

## **Untersuchungen von Weizensorten sowie Genbankherkünften auf Resistenz gegenüber dem Weizenflugbrand (*Ustilago tritici* f. sp. *tritici*) als Basis zur züchterischen Entwicklung von Genotypen mit Eignung für den ökologischen Landbau**

**Investigations of resistance in wheat cultivars as well as genebank accessions to loose smut (*Ustilago tritici* f. sp. *tritici*) as a basis for the development of genotypes suitable for eco-farming systems**

**FKZ: 03OE646**

**Projektnehmer:**

Julius Kühn-Institut (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz  
Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg  
Tel.: +49 3946 47-602  
Fax: +49 3946 47-600  
E-Mail: [rs@jki.bund.de](mailto:rs@jki.bund.de)  
Internet: <http://www.jki.bund.de>

**Autoren:**

Hobert, Mirko; Ordon, Frank; Kopahnke, Doris

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)



# Bundesprogramm Ökologischer Landbau

## Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen  
Institut für Epidemiologie und Resistenzressourcen  
Erwin-Baur-Str. 27  
D-06484 Quedlinburg

Drittmittelträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Forschungsprojekt Nr.: 03OE646

**"Untersuchungen von Weizensorten sowie Genbankherkünften auf Resistenz gegenüber dem Weizenflugbrand (*Ustilago tritici* f. sp. *tritici*) als Basis zur züchterischen Entwicklung von Genotypen mit Eignung für den ökologischen Landbau"**

Laufzeit: 01.06.2004 bis 30.04.2007

Projektleiterin: Dr. Doris Kopahnke  
d.kopahnke@bafz.de

Bearbeiter: Mirko Hobert  
m.hobert@bafz.de

# 1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

## 1.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Flugbrand an Weizen (*Ustilago tritici* Pers. *Rostrup*) tritt weltweit auf, hat jedoch seine stärkste Verbreitung in humiden und semihumiden Klimabereichen. Er durchläuft im Jahr einen Vermehrungszyklus. Die flugbrandinfizierten Pflanzen entwickeln sich zunächst unauffällig im Bestand und sind nicht von gesunden Pflanzen zu unterscheiden. Erst beim Ährenschieben wird der Befall sichtbar: Infizierte Pflanzen schieben die Ähre früher als gesunde und bleiben etwas kleiner; zudem wird sichtbar, dass keine Körner ausgebildet wurden sondern die Ähre bis auf die Spindel ausschließlich aus der schwarzbraunen Sporenmasse des Pilzes besteht. Diese Brandsporenlager reißen kurz nach dem Ährenschieben auf und die Sporen verbreiten sich bis zu 150 m weit (FISCHER et al., 2002). Wenn eine Flugbrandspore in eine Blüte einer anderen Pflanze der Gattung *Triticum* gelangt, keimt sie und das Mycel wächst durch Narbe, Griffel oder durch das Pericarp in den Fruchtknoten, wo es in dem reifenden Embryo bis zur Aussaat in einem Ruhestadium überdauert.

Bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts gehörte der Flugbrand (*Ustilago* ssp.) zu den wichtigsten Getreidekrankheiten. In Einzelfällen kann bei hochanfälligen Sorten ein Befall von 20-50 % auftreten (HOFFMANN & SCHMUTTERER, 1983). Mit der Entwicklung und Einführung systemisch wirkender Fungizide bleibt das Auftreten in der konventionellen Landwirtschaft heute allgemein gering. Aufgrund dessen wurde die Resistenzzüchtung in Deutschland zugunsten anderer Aufgaben zurückgestellt. Nach wie vor ist jedoch die Bekämpfung des Flugbrandes eine wirtschaftlich notwendige Maßnahme. Da im ökologischen Landbau auf den Einsatz chemischer Fungizide und Beizmittel verzichtet wird und nach EU-Verordnung 2092/91/EWG seit 2004 das Saatgut ebenfalls aus ökologischem Anbau kommen muss, können Brandkrankheiten zu einer Gefahr für ökologisch arbeitende Betriebe werden. Zur Bekämpfung dieser saatgutübertragbaren Krankheit kommen nur biologische Präparate, physikalische Verfahren und der Anbau resistenter Sorten in Frage. Gegenwärtig ist keine der Behandlungsmethoden ausreichend zuverlässig, um den Flugbrandbefall für eine Anerkennung von Feldbeständen für die Saatguterzeugung nach den Grundsätzen des ökologischen Landbaus unter den gesetzten Grenzwerten zu halten. Bei Saatgutvermehrungsbeständen führt bereits ein geringer Besatz mit Flugbrandähren (bei Basissaatgut max. 3 Ähren auf 150 m<sup>2</sup>) zur Aberkennung des Saatgutes und somit zu finanziellen Einbußen.

Über das tatsächliche Niveau von Anfälligkeit oder Resistenz der zugelassenen Winter- und Sommerweizensorten gibt es nur wenige Informationen, obwohl generell Anfälligkeitsunterschiede zu erwarten sind. Für die Festlegung von Strategien zur züchterischen Bearbeitung des Weizens für den ökologischen Landbau sind jedoch entsprechende Angaben unerlässlich. Nach den Erfahrungen von NOVER & LEHMANN (1969) sind Resistenzprüfungen mit Flugbrand aufgrund der umweltbedingten großen Variabilität der Befallsstärke sehr langfristige Arbeiten. Dadurch bedingt ist die Züchtung auf flugbrandresistente Sorten mit hohem Zeit- und Materialaufwand verbunden. Die zu testenden Genotypen müssen im Feld oder Gewächshaus bis zur Blüte wachsen, um inokuliert zu werden und erst in der folgenden Kulturperiode ist zur Blüte die Reaktion der Pflanze auf die Krankheit zu erkennen. Diese Faktoren sprechen für eine Anwendung von modernen Diagnosemethoden, die möglichst in einem frühen Stadium der Pflanzenentwicklung einen verlässlichen Nachweis des Erregers in der Wirtspflanze ermöglichen, wie z.B. molekulare oder immunologische Verfahren (ECKSTEIN et al., 2002; EIBEL, 2002).

Eine zuverlässige und einfache Methode zur Inokulation, bei der mit Hilfe einer Spritze mit Injektionsnadel in jedes einzelne Blütchen eine Sporensuspension von *Ustilago* injiziert wird, wurde von POEHLMAN (1945) beschrieben. Untersuchungen über den optimalen Inokulationszeitpunkt auf den Infektionserfolg wurden fortgeführt. WICKE (1986) gibt die Arbeitsleistung mit 120 Ähren / h an, KNOX et al. (2002) beschreiben den Einsatz von 1 mg Sporen pro ml destilliertem Wasser im Wachstumsstadium 65 während der Blüte.

Die Arbeit mit Flugbrand wird durch das Auftreten von physiologischen Rassen erschwert. Die Angaben über das Vorkommen und die Anzahl identifizierter Rassen schwanken bei verschiedenen Autoren sehr stark, was wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Differentialsortimente zurückzuführen ist (BEVER, 1953; NIELSEN, 1969; MENZIES et al., 2003). Das in neueren Untersuchungen verwendete Differentialsortiment, um *Ustilago tritici* Rassen zu differenzieren, umfasst 19 Sommerweizensorten und –linien (FISCHER et al., 2002). Nach MCINTOSH et al. (1998) werden fünf Resistenzgene (Ut1 – Ut-x) gegen *Ustilago tritici*, und die entsprechenden Sorten, in denen sie beschrieben wurden, unterschieden. Bei der Bewertung des Flugbrandbefalls nach künstlicher Inokulation ist generell zu beachten, dass geschlossen blühende (kleistogame) Sorten in ihrer Anfälligkeit überbewertet werden können. Unter natürlichen Infektionsbedingungen und normalen Witterungsbedingungen sind diese Sorten nicht so befallsgefährdet, was auch als morphologische Resistenz bezeichnet wird (FISCHER et al., 2002; MÜLLER, 2005).

## **1.2 Planung und Ablauf des Projektes**

Zur Ermittlung von Resistenzunterschieden sollten zunächst Sommerweizensorten der beschreibenden Sortenliste auf ökologischer Fläche angebaut werden und mit einem Flugbrandisolat aus Deutschland künstlich infiziert werden. Alle Winterweizensorten der beschreibenden Sortenliste sollten mit einer natürlichen Infektion unter Feldbedingungen auf ihre mögliche Anfälligkeit hin geprüft werden. Parallel dazu sollte ein ELISA-Test als immunologischer Nachweis auf Flugbrandinfektion entwickelt werden.

### 1.2.1 Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz nach künstlicher Inokulation

Alle Sommerweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 sollten an einem ökologisch bewirtschafteten Standort künstlich mit Flugbrand inokuliert werden, um die Anfälligkeit der verschiedenen Sorten zu untersuchen. Die Inokulation in die Blüte erfolgte mit einer standardisierten Sporenmenge. Bonitiert wurde die Anzahl infizierter Ähren im Nachbau.

### 1.2.2 Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz nach natürlicher Infektion

Alle Sommer- und Winterweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 sollten, zusammen mit infizierten Sorten als Infektionsquelle, angebaut werden, um die Anfälligkeit der unterschiedlichen Sorten unter Feldbedingungen zu überprüfen. Im Nachbau des Folgejahres wurde die Anzahl infizierter Ähren bonitiert.

### 1.2.3 Charakterisierung der Flugbrandisolate

Die zur Verfügung stehenden Flugbrandisolate sollten mit Hilfe eines international genutzten Differentialsortimentes von verschiedenen Sommerweizensorten charakterisiert werden.

### 1.2.4 Entwicklung eines Tests zur Frühdiagnose

Es sollte ein ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-Assay) Test entwickelt werden, der den Pilz möglichst, im Gegensatz zu früheren Verfahren bei denen das Korn der Pflanze getestet wurde und damit die Pflanze für die Züchtung verloren ist, in Blattmaterial nachweisen kann, um eine einzelpflanzenspezifische Frühdiagnose bezüglich Flugbrandbefall erstellen zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchung der Vitalität der Flugbrandsporen**

Mit Sporen der gleichen Flugbrandähren, die für die Inokulation vorgesehen waren, wurde ein Keimungstest durchgeführt. Hierfür wurden die Sporen in Wasseragar [Agar Koba (Serva) 6 g / 1 H<sub>2</sub>O] über Nacht auf Objektträgern inkubiert und am folgenden Tag bonitiert.

### **2.2 Künstliche Inokulation von Winterweizen**

Für die Versuche mit Winterweizen unter natürlichen Infektionsbedingungen wurde infiziertes Saatgut als Inokulumquelle erzeugt. Es wurden 2004 die als anfällig beschriebenen Winterweizensorten ‚Toni‘, ‚Zentos‘, ‚Bussard‘ und ‚Batis‘ (MÜLLER, 2004) in 24er Töpfen mit Einheitserde P im Gewächshaus angezogen (5 Pflanzen / Topf) und künstlich mit einem Weizenflugbrandisolat, welches von Herrn Dr. Müller (Getreidezüchtungsforoschung Darzau) zur Verfügung gestellt wurde, inokuliert.

Das Inokulum für die Infektion bestand aus:

- autoklaviertem, destilliertem Wasser
- 1 % (v/v) Tween-20
- Weizenflugbrandsporen (1 g / l)

Infiziert wurde nach der Methode von POEHLMAN (1945). Dafür wurde eine 50 ml Spritze mit einer Injektionsnadel verwendet und in jedes einzelne Blütchen der Ähre ein Tropfen Inokulum injiziert.



**Abb. 1:** Inokulation der Blütenchen mit einer Injektionsspritze

Der optimale Zeitpunkt für eine Infektion mit Flugbrand ist relativ eng begrenzt (1-3 Tage) und liegt nach der erweiterten BBCH-Skala nach HACK et al. (1992) im Entwicklungsstadium 65 des Getreides, wenn 50 % der Staubbeutel reif sind. Es wurden jeweils nur Ähren inokuliert, die sich in diesem Stadium befanden. Die optimale Temperatur für einen erfolgreichen Infektionsverlauf beträgt 16-22 °C. Die reifen Ähren der infizierten Pflanzen wurden im Herbst per Hand geerntet und gedroschen.

