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **9**: S. 161-163.
- Schlösser, E. (1994):** Preformed phenols as resistance factors. *Acta Horticulturae* **381**: S. 615-630.
- Schlösser, E. (1997):** Preformed structural and chemical barriers. In: Hartleb, H.; Heitefuss, R. & Hoppe, H. H. (Ed.): Resistance of Crop Plants against fungi. S. 84-99. Gustav Fisher Verlag D-Jena, Stuttgart, Ulm.
- Schmidt, L. R., Marquard, R. & Friedt, W. (1989):** Status and prospects of breeding high oleic acid sunflower for central Europe. *Fat Science Tech.* **91**: S. 346- 349.
- Schmidt, A., Scheel, D. & Strack, D. (1998):** Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* **205**: S. 51 – 55.
- Schnabl, H., Binsfeld, P. C., Cerboncini, C., Dresen, B. & Peisker, H. (2002):** Biotechnological methods applied to produce *Sclerotinia sclerotiorum* resistant sunflower. *Helia* **25** (36): S. 191-200.
- Schneiter, A. A. & Miller, J. F. (1981):** Description of sunflower growth stages. *Crop Science* **21**: S. 901-903.
- Schneiter, A. A. (1994):** Growth stages of Sunflower. In: Berglund, D. R.: Sunflower production. *Revues North Dakota State Univ. Ext. Bulletin* **25**: S. 3-5.
- Scholz, E., Heinrich, M. & Hunkler, D. (1993):** Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. *Planta Medica* **60**: S. 360 – 364.
- Schuster, W. H. (1992):** Ölpflanzen in Europa. Biologie der Pflanzenöle. DLG-Verlag, Frankfurt.
- Schuster, W. H. (1993):** Die Züchtung der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.). Fortschritte der Pflanzenzüchtung; Heft 14. Paul Parey Verlag, Berlin – Hamburg.
- Schwacke, R. & Hager, A. (1992):** Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on  $Ca^{2+}$  and protein-kinase activity. *Planta* **187**: S. 136-141.

- Schweizer, P. & Metraux, J. P. (1996):** Pilz-, Bakterien- und Virusbefall. In: Brunold, C., Rügsegger, A. & Brändle, R. (Eds): Stress bei Pflanzen – Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. Verlag Haupt Bern – Stuttgart – Wien. UTB Grosse Reihe.
- Sedun, F. S. & Brown, J. F. (1986):** Relationship between sites of sucrose secretion on sunflower leaflets and their infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. In Brown, J. F. (Ed): Proc. 6<sup>th</sup> Australian Sunflower Workshop. Australian Sunflower Association, Toowoomba. S. 8-11.
- Sedun, F. S. & Brown, J. F. (1989):** Comparison of three methods to assess resistance in sunflower to basal stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Plant Disease* **73**: S. 52-55.
- Seiler, G. J. (1988):** The genus *Helianthus* as a source of genetic variability for cultivated sunflower. Proc. 12<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, Novi Sad, Yugoslavia, July 25 to 29, 1988. Yugoslav Association of Producers of Plant Oil and Fats.; Int. Sunflower Association. VOL I: S. 17-58.
- Seiler, G. J. (1991a):** Registration of 15 interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. *Crop Science* **31**: S. 1389-1390.
- Seiler, G. J. (1991b):** Registration of 13 downy mildew tolerant Interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. *Crop Science* **31**: S. 1714-1716.
- Seiler, G. J. (1992):** Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *Field Crops Research* **30**: 195-230.
- Seiler, G. J. (1994):** Progress report of the working group of the evaluation of wild *Helianthus* species for the period 1991-1993. *Helia* **17** (21): S. 87-92.
- Seiler, G.J. (1998):** The potential use of wild *Helianthus* species for selection of low saturated fatty acids in sunflower oil. S. 109-110. In: A.M de Ron (Ed.) International Symposium on Breeding of Protein and Oil Crops, EUCARPIA, Pontevedra, Spain.
- Seiler, G. J. (2001):** A wild perennial sunflower as a potential source of reduced saturated palmitic and stearic fatty acids in sunflower oil. In: Proc. 5<sup>th</sup> European Conf. on Sunflower Biotechnology, Nov. 4-8 - 2001, San Giuliano Terme (PI) – Italy: Section I Biodiversity and Wild Species S. 4.
- Seiler, G. J. & Cuk, L. (1981):** Range extension of *Helianthus* species (Asteraceae) in Arizona and Utah. *Great Basin Naturalist* **41**: S. 393-394.
- Seiler, G. J. & Cuk, L. & Rogers, C. E. (1981):** New and interesting distribution records for *Helianthus paradoxus* Heiser (Asteraceae). *The Southwestern Naturalist* **26** (4): S. 431-432.
- Seiler, G. J., Gulya, T. J. & Lofgren, T. J. (1993):** Evaluation of interspecific sunflower germplasm for *Sclerotinia* resistance. In: Proc. 15<sup>th</sup> Sunflower Research Workshop. Jan. 14-15, North Dakota, USA: S. 4-9.
- Seiler, G. J., Pomeroy, J., Dozet, B. & Gavrilova, V. (1990):** Wild sunflower germplasm collected from the great lake region of the U.S. *Helia* **13**: S. 21-27.
- Seiler, G. J. & Rieseberg, L. H. (1997):** Systematics, Origin, and Germplasm Resources of the Wild and Domesticated Sunflower. In: Schneiter, A. A. (Ed): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, USA, 1997: S. 21-65.
- Seitz, H. U., Seitz, U. & Alfermann, W. (1985):** Pflanzliche Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag – Stuttgart – New York.
- Seo, S., Sano, H & Ohashi, Y. (1997):** Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. *Physiol. Plant.* **101**: S. 740 – 745.
- Serieys, H. A. (1987):** FAO sunflower sub-network report 1984-1986. p. 1-23. In: Škoric, D. (ed.) Genetic evaluation and use of *Helianthus* wild species and their use in breeding programs. FAO Rome, Italy.

