

Abschlussbericht Teilprojekt 7

Stärkung der Krankheitstoleranz bei Mais

Projektverbund

BayKlimaFit 2 – Starke Pflanzen im Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Universität Regensburg
Zellbiologie und Pflanzenbiochemie
Dr. rer. nat. Karina van der Linde
Universitätsstraße 31
93053 Regensburg
Tel.: 0941/943-3006
Fax: 0941/943-3042
E-Mail: karina.van-der-linde@ur.de
Web: www.cell-biology.uni-regensburg.de

Berichtszeitraum:

1. Juni 2021 bis 31. August 2024



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Kurzfassung	4
2 Einführung.....	5
3 Zielstellung	6
4 Ergebnisse und Diskussion	7
4.1 AP1: Sorten- und Temperatur-bedingte Suszeptibilität	7
4.2 AP2: Etablierung der Applikation exogener RNAs	17
4.3 AP3: PTGS-induzierte sorten- und temperaturspezifisch Resistenz	19
4.4 Aktualisierter Zeitplan.....	19
4.5 Einordnung der Projektergebnisse und Darstellung des voraussichtlichen Nutzens	20
4.6 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts und Vernetzung	21
4.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	22
Literaturverzeichnis.....	24
Anhang	27

Abkürzungsverzeichnis

BI1	ZmBax-Inhibitor1
BIX	Bonitur-Index
bs	Basen
CC9	ZmCYSTATIN9
DEG	Differenziell regulierte Gene
dsRNA	Doppelsträngige RNA
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunden
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
PDS	Phytoene-Desaturase
PTGS	<i>Post transcriptional gene silencing</i>
qPCR	Quantitative PCR
RNAi	RNA-Interferenz
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ssRNA	<i>Single stranded RNA</i>
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>

1 Kurzfassung

Der Großteil der Ackerflächen in Bayern wird zum Anbau von Mais genutzt. Immer wieder treten auch in Bayern Infektionen mit *Ustilago maydis* auf, die zu Maisbeulenbrand führen. Damit einher geht der Verlust von Biomasse, eine Verschlechterung der Siliereigenschaften und die Verminderung der Maisfutteraufnahme von Milchvieh. Im Zuge der globalen Erwärmung prognostizieren Modellierungsanalysen eine Zunahme des Pathogenbefalls. Trotzdem gibt es bis heute keine gegen *U. maydis* resistenten Maislinien und es stehen auch keine wirksamen Fungizide zur Verfügung.

Basierend auf der Auswertung der bayerischen Klimadaten wurden Mais-*U. maydis*-Infektionsversuche unter verschiedenen Temperaturbedingungen durchgeführt. Bereits ein minimaler Anstieg der Temperatur führte zu einer Symptomzunahme. Noch deutlicher sind die Ergebnisse nach einer kurzen Hitzewelle. Mittels Koexpressionsanalysen wurde ein neuer Resistenzfaktor gefunden und durch weitere Versuche bestätigt. Zudem konnte die pflanzliche γ -Aminobuttersäure (GABA) als weiterer wichtiger Faktor für die Infektion identifiziert werden.

2 Einführung

Weltweit ist Mais (*Zea mays* ssp. *mays*) die meistangebaute Nahrungsmittelpflanze. Der Großteil der bayerischen Ackerfläche wird zum Maisanbau genutzt [1]. Jedoch sind die Maiserträge durch den Klimawandel bedroht. Bereits zwischen 1980 und 2008 sank der Maisertrag aufgrund steigender Temperaturen um 3,8%, und es wird prognostiziert, dass bis 2100 der Ertrag um weitere 10 - 22% sinken wird [2-4]. Neben dem direkten Einfluss steigender Temperaturen auf den Maisanbau werden zusätzlich Pathogeninfektionen begünstigt, die den Ertrag weiter schmälern werden. Es wird vorhergesagt, dass steigende Temperaturen zur erhöhten Suszeptibilität von Agrarpflanzen gegenüber Pathogenen führen werden und dass Pathogene virulenter werden [5, 6]. Durch die globale Erwärmung werden die Tages- und Nachttemperaturen auch in Bayern steigen. Außerdem wird es zu einer Zunahme von Wetterextremen kommen: So konnte bereits im Maisaussaatmonat Mai 2021 im Nachbarbundesland Baden-Württemberg eine kurzzeitige Tagesmaximumtemperatur von 31,3 °C gemessen werden [7]. Trotz alledem fehlen bis heute zuverlässige Daten zum Einfluss der Klimawandel-bedingt steigenden Temperaturen auf die Pflanzen-Pathogen-Interaktion.

Das biotrophe Pathogen *U. maydis*, welches auch in Bayern natürlich vorkommt, befällt alle oberirdischen Teile der Maispflanze und induziert dort Maisbeulenbrand. Damit verbunden ist eine verminderte Biomasseproduktion und eine Verschlechterung der Futtereigenschaften von Mais [8, 9]. Zudem sind befallene Körnermaiskolben meist nicht vermarktbar aufgrund des unappetitlichen Aussehens. Initial führt die Infektion mit *U. maydis* zu einer unspezifischen pflanzlichen Abwehrreaktion, mit Etablierung der biotrophen Interaktion wird diese Abwehr unterdrückt und pflanzliche Nährstoffe werden zum Pathogen umgeleitet [10]. Hierfür verantwortlich sind auf pflanzlicher Seite sogenannte Suszeptibilitätsfaktoren, die vermehrt in der biotrophen Phase von der Pflanze exprimiert werden [11-13].

Mittels *Post transcriptional gene silencing* (PTGS), welches durch RNA-Interferenz (RNAi) induziert wird und vor über 20 Jahren als natürlicher, viraler Abwehrmechanismus entdeckt wurde, können Pflanzen erfolgreich gegen Nematoden, Viren, Viroide, Pilze, Insekten und Milben geschützt werden [12, 14-16]. In den letzten Jahren wurden Versuche mit applizierten, exogenen RNA-Fragmenten erfolgreich in verschiedenen Pflanzen-Pathogen-Systemen durchgeführt [16, 17]. Zur Herstellung der benötigten RNAs können verschiedene Verfahren angewendet werden: *in vitro* Synthese, *in vitro* Transkription oder die Expression in Bakterien. Besonders bakterielle Expression ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Produktion großer Mengen doppelsträngiger RNA (dsRNA) [18, 19]. Ebenfalls wurden verschiedene Applikationsmethoden, darunter Hochdrucksprühen, Sprühen, Stamminjektionen und mechanische Inokulation getestet. In diesen Versuchen wurden außerdem unterschiedliche Trägermaterialien, die auch zum Schutz der RNA dienen können, eingesetzt [16, 20-22]. Für die Mais-Pathogen-Interaktion konnte bisher in zwei unabhängigen Studien die Wirkung von applizierter, exogener dsRNA nachgewiesen werden. Dabei richtete sich die RNAi jeweils direkt gegen den Schadorganismus [18, 23]. Studien zur RNAi mit Maistranskripten nach Aufnahme exogener RNA in die Pflanze liegen nicht vor.

3 Zielstellung

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Methode zur direkten Bekämpfung des Maisbeulenbrandes und auch keine resistenten Maissorten. Die Ausprägung der Infektion von Mais mit *U. maydis* ist abhängig von abiotischen Faktoren, der Suszeptibilität der Maissorte und der Infektiosität des *U. maydis*-Stamms, was im Krankheitsdreieck zusammengefasst dargestellt werden kann (Abbildung 1).

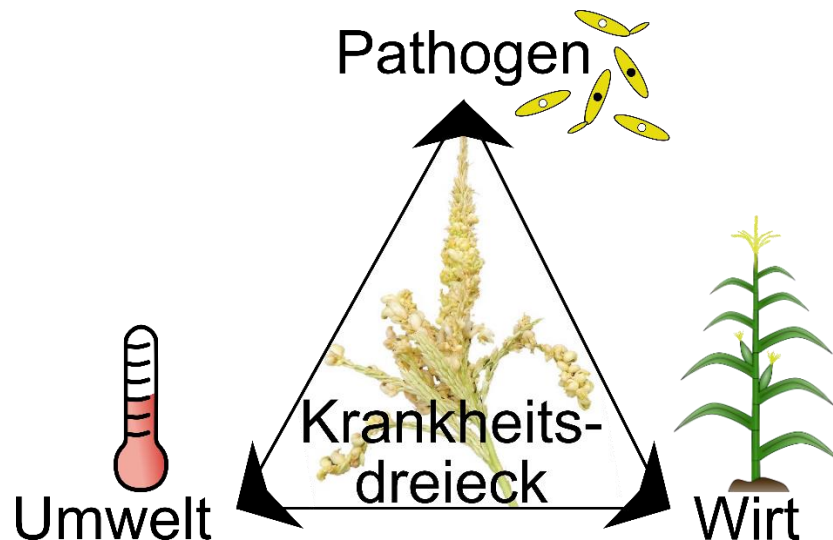


Abbildung 1: Krankheitsdreieck. Das Krankheitsdreieck beschreibt die Abhängigkeit der Infektion von drei Hauptfaktoren: Umweltbedingungen, Pathogenen und Wirtspflanzen.

Somit wirken sich die Sortenwahl, aber auch die im Rahmen des Klimawandels prognostizierten Temperaturveränderungen direkt auf die Infektion und folglich auch auf die Maiserträge aus. Allerdings lässt die bisherige Forschungsdatenlage keine Bewertung des Temperatureinflusses auf die *U. maydis*-Mais-Interaktion zu und es ist unklar, welche molekularen Faktoren die unterschiedliche Suszeptibilität von verschiedenen Maissorten bestimmen. Ziel des Projekts ist es daher:

1. Den Temperatureinfluss auf die *U. maydis*-Infektion von verschiedenen Dent- und Flint-Maissorten zu untersuchen und dabei Suszeptibilität- und Resistenzfaktoren zu identifizieren.
2. Eine Methode zum PTGS von spezifischen Maistranskripten mittels Applikation von RNA-Fragmenten zu entwickeln.
3. PTGS von Mais-Suszeptibilitätsfaktoren mittels Applikation von RNA-Fragmenten zum temperatur- und sortenspezifischen Schutz gegen Maisbeulenbrand einzusetzen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Basierend auf den drei Projektzielen wurden die Forschungsarbeiten in drei Arbeitspakete (AP) unterteilt:

- (AP1) Die Auswirkungen der *U. maydis*-Infektion auf die 17 EU-NAM-Maiselterlinien plus der Linie B73, welche zum Abgleich mit Studien aus den USA dient, unter verschiedenen Temperaturbedingungen soll analysiert und molekulare Faktoren identifiziert werden.
- (AP2) Es soll eine kostengünstige und anwenderfreundliche Methode zur Induktion von RNAi in Mais durch Applikation von exogenen RNAs erarbeitet werden.
- (AP3) Mittels der in AP1 und AP2 gewonnenen Erkenntnisse soll in zehn Beispielen exemplarisch die Resistenz von Mais gegenüber *U. maydis* Sorten- und Temperatur-spezifisch verbessert werden.

4.1 AP1: Sorten- und Temperatur-bedingte Suszeptibilität

In AP1 soll die Auswirkung verschiedener Temperaturbedingungen auf die Mais-*U. maydis*-Interaktion sowohl durch Bonituren als auch auf molekularer Ebene durch RNA-Sequenzierungs-Analysen untersucht werden. Diese Versuche erfolgen auf Maiskeimlingen mit einer Kreuzung der *U. maydis*-Wildtypstämme FB1 und FB2 [24]. Dabei werden vier Temperaturbedingungen verwendet: Standardbedingungen, die durchschnittliche Temperatur im Mai 1985 (als Referenz zu vor den Auswirkungen des Klimawandels), die prognostizierten Temperaturbedingungen für Mai 2050, sowie eine kurze Hitzewelle (drei Tage 35 °C Tagestemperatur und 25 °C Nachttemperatur).