### **2.3 Künstliche Inokulation von Sommerweizen**

Es wurden 2004 21 Sommerweizensorten (Weich- und Hartweizen), sowie drei Sommertriticalesorten der Beschreibenden Sortenliste (2004) an einem ökologisch bewirtschafteten Standort der Landesanstalt für Landwirtschaft in Bernburg ausgesät. Die Größe jeder Parzelle betrug 1 m<sup>2</sup> und es wurden pro Sorte 125 Körner ausgelegt. Um die Anlage herum wurde ein 1 m breiter Randstreifen der Sorte ‚Remus‘, welche als besonders anfällig gilt, gedrillt.

Aufgrund unterschiedlicher Beschreibungen in der Literatur (NOVER et al., 1969; FISCHER et al., 2002) wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Brandsporen im Versuch verwendet, um mögliche Unterschiede zwischen den Konzentrationen feststellen zu können. Es erfolgte Einzelblütcheninokulation mit einer Spritze (siehe 2.2).

Das Inokulum für die Infektion bestand aus:

- autoklaviertem, destilliertem Wasser
- 1 % (v/v) Tween-20
- 100 mg bzw. 1 g Weizenflugbrandsporen / l

Die reifen Ähren der infizierten Pflanzen wurden im Herbst per Hand geerntet und gedroschen. Für die Resistenzfeststellung wurden in der Vegetationsperiode 2005 ca. 450 Körner / Sorte im Freiland am Standort Bernburg nachgebaut. Für eine zeitige Aussage über den Erfolg der Infektion wurden zusätzlich drei Ähren / Sorte im Herbst 2004 im Gewächshaus in 13er Töpfen mit Fruhstorfer Erde Typ T ausgelegt, bei 18 °C und 16 h Licht kultiviert und auf die Anzahl Flugbrand tragender Ähren bonitiert. Zur besseren Einschätzung der Daten wurde eine Datenanalyse mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 vorgenommen.

## **2.4 Evaluierung von Winterweizen unter Feldbedingungen**

### Versuchsjahr 2004/05

Die 112 Winterweizenweizensorten der Beschreibenden Sortenliste (2004) wurden im Herbst 2004 am Standort Bernburg in einer randomisierten Blockanlage zweireihig, mit 25 Korn / Reihe, Parzellengröße 0,55 m<sup>2</sup>, in drei Wiederholungen ausgelegt. Als Infektionsquelle wurde das Saatgut der künstlich infizierten Pflanzen vom Frühjahr 2004 mit der Sorte ‚Bussard‘ vermischt, die als Rand und Zwischenstreifen (Infektionsstreifen) von Hand gedrillt wurde.

### Versuchsjahr 2005/06

Die erneute Aussaat der geernteten Körner erfolgte direkt nach der Aufarbeitung im Herbst 2005 in einer randomisierten Blockanlage mit vier Wiederholungen. Der gesamte Versuch wurde mit einer sechsstreifigen Drillmaschine (Wintersteiger, Hege 90) gesät. Die Parzellengröße betrug 1 m x 1,2 m und es wurden ca. 30 Körner / Reihe ausgebracht. Abbildung 2 zeigt die Versuchsfläche in Bernburg.



**Abb. 2:** Übersicht der Blockanlage / Flugbrandähren im Feldbestand

Aufgrund der geringen Anzahl infizierter Pflanzen, die als Inokulumquelle zur Verfügung standen, wurde der Nachbau der zum Teil infizierten Pflanzen, mit dem erneuten Infektionsversuch der Sortentestungen kombiniert in einem großen Schlag angebaut. Der Nachbau des Infektionsversuchs von 2004/05 diente somit als Inokulum für den aktuellen Test. Zur Sicherstellung des Vorhandenseins von Flugbrandähren wurden künstlich infizierte Körner aus 2.2 in mehreren Parzellen über den Schlag verteilt. Einen Ausschnitt der Versuchsanlage zeigt Abb. 3. Eine Spur beinhaltet sechs Reihen (drei Parzellen / Beet) und umfasst eine Länge von 20 Beeten. Die Pflanzen im Nachbau wurden in jeweils zweireihigen Parzellen gedrilht (farbig markiert), die Testsorten wurden in jeweils sechs Reihen gedrilht (3 Mal 2 Reihen).

Drillspur	Beet 1	Beet 2	Beet 3	Beet 4	Beet 5	Beet 6
Spur 26	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand
	1	50	1	51	100	149
	1	50	2	51	100	148
Spur 25	1	50	3	51	100	147
	2	49	4	52	99	146
	2	49	5	52	99	145

**Abb. 3:** Ausschnitt der Versuchsanlage

Der Versuch 2005/06 wurde, neben dem ökologisch bewirtschafteten Feld in Bernburg und dem Versuchsfeld der BAZ in Aschersleben, noch auf einem weiteren Standort der Firma Deutsche Saatveredelung AG (DSV) in Boldebeck (Mecklenburg) gedrillt.

## **2.5 Evaluierung von Sommerweizen unter Feldbedingungen**

### Versuchsjahr 2005

Die 21 Sommerweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 des Hart- und Weichweizens und die drei Sommertriticalesorten (im folgenden Text unter Sommerweizen zusammengefasst) wurden im Frühjahr 2005 am Standort Bernburg in einer randomisierten Blockanlage zweireihig, mit 30 Korn / Reihe, Parzellengröße 0,55 m<sup>2</sup>, in drei Wiederholungen ausgelegt. Als Infektionsquelle wurden die Körner der künstlich infizierten Pflanzen aus 2004 mit der Sorte 'Remus' vermischt als Rand und Zwischenstreifen (Infektionsstreifen) gedrillt.

### Versuchsjahr 2006

Die Aussaat der geernteten Körner erfolgte 2006 in einer randomisierten Blockanlage mit drei Wiederholungen. Der gesamte Versuch wurde mit einer sechsreihigen Drillmaschine (Hege 90) gedrillt. Die Parzellengröße betrug 1 m x 1,2 m und es wurden ca. 30 Körner / Reihe ausgebracht. Ebenso wie beim Winterweizen wurde vereinbart, den Sommerweizen an einem weiteren Standort, in Zappendorf, auf einem ökologisch bewirtschafteten Feld eines privaten Landwirtes, anzubauen. Der Versuchsaufbau entsprach dem in Abb. 3 gezeigten, da alle Versuche mit einer Drillmaschine ausgesät wurden.

## **2.6 Nachbau des natürlich infizierten Sommerweizens im Gewächshaus**

Die Ernte der Versuchsglieder 2006 erfolgte als Stichprobe von 12 Ähren / Parzelle. Diese wurden gedroschen und das Saatgut einer Wiederholung gemischt. Eine Stichprobe von ca. 25 Körnern / Wiederholung wurde in Keimrollen (Körner in zwei Lagen Vliespapier und einer Lage Folie eingerollt) zwei Wochen bei 5 °C angezogen. Die Pflanzen wurden anschließend in 77er Multitopfplatten (360 x 560 mm) mit Einheitserde P pikiert und bei 16 °C bis zum Ährenschieben kultiviert (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Pikieren in Multitopfplatten (im unteren Teil ist die geöffnete Keimrolle zu sehen)

Die Bonitur aller nachgebauten Versuche (Freiland und Gewächshaus) erfolgte durch Auszählen der Pflanzen mit Brandähren. Zur besseren Einschätzung der Daten wurde eine Datenanalyse mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 vorgenommen.

## **2.7 Nachbau des natürlich infizierten Winterweizens im Gewächshaus**

Die Ernte der Versuchsglieder 2006 erfolgte als Stichprobe von 12 Ähren / Parzelle. Diese wurden gedroschen und das Saatgut einer Wiederholung gemischt. Eine Stichprobe von ca. 25 Körnern / Wiederholung wurde in Keimrollen (Körner in zwei Lagen Vliespapier und einer Lage Folie eingerollt) bei 5 °C angezogen und weitere 5 Wochen bei 5 °C vernalisiert. Die Pflanzen wurden anschließend inklusive Vlies reihenweise direkt in Schalen (320 x 500 mm) mit Einheitserde P gesetzt und bei 16 °C bis zum Ährenschieben angezogen (siehe Abb.5).

Die Bonitur erfolgte durch Auszählen der Pflanzen mit Brandähren. Zur besseren Einschätzung der Daten wurde eine Datenanalyse mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 vorgenommen.



**Abb. 5:** Nachbau des natürlich infizierten Winterweichweizens im GwH 2007

## 2.8 Erfassung relevanter Merkmale für einen ökologischen Anbau

Im ökologischen Landbau, wo es zu keinem Einsatz von chemisch synthetischen Herbiziden kommt und eine mechanische Bearbeitung des Bodens nur bis zu einem begrenzten Entwicklungsstadium der Pflanze durchgeführt werden kann, ist es wichtig, dass die Pflanzen einen dichten Bestand bilden, in dem Wildkräuter wenig Chancen zum Auflaufen bekommen, die sogenannte „Beikrautregulierung durch Beschattung“.

Alle angebauten Sommer- und Winterweizensorten wurden hinsichtlich der Beschattung bonitiert. Dieser Parameter soll eine Aussage über die jeweilige „Ökoeignung“ der konventionellen Sorten erlauben. Die Beschattungsbonitur wurde im Versuchsjahr 2006 mit einem Belichtungsmessgerät durchgeführt, indem die Lichtstärke (in Lux) auf Bodenhöhe im Bestand für jede einzelne Sorte gemessen wurde. Als Referenz diente der jeweilige Messwert über dem Bestand. Nach Möglichkeit wurde die Messung bei gleichen Einstrahlungsbedingungen vorgenommen (13 h Mittags, wenig Bewölkung). Nach Umrechnung der erhaltenen Werte in prozentuale Werte, wurde eine Datenanalyse mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 durchgeführt.

## 2.9 Charakterisierung der Flugbrandisolate anhand eines Differentialsortimentes

Für alle Infektionsversuche zur Ermittlung der Anfälligkeit/Resistenz wurde ein Isolat von Dr. K.-J. Müller aus Darzau verwendet. Die Reaktion auf dem Testsortiment war nicht bekannt. Ein weiteres Isolat wurde 2005 aus Russland in Form von infiziertem Saatgut erhalten, welches jedoch nicht keimfähig war. Bei dem aus Ungarn (Szeged) erhaltenen Isolat handelte es sich um *Ustilago avenae* (Haferflugbrand), das nicht verwendet werden konnte.

2005 konnten zwei weitere Isolate in Form sporulierender Ähren aus Mecklenburg und Rumänien (Frau Dr. Ittu) analysiert werden.

Die Sporen tragenden Ähren wurden generell für eine längere Lagerung in Exsikkatoren über Silica (Roth) getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

Verwendete Isolate (Herkunft):

**D** (Darzau, NDS)

**NWM** (NordWestMecklenburg, MV)

**Ro** (Rumänien)

Es wurden Akzessionen der beschriebenen Differentialsortimente nach TIKHOMIROV (1983) und NIELSEN (1987) aus den Genbanken des Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben und des N.I. Vavilov Institut für Pflanzenzüchtung (VIR) in St. Petersburg beschafft. Eine Übersicht über das zusammengestellte Differentialsortiment gibt Tab.1.