- Serieys, H. (1994):** Report on the past activities of the F.A.O. working group : „identification, study and utilization in breeding programs of new cms sources“, for the period 1991-1993. *Helia* **17** (21): S. 93-102.
- Serieys, H. (1996):** Identification, study and utilization in breeding programs of new cms sources from *Helianthus* genus. *Helia* **19**: S. 144-160.
- Serghini, K., Pérez de Luque, A., Castejón-Muñoz, M., Garcia-Torres, L. & Jorrin, J. V. (2001):** Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J. Experim. Botany* **52** (364): S. 2227-2234.
- Shaner, G., Stromberg, E. L., Lacy, G. H., Barker, K. R. & Pirone, T. P. (1992):** Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: S. 47-66.
- Sholtens-Toma, I. M. J. & de Wit, P. J. G. M. (1988):** Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **33**: S. 59-67.
- Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A. J. & Bonomo, R. P. (1991):** In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanines against O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Free Radical Res. Communications* **11**: S. 1 – 8.
- Simmonds, N. W. (1991):** Genetics of horizontal resistance to diseases of crops. *Biol. Rev.* **66**: S. 189-241.
- Singh, U. P., Singh, R. B. & Gupta, S. (1985):** Effect of temperature on sclerotial germination, growth and sclerotia formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Plant Diseases and Protection* **92**: S. 281-287.
- Sivolap, Y. M. & Solodenko, A. E. (1998):** Inter- and intraspecies differentiation in the genus *Helianthus* by RAPD analysis. *Helia* **21** (29): S. 9-18.
- Škoric, D. (1985):** Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe* / *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al. *Helia* **8**: S. 21-23.
- Škoric, D. (1987):** FAO subnetwork report 1984-86. In: Škoric, D. (ed.) Genetic evaluation and use of *Helianthus* wild species and their use in breeding programs. FAO, Rome, Italy.
- Škoric, D. (1987):** Sunflower breeding. *Uljarstvo* **25** (1): S. 3-91.
- Škoric, D. (1992):** Achievement and future directions of sunflower breeding. *Field Crops Research* **30**: S. 231-270.
- Škoric, D. & Rajcan, I. (1992):** Breeding for *Sclerotinia* resistance on sunflower. Proc. 13<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, September 7-11 1992, Pisa, Italy. Int. Sunflower Association: S. 1257-1262.
- Škoric, D. (1993):** Wild species use in sunflower breeding – results and future directions. *Plant Genetic Resource Letter* **93**: S. 17-23.
- Slanja, J., Paulova, H., Humpa, O., Bochorakova, H. & Taborska, E. (1999):** 1,5-Dicaffeoylquinic acid, an antioxidant component of *Cyanara cardunculus* leaves. *Scripta Medica* (Brno) **72**: S. 9 – 18.
- Slatter, J. S. (1992):** Sunflower planting strategies to minimise disease losses. Proceedings of the Australian Sunflower Association 9th Workshop, Yeppon, Queensland: S. 86-93.
- Smith, F. D., Phipps, P. M., & Stipes, R. J. (1991):** Agar plate, soil plate, and field evaluation of Fluazinam and other fungicides for control of *Sclerotinia minor* on peanut. *Plant Disease* **75**: S. 1138-1143.

- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973):** Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA. S. 230-234.
- Soldatov, K. I. (1976):** Chemical mutagenesis in sunflower breeding. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Krasnodor, Russia. 27 June-3 July 1976. Int. Sunflower Association, Paris, France. S. 352-357.
- Sossey-Alaoui, K., Serieys, H., Tersac, M., Lambert, P., Schilling, E., Griveau, Y., Kaan, F. & Bervillé, A. (1999):** Molecular relationship of *Helianthus* based on RAPD markers. *Helia* **22** (30): S. 1-18.
- Sossey-Alaoui, K., Serieys, H., Tersac, M., Lambert, P., Schilling, E., Griveau, Y., Kaan, F. & Bervillé, A. (1998):** Evidence for several genomes in *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* **97**: S. 422-430.
- Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1998):** Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* **3**: S. 86-90.
- Spring, O., Priester, T., Stransky, H & Hager, A. (1985):** Sesquiterpene Lactones in Sunflower Seedlings: Distribution in the Plant and Occurrence in Genetic Varieties as Determined by an Isocratic HPLC Technique. *J. Plant Physiol.* **120**: S. 321-329.
- Spring, O., Klemt, V., Albert, K. & Hager, A. (1986):** A Furanohelianolide in *Helianthus debilis*; Implications for a Chemotaxonomy of the Genus *Helianthus*. *Z. Naturforschung* **41c**: S. 695-698.
- Spring, O., & Bienert, U. (1987):** Capitulate Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *J. Plant Physiol.* **130**: S. 441-448.
- Spring, O., Bienert, U. & Klemt, V. (1987):** Sesquiterpene Lactones in Glandular Trichomes of Sunflower Leaves. *J. Plant Physiol.* **130**: S. 433-439.
- Spring, O., Benz, A. & Faust, V. (1991):** Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on the development and metabolism of sunflower. *J. Plant Disease Protection* **98**: S. 597-604.
- Srivastana, S. K. (1987):** Peroxidase and poly-phenoloxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomia phaseolina* (Tassai) Goid. and their implication in disease resistance. *J. Phytopathol.* **120**: S. 249-254.
- Stahl, E. (1997):** Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Springer Verlag – New York, Heidelberg.
- Steadman, J. R. (1979):** Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: S. 904-907.
- Steadman, J. R., Powers, K. & Higgins, B. (1997):** Screening common bean for white mold resistance using detached leaves. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* **40**:140-141.
- Steimle, D. E., Schnitzler, J.-P. & Seitz, H. U. (1994):** Modes of expression of phenylalanin ammonia lyase and chalcone synthase in elicitor treated carrot cell cultures. *Acta Horticulturae* **381**: S. 206 – 209.
- Steward, E. S., Matlin, S. A. & Marby, T. J. (1985):** A Sesquiterpene Dilactone from *Helianthus maximiliani*. *Phytochemistry* **24** (9): S. 2116-2117.
- Sticher, O. (1999):** Phenolische Verbindungen. In: Hänsel, O., Sticher, O. & Steinegger, E. (Ed.): Pharmakognosie – Phytopharmazie. 6. Aufl. Springer Verlag – Berlin, Heidelberg, New York. S. 771-934.
- Stockigt, J. & Zenk M. H. (1974):** Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Lett* **42** (2): S. 131 - 134.