In einem ersten Schritt wurden Daten von Klimamodellen für den Monat Mai in Bayern, die vom Bayerischen Landesamt für Umwelt berechnet wurden, zugrunde gelegt und im Hinblick auf die Ziele des Projektes bewertet (Abbildung 2). Für die Berechnung der zukünftigen Temperaturen wurden drei verschiedenen Emissions-Szenarien (RCP2.6, RCP4.5 und RCP8.5) verwendet [25]. Diese legen bestimmte Treibhausgaskonzentrationen für das Jahr 2100 und den damit einhergehenden Strahlungsantrieb fest, wodurch die zukünftige Temperaturentwicklung berechnet werden kann. Anschließend wurden daraus, wie im Bericht über das Bayerische Klimaprojektionsensemble beschrieben, regionale Modelle für Bayern modelliert. Diese Modelle beschreiben die Temperaturänderung der Tagesmaximum- und Tagesminimumtemperatur gegenüber des 30-jährigen Mittels der Referenzperiode (1971-2000) von 1985 bis 2085 (Abbildung 2) [26]. Basierend auf diesen Daten wurden als Ausgangspunkt die Temperaturbedingungen im Mai des Jahres 1985, mit 17,9 °C Tagestemperatur und 6,9 °C Nachttemperatur, als Werte für die Bedingungen vor Auftreten klimawandelbedingter Temperaturänderungen für alle weiteren Versuche verwendet. Für das Jahr 2050 beträgt der mittlere maximale Tagestemperaturwert für RCP4.5 19,1 °C und die mittlere Tagesminimumtemperatur 8,4 °C. Somit ist laut diesem Modell von einem Anstieg der Tagestemperatur um 1,2 °C bzw. der Nachttemperatur um 1,5 °C im Jahr 2050 auszugehen (Abbildung 2). Mit Hilfe der vorhandenen Daten für das Jahr 1985 und den prognostizierten RCP4.5-Daten wurden die Temperaturbedingung für die weiteren Versuche festgelegt (Abbildung 3A).

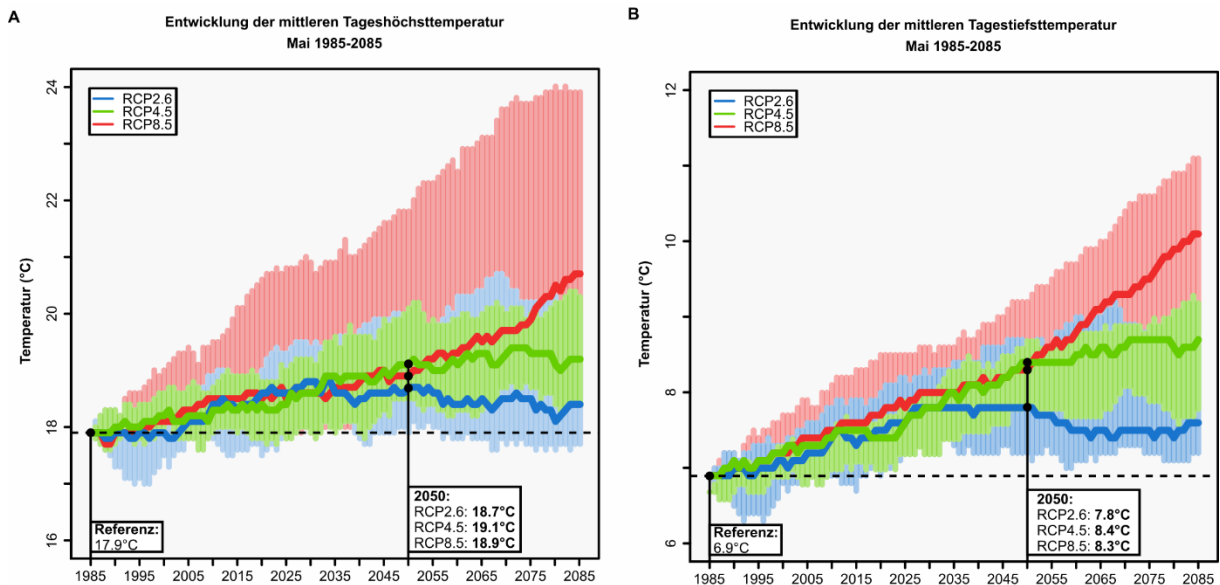


Abbildung 2: Prognostizierte Entwicklung der Tages- und Nachttemperaturen für den Monat Mai in Bayern. (A) Der Mittelwert der Tagesmaximumtemperatur für den Monat Mai in Bayern ist als Linie dargestellt, der mögliche Schwankungsbereich der maximalen bzw. minimalen prognostizierten Temperatur ist farbig hinterlegt. Für die Modellierung wurden drei verschiedene RCP-Szenarien (RCP2.6, RCP4.5 und RCP8.5) verwendet. (B) Darstellung der Tagesminimumtemperatur für den Monat Mai in Bayern. Die gemessenen Temperaturdaten wurden vom Bayerischen Landesamt für Umwelt zur Verfügung gestellt und die Berechnung der Klimamodelle erfolgte basierend auf dem Bayerischen Klimaensemble in Zusammenarbeit mit Herrn Christopher Zier vom Bayerischen Landesamt für Umwelt [26].

Bei Verwendung der Temperaturen des Monats Mai für das Jahr 1985 wurden 14 Tage nach der Infektion häufig nur Chlorosen und kleine Tumore beobachtet. Nur in seltenen Fällen kam es bei einigen Maissorten zur Bildung von großen Tumoren oder gestauchtem Wachstum. (Abbildung 3B-C). Im Gegensatz dazu traten diese starken Infektionssymptome unter den leicht erhöhten Temperaturbedingungen, die für das Jahr 2050 prognostiziert sind, deutlich häufiger auf und die Symptomatik war insgesamt stärker (Abbildung 3D). Neben steigenden Temperaturen wird erwartet, dass durch den Klimawandel auch Extremwetterlagen zunehmen. Bereits im Frühjahr könnten dadurch teilweise an einigen Tagen Temperaturen von über 30 °C erreicht werden. Um die Auswirkungen von kurzzeitigem Hitzestress auf die Suszeptibilität von Maiskeimlingen gegenüber *U. maydis*-Infektionen zu untersuchen, wurden die Pflanzen nach der Infektion für 72 Stunden einer simulierten Hitzewelle mit Tages- und Nachttemperaturen von 35 °C bzw. 25 °C ausgesetzt. Das weitere Wachstum erfolgte anschließend unter den Bedingungen des Jahres 1985. 14 Tage nach der Infektion zeigte sich, dass die Symptome in den meisten Linien schwerwiegender wurden, mit erhöhtem Auftreten von großen Tumoren und verkümmertem Wachstum (Abbildung 3E); ihre Suszeptibilität scheint also durch die kurze Hitzewelle zugenommen zu haben. Zur Quantifizierung der Boniturdaten wurden quantitative PCR (qPCR)-Experimente durchgeführt (Abbildung 11).

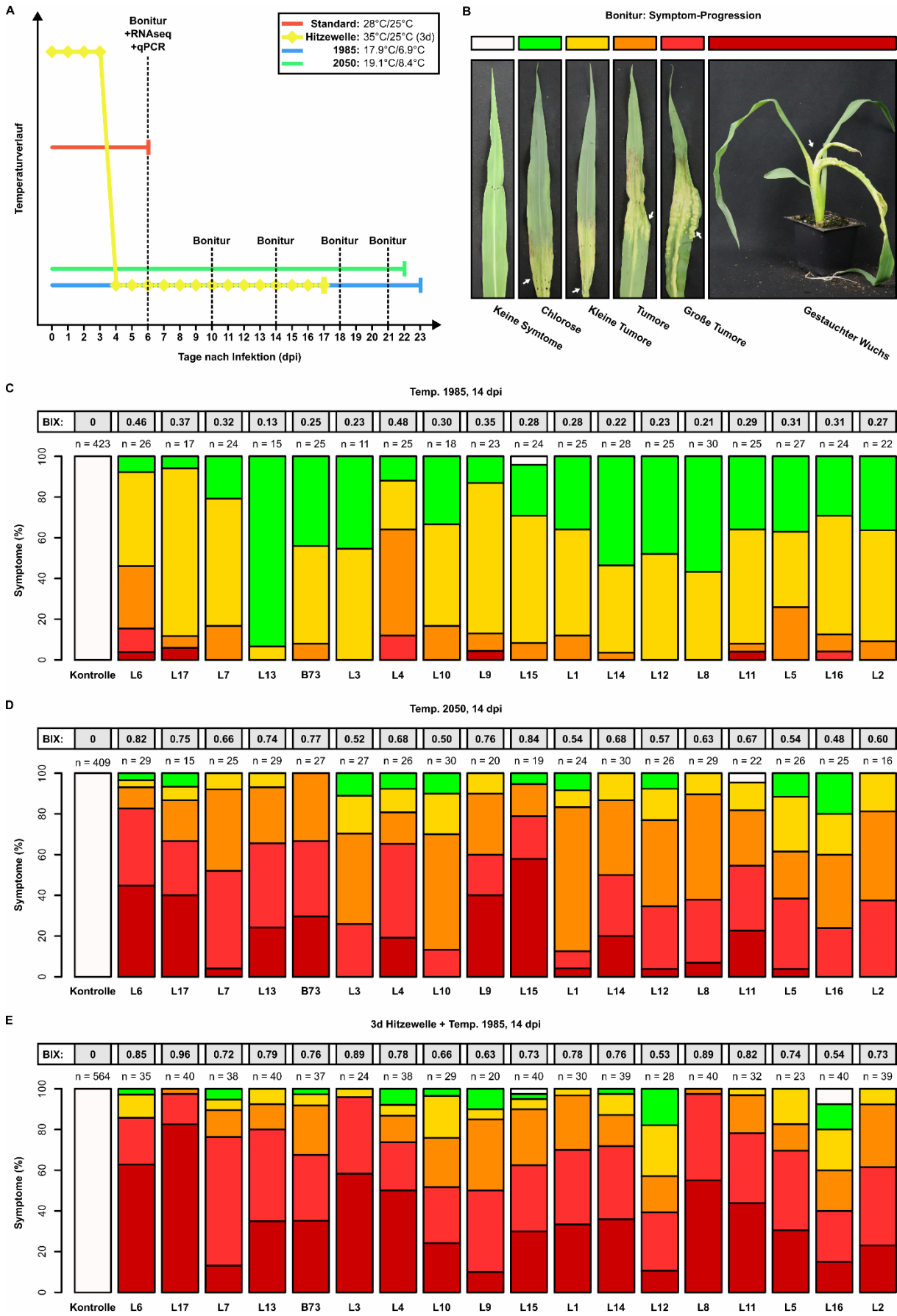


Abbildung 3: Vergleichende Analyse der *U. maydis*-Infektion von EU NAM-Elternlinien unter drei verschiedenen Temperaturbedingungen. (A) Die Infektionsstudien wurden unter vier verschiedenen Temperaturregimen durchgeführt. (B) Übersicht zum verwendeten Bonitur-System. (C-E) Bonitur 14 Tage nach der Infektion unter den Temperaturbedingungen für 1985 (C), 2050 (D), sowie der Temperatur für 1985 mit zusätzlicher Hitzewelle (E). Alle Versuche wurden in jeweils zwei biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt, die insgesamt verwendete Anzahl an Pflanzen (n) ist jeweils angegeben. Die mittlere Symptomintensität jeder Maislinie (L) ist als Bonitur-Index (BIX) angegeben.