**Tab. 1:** Differentialsortiment für die Rassencharakterisierung von *Ustilago tritici*

Lfd.Nr.	Sortimentsnr.	Sorte/Stamm	Resistenzgen
1	ATRI 5306/75	Diamant	
2	ATRI 8173/81	Sonop	
3	ATRI 394/74	Kota	Ut 2
4	ATRI 9723/98	Manitou	
5	ATRI 3996/79	Little Club	Ut 2
6	ATRI 11047/81	Wakooma (T. durum)	
7	ATRI 398/80	Marquillo	
8	ATRI 813/79	v. Rümkers Sommer-Dickkopf	
9	ATRI 406/82	Preston	
10	ATRI 26208/91 BS	Pentad	
11	ATRI 397/93	Marquis	
12	HTRI 1308/76	Thatcher	Ut 4
13	ATRI 1952/75	Reward Ottawa	
14	ATRI 25585/BS	Florence Aurore	Ut 1
15	ATRI 23419/BS	Renfrew	Ut 1
16	ATRI 22472/BS	Carma	Ut 3
17	ATRI 3653/81	Mindum (T. durum)	
18	ATRI 4425/00	Red Bobs	Ut 1
19	K 41173	Skala	
20	VI 08097	Reward	
21	VI 38411	Regent	
22	VI 43713	Giza 144	
23	VI 63480	Marroqui 588	

Die Sorten des Differentialsortimentes wurden in drei Wiederholungen in 13er Töpfen mit Fruhstorfer Erde Typ T bei 16 °C im Gewächshaus angezogen (5 Pflanzen / Topf).

Im Stadium 65 nach der erweiterten BBCH-Skala wurden die Pflanzen mittels 50 ml Spritze und Kanüle mit Flugbrandsporen inokuliert. Als Sporenkonzentration wurden 100 mg Sporen / l destilliertes Wasser mit 1 % (v/v) Tween-20 verwendet. Die Bonitur erfolgte beim Nachbau, durch Auszählen der Pflanzen mit Brandähren pro Akzession.

### **2.10 Anzucht von *Ustilago tritici* in vitro**

Flugbrandsporen wurden auf dem Standard-Nährmedium für Pilze, Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) mit Zugabe von 100 ppm Streptomycin, angezogen. Die weitere Kultivierung erfolgte auf Malz-Pepton-Agar (MPA) und Czapek-Dox-Pepton-Agar (CzPep) bei 19 °C und wenig Licht. Die genaue Zusammensetzung der Nährmedien ist Tabelle A1 im Anhang zu entnehmen. Als Referenz wurde ein *in vitro* Stamm (119.19) von *Ustilago tritici* aus der Kultursammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Niederlande) verwendet.

### **2.11 Entwicklung eines ELISA zur Frühdiagnose**

Für die ELISA-Testungen wurde von infizierten und gesunden Pflanzen jeweils ca. 100 mg Blattmaterial eines äußerlich gesunden Blattes geerntet, mit destilliertem Wasser abgespült und für spätere Tests bei -20 °C gelagert.

Für einen ELISA- Test für *Ustilago tritici* wurden Antikörper in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Frank Rabenstein vom Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik der BAZ in Kaninchen hergestellt. Voraussetzung war erfolgreich kultiviertes *Ustilago* Mycel *in vitro*, welches für die Immunisierung der Kaninchen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen musste. Das Mycel wurde von den Agarplatten vorsichtig abgenommen und in 1X PBS Puffer homogenisiert. Die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13000 X g entfernt und die Menge an gelösten Proteinen mit der Bestimmungsmethode nach BRADFORD (1976) gemessen. Diese Methode wurde mit Hilfe des 'Quick Start Bradford Protein Assay' der Firma Bio-Rad nach der Protokollbeschreibung durchgeführt. Die Proteinmenge für die 1. Injektion der Kaninchen wurde auf 100 µg / ml eingestellt, für alle weiteren Injektionen auf 1 mg / ml. Das Antigen aus der Probennahme im Januar 2006 wurde in einem Plattengebundenen (PTA) ELISA getestet. Der erste direkte (DAS) ELISA- Test erfolgte im September 2006 mit aufgereinigtem Immunglobulin der Klasse G (IgG) und dem zugehörigen Konjugat. Eine Übersicht des Immunisierungsschemas gibt Tabelle 2.

**Tab. 2:** Immunisierungsschema für *Ustilago tritici* in Kaninchen

1. Injektion:	22.11.2005	pro Kaninchen wurde 1 ml Antigenlösung mit Adjuvans complete 1:1 v/v gemischt (bis eine sehr homogene Suspension entsteht) und ca. 0,5 ml intramuskulär, und ca. 0,5 ml subkutan (sc) injiziert.
2. Injektion:	08.12.2005	1 ml Antigenlösung (in PBS) mit Adjuvans incomplete 1:1 v/v gemischt ca. 0,5 ml im und ca. 0,5 ml sc pro Tier injiziert.
1. Probeblutung:	15.12.2005	
3. Injektion:	21.12.2005	1 ml Antigenlösung + Adjuvans incomplete 0,5 ml im und 0,5 ml sc / Tier
4. Injektion:	05.01.2006	1 ml Antigenlösung + Adjuvans incomplete 0,5 ml im und 0,5 ml sc / Tier
2. Blutung:	17.01.2006	
Booster-Injektion:	15.08.2006	pro Kaninchen 1 ml Antigenlsg. mit 1:1 Adjuvans incomplete intramuskulär injizieren
3. Blutung:	25.08.2006	
4. Blutung:	01.09.2006	
5. Injektion:	21.03.2007	pro Kaninchen 1 ml Antigenlsg. mit 1:1 Adjuvans incomplete intramuskulär injizieren
Schlachten:	30.03.2007	

In den Übersichten in Anhang A sind die verwendeten Puffer und Lösungen, sowie die Methoden des PTA- und DAS-ELISA aufgelistet.

## 2.12 Westernblot zur Überprüfung der Antikörperreaktion

Da die Entwicklung eines Antikörpertests ein langwieriger Prozess ist, bei in umfangreichen Voruntersuchungen die Effektivität und Genauigkeit des Antiserums unter Beweis gestellt werden muß und ein Nachweis von *Ustilago*- Antigenkonzentrationen von unter 0,01 µg / ml nötig ist, um einen Nachweis aus aufgearbeitetem Pflanzenmaterial zu ermöglichen, wurde für eine Optimierung des ELISA ein Westernblot mit den aufgearbeiteten *Ustilago tritici* Antigenen durchgeführt. Dies war nötig, um eine Klärung der genauen Antigen-Antiserumreaktion im ELISA zu erlangen, indem geprüft wird, ob die Reaktion der Antikörper auf einer Bindung an Glykoproteinen oder Glykopeptiden beruht, wie es bei Pilzen der Fall sein kann (RABENSTEIN, F., mündliche Mitteilung). In diesem Fall hätte ein anderer Extraktionspuffer gewählt werden müssen. Der Westernblot gab zusätzlich die Möglichkeit, die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, indem Sporenprotein von *Ustilago nuda* und *Tilletia* ssp. im gleichen Test verwendet wurde.

Die verwendeten Puffer und Vorschriften finden sich in Anhang A.

### **2.13 Statistische Analyse**

Die Daten der Versuche mit künstlicher bzw. natürlicher Infektion der Sommer- und Winterweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004, sowie die Daten zur Bestimmung der Beschattung wurden für eine statistische Analyse mit der inversen Sinusfunktion transformiert. Mit dem ‚Shapiro-Wilk-Test‘ wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Bei einer schiefen Verteilung der Daten wurde ein nichtparametrisches Testverfahren nach ‚Kruskal-Wallis‘ gewählt. Normalverteilte Daten wurden in einer ANOVA verrechnet und mit dem ‚Tukey-Test‘ ein Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikpaketes SAS, Version 9.1 für Windows (SAS Institute Inc.) durchgeführt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Vitalität der verwendeten Sporen von *U. tritici***

Die Sporen wurden unter dem Lichtmikroskop bei 640facher Vergrößerung ausgezählt.

Objektträger 1) 157 ungekeimt - 207 gekeimt

Objektträger 2) 67 ungekeimt - 88 gekeimt

Objektträger 3) 55 ungekeimt - 76 gekeimt

Es wurden insgesamt 650 Sporen gezählt, von denen 371 Sporen gekeimt waren.

Die Keimungsrate betrug somit 57 %, was für eine Infektion der Pflanzen ausreichend ist, da mit jedem Tropfen Inokulum Millionen von Sporen in die Blütchen gelangen und theoretisch nur eine gekeimte Spore für eine erfolgreiche Infektion der Pflanze ausreichend ist.

### **3.2 Nachbau des künstlich infizierten Sommerweizens 2004 im Gewächshaus**

Die infizierten Ähren des Sommersortimentes vom Standort Bernburg wurden einzeln gedroschen. Von jeder Sorte wurden die Körner von 3 Ähren in Töpfen im Gewächshaus ausgelegt, um erste Erkenntnisse über den Infektionserfolg und etwaige sortentypische Unterschiede zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt und zeigen einen zufriedenstellenden Infektionserfolg.

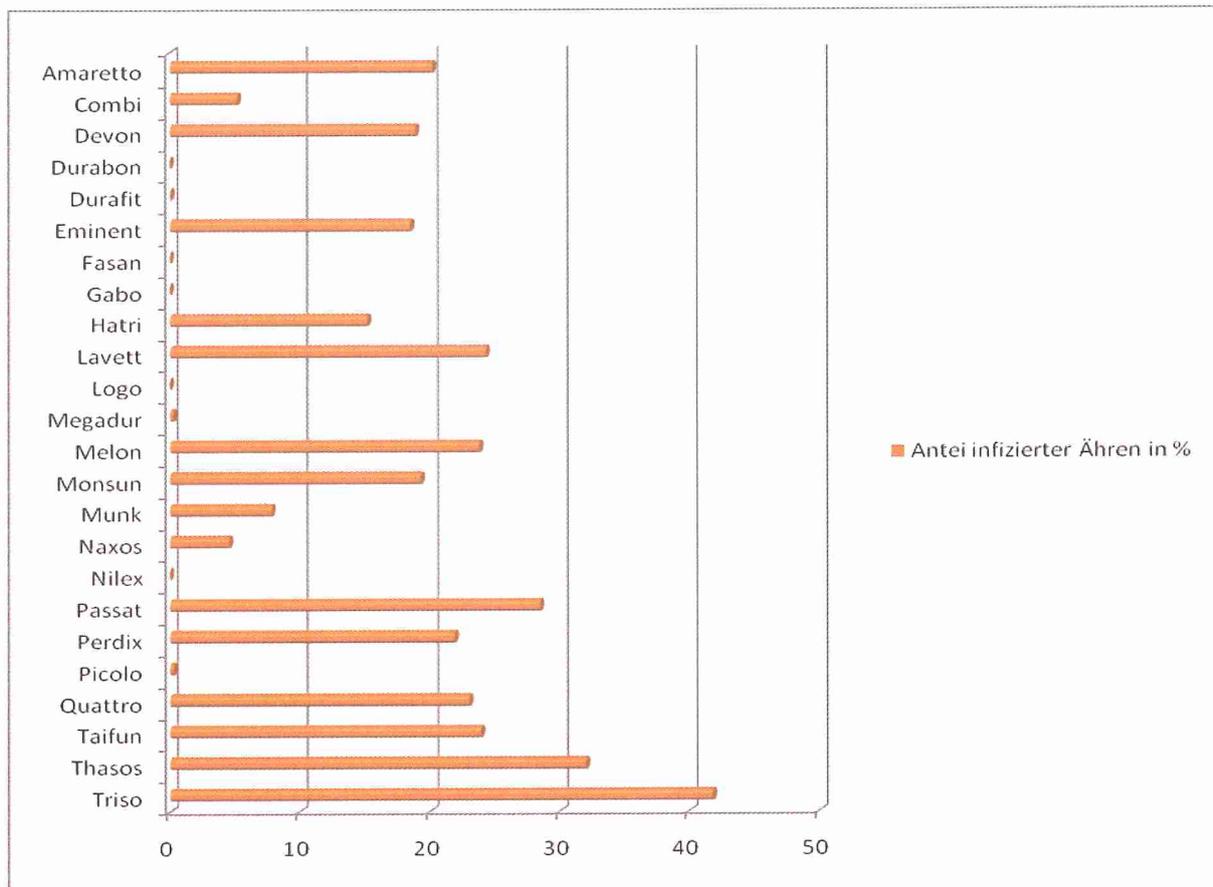
**Tab. 3:** Anzahl der Flugbrandähren im Verhältnis zur Gesamtanzahl bonitierter Ähren der jeweiligen Sorte. Gelb markiert sind die Sorten, bei denen kein Befall auftrat.