- Stremer, B. A. & Hammerschmidt, R. (1984):** Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumbers. *Physiol. Plant Pathology* **25**: S. 239-249.
- Sturges, H. A. (1926):** The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association* **21**: S. 65-66.
- Subbarao, K. V. (1998):** Progress toward integral management of lettuce drop. *Plant Disease* **82**: S. 1068-1078.
- Sukno, S., Ruso, J., Jan, C. C., Melero-Vara, J. M. & Fernandez-Martinez, J. M. (1999):** Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica* **106**: S. 69-78.
- Sun, P. & Yang, X. B. (2000):** Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **84**: S. 1287-1293.
- SPSS (1999a):** SPSS Advanced models Version 10.0. SPSS Inc. Chicago IL, USA; Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA.
- SPSS (1999b):** SPSS Base 10.0 - Benutzerhandbuch. SPSS Inc. Chicago IL, USA; Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA.
- Takahama U., & Oniki, T. (1997):** A peroxidase / phenolics / ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol. Plant.* **101**: S. 845-852.
- Takahama, U., Hirotsu, M. & Oniki, T. (1999):** Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: Mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Cell Physiol.* **40**: S. 716-724.
- Takken, F. L. W. & Joosten, H. A. J. (2000):** Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal Plant Pathology* **106**: S. 699-713.
- Tal, B. & Robeson, D. (1986a):** The Metabolism of Sunflower Phytoalexins Ayapin and Scopoletin. *Plant Physiol.* **82**: S. 167-172.
- Tal, B. & Robeson, D. (1986b):** The induction, by fungal inoculation, of Ayapin and Scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* **25** (1): S. 77-79.
- Tan, A. S., Jan, C. C. & Gulya, T. J. (1992):** Inheritance of resistance to race 4 of sunflower downy mildew in wild sunflower accessions. *Crop Science* **32**: S. 949-952.
- Tatum, L. A. (1971):** The southern corn leaf blight epidemic. *Science* **171**: S. 1113-1116.
- Termorshuizen, A. J. (2002):** Cultural control. In: Waller, J. M.; Lenné, J. M. & Waller, S. J. (Eds.): Plant Pathologist's Pocketbook. 3rd Edition, CAB International Publishing, Wallingford Oxon, UK. S. 318-327.
- Tahmasebi-Enferadi, S., Turi, M., Baldini, M. & Vannozzi, G. P. (2000):** Comparison between artificial inoculation and culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary treatments on nine sunflower genotypes. In: Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. K23-K28.
- Thind, T. S.; Mohan, C., Sokhi, S. S. & Bedi, J. S. (1989):** A detached leaf technique for maintenance and multiplication of *Phytophthora infestans* and evaluation of fungicides. *Current Science* **58**(7): S. 388-389.
- Thompson, T. E.; Rogers, C. E.; Zimmermann, D. C.; Huang, D. C. Whalen, E. D. P. & Miller, J. F. (1978):** Evaluation of *Helianthus* species for disease resistance and oil content and quality. 501-509. In: Proc. 8<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., Minneapolis, MN. 23-27 July 1978. Int. Sunflower Assoc., Paris, France.