Neben der Bonitur wurde auch die Länge des vierten Blattes nach der Infektion als Indikator für die Biomasseproduktion der Maiskeimlinge gemessen und mit der Blattlänge nicht-infizierter Pflanzen unter den jeweiligen Temperaturbedingungen verglichen. Auch hier liegt nun ein vollständiger Datensatz in zwei unabhängigen biologischen Replikaten für alle Maissorten vor (Abbildung 4). Unter allen Temperaturbedingungen zeigten alle verwendeten Maissorten bereits sechs Tage nach der Infektion mit *U. maydis* eine signifikante Blattlängenreduktion von 12-27% (Abbildung 4). Während die Blattlängenreduktion unter den Temperaturbedingungen von 1985 und 2050 weiter im Verlauf des Experiments zunahm, wurde unter Hitzestressbedingungen keine weitere signifikante Blattlängenreduktion gemessen. Die größte Reduktion (27%) zeigte sich 14 Tage nach der Infektion unter den Temperaturbedingungen von 2050 (Abbildung 4). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer bereits veröffentlichten Studie, in der der Ertrag von infizierten und nicht infizierten Pflanzen verglichen wurde und eine deutliche Ertragsminderung nach der Infektion festgestellt werden konnte [8].

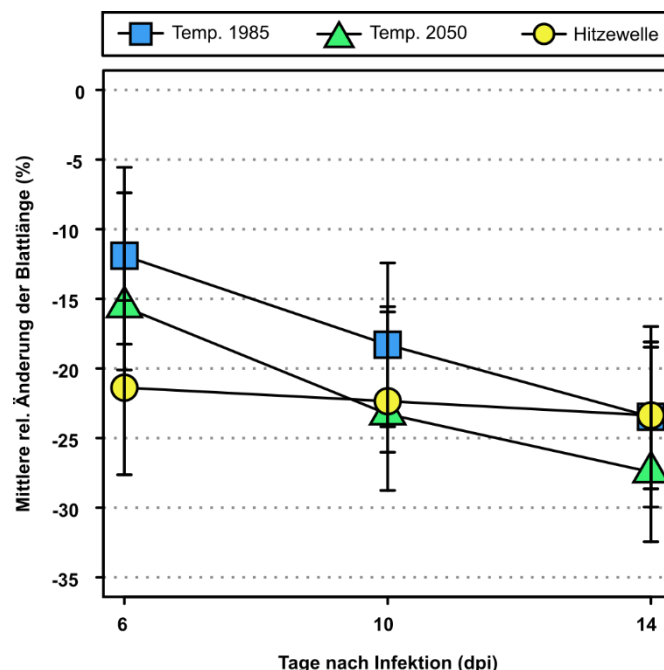


Abbildung 4: Analyse der mittleren Blattlängenreduktion nach *U. maydis*-Infektion unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Die Länge des vierten Blattes wurde unter den verschiedenen Temperaturbedingungen 6, 10 und 14 Tage nach der Infektion mit *U. maydis* für alle verwendeten EU-NAM Linien gemessen und gemittelt.

Die starke Symptomzunahme unter Hitzestress und Klimawandel-Bedingungen deutet darauf hin, dass in Zukunft auch mit einer früheren und stärkeren Sporenbildung zu rechnen ist. Daher wurde unter den verwendeten Temperaturbedingungen auch die Sporenbildung in allen

EU-NAM-Linien untersucht (Abbildung 5). Während die ersten Sporen unter den Temperaturbedingungen von 1985 im Durchschnitt 22-23 Tage nach der Infektion gebildet wurden, trat die Sporenbildung sowohl unter den für das Jahr 2050 prognostizierten Temperaturen als auch nach kurzzeitigem Hitzestress deutlich früher auf. Unter Hitzestressbedingungen konnte die Sporenbildung in einzelnen Maissorten bereits 14 Tage nach der Infektion vermerkt werden. Insgesamt scheint die Sporenbildung bei erhöhten Temperaturen früher einzusetzen. Allerdings basieren diese Daten zurzeit nur auf einem biologischen Replikate, daher soll dieser Versuch wiederholt werden.

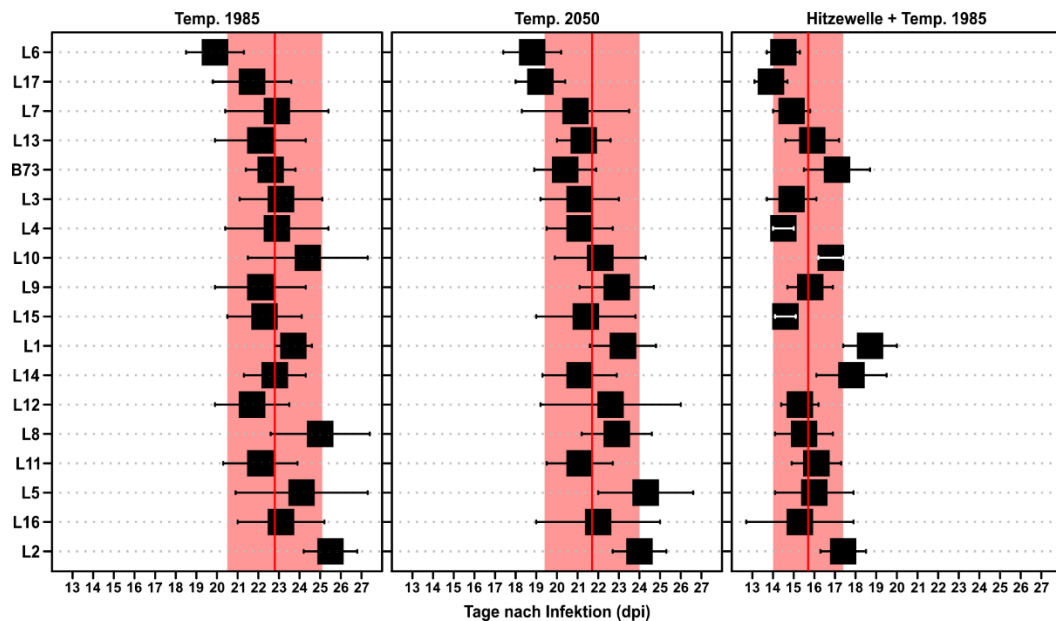


Abbildung 5: Analyse der Sporenbildung in EU-NAM-Linien unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Der erste Tag, an dem unter den verschiedenen Temperaturbedingungen melanisierte *U. maydis*-Sporen in den Tumoren sichtbar waren, wurde für alle EU-NAM-Elternlinien aufgezeichnet. Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Auf der Grundlage dieser Werte wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die einzelnen Maislinien errechnet (schwarz). Zusätzlich wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aller Maislinien (rot) ermittelt.

Um neue Sorten- und Temperatur-spezifische Resistenz- und Suszeptibilitätsfaktoren zu identifizieren, wurden RNA-Sequenzierungen (RNAseq) durchgeführt. Bei Beantragung des Projekts wurde mit 90 RNAseq-Reaktionen geplant: Es sollten neun verschiedene Maislinien, jeweils infiziert mit *U. maydis*, unter vier Temperaturbedingungen (Temp. 1985, Temp. 2050, Hitzewelle, Standard Temp.) plus die Kontrollen für Temp. 1985 in jeweils zwei biologischen Replikaten untersucht werden. Im Verlauf der Datenanalyse hat sich gezeigt, dass die korrespondierenden nicht-infizierten Proben für alle Temperaturen unabdingbar für eine aussagekräftige Analyse sind. Daher wurden zusätzlich 54 RNA-Sequenzierungen durchgeführt, sodass schlussendlich Daten von 144 RNAseq-Ansätzen zur Verfügung standen. Die nachfolgende Auswertung zeigte, dass die Expressionsmuster bei allen Temperaturen zwischen nicht-infizierten und infizierten Proben sowie den einzelnen Temperaturbedingungen separieren (Abbildung 6A). Während sowohl die infizierten als auch die nicht-infizierten Proben der Temperaturen für 1985 und 2050 überlappende Cluster bilden, liegen die Proben der Linien, die einer zusätzlichen Hitzewelle ausgesetzt waren, näher an den Clustern der Standardtemperatur. Das deutet darauf hin, dass die Hitzewelle und die damit einhergehenden stärkeren

Infektionssymptome einen deutlichen Einfluss auf die Expressionsmuster der infizierten und nicht-infizierten Pflanzen hatten.

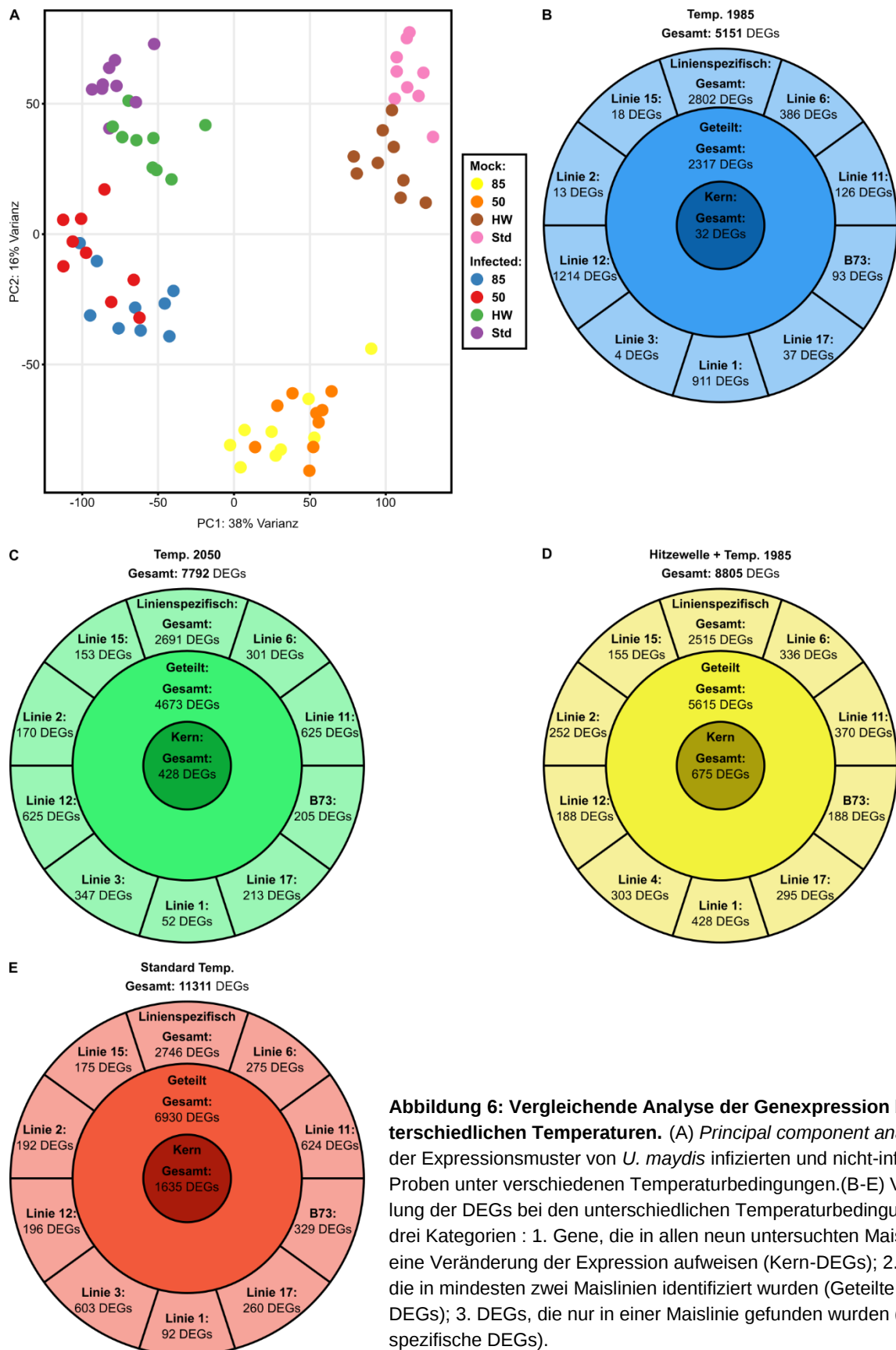


Abbildung 6: Vergleichende Analyse der Genexpression bei unterschiedlichen Temperaturen. (A) *Principal component analysis* der Expressionsmuster von *U. maydis* infizierten und nicht-infizierter Proben unter verschiedenen Temperaturbedingungen. (B-E) Verteilung der DEGs bei den unterschiedlichen Temperaturbedingungen in drei Kategorien: 1. Gene, die in allen neun untersuchten Maislinien eine Veränderung der Expression aufweisen (Kern-DEGs); 2. DEGs, die in mindestens zwei Maislinien identifiziert wurden (Geteilte DEGs); 3. DEGs, die nur in einer Maislinie gefunden wurden (Linien-spezifische DEGs).