Sorte	Anz. Ähren	Flugbrand	%	Sorte	Anz. Ähren	Flugbrand	%
Amaretto	128	34	26,6	Melon	72	4	5,6
Combi	85	1	1,2	Monsun	74	0	0
Devon	61	45	73,8	Munk	119	9	7,6
Durabon	58	0	0	Naxos	79	3	3,8
Durafit	50	0	0	Nilex	67	0	0
Eminent	88	9	10,2	Passat	91	20	22
Fasan	40	0	0	Perdix	89	29	32,6
Gabo	90	0	0	Piccolo	82	1	1,2
Hatri	75	9	12	Quattro	87	47	54
Lavett	72	14	19,4	Taifun	87	31	35,6
Logo	100	0	0	Thasos	81	12	14,8
Megadur	91	0	0	Triso	54	19	35,2

Befallsfrei waren die Sommerweichweizensorten ‚Fasan‘ und ‚Monsun‘, die drei Sommerhartweizensorten ‚Durabon‘, ‚Durafit‘ und ‚Megadur‘, sowie die drei Sommertricalesorten ‚Gabo‘, ‚Logo‘ und ‚Nilex‘. Es wurden gesondert Körner ausgelegt, deren Ähren mit einer höheren Sporenkonzentration (1 g / l) inokuliert wurden. Die Konzentrationsunterschiede des Inokulums bewirkten keine Unterschiede in der Befallsstärke gegenüber der üblichen Sporenkonzentration von 0,1 g / l. Die Ergebnisse des Nachbaus unter Glas sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da jeweils nur drei Ähren pro Sorte angebaut wurden. Der Versuch diente hauptsächlich der frühzeitigen Information, ob die von uns verwendete Infektionsmethode erfolgreich gewesen ist.

### 3.3 Nachbau des künstlich infizierten Sommerweizens (2004) im Feld 2005

Die Bonitur erfolgte differenzierter als im Gewächshaus, wo lediglich die Anzahl der infizierten Ähren pro Sorte erfasst wurde. Zusätzlich zu der Information über den Befallsgrad der einzelnen Sorte, sollte die Befallssituation der Einzelpflanzen erfasst werden. Es wurde nicht nur die Anzahl der befallenen Ähren erfasst, sondern ebenso die Anzahl der mit Flugbrand befallenen Pflanzen. Zudem wurde unterschieden zwischen einer teilweise befallenen Pflanze, die sowohl befallene, als auch gesunde Ähren trägt und einer Pflanze, deren Ähren alle mit Flugbrand befallen sind. Um diese aufwändigere Bonitur durchführen zu können, mussten alle Pflanzen vereinzelt und gesondert betrachtet werden.



**Abb. 6:** Flugbrandinfektion nach künstlicher Inokulation (Freilandnachbau)

In Abbildung 6 ist die unterschiedliche Reaktion der Sorten auf eine künstliche Infektion mit *U. tritici* deutlich zu erkennen. Die Sommertriticale Sorten ‚Gabo‘, ‚Logo‘, ‚Nilex‘, die Sommerweichweizensorte ‚Fasan‘, sowie die Sommerhartweizensorte ‚Durabon‘ blieben befallsfrei. Die Sorten ‚Durafit‘ und ‚Megadur‘ (Hartweizen), die im Gewächshausnachbau keinen Befall zeigten, weisen im Freilandnachbau einen geringen Befall von unter einem Prozent auf. Die Sorte ‚Piccolo‘ zeigt auch im Freilandnachbau einen geringen Befall von unter einem Prozent. Ein großer Unterschied zeigt sich bei der Sorte ‚Monsun‘. Diese hatte keinen Flugbrand im Nachbau unter Glas, zeigt jedoch im Feldbestand einen deutlichen Befall von 19 %. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse ist Anhang B zu entnehmen. Bei einer Betrachtung der Einzelpflanze fallen die prozentualen Werte für eine Infektion nahezu doppelt so hoch aus. Die Bonitur auf teilweise oder gesamt befallene Pflanzen zeigte jedoch keine deutlichen Unterschiede zu der oben dargestellten Bonitur der Ähren, so dass diese wesentlich umfangreichere und aufwändigere Bonitur nicht weiter verfolgt wurde.

Entscheidend für eine Infektion ist, dass zum richtigen Stadium der Blüte inokuliert wird. Ist dies nicht der Fall, kann die Infektion fehlschlagen.

Ein sehr schnelles Wachstum der Pflanze oder nicht optimale Witterungsbedingungen können eine Sporulation bzw. Infektion verhindern. Die Unterschiede zwischen dem Nachbau unter Glas und dem Nachbau im Freiland resultieren aus dem Erfolg bzw. Misserfolg der Infektion in der vorangegangenen Kulturperiode. Bei drei nachgebauten Ähren (Bsp. ‚Monzun‘) kann gerade bei diesen Ähren die Infektion nicht erfolgreich verlaufen sein, was sich aufgrund der geringen Stichprobe entscheidend zu Gunsten einer falsch positiven Aussage widerspiegelt.

Zur besseren Einschätzung der Daten wurde eine Verrechnung mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 vorgenommen. Da die ermittelten Werte Prozentwerte sind, nicht der Normalverteilung unterliegen, und damit nicht direkt in eine Varianzanalyse einfließen dürfen (WEBER, E., 1986), wurden die Daten zunächst mit der inversen Sinusfunktion transformiert. Eine anschließende Prüfung auf Normalverteilung (die Grundvoraussetzung für eine Varianzanalyse) zeigte, dass die Daten auch nach der Transformation nicht normalverteilt sind (Shapiro-Wilk-Test). Es wurden deshalb die ursprünglichen Daten mit einem nichtparametrischen Verfahren, dem „Kruskal-Wallis-Test“ mit einer Rangsummenverteilung nach Wilcoxon getestet. Dieser Test zeigte signifikante Unterschiede der Sorten. Genauere Erkenntnisse können mit diesem Testverfahren nicht erhalten werden. Es wurde, um einen paarweisen Mittelwertvergleich und damit eine bessere Charakterisierung der Unterschiede der einzelnen Sorten zu erhalten, eine Varianzanalyse durchgeführt, auch wenn diese, aufgrund der schief verteilten Daten, eventuell die Grenzdifferenz zu groß schätzt.

Die Sorten unterscheiden sich hoch signifikant voneinander bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die Wiederholungen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Aus dem Vergleich der Mittelwerte mit dem Tukey-Test der studentisierten Spannweite geht hervor, dass sich die Sorten mit einer Grenzdifferenz von 18,3 signifikant unterscheiden. Das besagt, dass ein Unterschied zwischen zwei Sorten nur signifikant ist, wenn sie sich in der Befallsstärke um mindestens 18,3 % unterscheiden. Die befallsfreien Sorten unterscheiden sich somit nicht signifikant von der Sorte ‚Hatri‘, mit einem mittleren Befall von 15,1 %. Einzelheiten der Analyse sind den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen. Es ist zu beachten, dass die einzelnen Werte, aufgrund der oben erwähnten schiefen Verteilung der Daten, eine Ungenauigkeit aufweisen.

**Tab. 4:** Varianzanalyse Sommerweizen (künstliche Infektion)

	FG	MQ	F
Sorten	23	477.21467	14.19 *
Wdh	2	7.57646	0.23
Fehler	46	33.63460	
Gesamt	71		

\* Sorten unterscheiden sich signifikant bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %

**Tab. 5:** Tukey-Test künstlich infizierter Sommerweizensorten

Sorte	Mittelwert	Tukey-Gruppierung <sup>1)</sup>						
Triso	41.596	A						
Thasos	32.058	A	B					
Passat	28.728	A	B					
Lavett	24.398	A	B	C				
Taifun	24.230	A	B	C				
Melon	24.213	A	B	C				
Quattro	23.299		B	C	D			
Devon	21.358		B	C	D	E		
Perdix	21.292		B	C	D	E		
Amaretto	20.208		B	C	D	E		
Monsun	19.463		B	C	D	E		
Eminent	18.430		B	C	D	E	F	
Hatri	15.123		B	C	D	E	F	G
Munk	7.810			C	D	E	F	G
Combi	5.347				D	E	F	G
Naxos	4.436					E	F	G
Piccolo	0.324						F	G
Megadur	0.239						F	G
Durafit	0.094							G
Logo	0.000							G
Nilex	0.000							G
Durabon	0.000							G
Fasan	0.000							G
Gabo	0.000							G

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit P = 0.05

WILCOXON & SAARI (1996) haben eine Klassifizierung der Flugbrandreaktion nach künstlicher Infektion in fünf Klassen vorgenommen, die in Tab. 6 dargestellt ist.

**Tab. 6:** Reaktionsklassen bei *U. tritici*

Befall in %	Reaktionsklasse
0 - 10	resistent
11 - 30	moderat resistent
31 - 50	moderat anfällig
51 - 70	anfällig
über 70	hoch anfällig

In Anlehnung an diese Klassifizierung und die Erfahrungen von NIELSEN (1987) für die Prüfung von Differentialsortimenten, der ebenfalls eine Befallsreaktion von bis zu 10 % nach künstlicher Inokulation als resistent beschreibt, können von den hier geprüften Sommerweichweizensorten die Sorten ‚Fasan‘, ‚Combi‘, ‚Munk‘, ‚Naxos‘ und ‚Picolo‘ als resistent betrachtet werden, von den Sommerhartweizensorten alle drei Sorten (‚Durabon‘, ‚Durafit‘ und ‚Megadur‘), sowie die geprüften Sommertriticale ‚Nilex‘, ‚Logo‘ und ‚Gabo‘.

### 3.4 Bonitur der natürlichen Infektion des Sommerweizens 2006

Die Bonituren der 24 Sorten, die in drei Wiederholungen an drei verschiedenen Standorten (Aschersleben, Bernburg, Zappendorf) angebaut wurden, wurden mit der Statistik-Software SAS 9.1 verrechnet. Da die ermittelten Prozentwerte nicht direkt in eine Varianzanalyse einfließen dürfen (WEBER, E., 1986), wurden die Daten zunächst mit der inversen Sinusfunktion transformiert. Eine anschließende Prüfung auf Normalverteilung (die Grundvoraussetzung für eine Varianzanalyse) zeigte, dass die Daten auch nach der Transformation nicht normalverteilt sind. Es wurde deshalb mit einem nicht parametrischen Verfahren, dem „Kruskal-Wallis-Test“ mit einer Rangsummenverteilung nach Wilcoxon getestet. Dieser Test zeigte signifikante Unterschiede der Sorten an den unterschiedlichen Orten. Genauere Erkenntnisse können mit diesem Testverfahren nicht erhalten werden. Es wurde, um einen paarweisen Mittelwertvergleich und damit eine bessere Charakterisierung der Unterschiede der einzelnen Sorten zu erhalten, eine Varianzanalyse durchgeführt, auch wenn diese, aufgrund der schief verteilten Daten, eventuell die Grenzdifferenz zu groß schätzt. Anschließend folgte ein paarweiser Mittelwertvergleich mit dem Test nach Tukey.