- Thuault, M. & Tourvieille, D. (1988):** Étude du pouvoir pathogène de huit isolats de *Sclerotinia* appartenant aux espèces *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* et *Sclerotinia trifolium* sur tournesol. *Inf. Tech. Cetiom* **103**: S. 21–27.
- Tonneijck, A. E. G. & Leone, G. (1993):** Changes in susceptibility of bean leaves (*Phaseolus vulgaris*) to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinera* by pre – inoculative ozone exposures. *Neth. J. Pl. Path.* **99**: S. 313 – 322.
- Tourvieille de Labrouhe, D. & Vear, F. (1990):** Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers. III. Study of reactions to artificial infections of root and cotyledons. *Agronomie* **10**: S. 323-330.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. & Achbani, E. H. (1992):** Attack of sunflower terminal buds by *Sclerotinia sclerotiorum*, symptoms and resistance. In: Proc. 13<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, Pisa, Italy. International Sunflower Association, Paris, France. S. 859-864.
- Tourvieille de Labrouhe, D, Mestries, E. & Vear, F. (1996):** Multilocal *Sclerotinia sclerotiorum* resistance tests. In: Proc. Intern. Sunflower Symposium I: Disease Tolerance in Sunflower, 13 June 1996, Beijing, China. S. 71-76.
- Tourvieille de Labrouhe, D; Mondolot-Cosson, L.; Walser, P.; Andary, C. & Serieys, H. (1997):** Relation entre teneurs en dérivés caffeoylquiniques des feuilles et la résistance de *Helianthus spp.* a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Helia* **20**: S. 39-50.
- Tourvieille de Labrouhe, D. & Vear, F. (1984):** La sélection du Tournesol pour une meilleur résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*. *Information Tech. CETIOM* **88**: S. 3-23.
- Tu, J. C. (1984):** Mycoparasitism by *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its effect on sclerotial germination. *Phytopathol. Z.* **109**: S. 261-268.
- Tu, J. C. (1989):** Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. *Microbios* **57**: S. 85 – 91.
- Tu, J. C. (1997):** An integrated control of white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. *Bot. Bull. Acad. Sinica* **38**: S. 73-76.
- Tuzun, S. (2001):** The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European J. Plant Pathology* **107**: S. 85-93.
- Unger, K. K. & Weber, E. (Ed.) (1995):** Handbuch der HPLC. Teil 1 – Leitfaden für Anfänger und Praktiker. 2. überarbeitete Auflage. GIT-Verlag, Darmstadt.
- Ungerer, M. C., Baird, J. E. S., Pan, J. & Rieseberg, L. H. (1998):** Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (9): S. 11757-11762.
- Urdangarin, C., Regente, M. C., Jorin, J. & Canal, L. (1999):** Sunflower coumarin phytoalexins inhibit the growth of the virulent pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Phytopathol.* **147**: S. 441-443.
- Urie, A. L. (1985):** Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop Science* **25**: S. 986-989.
- Valette, C., Andary, C., Geiger, J. P., Sarah, J. L. & Nicole, M. (1989):** Histochemical and Cytochemical Investigations of Phenols in Roots of Banana Infected by the Burrowing Nematode *Radopholus similis*. *Phytopathology* **88** (11): S. 1141-1148.
- van Alfen, N. K. (1989):** Reassessment of plant wilt toxins. *Annual Reviews of Phytopathology* **27**: S. 533 – 550.
- van de Peer, Y. & de Wachter, R. (1994):** Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows Environment. *Comput. Applic. Biosc.* **10**: S. 569-570.

- van der Planck, J. E. (1963):** Plant Diseases, Epidemics and control. Academic Press, London, New York.
- van der Planck, J. E. (1968):** Disease resistance in plants. Academic Press, London.
- van Vliet, L. J., Boddekke, F. R., Sudar, D. & Young, I. T. (1998):** Image detectors for digital microscopy. *In:* Wilkinsin, M. H. F. & Schut, F. (Eds.): Digital image analysis of microbes, imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications. Modern Microbial Methods, John Wiley & Sons, Chichester (UK). S. 37-63.
- Vear, F. & Tourvieille, D. (1988):** Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospores infections. *Agronomie* **8**: S. 503-508.
- Vear, F., Serre, F., Walser, P., Bony, H., Joubert, G. & Tourvieille, D. (2000):** Pedigree selection for sunflower resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *In:* Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conference, 12-15 June, Toulouse, France. Int. Sunflower Association, Paris, France. Vol. II: S. K42-K47.
- Veit, M., Geiger, H., Wray, V., Abou-Mandour, A. A., Rozdzinski, W., Witte, L., Strack, D. & Czygan, F-C. (1993):** Equisetumpyrone, a styrolpyrol glucosid in gametophytes from *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* **32**: 1029-1032.
- Venette, J. (1998):** *Sclerotinia* spore formation, transport and infection. *In:* Proc. *Sclerotinia* Workshop, January 21, 1998, Fargo ND, Minnesota / North Dakota - In Service Extension Workshop: S. 4-7.
- Verburg, J. G. & Huynh, Q. K. (1991):** Purification and Charakterization of an Antifungal Chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **95**: S. 450 -455.
- Viguié, A., Vear, F. & Tourvieille, D. (1999):** Interactions between French isolates of *Phomopsis / Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al. and sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *European Journal of Plant Pathology* **105**: S. 693-702.
- Villegaas, R. J. A. & Kojima, M. (1986):** Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. *J. Biol. Chem.* **261** : S. 8729-8733.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., van Dooijeweert, W., Govers, F. Kamoun, S. & Colon, L. T. (2000):** The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: S. 853-864.
- von Bruchhausen, F., Dannhardt, G., Ebel, S., Frahm, A. W., Hackenthal, E., Hänsel, R., Holzgrabe, U., Keller, K., Nürnberg, E., Rimpler, H., Schneider, G., Surmann, P., Wolf, H. U., & Wurm, G. (1993):** Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., Auflage – Springer Verlag – Berlin, Heidelberg, New York.
- von Tiedemann, A., Hedke, K. & Mögling, R. (2001):** Abbauverhalten von Sklerotien der Weißstängeligkeit bei Einsatz von Contans. *Raps* **1/2001**: S. 1-3.
- Vranova, E., Inze, D. & van Breusegem, F. (2002):** Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Botany* **53** (372): S. 1227-1236.
- Wadell, T. J. (1973):** Hymenoxin: a flavone from *Helianthus angustifolius*. *Phytochemistry* **12**: S. 2061.
- Waksman, G. (1988):** Molecular cloning of genes expressed specifically during induction of cell wall degrading enzymes from *Sclerotinia sclerotiorum* and preliminary identification of fungal beta-galactosidase encoding gene by expression in *Escherichia coli*. *Current Genetics* **14**: S. 91-93.
- Waksman, G. (1989):** Molecular cloning of a beta-glucosidase-encoding gene from *Sclerotinia sclerotiorum* by expression in *Escherichia coli*. *Current Genetics* **15**: S. 295-297.