Insgesamt wurden 33.059 differenziell regulierte Gene (DEGs) nach der Infektion im Vergleich zu den nicht-infizierten Proben detektiert. Diese DEGs können weiterhin für die einzelnen Temperaturbedingungen in drei Kategorien unterschieden werden: 1. Gene, die in allen neun untersuchten Maislinien eine Veränderung der Expression aufweisen (Kern-DEGs); 2. DEGs, die in mindestens zwei Maislinien identifiziert wurden (Geteilte DEGs); 3. DEGs, die nur in einer Maislinie gefunden wurden (Linien-spezifische DEGs) (Abbildung 6B-E). Interessanterweise konnten unter den Temperaturbedingungen für 1985 nahezu nur Linien-spezifische DEGs und kaum Kern-DEGs gefunden werden, wohingegen unter Standard-Temperaturbedingungen der Anteil Linien-spezifischer DEGs deutlich sinkt und der Anteil der Kern-DEGs stark zunimmt. Insgesamt deutet die Analyse der differentiellen Genexpression bei verschiedenen Temperaturbedingungen in Kombination mit den Bonitur-Daten darauf hin, dass mit steigender Symptomintensität die Anzahl der DEGs zunimmt und sich in den untersuchten Linien die Expressionsmuster angleichen.

In Koexpressionsanalysen zeigten je nach Temperaturbedingung mehrere Module eine signifikante Korrelation mit der Infektion (Temp. 1985: 4 Module, Temp. 2050: 3 Module, Hitzewelle: 2 Module, Standard Temp.: 3 Module) (Abbildung 7). Zur Identifikation von generell mit der Infektion assoziierten Faktoren wurden diese signifikanten Module weiter analysiert. Hierbei wurde ein bisher nicht beschriebenes Maisgen (*CANDIDAT1*, *CAN1*) gefunden, dessen Expression unter allen Temperaturbedingungen mit *U. maydis*-Befall korreliert.

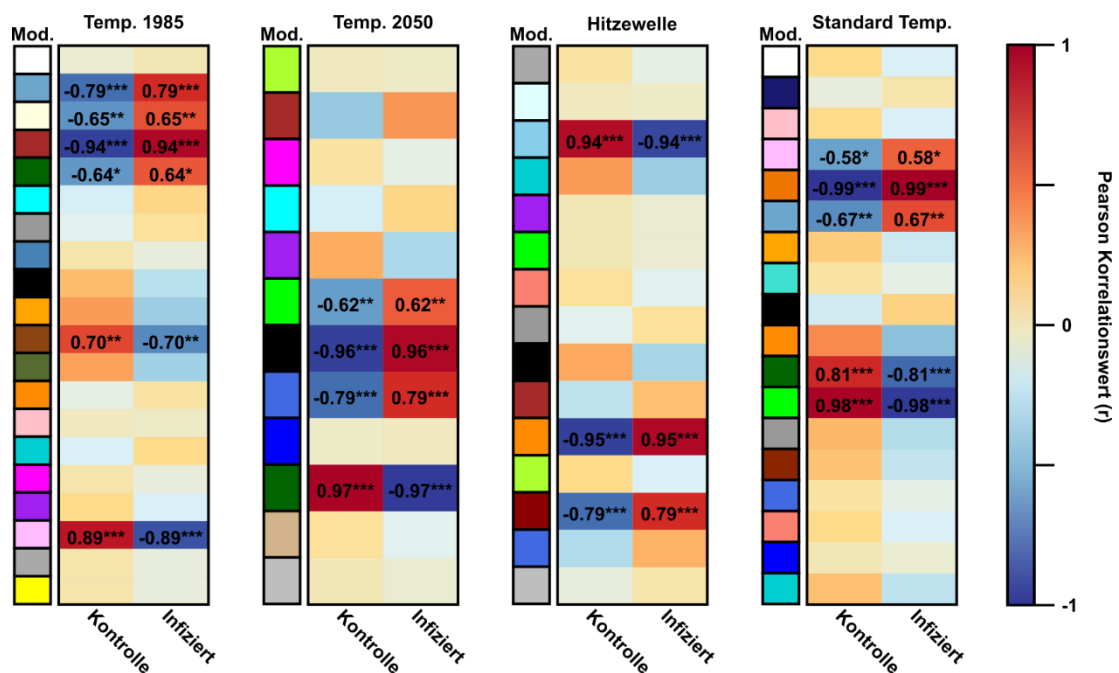


Abbildung 7: Koexpressionsanalysen unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Für jede Temperaturbedingung wurde eine separate Koexpressionsanalyse der infizierten und nicht-infizierten (Kontrolle) RNAseq-Daten durchgeführt und für jedes der resultierenden Koexpressionsmodul (Mod.) wurde die Pearson Korrelation berechnet. Für signifikante Korrelationen wird der Pearson Korrelationswert (r) als Zahl angegeben. *: p-Wert < 0,05; **: p-Wert < 0,01; ***: p-Wert < 0,001.

CAN1 kodiert für ein sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 11,91 kDA. Um den Einfluss von *CAN1* auf die *U. maydis*-Mais-Interaktion zu testen, kann die Trojanische Pferd-Methode genutzt werden. Hierbei wird das zu untersuchende Protein gezielt in den Apoplasten der infizierten Maiszelle „injiziert“ und im Anschluss Bonituren durchgeführt [14,

27]. Da die höchste Expression in Dent-Maislinien gemessen wurde (Abbildung 8A) und diese im Vergleich zu Flint-Mais eine signifikant niedrigere *U. maydis*-Besiedlung aufweisen (Abbildung 8B), wurden für diese Versuche sowohl Dent- als auch Flint-Linien verwendet. In allen Fällen wurde durch Zugabe von CAN1 die Symptomintensität deutlich verringert (Abbildung 8C). Hierbei wurde die stärkste Reduktion in der Dent-Maislinie B73 beobachtet, welche zusätzlich die höchste getestete CAN1-Expression nach der Infektion mit *U. maydis* aufwies (Abbildung 8A und C). Gleichzeitig war in den Linien 11 und B73 die relative Besiedlung mit *U. maydis* signifikant reduziert (Abbildung 8D). Somit handelt es sich bei CAN1 um einen neuen Resistenzfaktor.

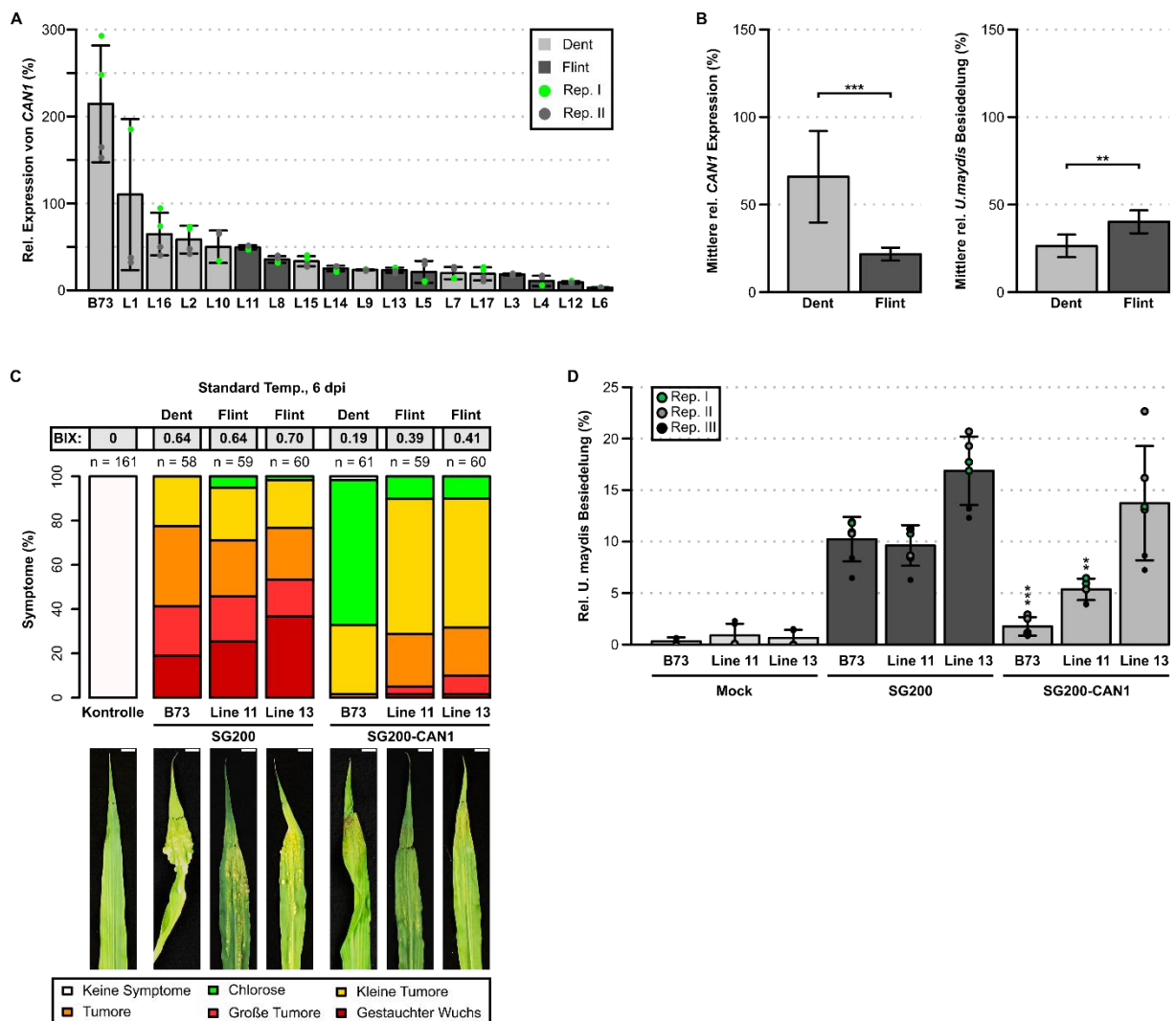


Abbildung 8: Einfluss von CAN1 auf die Infektion von Dent- und Flintmais mit *U. maydis*. (A) Expression von CAN1 nach der Infektion mit *U. maydis* wurde für alle Maislinien ermittelt durch quantitative *real time* PCR. (B) Vergleich der mittleren CAN1 Expression und der mittleren *U. maydis* Besiedlung in Dent- und Flint-Maislinien. (C) Bonitur nach Infektion von drei verschiedenen Maislinien mit dem *U. maydis* Stamm SG200 oder dem Trojanischen Pferd-Stamm SG200-CAN1, welcher CAN1 in den pflanzlichen Apoplast abgibt. (D) Die in (C) dargestellten Infektionen wurden mittels qPCR quantifiziert. **: p-Wert < 0,01; ***: p-Wert < 0,001.