**Tab. 7:** Varianzanalyse Sommerweizen 2006

	FG	MQ	F
Orte	2	0.7412561	2.01
Sorten	23	5.7652561	15.61 *
Wdh	2	0.4363755	1.18
Fehler	142	0.3693549	
Sorten x Orte	46	0.2792961	0.76
Gesamt	215		

\* Sorten unterscheiden sich signifikant bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %

Die Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied der einzelnen Sorten. Die 3 Wiederholungen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die 3 Orte zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, was auch nicht zu erwarten gewesen ist, da die Infektion im Jahr zuvor auf dem selben Standort erfolgt ist und der Nachbarbau allgemein weniger Einfluss auf den Befall mit Weizenflugbrand haben dürfte, als die Infektionsbedingungen zur Blütezeit der Pflanze. Es gibt keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Sorten und den Orten. Die signifikanten Unterschiede der einzelnen Sorten zeigt Tab.8.

**Tab. 8:** Tukey-Test der prozentualen Mittelwerte, Sommerweizen 2006

Sorte	Mittelwert	Tukey-Test <sup>1)</sup>
Quattro	3.3512	A
Star	1.6959	B
Triso	1.6277	B C
Taifun	1.5394	B C D
Passat	1.5089	B C D
Melon	1.4524	B C D
Naxos	1.1890	B C D E
Thasos	1.1745	B C D E
Tybalt	1.0632	B C D E F
Eminent	0.7451	B C D E F G
Amaretto	0.6296	C D E F G
Monsun	0.5967	C D E F G
Perdix	0.5385	D E F G
Melissos	0.5345	D E F G
Lona	0.5327	D E F G
Granny	0.3492	E F G
Combi	0.2206	E F G
Safrania	0.1584	E F G
Piccolo	0.0637	F G
Epos	0.0474	F G
Durabon	0.0000	G
Megadur	0.0000	G
Fasan	0.0000	G
Durafit	0.0000	G

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit P = 0.05

Allgemein sind die Werte der einzelnen Sorten mit einem maximalen Befall von 3,4 % sehr gering. Auch wenn einige Sorten befallsfrei geblieben sind, gibt es, in Bezug auf den Flugbrandbefall, keine signifikanten Unterschiede zwischen ‚befallsfrei‘ und einem Befall von 1,063 % (Grenzdifferenz).

### 3.5 Bonitur der natürlichen Infektion des Winterweizens 2006

Die Bonituren der 112 Sorten, die in drei Wiederholungen an drei verschiedenen Standorten (Aschersleben, Bernburg, Boldebeck) angebaut wurden, wurden mit der Statistik-Software SAS 9.1 verrechnet. Da die ermittelten Prozentwerte nicht direkt in eine Varianzanalyse einfließen dürfen wurden die Daten zunächst mit der inversen Sinusfunktion transformiert. Eine anschließende Prüfung auf Normalverteilung zeigte ebenfalls eine schiefe Verteilung der Daten. Es wurde deshalb mit einem nicht parametrischen Verfahren, dem „Kruskal-Wallis-Test“ mit einer Rangsummenverteilung nach Wilcoxon getestet. Dieser Test zeigte signifikante Unterschiede der Sorten. Genauere Erkenntnisse können mit diesem Testverfahren nicht erhalten werden. Es wurde, um einen paarweisen Mittelwertvergleich und damit eine bessere Charakterisierung der Unterschiede der einzelnen Sorten zu erhalten, mit den prozentualen Einzelwerten eine Varianzanalyse durchgeführt, auch wenn diese, aufgrund der schief verteilten Daten, eventuell die Grenzdifferenz zu groß schätzt. Anschließend folgte ein paarweiser Mittelwertvergleich mit dem Test nach Tukey.

**Tab. 9:** Varianzanalyse Winterweizen 2006

	FG	MQ	F
Orte	2	0.29941615	7.1*
Sorten	111	0.11629689	2.76 *
Wdh	2	0.02733390	0.65
Fehler	670	0.04216692	
Sorten x Orte	222	0.03556189	0.84
Gesamt	1007		

\* unterscheiden sich signifikant bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %

Die Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied der einzelnen Sorten. Die 3 Wiederholungen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Orte zeigen einen signifikanten Unterschied. Wie bereits in 3.1.5 beschreiben, wäre dies nicht zu erwarten gewesen. In Tabelle 10 ist jedoch deutlich zu sehen, dass sich der Standort Boldebeck deutlich von den anderen beiden Standorten ASL und BBG unterscheidet. In Boldebeck ist der Boden, im Vergleich zu den Bördeböden von ASL und BBG mit hohen Bodenzahlen, sehr sandig und von geringerer Bodenzahl. Hinzu kam, dass es in 2006 am Standort Boldebeck sehr heiß und trocken gewesen ist (KÖSTER, R., mündliche Mitt.) und die Pflanzen an diesem Standort allgemein einen schlechteren Wuchs aufwiesen. Die befallenen Pflanzen können somit früher gereift sein, bevor der Pilz sich in der Pflanze ausbreiten konnte.

Ebenso muss bei den Versuchen mit Weizenflugbrand immer berücksichtigt werden, dass der Nachbau einer sehr kleinen Stichprobe die Befallssituation nur ungenügend wiedergibt. Signifikante Wechselwirkungen zwischen den Sorten und den Orten gab es nicht.

**Tab. 10:** Vergleich der Orte

Ort	Mittelwert	Tukey Gruppierung <sup>1)</sup>
BBG	0.06520	A
ASL	0.04889	A
BBUCK	0.00731	B

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit  $P = 0.05$

**Tab. 11:** Tukey-Test Winterweizen 2006

Sorte	Mittelwert	Tukey-Test <sup>1)</sup>
Toronto	0.79017	A
Astron	0.69585	A B
Opus	0.31767	B C
Terrier	0.29563	B C
Korund	0.24262	C
Koch	0.18526	C
Madrid	0.17593	C
Wenga	0.15700	C

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit  $P = 0.05$

Tabelle 11 zeigt nur einen Ausschnitt über acht Sorten, da alle weiteren Sorten mit geringeren Befallswerten in die Gruppe C eingeteilt wurden und es keine signifikanten Unterschiede gibt, außer zu den Sorten der Gruppen B und A. Die vollständige Liste ist im Anhang B dargestellt. Die prozentualen Befallswerte der einzelnen Sorten, mit einem maximalen Befall von 0,8 %, sind sehr gering. Der überwiegende Teil der Sorten (84) ist befallsfrei geblieben. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen befallsfreien Pflanzen und Pflanzen mit einem Befall von 0,42 % (Grenzdifferenz). Die Sorten ‚Toronto‘ und ‚Astron‘ bilden eine Gruppe; eine zweite Gruppe B beinhaltet ebenfalls ‚Astron‘ und die beiden Sorten ‚Opus‘ und ‚Terrier‘. Alle anderen, inklusive der Sorten ‚Opus‘ und ‚Terrier‘, gehören zur Gruppe C.

Bei einem Vergleich mit den von MÜLLER (2005) getesteten Winterweizensorten kann aufgrund des hohen Prozentsatzes an nicht befallenen Pflanzen kein Zusammenhang hergestellt werden.

Unterschiede zwischen befallsfreien (resistent) und infizierten Pflanzen lassen sich mit der natürlichen Infektion bei einem sehr geringen Befallsgrad nicht ermitteln. Hierfür müssten wesentlich größere Flächen infiziert und nachgebaut werden.

Eine Einschätzung der Gefährdung von Flächen, auf denen Flugbrand im ökologischen Landbau vorkommt, und inwieweit sich der Befall in Folgejahren in einem Betrieb potenzieren würde, kann mit dieser Untersuchungsmethode nicht hinreichend genau bestimmt werden, da ein weiterer Nachbau des Bestandes nicht erfolgt ist.

### 3.6 Bestimmung der ökologisch relevanten Parameter

Als Parameter für eine erfolgreiche Wildkrautunterdrückung wurde die Beschattung des Bodens durch den Pflanzenbestand gewählt. Die einzelnen Parzellen waren gleichmäßig mit einer sechsreihigen Drillmaschine (Wintersteiger, Hege 90) im seedmatic Verfahren ausgesät worden. Es wurde der Einstrahlungswert in Lux erfasst und daraus die prozentuale Verringerung der Lichtstärke pro Sorte und Wiederholung ermittelt. Die Daten wurden für eine Varianzanalyse in SAS 9.1 mit der inversen Sinusfunktion transformiert und auf Normalverteilung getestet. Diese Annahme wurde für Sommer- und Winterweizen mit dem „Shapiro-Wilk-Test“ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % abgelehnt. Aufgrund der schiefen Verteilung der Daten, wurde der „Kruskal-Wallis-Test“ zur Berechnung von Unterschieden verwendet.

Der Sommerweizen zeigte sowohl im nichtparametrischen Testverfahren, als auch in der Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede der Sorten (Tab.12). Ein Mittelwertvergleich nach Tukey gruppierte alle Sorten in eine Gruppe (Daten nicht gezeigt).

Beim Winterweizen gibt es signifikante Unterschiede der Sorten in ihrem Beschattungsvermögen. Eine anschließende Varianzanalyse zeigte, dass sich die Wiederholungen ebenfalls signifikant voneinander unterscheiden. Der Vergleich der Mittelwerte nach Tukey zeigte, dass sich nur die Sorten ‚Dream‘, ‚Skater‘ und ‚Champion‘ unterscheiden. Alle weiteren Sorten gruppieren sich mit keinen signifikanten Unterschieden untereinander. Die Tabellen 13 und 14 zeigen die wesentlichen Ergebnisse der statistischen Analyse.

**Tab. 12:** Varianzanalyse für Beschattung von Sommerweizen

	FG	MQ	F
24 Sorten	23	0.06707115	1.68
3 Wdh	2	0.00993203	2.87
Fehler	46	0.07961663	
Gesamt	71		

**Tab. 13** Varianzanalyse für Beschattung von Winterweizen

	FG	MQ	F
Sorten	111	0.01206920	1.55 *
Wdh	2	0.10822940	13.92 *
Fehler	222	0.00777331	
Gesamt	335		

\* signifikante Unterschiede bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%

**Tab. 14** Vergleich der Mittelwerte (Winterweizen)

Sorte	Mittelwert	Tukey-Test <sup>1)</sup>
Dream	1.23594	A
Ranger	1.22575	A B
Mandub	1.18558	A B C
Compliment	0.93903	A B C
Skater	0.91502	B C
Champion	0.90673	C

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit  $P=0.05$

In Tabelle 14 sind nur die Unterschiede in der oberen bzw. unteren Region der Gesamttabelle gezeigt, da alle weiteren Sorten in allen drei Gruppen (A, B und C) gruppieren.

Die Mittelwerte in der statistischen Analyse stellen keine absoluten Werte dar, sondern die transformierten Werte. Die absoluten Mittelwerte der Beschattungsintensität beim Sommerweizen (Verringerung der Einstrahlung in %) liegen zwischen 98 % (,Quattro' und ,Safrania') und 95 % (,Granny', ,Durabon', ,Durafit' und ,Megadur'); beim Winterweizen zwischen 94 % (,Dream') und 77 % (,Champion').

### 3.7 Rassencharakterisierung anhand eines Differentialsortimentes

Die Betreuung des Differentialsortimentes war sehr zeitintensiv, da die Sorten sehr ungleichmäßig abblühten und einige Genotypen nur sehr kleine Ähren bildeten, wodurch eine erfolgreiche Inokulation erschwert wurde. Es wurden alle Genotypen in drei Wiederholungen mit allen drei Isolaten (D, NWM, Ro) künstlich infiziert (15 Pflanzen / Wdh.). Bei der Auswertung wurden, in Anlehnung an NIELSEN (1987), Isolate mit einer Pflanzenreaktion von unter 10 % als ,nicht virulent' gewertet. Die Reaktion der einzelnen Sorten und Linien des Differentialsortimentes sind in Tab. 15 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Reaktion der Pflanzen auf die einzelnen Isolate sich nicht wesentlich unterscheidet. Die Sorten ,Preston' und ,Red Bobs' können deutlich die beiden deutschen Isolate von dem rumänischen Isolat differenzieren. Die Reaktion der Sorte ,Reward' kann zur Unterscheidung des Isolates aus Darzau von den anderen beiden verwendet werden.