- Walker, J. C. & Stahmann, M. A. (1955):** Chemical nature of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **6**: S. 351-366.
- Waller, J. M. & Lenné, J. M. (2002):** Disease Resistance. In: Waller, J. M.; Lenné, J. M. & Waller, S. J. (Eds.): *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd Edition, CAB International Publishing, Wallingford Oxon, UK. S. 328-335.
- Waller, J. M.; Lenné, J. M. & Waller, S. J. (2002):** *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd Edition, CAB International Publishing, Wallingford Oxon, UK.
- Walling, L. L. (2000):** The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* **19**: S. 195 – 216.
- Warneck, H., Haug, T. & Seitz, H. (1996):** Activation of cell wall-associated peroxidase isoenzymes in pea epicotyles by a xyloglucan-derived nonasaccharide. *Journal of Experimental Botany* **47**: S. 1897-1904.
- Waterman, P. G. & Mole, S. (1994):** Importance of phenolic compounds: Abiotic constraints and plant development. In: Waterman, P.G. & Mole, S. (Ed): *Methods in Ecology: Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications – Oxford, Boston, Paris, Berlin. S. 61-65.
- Webster, J. (1993):** *Introduction to Fungi*. Second Edition. Cambridge University Press.
- Weisner, J. (1878):** Über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandten Körper zu verholzten Zellmembranen. *Sitzungsbericht Akad. Wiss. Wien. Math. Naturwissenschaften Kl. 77*: S. 60.
- Weisshaar, B., & Jenkins, G. I. (1998):** Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 251-257.
- Wegulo, S. N.; Yang, X. B. & Martinson, C. A. (1998):** Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant Disease* **82**: S. 1264-1270.
- Wegulo, S. N., Sun, P., Martinson, C. A. & Yang, X. B. (1999):** Spread of *Sclerotinia* stem rot of soybean from area and point sources of apothecial inoculum. *Can. J. Plant Science* **80**: S. 389-402.
- Welch, M. E. & Rieseberg, L. H. (2002):** Habitat divergence between a homoploid hybrid sunflower species, *Helianthus paradoxus* (Asteraceae), and its progenitors. *Am. J. Botany* **89** (3): S. 472 - 478.
- Whipps, J. & Gerlagh, M. (1992):** Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* **96**: S. 897-907.
- Willetts, H. J. (1997):** Morphology, development and evolution of stromata / sclerotia and macroconidia of the Sclerotiniaceae. *Mycol. Res.* **101** (8): S. 939-952.
- Willetts, H. J., & Bullock, S. (1992):** Developmental biology of sclerotia. *Mycol. Res.* **96**: S. 801–816.
- Wingender, R., Röhrig, H., Höricke, C. Wing, D. & Schell, J. (1989):** Differential regulation of soybean chalcone synthase genes in plant defence, symbiosis and upon environmental stimuli. *Mol. Gen. Genet* **218**: S. 315 – 322.
- Witt, T. & Heller, A. (2000):** Cytological investigations of very early infection stages of *Sclerotinia sclerotiorum* infected sunflower hypocotyls and the effect of oxalic acid. In: Spring, O.: *Pathogene der Sonnenblume – Biologie und Bekämpfungsstrategien*. 1. Symposium der DFG-Forschergruppe - "Wirt-Pathogen-Interaktionen". 11. Februar 2000, Universität Hohenheim. S. 25-27.
- Welinder, K. G. (1992):** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2** (3): S. 388-393.