Bisher wurden nur wenige Maissorten unter Standardbedingungen auf Resistenz- und Suszeptibilitätsfaktoren hin untersucht, wodurch es wahrscheinlich ist, dass viele potenzielle Faktoren übersehen wurden. Insbesondere Proben, die eine niedrige *U. maydis*-Besiedlung

aufweisen, sollten theoretisch vermehrt Resistenzfaktoren exprimieren. Deshalb wurden weitere Koexpressionsstudien durchgeführt, bei denen Koexpressionsmodule mit der relativen *U. maydis*-Besiedelung jeder Temperaturbedingung korreliert wurden. Dabei wurde ein Modul identifiziert, welches mit der niedrigsten gemessenen *U. maydis*-Besiedelung bei der Temperatur für 1985 korreliert (Abbildung 9A). Eine Analyse der GO-Annotationen für die biologische Funktion der im Modul enthaltenen DEGs zeigte eine besonders hohe Assoziation mit dem GABA-*shunt*-Stoffwechselweg (Abbildung 9B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass GABA die Infektion beeinflussen könnte. Daher wurden *U. maydis*-Infektionsversuche mit und ohne zusätzliche GABA-Behandlung durchgeführt, wobei GABA die Symptome der Infektion verstärkte (Abbildung 9C). Hierbei bleibt unklar, ob die stärkeren Symptome auftreten, weil GABA eine zusätzliche Nährstoffquelle für *U. maydis* ist oder ob GABA mit pflanzlichen Signalwegen interferiert, die an der Abwehr beteiligt sind. *U. maydis* befallene Pflanzen akkumulieren freie Aminosäuren an der Infektionsstelle und diese werden wahrscheinlich vom Pilz aufgenommen [10, 28]. Da es sich bei GABA um das primäre Amin der Glutaminsäure handelt ist nicht auszuschließen, dass GABA von *U. maydis* aufgenommen und verstoffwechselt werden kann. Andererseits wurde auch beschrieben, dass GABA-Akkumulation zur Reduktion von *reactive oxygen species* (ROS) führt [29]. ROS sind wiederum ein zentraler Baustein der initialen pflanzlichen Abwehrreaktion. Um die Wirkung von GABA auf die Infektion spezifischer zu charakterisieren, wurden zunächst Infektionsexperiment mit dem GABA-Synthesehammer L-DABA durchgeführt. L-DABA ist wie GABA eine Aminosäure (Abbildung 9D). In diesem Experiment konnte keine gesteigerte Infektion nach L-DABA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass GABA die ROS-Bildung inhibiert und nicht als Nährstoffquelle genutzt wird, da in diesem Fall auch L-DABA als Stickstoffquelle dienen könnte und zu einer stärkeren Infektion führen müsste.

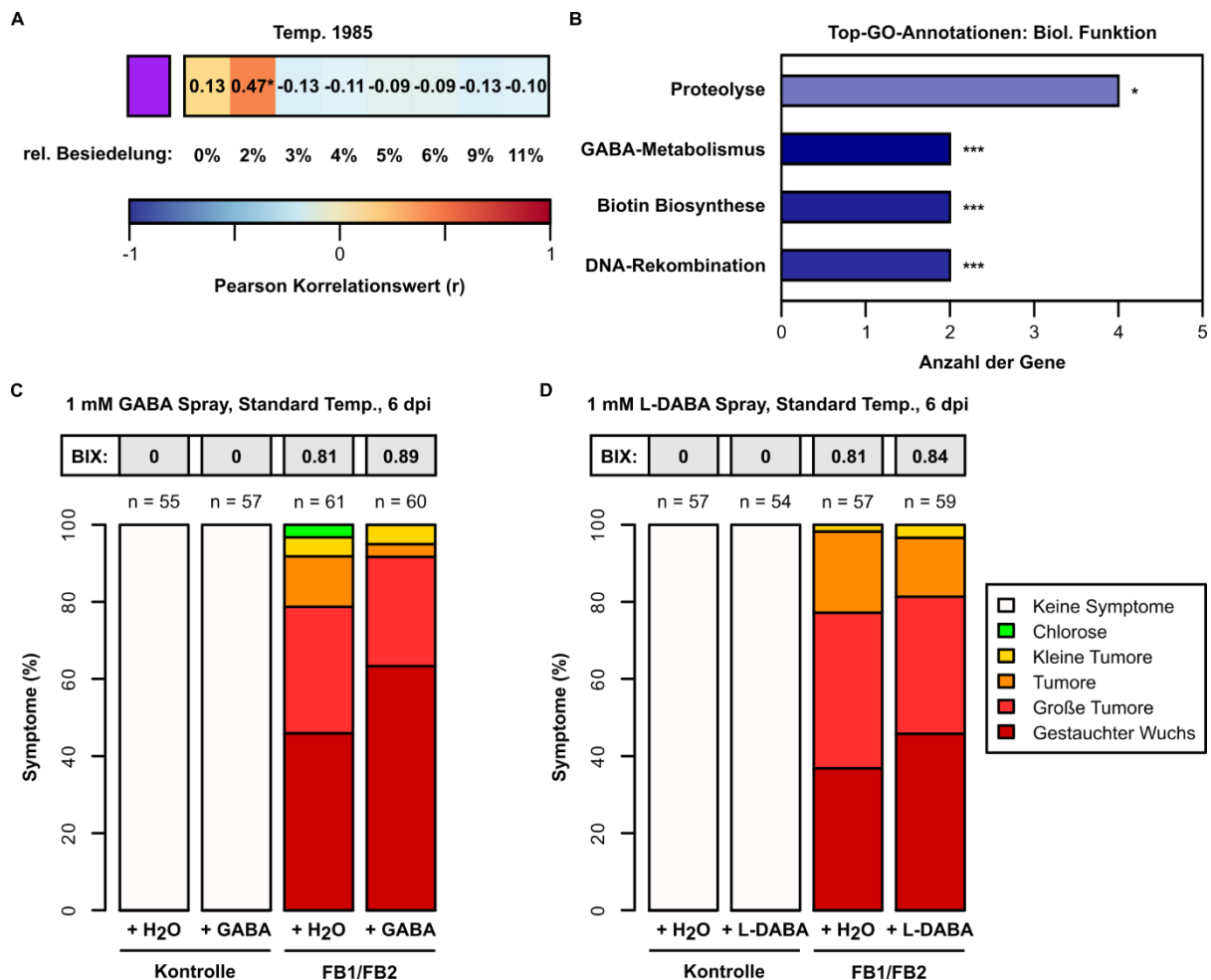


Abbildung 9: Analyse der Auswirkungen von GABA auf die Infektion von Mais mit *U. maydis*. (A) In Koexpressionsanalyse bei Temp. 1985 korreliert das Modul „Violett“ mit der niedrigsten relativen *U. maydis*-Besiedelung. (B) GO-Annotationen von DEGs aus dem Modul „Violett“ (C). Bonitur 6 dpi nach *U. maydis*-Infektionen (FB1/FB2) und täglicher Sprüh-Applikation von 1 mM GABA. *: p-Wert < 0,5; **: p-Wert < 0,01; ***: p-Wert < 0,001. (D) Bonitur 6 dpi nach *U. maydis*-Infektionen (FB1/FB2) und täglicher Sprüh-Applikation von 1 mM L-GABA (GABA-Synthesehemmer).

Um die Ergebnisse der Infektionsstudien mit GABA und L-DABA zu verifizieren wurden weitere Versuche durchgeführt. Dazu wurde das Wachstum von *U. maydis* in verschiedenen Flüssigmedien und das filamentöse Wachstum auf verschiedenen Festmedien getestet (Abbildung 9). Sowohl in Flüssigkultur mit GABA, als auch auf Festmedium mit GABA konnte ein langsames Wachstum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wuchsen die *U. maydis*-Zellen sowohl in Flüssigkultur mit L-DABA als auch auf Festmedium mit L-DABA nicht. Somit kann noch nicht eindeutig gesagt werden, ob GABA während der Infektion als Nährstoffquelle dient oder die ROS-Bildung negativ beeinflusst und so zur stärkeren Infektion beiträgt. Interessanterweise wird GABA verstärkt unter abiotischen Stressbedingungen akkumuliert, welche Klimawandel-bedingt in Zukunft häufiger auftreten werden und somit *U. maydis*-Infektionen begünstigen könnten [30].

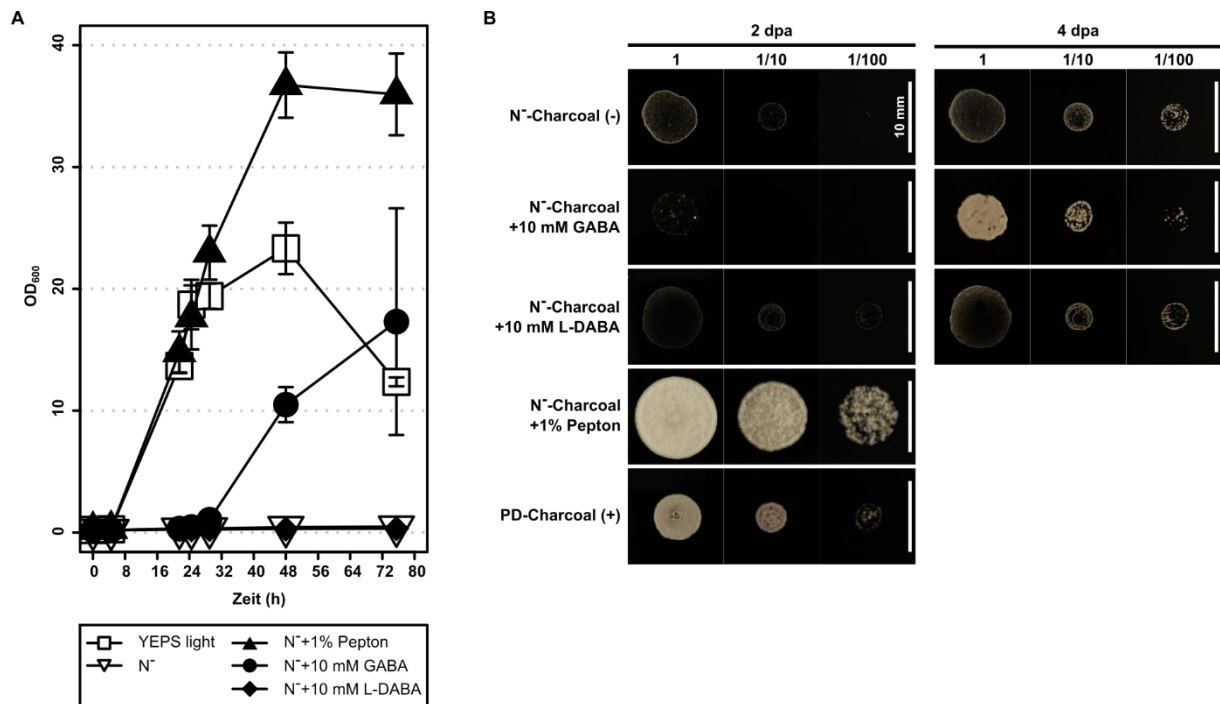


Abbildung 10: Analyse der Effekte von GABA und L-DABA auf das Wachstum von *U. maydis*. (A) Das Wachstum von *U. maydis* in verschiedenen Flüssigmedien wurde mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) bestimmt. Es wurde Vollmedium (YEPS light), Stickstoffmangelmedium (N^-) oder Stickstoffmangelmedium mit verschiedenen Stickstoffquellen verwendet. Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. (B) Die Filamentbildung von *U. maydis* wurde auf Festedium durch Zugabe von Aktivkohle (Charcoal) stimuliert. Es wurde Vollmedium (PD), Stickstoffmangelmedium (N^-) oder Stickstoffmangelmedium mit verschiedenen Stickstoffquellen verwendet.