Das Isolat aus Nordwestmecklenburg lässt sich mit der Sorte ‚Kota‘ abgrenzen. Es zeigt sich, dass eine Rassenzugehörigkeit beim Flugbrand nicht mit der geografischen Herkunft korreliert, was auch schon von NIELSEN et al. (1987) beschreiben wurde.

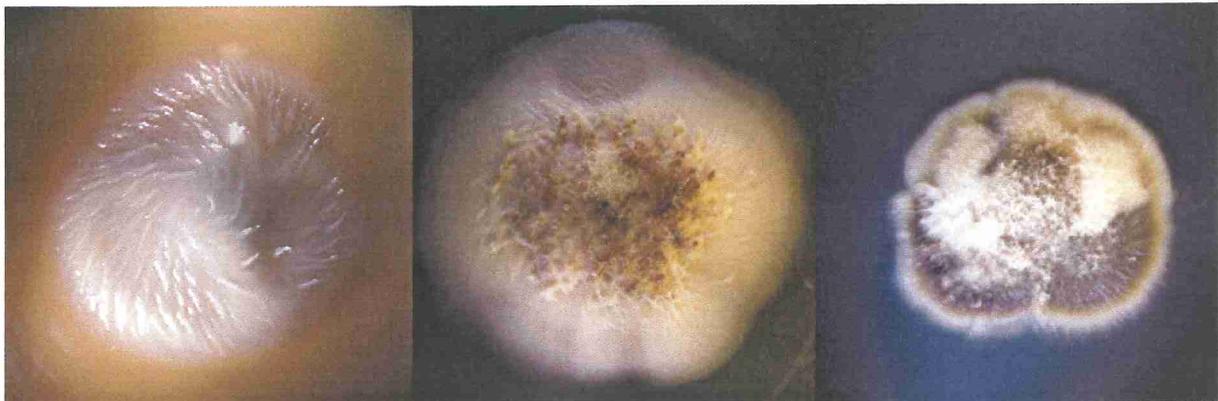
Es konnten Übereinstimmungen, mit in der Literatur veröffentlichten Rassen (TIKHOMIROV, 1983; NIELSEN, 1987), hergestellt werden. Das Isolat aus Rumänien zeigt, verglichen mit den Linien des Differentialsortimentes von NIELSEN (1987) eine Übereinstimmung der Reaktion mit der beschriebenen Rasse 8. Es waren in dem eigenen Test jedoch nicht alle Linien, die Nielsen verwendet hatte, vorhanden. TIKHOMIROV (1983) hat 60 verschiedene Rassen differenziert und es konnten mehrere Übereinstimmungen gefunden werden, wobei nur die vorhandenen Linien bewertet werden konnten. Das Isolat aus Darzau zeigt eine übereinstimmende Reaktion mit der Rasse 42. Das Isolat aus Nordwestmecklenburg reagiert auf den vorhandenen Sorten wie die Rasse Nr. 18 und das Rumänische Isolat zeigt mehrere Übereinstimmungen, die den beschriebenen Rassen 12, 30, 31 und 40 zugeordnet werden konnten.

**Tab. 15:** Übersicht der Reaktion der Sorten auf die unterschiedlichen Isolate  
(eine Befallsreaktion ist farbig hervorgehoben)

		Darzau	NWM	Romania
1	Diamant			
2	Sonop			
3	Kota			
4	Manitou			
5	Little Club			
6	Wakooma			
7	Marquillo			
8	v. Rümkers Sommer-Dickkopf			
9	Preston			
10	Pentad			
11	Marquis			
12	Thatcher			
13	Reward Ottawa			
14	Florence Aurore			
15	Renfrew			
16	Carma			
17	Mindum			
18	Red Bobs			
19	Skala			
20	Reward			
21	Regent			
22	Giza 144			
23	Marroqui 588			

### 3.8 Kultur von *Ustilago tritici* *in vitro*

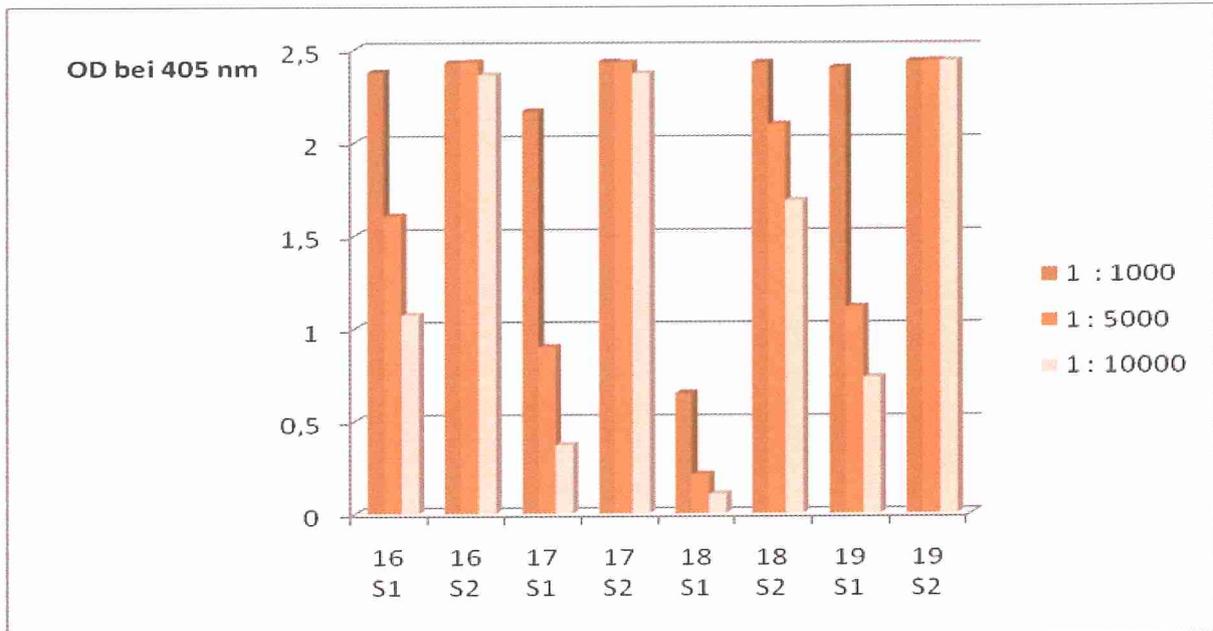
Für Untersuchungen zur Charakterisierung verschiedener Flugbrandisolate wurde versucht den Flugbrand auf Nährmedium anzuziehen, was für fakultativ biotrophe Pilze grundsätzlich möglich ist. Aufgrund einer hohen Kontamination der natürlichen Sporenmasse mit Mikroorganismen musste mehrfach überimpft werden, um eine Reinkultur von *Ustilago* zu erhalten. Die Kultur erfolgte weiterhin auf allen drei Medien, da die Koloniemorphologie auf den einzelnen Medien sehr unterschiedlich ausfällt und kein Medium als besser oder schlechter geeignet beurteilt werden kann. Die Reinheit der aus Sporen angezogenen Isolate konnte erhöht werden, einige sind jedoch immer noch mit anderen Mikroorganismen wie Hefen und anderen Pilzen (Saprophyten an den Flugbrandähren) vergesellschaftet. Das Wachstum des Referenzstammes entspricht dem der eigenen Isolate, wobei Flugbrand *in vitro* auf verschiedenen Medien unterschiedliche Koloniemorphologien aufweist (siehe Abb. 7), wie es z.B. auch bei *Fusarium* -Kulturen auf synthetischen Nährmedien zu beobachten ist.



**Abb. 7:** Wachstum von *U. tritici* auf PDYA, MPA und CzPep.

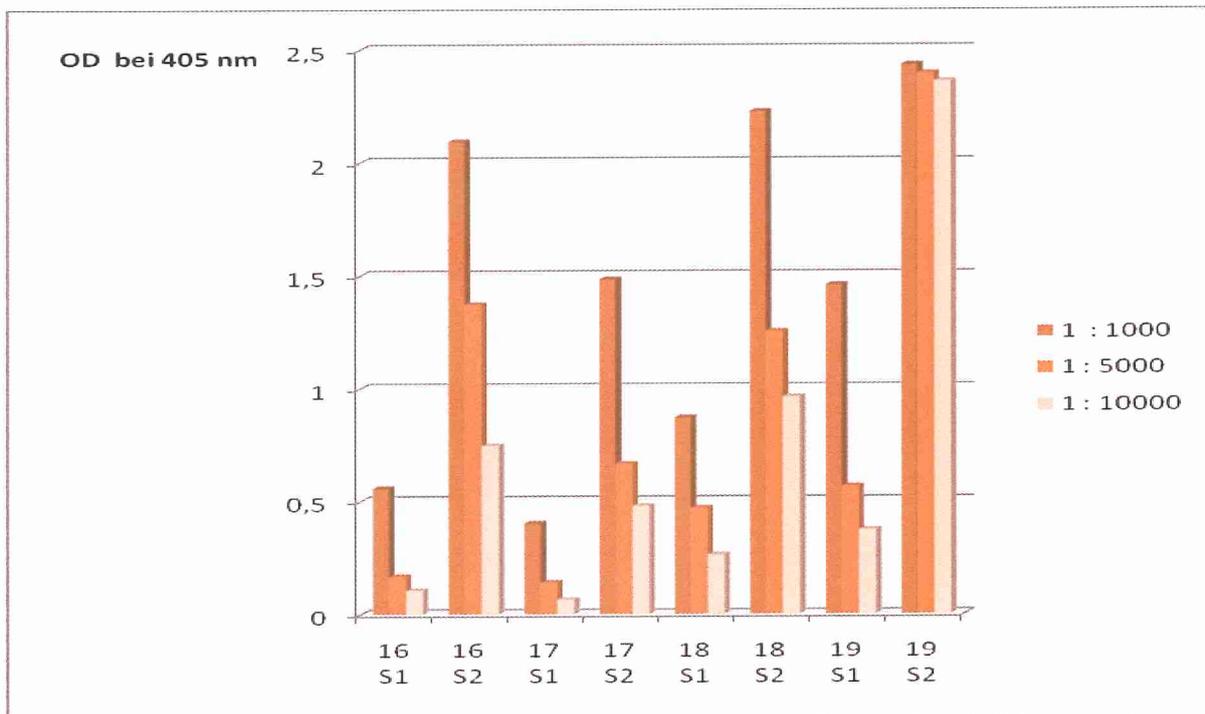
### 3.9 Entwicklung eines ELISA-Test

Das Serum der ersten beiden Blutungen wurde in einem PTA-ELISA getestet und zeigt eine gute Reaktion gegenüber *U. tritici* Mycelextrakt. Die Kreuzreaktivität gegenüber *Fusarium graminearum* ist gering. Die Darstellung des Serenvergleichs der ersten (S1) und zweiten Blutung (S2) ist in Abb. 8 und Abb. 9 dargestellt. Ut1 bezeichnet das Isolat aus der Kultursammlung (CBS), Ut2 ist das Ascherslebener Isolat (ASL). Die Zahlen 16 bis 19 unterscheiden die vier verschiedenen Kaninchen, deren Serum getestet wurde.



**Abb. 8:** Serenvergleich von Ut1 (Antigenkonzentration 1 µg / ml)

Die Datenreihen zeigen die verschiedenen Verdünnungsstufen des Antiserums



**Abb. 9:** Serenvergleich von Ut2 (Antigenkonzentration 1 µg / ml)

Die Datenreihen zeigen die verschiedenen Verdünnungsstufen des Antiserums

Deutlich zu sehen ist, dass das Serum von Tier Nr. 19 der ersten und zweiten Blutung bereits in hoher Verdünnung *Ustilago tritici* Mycel nachweisen kann.