- Winston, P. W. & Bates, D.H. (1960):** Saturated solutions for control of humidity in biological research. *Ecology* **41**: S. 232.
- Wolf, D. E., Takebayashi, N. & Rieseberg, L. (2001):** Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. *Conservation Biology* **15** (4): S. 1039-1056.
- Workneh, F. and Yang, X. B. (2000):** Prevalence of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybeans in the North-Central United States in Relation to Tillage, Climate, and Latitudinal Positions. *Phytopathology* **90**: S. 1375-1382.
- Wu, W. S. (1991):** Control of *Sclerotinia* rot of sunflower and chrysanthemum. *Plant protection Bulletin (Taipei)* **33**: S. 45-55.
- Yang, Z. B. (1986):** Induced antifungal compounds in *Helianthus annuus* L. Master of Science Thesis. University of Iowa. 75 S.
- Yang, Y., Shah, J. & Klessing, D. F. (1997):** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development* **11**: S. 1621-1639.
- Yarden, O., Ben-Yephet, Y., Katan, J. & Aharonson, N. (1986):** Fungicidal control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil with combination of benomyl and thiram. *Plant Disease* **70**: S. 738-742.
- Yun, D-J., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. (1997):** Plant antifungal proteins. *Plant Breeding Reviews* **14**: S. 39-88.
- Zizzerini, A. & Tosi, L. (1985):** Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* **34**: S. 415-421.
- Ziman, L., Jedryczka, M. & Srobarova, A. (1998):** Relationship between morphological and biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates and their aggressivity. *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105** (3): S. 283-288.
- Zobel, M. & Schäfer, H. J. (1998):** Nukleophile Addition und Substitution an ungesättigten Fettsäuren. In: FNR (Hrsg.): Chemische Nutzung heimischer Pflanzenöle. Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ No. 12. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., D-18276 Gülzow. S. 75-110.
- ZMP (1997):** Bilanz für Getreide, Ölsaaten, Futtermittel. Zentrale Preisberichtsstelle GmbH, 97 – Bonn.

## **Danksagung:**

Frau Prof. Dr. H. Schnabl möchte ich meinen herzlichen Dank für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes aussprechen.

Herrn Prof. Dr. W. Kühbauch sei gedankt für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Bernhard Oertel und Frau Jutta Wolter – Sadlers für ihre sehr gute Einarbeitung in die HPLC-Analytik und insbesondere in die Analytik komplexer Phenolmuster sowie für ihre kritische Beurteilung der Ergebnisse.

Mein besonderen Dank gilt den Mitarbeitern und ehemaligen Mitstreitern der Arbeitsgruppe *Helianthus*; Helga Peisker, Andrea Zerwas, Brigitte Dresen, Gaby Beine und Dr. Pedro Binsfeld für ihre tatkräftige physische und psychische Unterstützung die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für ihr besonderes Interesse am Erfolg der Arbeit, ihre stete Diskussionsbereitschaft auch über den Tellerrand hinaus und manch aufbauendes Wort bei Rückschlägen danke ich insbesondere Gaby Beine, Helga Peisker und Dr. Christoph Reisch.

Herzlichen Dank sei hier nochmals Helga Peisker und Cornelia Reuter für die schnelle Durchsicht und Korrektur der Arbeit ausgesprochen.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden, Diplomanden, Schülern und Praktikanten des Institutes für Landwirtschaftliche Botanik sei für das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen zwei Familien sowie Freunden und Bekannten, die sich während der Erstellung dieser Arbeit häufiger meine Beschwerden anhören mussten.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) / Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) finanziert.