4.2 AP2: Etablierung der Applikation exogener RNAs

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass *U. maydis*-Infektionen durch RNAi von in Mais exprimierten Suszeptibilitäts- und Resistenzfaktoren beeinflusst werden können. In diesen Studien wurde das PTGS entweder durch *virus-induced gene silencing* (VIGS) oder stabil transformierte *hairpin*-Konstrukte induziert [12, 15]. Da diese beiden Methoden zum Zeitpunkt der Antragstellung nicht für die deutsche Agrarwirtschaft zugelassen waren, soll in diesem Projekt in AP2 eine Methode entwickelt werden, um RNAi durch exogen aufgebraachte RNAs zu induzieren. Diese Methode soll anschließend dazu genutzt werden, die Translation von Suszeptibilitätsfaktoren durch PTGS zu inhibieren, um eine Infektion mit *U. maydis* zu verhindern. Für erste Versuche wurden die beiden Suszeptibilitätsfaktoren *ZmBax-Inhibitor1* (*BI1*) und *ZmCystatin9* (*CC9*) ausgewählt. Ihre Funktion als Suszeptibilitätsfaktoren während der Infektion mit *U. maydis* ist bereits bekannt [12, 15].

Im ersten Projektjahr wurden deshalb zunächst anhand des Programms „siFi21“ mögliche Ziel-Sequenzen in den Genen für *BI1* und *CC9* identifiziert, für die eine besonders hohe Effizienz zur Induktion von RNAi erwartet werden kann [31]. Mit Hilfe von *in vitro*-Transkription konnten diese RNA-Sequenzen synthetisiert werden. Da dieses Verfahren allerdings relativ kostenintensiv ist, wurde auch versucht, diese Sequenzen als dsRNA in *Escherichia coli* zu exprimieren. Im zweiten Projektjahr konnten wir dieses Verfahren etablieren (Abbildung 11).

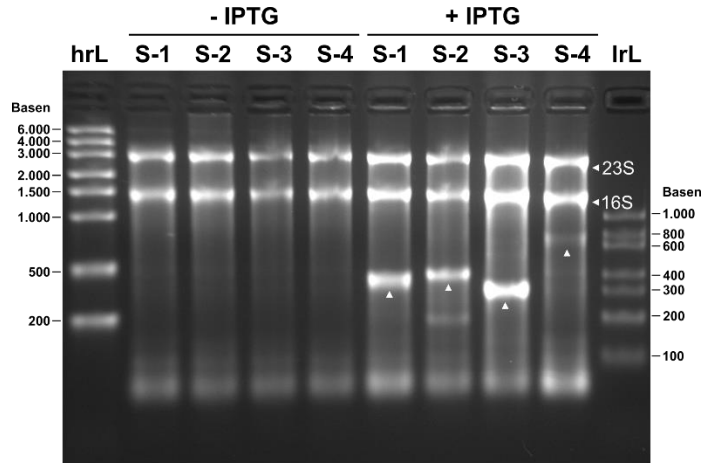


Abbildung 11 : Expression von verschiedenen *Phytoen-Desaturase* dsRNA-Fragmenten in *E. coli*. Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von total RNA aus vier verschiedenen *E. coli*-Stämmen (S-1 = Stamm1 *PDS*-Fragment, 423 bp; S-2 = Stamm-2 *PDS*-Fragment 425 bp; S-3 = Stamm-3 *PDS*-Fragment, 360 bp; S-4 = Stamm-4 *PDS*-Fragment 789 bp) vor und nach Induktion der Expression durch IPTG. Neben den erwarteten *PDS*-Fragmenten ist die 23S- und 16S-rRNA aus *E. coli* durch Pfeile markiert. Verwendete Größenstandards: RiboRuler High Range Ladder (hrL) und RiboRuler Low Range Ladder (IrL).

Die mittels *in vitro*-Transkription oder Expression in *E. coli* gewonnene RNA wurde bisher in fünf verschiedenen Applikationen verwendet (Tabelle 1). Teilweise wurden in diesen Experimenten auch verschiedene Additive verwendet. So wurden BioClay oder Korund als Trägermaterial für dsRNA verwendet, um die Aufnahme in die Pflanze zu erhöhen [15, 21]. Allerdings konnte in keinem der durchgeführten Experimente PTGS beobachtet werden. Daher wurden weitere Experimente begonnen zum PTGS von *Phytoene-Desaturase* (*PDS*), welches zur Weißfärbung der normalerweise grünen Pflanzenteile führt und somit einfach visuell ausgelesen werden kann. Für diese Experimente steht nun auch ein *PDS*-Fragment zur Verfügung, welches sich bereits in VIGS-Experimenten als funktional erwiesen hat [15].

Tabelle 1: Übersicht getesteter dsRNA-Anwendungen.

Anwendung	Zeitpunkt	Target	Additiv	Mais Linie
Injektion	Direkt nach Infektion	<i>BAX INHIBITOR 1</i>	Bio-Clay	A188
		<i>CYSTATIN9</i>	Bio-Clay	A188
Injektion	24 h vor Infektion	<i>BAX INHIBITOR1</i>	Bio-Clay	A188
		<i>CYSTATIN 9</i>	Bio-Clay	A188
		<i>TERPENE SYNTHASE 6</i>	Bio-Clay	A188
Sprühen (Niedrigdruck)	Direkt nach Infektion	<i>BAX INHIBITOR1</i>	Bio-Clay	A188
		<i>CYSTATIN 9</i>	Bio-Clay	A188
Sprühen (Hockdruck, 4 bar)	/	<i>PHYTYTOENE DESATURASE</i>	ohne	A188
Einreiben	/	<i>PHYTYTOENE DESATURASE</i>	Korund	A188

4.3 AP3: PTGS-induzierte sorten- und temperaturspezifisch Resistenz

Im AP3 sollte versucht werden, mit der in AP2 etablierten Methode, die Resistenz von Mais gegenüber *U. maydis* zu verbessern. Hierzu sollten zehn, der im AP1 identifizierten, potenziellen Suszeptibilitätsfaktoren gewählt und die entsprechenden exogenen RNA-Fragmente appliziert werden. Im Anschluss sollte die Stärke der Maisbeulenbrandinfektion auch hier durch Bonituren überprüft werden. Zusätzlich sollte das Pflanzenfrischgewicht, die Anzahl der Blätter und die Pflanzengröße am Ende des Experiments ermittelt werden, um unerwünschte Nebeneffekte der RNA-Applikation zu untersuchen. Als Kontrollen sollten hier sowohl nicht-infizierte als auch nicht RNA-behandelte Pflanzen der gleichen Sorte dienen. Da bisher keine effektive Methode zur RNA-Applikation in AP2 erarbeitet werden konnte, wurde AP3 noch nicht begonnen.

4.4 Aktualisierter Zeitplan

In TP7 sollen sowohl sorten- als auch temperaturbedingte Unterschiede in der *U. maydis*-Mais-Interaktion untersucht werden (AP1) und mittels Applikation exogener RNAs ein Sorten- und Temperatur-spezifischer Schutz von Mais gegen Maisbeulenbrand entwickelt werden (AP2 und AP3). Wie in Abschnitt 4.2 und 4.3 beschrieben konnte bisher noch keine Methode zur Applikation von exogenen RNAs, die zu PTGS in Mais führt, in diesem Projekt gefunden werden. Mit Professorin Dr. Aline Koch konnte eine weltweit führende Expertin im Bereich des Spray-RNA-basierten Pflanzenschutz an die Universität Regensburg rekrutiert werden. Wir erhoffen uns durch Kollaboration mit Professorin Dr. Aline Koch neue Impulse für die RNA-Applikation zu erhalten und werden, wie in

Tabelle 2 dargestellt, unsere Forschung in den verbleibenden Monaten auf diesen Teil des Projekts konzentrieren. Unter anderem soll die Aufnahme von exogene RNAs genauer untersucht werden. Hierzu sollen z. B. RNAs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die bisher gewonnen Daten zur RNA-Applikation zeigen aber auch den weiteren Forschungs- und damit einhergehenden Förderungsbedarf zur Etablierung von „Biopestiziden“ auf.

Die in diesem Bericht dargestellten bioinformatischen Analysen der gesammelten Phänotypierungsdaten in Korrelation mit den Transkriptom-Daten und die darauf basierende Identifizierung von CAN1 und des GABA *shunts* verdeutlichen das enorme Potenzial der in AP1 gesammelten Daten zur Identifizierung neuer Resistenzmechanismen in der *U. maydis*-Mais-Interaktion. Bei der Antragstellung wurde dieses Potenzial so wie das mögliche Interesse für die Öffentlichkeit nicht antizipiert (s. 4.5 und 4.6). Daher wurde jetzt in AP1 das Ziel Z4 formuliert, das vorsieht, dieses große Datenpaket schnellstmöglich zu publizieren.

Tabelle 2: Gantt-Chart mit detailliertem, aktuellem Zeitplan und Aufgaben (A) innerhalb der Arbeitspakete (AP) und angestrebte Ziele (Z).