Zum Vergleich: Der mittlere Extinktionswert des PBS-Puffers lag, über alle Verdünnungsstufen, bei OD<sub>405</sub> 0,014, der Mittelwert von *Fusarium* bei OD<sub>405</sub> 0,216.

Da die Spezifität eines DAS-ELISA höher als die eines PTA-ELISA ist, der die enzymatische Nachweisreaktion über ein Antiserum gegen Kaninchenantikörper führt, an Stelle eines Nachweises gegen das Antigen direkt, wurde angestrebt einen DAS-ELISA zu entwickeln, da in der Praxis dieser ELISA zum Nachweis von Pathogenen in Pflanzenmaterial weit verbreitet ist und daher für die praktische Züchtungsforschung leicht ein zusätzlicher Test auf Weizenflugbrand durchführbar wäre.

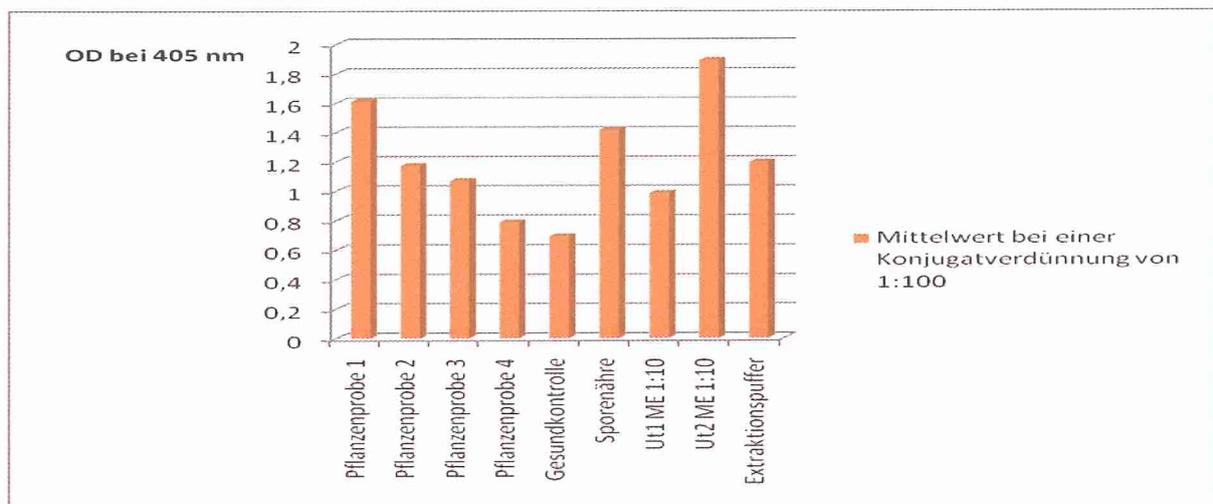
Es wurden verschiedene Verdünnungen des IgG von 5 µg / ml bis 0,1 µg / ml in Verbindung mit Verdünnungen des Konjugates von 1:250 bis 1:1000 untersucht. In mehreren Versuchen reagierte der Extraktionspuffer, so dass die Ergebnisse bisher nicht verwertbar sind. Ein großes Problem war die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die aufgereinigten IgGs der Tiere 16 und 18 zeigten in Verbindung mit dem eigenen Mycelextrakt keine ausreichende Nachweisempfindlichkeit. Bei der IgG Konzentration wurde ein Wert von 2,0 µg / ml für die weiteren Tests verwendet, die Antigenkonzentration konnte erfolgreich unter 1 µg / ml nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte für einen erfolgreichen Nachweis von *U. tritici* Mycelextrakt sind in Abb. 10 dargestellt.

	1	IgG 17 2,0 µg / ml			IgG 19 2,0 µg / ml			BSA 1µg / ml		Extraktionspuffer		12	Konjugat	
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
A	Blank	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
B	Blank	1.841	1.897	1.885	1.683	1.789	1.731	0.294	0.321	0.301	0.372	****	1:250	Antigen 1,0 µg / ml
C	****	1.433	1.406	1.392	1.145	1.094	1.167	0.150	0.164	0.165	0.187	****	1:500	
D	****	0.858	0.906	0.914	0.835	0.823	0.716	0.103	0.125	0.095	0.122	****	1:1000	
E	****	1.551	1.571	1.504	1.354	1.265	1.405	0.291	0.280	0.280	0.364	****	1:250	Antigen 0,1 µg / ml
F	****	1.164	1.209	1.825	1.114	0.938	0.988	0.120	0.173	0.172	0.270	****	1:500	
G	****	0.737	0.784	0.789	0.669	0.676	0.734	0.083	0.142	0.175	0.283	****	1:1000	
H	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		

**Abb. 10:** Darstellung der OD<sub>405</sub>-Werte einer Reaktionsplatte des DAS-ELISA

Es ist ersichtlich, dass Mycel von *U. tritici* mit dem Test nachgewiesen werden kann. Die Werte des Extraktionspuffers sind jedoch sehr hoch, ebenso die Konjugatkonzentrationen die eingesetzt werden müssen. In weiteren Versuchen konnte die Spezifität der IgGs mit den zugehörigen Konjugaten der Tiere 17 und 19 weiter erhöht werden, so dass der DAS-ELISA mit einer Konjugatverdünnung 1:250 und einer IgG-Konzentration von 1 µg / ml 0,1 µg und sogar 0,01 µg Pilzmycel nachweisen konnte. Der Hintergrund des Puffers konnte unter eine Extinktion von OD<sub>405</sub> 0.1 gesenkt werden.

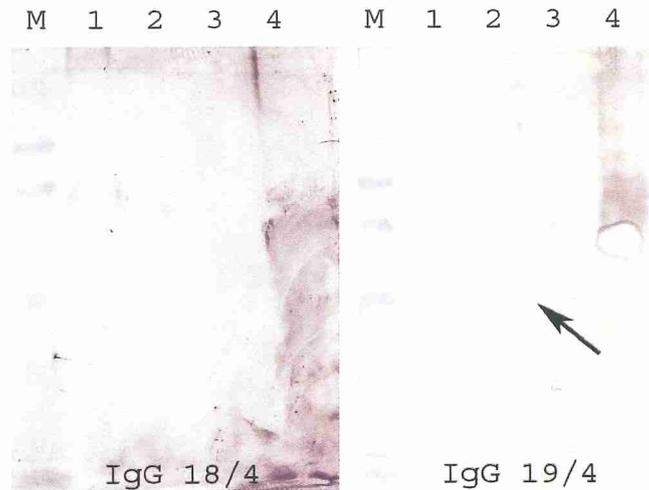
Ein Nachweis von Flugbrandmycel aus Pflanzenmaterial konnte nicht ausreichend genau geführt werden. In einem Test mit infiziertem Pflanzenmaterial zeigte sich, dass der Extraktionspuffer mit Werten von über OD<sub>405</sub> 1,1 zu hoch für einen zuverlässigen Nachweis lag und somit ein geeigneter Puffer ermittelt werden muss. Die Gesundkontrolle (nicht infiziertes Pflanzenmaterial) lag mit einem Extinktionswert von OD<sub>405</sub> 0,7 ebenfalls weit über einem akzeptablen Wert von höchstens OD<sub>405</sub> 0,1. Die Mittelwerte dieses Ansatzes sind in folgender Grafik dargestellt.



**Abb. 11:** DAS-ELISA mit Pflanzenmaterial (UtME = *U. tritici* Mycelextrakt)

### 3.10 Westernblot zur Überprüfung der Antikörperreaktion

Zur Überprüfung der Antikörper und Rohseren, welche im ELISA verwendet wurden, wurden mehrere Westernblots durchgeführt. Zunächst wurden die *Ustilago tritici* Isolate Ut1 und Ut2, ein *Tilletia* ssp. Isolat und ein *Ustilago nuda* Isolat mit den IgGs 18/4 und 19/4 getestet (Abb. 12).



**Abb. 12:** Vergleich der IgGs (M=Größenstandard; 1=Ut1; 2=Ut2; 3=*T.controversa*; 4=*U.nuda*)

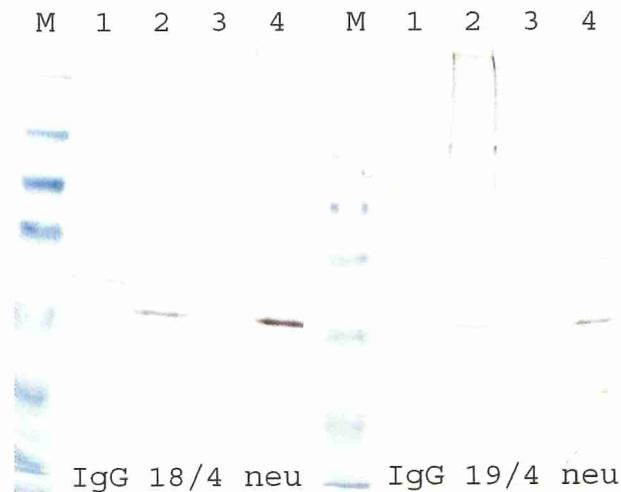
Die Membran auf der rechten Seite wurde 5 min. entwickelt. Zu sehen ist die klare Reaktion von Ut2 in Gestalt einer Proteinbande. Dies bestätigt die Ergebnisse der ELISA-Tests, in denen das IgG 19/4 gute Ergebnisse hervorbrachte. Die Membran auf der linken Seite wurde 12 min in Entwickler inkubiert und zeigt keine spezifische Reaktion.

In dem Fall, dass die Immunglobuline (Tier18) nicht spezifisch reagieren, wurde untersucht ob evtl. das Rohserum des betreffenden Tieres eine Reaktion zeigt. Hier reagierte das Rohserum sehr gut mit den Ut1 und Ut2 Proben, sowie der *U. nuda* Probe (Abb. 13). Eine Reaktion auf *Ustilago nuda* ist, aufgrund der engen Verwandtschaft der Brandpilze, zu erwarten gewesen und ist auch von EIBEL (2002) beschrieben worden. Gleichzeitig wurde, auf zwei weiteren Membranen, die Reaktion der Proben auf Rohserum von Tieren getestet, die Antikörper gegen *U. nuda* und *T. caries* enthalten sollten. Es konnte jedoch keine Reaktion festgestellt werden.



**Abb. 13:** Blot gegen Rohserum von Tier 18 (M=Größenstandard; 1=Ut1; 2=Ut2; 3=*T.controversa*; 4=*U.nuda*)

In einem weiteren Blot wurden nochmals neue IgGs der Proben 18/4 und 19/4 getestet, um zu untersuchen, ob die Immunglobuline von Tier 18 hier reagieren. Dies wurde nötig, da die bisher in den ELISA Tests verwendeten IgGs, die in dem Blot der Abb. 12 verwendet wurden, eventuell überlagert waren. Die neu getauten IgGs zeigten eine sehr klare Reaktion, die der des Rohserums (Abb. 13) entsprach. Das IgG 19/4 reagierte hier etwas unspezifischer, mit Reaktionen auf *Tilletia caries*, konnte den Nachweis auf *Ustilgo* jedoch führen (Abb. 14).



**Abb. 14:** Vergleich der IgGs (neu)  
(M=Größenstandard; 1=Ut1; 2=Ut2; 3=*T. controversa*; 4=*U. nuda*)

Reaktionen der Rohseren und gereinigten Immunglobuline auf Glykopeptide, welche den ELISA beeinflussen könnten, sind nicht zu verzeichnen.

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Die künstliche Infektion von *Triticum* ssp. mit *Ustilago tritici* ist problemlos möglich, wenn das Zeitfenster während der Blüte des Weizens genau eingehalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Sommerweichweizensorten ‚Fasan‘, ‚Combi‘, ‚Munk‘, ‚Naxos‘ und ‚Picolo‘, die Sommerhartweizensorten ‚Durabon‘, ‚Durafit‘ und ‚Megadur‘ und die Sommertriticaleorten ‚Nilex‘, ‚Logo‘, und ‚Gabo‘, als resistent betrachtet werden können (bei einer Grenze von max. 10 % Flugbrandbefall).