AP1	Sorten- und Temperatur-bedingte Suszeptibilität	Jahr 1 (10/21-09/22)					Jahr 2 (10/22-09/23)					Jahr 3 (10/23-8/24)				
A1	Bonitur und Probennahme															
A2	RNAseq															
A3	Auswertung RNAseq															
Z1	Sorten- und Temperaturunterschiede			x												
Z2	Resistenz- und Suszeptibilitätsfaktoren							x						x		
Z3	Präsentation der Daten auf Kongress					x		x	x							
Z4	Publikation der Daten														x	
AP2	Etablierung der Applikation exogener RNAs	Jahr 1 (10/21-09/22)					Jahr 2 (10/22-09/23)					Jahr 3 (10/23-8/24)				
A1	RNA-Synthese															
A2	RNA-Applikationsversuche															
Z1	RNAi in Mais durch exogene RNAs															x
AP3	Krankheitstoleranz von Mais durch Applikation exogener RNAs	Jahr 1 (10/21-09/22)					Jahr 2 (10/22-09/23)					Jahr 3 (10/23-8/24)				
A1	RNA-Synthese															
A2	RNA-Applikation und Bonitur															
Z1	Präsentation der Daten auf Kongress															
Z2	Publikation der Daten															
Z3	Resistentere Maispflanzen															

4.5 Einordnung der Projektergebnisse und Darstellung des voraussichtlichen Nutzens

Im Februar 2024 ging die Nachricht, dass die letzten 12 Monate erstmals konstant 1,5 °C wärmer waren als vor der Industrialisierung, um die Welt. Es wird prognostiziert, dass die globale Erwärmung bis 2100 zu Ertragseinbußen von 10 - 22% in der Landwirtschaft führen wird [2-4]. Neben dem direkten Einfluss steigender Temperaturen auf die angebauten Pflanzen wird auch vorhergesagt, dass steigende Temperaturen zur erhöhter Suszeptibilität von Agrarpflanzen gegenüber Pathogenen führen werden und dass Pathogene virulenter werden [5, 6]. Um diese Prognosen experimentell zu testen, wurden zunächst die zukünftigen Temperaturen in Bayern unter drei verschiedenen Emissions-Szenarien (RCP2,6; RCP4,5 und RCP8.5) berechnet. Dabei wird eine Erwärmung von ca. 1,5 °C im Jahr 2050 im Vergleich zum Jahr 1985 bei einem RCP-Wert von 4,5 vorausgesagt. Basierend auf diesen vorausgesagten Temperaturdaten wurden verschiedene Temperatur-Szenarien entwickelt und *U. maydis*-Mais -Infektionstudien durchgeführt. Uns sind bisher keine experimentellen Pflanzen-Pathogen-Studien bekannt, die prognostizierte Temperaturdaten nutzen oder minimale Temperaturveränderung im Bereich von 1,5 °C untersuchen. Die gewonnen Boniturdaten, die eine deutliche Zunahme der *U. maydis*-Infektion bereits bei einer Temperturänderung von ca. 1,5 °C zeigen, gewinnen besonders in Bezug auf die Nachrichten zur globalen Erwärmung vom Februar an Bedeutung und haben durch die eingängige Visualisierung der Ergebnisse das Potenzial, auch der breiten Öffentlichkeit den Einfluss von Klimawandel-bedingten Temperaturveränderungen auf die Landwirtschaft in Bayern nahe zu bringen.

Neben den Boniturdaten wurden weitere Phänotypisierungsdaten gesammelt und 144 RNA-seq-Analysen durchgeführt, wodurch ein sehr umfangreicher Datensatz entstanden ist. Die

bis dato größte, veröffentlichte Phänotyp-Transkriptom-Studie der *U. maydis*-Mais-Infektion wurde nur bei einer einzelnen Temperaturbedingung durchgeführt und beinhaltet nur phänotypische Daten zur Symptomstärke [32]. An zwei Beispielen (CAN1 und GABA) konnte gezeigt werden, wie durch systematische Auswertung neue pflanzliche Faktoren der *U. maydis*-Mais-Interaktion identifiziert werden können. Damit stellen die in AP1 gewonnenen Daten eine wichtige neue Ressource in der Maisforschung dar, die z. B. zur Ertragsvorhersage eingesetzt werden können [33, 34].

Die Versuche zu CAN1 in verschiedenen Dent- und Flint-Maislinien verdeutlichen auch die allelische Variation zwischen verschiedenen Maislinien, die zur unterschiedlichen Suszeptibilität der Maislinien führt. Durch detaillierte Analysen unserer Daten können diese Variationen im EU-NAM-Genpool identifiziert werden und sowohl in der klassischen Züchtung als auch in der cisgenetischen oder *genome editing*-vermittelten Präzisionszüchtung eingesetzt werden. Seit Sommer 2023 liegt ein Vorschlag der EU-Kommission für eine Reform des EU-Gentechnikrechts vor. Gemäß dieses Vorschlags sollen bestimmte, über neue genomische Techniken erzeugte Pflanzen, vom Gentechnikrecht ausgenommen werden. Freilandversuche und der Anbau dieser Pflanzen wären dann in der EU nach einer einfachen Notifizierung möglich. Das Europäische Parlament hat diesem Gesetzentwurf bereits im Kern zugestimmt. Der EU-Rat hat derzeit noch keine Position festgelegt, so dass die sogenannten Trilog-Verhandlungen zum Gesetzentwurf noch nicht starten konnten.

Bisher konnte keine RNA-Applikationsmethode zur Induktion von PTGS in Mais etabliert werden (s. AP2). Unseres Wissens nach liegen keine Studien zur erfolgreichen RNA-Applikation in Mais vor. In den zwei bisher veröffentlichten Publikationen wurde jeweils Pathogen-infizierter Mais mit RNAs behandelt und hierdurch PTSG im Schadorganismus hervorgerufen [18, 23]. Mittlerweile konnte in vielen Studien nachgewiesen werden, dass durch den Einsatz von RNA-Sprays PTSG in Phytopathogenen induziert werden kann [35]. In den USA erfolgte im letzten Jahr die erste Zulassung eines RNA-Spray-basierten Pflanzenschutzmittels (Handelsname Ledprona), welches ab April 2024 vermarktet wird. Ledprona richtet sich gegen den Kartoffelkäfer [36]. Diese Option besteht in der *U. maydis*-Mais-Interaktion nicht, da *U. maydis* die für den RNAi-Mechanismus nötigen Enzyme nicht besitzt [37].

4.6 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts und Vernetzung

An dieser Stelle muss die enge Kollaboration mit dem Lehrstuhl von Prof. Chris-Carolin Schön hervorgehoben werden. Der Lehrstuhl hat TP7 durch die Bereitstellung von Saatgut die in diesem Bericht vorgestellten Versuche und daraus hervorgehenden Daten ermöglicht. Im Gegenzug wurde ein Teil der Versuche des TP10 in Regensburg durchgeführt. Hierbei wurde Doktorandin Betina Debastiani Benato sowohl bei der Durchführung der Versuche im Labor als auch durch die Bereitstellung von *state-of-the-art* Klimakammern, die große Versuchsansätze unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen, unterstützt. Des Weiteren ist Dr. Karina van der Linde Mitglied im Promotions-Mentorat von Betina Debastiani Benato.

Christian Schwarz hat die bisherigen Ergebnisse des Projekts auf der Botaniker Tagung 2022 in Bonn, auf dem Arbeitskreistreffen Wirt-Parasit 2023 in München und auf dem SFB924-Symposium in München der Fachwelt präsentiert. Bei diesen Präsentationen erhielt

unser Projekt so viel Zuspruch, dass Dr. Karina van der Linde eingeladen wurde, die Daten als *plenary speaker* in der Session „*Plant response to pathogens*“ beim 12. internationalen Kongress „*Plant Pathology*“ (ICPP) 2023 in Lyon vorzustellen. Im nächsten Schritt sollen die in AP1 gesammelten Daten der interessierten Öffentlichkeit und anderen Forschenden durch *open access* Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift zugänglich gemacht werden. Das entsprechende Manuskript soll Ende April 2024 zur Einsicht vor der Veröffentlichung beim Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz eingereicht werden. Insbesondere die in AP1 gewonnen Bonitur-Daten sind für die Öffentlichkeit einfach verständlich und zeigen eindrucksvoll, welche schwerwiegenden Auswirkungen minimale, Klimawandelbedingte Temperaturänderungen auf die Landwirtschaft in Bayern haben können. Daher soll, nach Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift, mittels Pressemitteilung der Universität Regensburg auf diese Daten aufmerksam gemacht werden.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Heutige Modelle zum Klimawandel prognostizieren, dass agrarwirtschaftliche Erträge sowohl durch den direkten Einfluss der steigenden Temperaturen als auch durch die damit einhergehenden Veränderungen des Pathogenbefalls bedroht sind. Der Großteil der Ackerflächen in Bayern wird zum Anbau von Mais genutzt, welcher neben der Verwertung in der Biogas-Produktion und der chemischen Industrie hauptsächlich zur Viehfütterung verwendet wird und als Zuckermais verkauft wird. Neben anderen Maisschädlingen treten auch in Bayern immer wieder Infektionen mit *Ustilago maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrands, auf. Dies führt zu einem Verlust von Biomasse, einer Verschlechterung der Siliereigenschaften und zur Verminderung der Maisfutteraufnahme von Milchvieh. Außerdem sind infizierte Kolben meist nicht für die Körnermaisproduktion verwendbar. Dennoch gibt es bis heute keine resistenten Maislinien und es stehen auch keine gegen *U. maydis* wirksamen Fungizide für den Feldanbau zur Verfügung. Daher sollten im Rahmen des Teilprojekts 7 im BayKlimaFit 2-Projektverbund die Auswirkungen der Maissortenwahl und der Klimawandelbedingten Temperaturänderungen auf das *U. maydis*-Mais-Pathosystem untersucht werden. Zudem sollten neuartige Methoden zum Pflanzenschutz mittels Applikation von RNA-Fragmenten entwickelt werden, um die Krankheitstoleranz von Mais zu verbessern und damit landwirtschaftliche Erträge in Bayern zu sichern.

Basierend auf der Auswertung der bayerischen Klimadaten kann für Bayern eine Erwärmung von 1,2 °C für die durchschnittliche Tagesmaximumtemperatur und 1,5 °C für die durchschnittliche Tagesminimumtemperatur für den Monat Mai im Jahr 2050 gegenüber dem Jahr 1985 prognostiziert werden. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass bereits diese minimale Klimawandelbedingte Veränderung der Temperatur zu deutlich verstärkten Infektionssymptomen im Vergleich zu den Temperaturbedingungen von 1985 führt. Auch kurzzeitiger Hitzestress wirkte sich in diesen Versuchen sehr negativ auf die Resistenz und die Biomassebildung vieler EU-NAM Maissorten aus. Zudem kann unter den vorausgesagten Temperaturbedingungen eine deutlich frühere Sporenbildung beobachtet werden, die wahrscheinlich in Zukunft zu häufigeren Infektionen und Reinfektionen innerhalb einer Vegetationsperiode führen kann, wodurch auf Dauer ein klimawandel-induzierter, sich selbstverstärkender Infektionskreislauf eingeleitet werden könnte. Besondere Brisanz erhalten diese Daten im Hinblick auf die aktuellen Nachrichten zur globalen Erwärmung um 1,5 °C.

Neben den phänotypischen Daten zur Infektion wurden auch umfangreiche Transkriptomdaten gesammelt. Mittels Korrelation dieser beiden Datenpakete und weiteren Versuchen konnte ein neuer Resistenzfaktor (CAN1) identifiziert werden sowie gezeigt werden, dass GABA die Infektion fördert. Diese beiden Beispiele verdeutlichen das Nutzungspotenzial dieser in TP7 erzeugten Datenpakete. In Zukunft können die gewonnenen Daten sowohl zur Ertragsvorhersage, aber auch für gezielte Züchtungsansätze genutzt werden, um so die Krankheitstoleranz von Mais unter den zukünftigen, Klimawandel-bedingt veränderten Temperaturbedingungen zu verbessern. Im Rahmen dieses Projekts wird auch versucht, eine Methode basierend auf der Applikation von RNAs zur Induktion von PTGS zum Pflanzenschutz zu etablieren. Die Studien hierzu werden mindestens bis zum Projektende dauern und eine weitere Förderung dieses Forschungsansatzes wäre wünschenswert.

Literaturverzeichnis

- [1] DMK (2016): Karten zum Maisanbau. <https://www.maiskomitee.de/public/Fakten.aspx/Statistik/Deutschland/Maisanbau>
- [2] Lobell, D.B., Schlenker, W., and Costa-Roberts, J. (2011): Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333, 616-620
- [3] Žydelis, R., Weihermüller, L., and Herbst, M. (2021): Future climate change will accelerate maize phenological development and increase yield in the Nemoral climate. *The Science of the total environment* 784, 147175
- [4] Han, Z., Zhang, B., Yang, L., and He, C. (2021): Assessment of the impact of future climate change on maize yield and water use efficiency in agro-pastoral ecotone of Northwestern China. *Journal of Agronomy and Crop Science* 207, 317-331
- [5] Hunjan, M.S., and Lore, J.S. (2020): Climate change: Impact on plant pathogens, diseases, and their management. In *Crop Protection Under Changing Climate*, K. Jabran, S. Florentine and B.S. Chauhan, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 85-100
- [6] Bregaglio, S., Donatelli, M., and Confalonieri, R. (2013): Fungal infections of rice, wheat, and grape in Europe in 203P 2050. *Agronomy for Sustainable Development* 33, 767-776
- [7] D. Wetterdienst: Tägliche Stationsmessungen des Maximums der Lufttemperatur in 2 m Höhe in °C, Station Waghäusel-Kirrlach am 09.05.2021, www.cdc.dwd.de/portal/shortlink/3ae117be-81c4-4872-91e2-8ed836c980fd
- [8] Sosso, D., van der Linde, K., Bezruczyk, M., Schuler, D., Schneider, K., Kämper, J., and Walbot, V. (2019): Sugar partitioning between *Ustilago maydis* and its host *Zea mays* L during infection. *Plant Physiol* 179, 1373-1385
- [9] LfL (2020): Maisbeulenbrand: Pflanzenschutz und Fütterung. https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/merkblaetter/maiseulenbrand_lfl-merkblatt.pdf
- [10] Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., et al. (2008): Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 56, 181-195
- [11] van der Linde, K., and Doehlemann, G. (2013): Utilizing virus induced gene silencing for the functional characterization of maize genes during infection with the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Methods in Molecular Biology*, Springer Science + Business Media 975, 47-60
- [12] van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A., Kumlehn, J., and Doehlemann, G. (2012): A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *Plant Cell* 24, 1285-1300
- [13] van der Linde, K., Mueller, A., Hemetsberger, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A.L., and Doehlemann, G. (2012): The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant signaling & behavior* 7, 1397-1401
- [14] Ziemann, S., van der Linde, K., Lahrmann, U., Acar, B., Kaschani, F., Colby, T., Kaiser, M., Ding, Y., Schmelz, E., Huffaker, A., et al. (2018): An apoplastic peptide activates salicylic acid signalling in maize. *Nature plants* 4, 172-180
- [15] van der Linde, K., Kastner, C., Kumlehn, J., Kahmann, R., and Doehlemann, G. (2011): Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. *New Phytol* 189, 471-483
- [16] Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M.L., and Papadopoulou, K. (2020): Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiol* 182, 38-50

- [17] Zotti, M., dos Santos, E.A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C.N.T., and Smaghe, G. (2018): RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag Sci* 74, 1239-1250
- [18] Gan, D., Zhang, J., Jiang, H., Jiang, T., Zhu, S., and Cheng, B. (2010): Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep* 29, 1261-1268
- [19] Shen, W., Yang, G., Chen, Y., Yan, P., Tuo, D., Li, X., and Zhou, P. (2014): Resistance of non-transgenic papaya plants to papaya ringspot virus (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. *Acta virologica* 58, 261-266
- [20] Lau, S.-E., Schwarzacher, T., Othman, R.Y., and Harikrishna, J.A. (2015): dsRNA silencing of an R2R3-MYB transcription factor affects flower cell shape in a *Dendrobium* hybrid. *BMC Plant Biology* 15, 194
- [21] Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., Fletcher, S.J., Carroll, B.J., Lu, G.Q., and Xu, Z.P. (2017): Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature plants* 3, 16207
- [22] Dalakouras, A., Wassenegger, M., McMillan, J.N., Cardoza, V., Maegele, I., Dadami, E., Runne, M., Krczal, G., and Wassenegger, M. (2016): Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of *in vitro*-synthesized small RNAs. *Front Plant Sci* 7, 1327
- [23] Li, H., Guan, R., Guo, H., and Miao, X. (2015): New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ* 38, 2277-2285
- [24] Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989): Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5878-5882
- [25] Moss, R.H., Edmonds, J.A., Hibbard, K.A., Manning, M.R., Rose, S.K., van Vuuren, D.P., Carter, T.R., Emori, S., Kainuma, M., Kram, T., et al. (2010): The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature* 463, 747-756
- [26] Zier, C. (2020): Das Bayerische Klimaprojektionsensemble - Audit und Ensemblebildung (Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU))
- [27] van der Linde, K., Timofejeva, L., Egger, R.L., Ilau, B., Hammond, R., Teng, C., Meyers, B.C., Doehlemann, G., and Walbot, V. (2018): Pathogen Trojan horse delivers bioactive host protein to alter maize (*Zea mays*) anther cell behavior *in situ*. *Plant Cell* 30, 528-542
- [28] Horst, R.J., Doehlemann, G., Wahl, R., Hofmann, J., Schmiedl, A., Kahmann, R., Kämper, J., Sonnewald, U., and Voll, L.M. (2010): *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant Physiol* 152, 293-308
- [29] Xu, B., Feng, X., Piechatzek, A., Zhang, S., Konrad, K.R., Kromdijk, J., Hedrich, R., and Gilliham, M. (2024): The GABA shunt contributes to ROS homeostasis in guard cells of Arabidopsis. *New Phytol* 241, 73-81
- [30] Hasan, M.M., Alabdallah, N.M., Alharbi, B.M., Waseem, M., Yao, G., Liu, X.D., Abd El-Gawad, H.G., El-Yazied, A.A., Ibrahim, M.F.M., Jahan, M.S., et al. (2021): GABA: A Key player in drought stress resistance in plants. *Int J Mol Sci* 22
- [31] Lück, S., Kreszies, T., Strickert, M., Schweizer, P., Kuhlmann, M., and Douchkov, D. (2019): siRNA-Finder (si-Fi) software for RNAi-target design and off-target prediction. *Frontiers in Plant Science* 10
- [32] Schurack, S., Depotter, J.R.L., Gupta, D., Thines, M., and Doehlemann, G. (2021): Comparative transcriptome profiling identifies maize line specificity of fungal effectors in the maize–*Ustilago maydis* interaction. *The Plant Journal* 106, 733-752
- [33] Chang, Y., Latham, J., Licht, M., and Wang, L. (2023): A data-driven crop model for maize yield prediction. *Communications Biology* 6, 439
- [34] Croci, M., Impollonia, G., Meroni, M., and Amaducci, S. (2023): Dynamic maize yield predictions using machine learning on multi-source data. *Remote Sensing* 15, 100

- [35] Rank, A.P., and Koch, A. (2021): Lab-to-field transition of RNA spray applications – How far are we? *Frontiers in Plant Science* 12
- [36] Rodrigues, T.B., Mishra, S.K., Sridharan, K., Barnes, E.R., Alyokhin, A., Tuttle, R., Kokulapalan, W., Garby, D., Skizim, N.J., Tang, Y.-w., et al. (2021): First sprayable double-stranded RNA-based biopesticide product targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Frontiers in Plant Science* 12
- [37] Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., Munsterkotter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G., et al. (2012): Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* 24, 1733-1745

Anhang

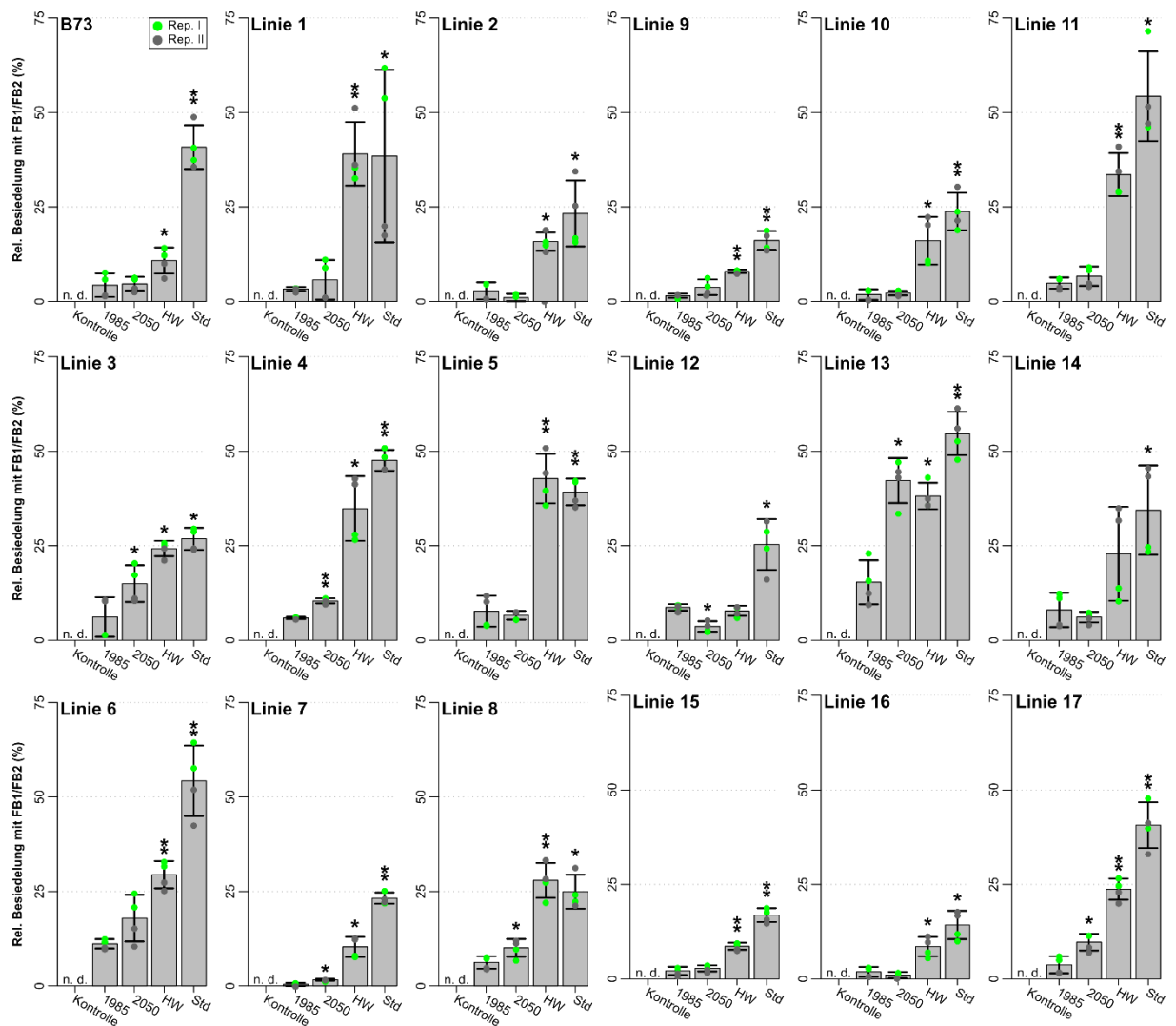


Abbildung 11: Quantifizierung der *U. maydis*-Besiedelung. Die quantitative qPCR-Experimente wurden mit Probenmaterial von Pflanzen 6 Tage nach der Infektion mit den *U. maydis* Wildtypstämmen FB1 und FB2 für alle verwendeten EU-NAM Linien unter vier verschiedenen Temperaturbedingungen (1985: Temperatur für 1985; 2050: Temperatur für 2050; HW: Hitzewelle; Std: Standard Temperatur) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt in zwei biologischen Replikaten (Rep. I, Rep. II) mit je zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Signifikanz wurde relativ zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle berechnet. *: p-Wert < 0,5; **: p-Wert < 0,01.