Mit der natürlichen Infektion lassen sich Unterschiede zwischen befallsfreien (resistent) und infizierten Pflanzen aufgrund eines sehr geringen Befalls nicht ermitteln.

Für eine umfassende Untersuchung der natürlichen Infektion und der einhergehenden möglichen Gefahr einer Potenzierung des Flugbrandbefalls über mehrere Jahre müssten die Sorten, getrennt voneinander an verschiedenen Orten, in großen Parzellen angebaut werden und der Brandbefall dann nach mehreren Jahren zusammen an einem Standort bonitiert werden. Die Resistenzeigenschaften der einzelnen Sorten bei natürlicher Infektion könnten dadurch viel deutlicher zum tragen kommen, ebenfalls ob es möglicherweise Grenzen des prozentualen Flugbrandbefalls für jede einzelne Sorte gibt.

Nicht erfasst werden kann eine mögliche Auswinterung von flugbrandinfizierten Pflanzen, die ein falsch positives Ergebnis der Sortenbonitur zur Folge haben kann. Ein ELISA-Test könnte hierfür möglicherweise eingesetzt werden, jedoch müssten die frostgeschädigten Pflanzen unverzüglich aufgearbeitet werden. Eine Unterscheidung von kleistogam blühenden Pflanzen und „eher offen“ blühenden Pflanzen könnte in die Berücksichtigung mit einbezogen werden, jedoch stellt nach ROEMER & RUDORF (1950) die Kleistogamie als strengste Form der Selbstbefruchtung beim Weizen nur eine Ausnahme dar.

Die Erfassung des Beschattungsvermögens mit einem Luxmeter zeigte keine deutlichen Unterschiede der Sorten. Die Nutzung der Messmethode zur Einstrahlungsintensität mittels eines Luxmeters, in Verbindung mit der Bonitur von anderen Parametern zur Beschattung, sollte methodisch weiter ausgearbeitet werden.

Die untersuchten Flugbrandisolate konnten mit dem verwendeten Differentialsortiment eindeutig charakterisiert werden. Eine Rassenzugehörigkeit, verglichen mit in der Literatur veröffentlichten Rassen (TIKHOMIROV, 1983; NIELSEN, 1987), konnte hergestellt werden.

*Ustilago tritici* lässt sich, ausgehend von Sporen, auf Nährmedien *in vitro* kultivieren. Die Koloniemorphologie und der Pigmentanteil der einzelnen Kulturen variiert. Eine Aufarbeitung des Mycels zur Herstellung von Lösungen mit gelösten *U. tritici* Proteinen für ELISA Tests ist möglich.

Der Nachweis von Flugbrand mittels ELISA konnte im PTA-ELISA und DAS-ELISA für gelöste Proteine aus Mycelextrakt von *U. tritici* gezeigt werden. Die Ermittlung des Brandbefalls aus Pflanzenmaterial lies sich nicht abschließend nachweisen. Die Auswertung der Western-Blots ergab, dass die IgGs 19/4 und 18/4 am besten für einen serologischen Nachweis von *Ustilago tritici* im ELISA geeignet sind. Eine vermutete unspezifische Reaktion der polyklonalen Antikörper auf Glykopeptide konnte nicht bestätigt werden.

## **5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**

### 5.1 Künstliche Infektion von Sommerweizen

Geplant:

Die Sommerweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 sollten künstlich infiziert und im Jahr 2005 die Bonitur auf Flugbrandinfektion vorgenommen werden.

Erreicht:

Die Sommerweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 wurden künstlich infiziert und im Jahr 2005 der Befall bonitiert. Es konnten insgesamt 11 Sorten als resistent postuliert werden.

### 5.2 Prüfung von Sommer- und Winterweizensorten mit natürlicher Infektion

Geplant:

Die Sommer- und Winterweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 sollten im Feld zusammen mit infizierten Pflanzen angebaut werden und die natürliche Infektion im darauffolgenden Jahr bonitiert werden. Die Prüfung sollte 2006 auf drei Standorte ausgedehnt werden und ein Nachbau 2006 erfolgen.

Erreicht:

Die Sommer- und Winterweizensorten der Beschreibenden Sortenliste 2004 wurden in einer randomisierten Blockanlage im Feld zusammen mit infizierten Pflanzen, z. T. als Infektionsstreifen, angebaut und die natürliche Infektion im darauffolgenden Jahr bonitiert. Die Prüfung wurde 2006 auf drei Standorte ausgedehnt und die Prüfglieder im Herbst 2006 im Gewächshaus nachgebaut, um die natürliche Infektion von 2006 ebenfalls zu erfassen. Von 112 Sorten zeigten lediglich drei Sorten einen signifikanten Unterschied in der Befallsstärke.

### 5.3 Erfassung der „Beikrautunterdrückung“

Geplant:

Die Sorten sollten anhand ihrer ökologisch relevanten „Beikrautunterdrückung durch Beschattung“ untersucht werden.

Erreicht:

Nach Abstimmung mit dem ökologisch arbeitenden Züchter Dr. K.-J. Müller von der Getreidezüchtungsforschung Darzau, wurde der ökologisch relevante Parameter, der „Beikrautunterdrückung durch Beschattung“, versucht zu erfassen. Dazu wurde im Jahr 2006 mit einem Einstrahlungsmessgerät ein Messwert in LUX erfasst. Die Sortenunterschiede waren so gering, dass ein Einfluß der Sorte auf die Beschattungsintensität nicht nachgewiesen werden konnte.

#### 5.4 Rassencharakterisierung mit einem Differentialsortiment

Geplant:

Es sollte in Anlehnung an FISCHER et al. (2002) ein Differentialsortiment beschafft werden und anhand dessen die gesammelten einheimischen Isolate charakterisiert werden.

Erreicht:

Es war sehr schwer deutsche Flugbrandisolate zu bekommen. Die erhaltenen zwei Isolate aus Norddeutschland wurden zusammen mit einem rumänischen Isolat getestet. Ein Differentialsortiment, das sich nicht nur auf das kanadische Differential beschränkte, sondern auch ältere Sorten aus der Genbank des VIR (Russland) einbezog, konnte beschafft werden. Einzig die Sorte ‚Biggar BSR‘, welche als einzige das Resistenzgen Ut-x enthält, war nicht zu bekommen. Eine Charakterisierung der Isolate lies sich mit den vorhandenen Sorten und Linien sehr gut durchführen.

#### 5.5 Entwicklung eines ELISA

Geplant:

Es sollte ein ELISA-Test zum Nachweis von *Ustilago tritici* in Pflanzenblättern entwickelt werden.

Erreicht:

Polyklonale Antikörper konnten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Resistenz und Pathogendiagnostik (Dr. Frank Rabenstein) hergestellt werden. In PTA- und DAS-ELISA konnte Flugbrandmycel aus Proteinlösung in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Ein Nachweis von *Ustilago tritici* aus Pflanzenmaterial konnte aufgrund der hohen unspezifischen Reaktion des Extraktionspuffers nicht erbracht werden. Die Reaktion der Antikörper mit den Antigenen ist sehr spezifisch, was in zusätzlichen Western-Blots gezeigt werden konnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- BEVER, W.M. (1953): Further studies on physiologic races of *Ustilago tritici*. *Phytopathology* 43, 681-683
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254
- ECKSTEIN, P.E., KRASICHYNSKA, N., VOTH, D., DUNCAN, S., ROSSNAGEL, B.G., SCOLES, G.J. (2002): Development of PCR-based markers for a gene (Un8) conferring true loose smut resistance in barley. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 46-53
- EIBEL, P. (2002) Entwicklung und Erprobung immunologischer Methoden zur Frühdiagnose von *Ustilago nuda* (Jens.) Rostrup und *Tilletia caries* (D.C.) Tul. & C. Tul. in Gerste und Weizen. Dissertation. Der andere Verlag.
- FISCHER, K.; SCHÖN, C.C.; MIEDANER, T. (2002): Chancen der Resistenzzüchtung gegen Brandpilze bei Weizen für den ökologischen Pflanzenbau. Stuttgart-Hohenheim, 73 S.
- HACK, H., BLEIHOLDER, H., BUHR, L., MEIER, U., SCHNOCK-FRICKE, E., WEBER, E. & WITZENBERGER, A. (1992): Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. -Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 44 (12): 265-270
- HOFFMANN, G.M. & SCHMUTTERER, H. (1983): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart
- KNOX, R.E., MENZIES, J.G., HOWES, N.K., CLARKE, J.M., AUNG, T., PENNER, G.A. (2002): Genetic analysis of resistance to loose smut and an associated DNA marker in durum wheat doubled haploids. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 316-322
- MCINTOSH, R.A., HART, G.E., DEVOS, K.M., GALE, M.D., ROGERS, W.J. (1998): Catalogue of Gene Symbols for Wheat. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium* 5. 144
- MENZIES, J.G., BAKKEREN, G., MATHESON, F., PROCUNIER, J.D., WOODS, S. (2003): Use of Inter-Simple Repeats and Amplified Fragment Polymorphisms to Analyse Genetic Relationships Among Small Grain-Infecting Species of *Ustilago*. *Phytopathology* 93 (2), 167-175

- MÜLLER, K.-J. (2004): Prüfung der Anfälligkeit aktuell verfügbarer Winterweizen der Qualitätsgruppen E, A und B gegenüber Flugbrand (*Ustilago tritici*) Abschlussbericht zum Forschungsprojekt 01.06.2002 bis 31.12.2003
- MÜLLER, K.-J. (2005): Bericht zum Forschungsprojekt 01HS027 „Die Anfälligkeit gegenüber Flugbrand im deutschen Sommergerstensortiment im Hinblick auf eine vollständige Saatgutvermehrung unter ökologischen Bedingungen“
- NIELSEN, J. (1969): A race of *Ustilago tritici* virulent on Thatcher wheat and its derivatives. Plant Disease Reporter 53, 393-395
- NIELSEN, J. (1987): Races of *Ustilago tritici* and techniques for their study. Canadian Journal of Plant Pathology 9(2), 91-105
- NOVER, I.; LEHMANN, CH. O. (1969): Resistenzeigenschaften im Gersten- und Weizensortiment Gatersleben. 11 Prüfung von Wintergersten auf ihr Verhalten gegen Flugbrand (*Ustilago nuda* [Jens.] Rostr.). Die Kulturpflanze 17, 233-240
- POEHLMAN, J.M. (1945): A simple method of inoculating barley with loose smut. Phytopathology 35, 640-644
- ROEMER, TH. & RUDORF, W. Hrg. (1950): Handbuch der Pflanzenzüchtung Band 2. Die Züchtung der Hauptgetreidearten. Parey Verlag Berlin, 323
- TIKHOMIROV, V.T. (1983): Genetics of Resistance of Wheat to the Loose Smut Pathogen, *Ustilago tritici* (Pers.) Jens. Genetika 19 (2), 295-303
- WEBER, E. (1986): Grundriss der biologischen Statistik; Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 336
- WICKE, H. (1986): Vergleichende Untersuchungen zur Resistenz von Sommergersten gegen den Flugbranderreger *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr., Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 152 S.
- WILCOXON, R.D. & SAARI, E.E. eds. (1996): Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT.

## 7. Veröffentlichung

Die Ergebnisse der künstlichen Infektionen wurden 2006 auf der Tagung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V. in Form eines Posters vorgestellt.

- HOBERT, M. & KOPAHNKE, D. (2006): Evaluierung deutscher Sommerweizensorten auf Resistenz gegenüber Weizenflugbrand (*Ustilago tritici*). Vorträge Pflanzenzüchtung 68, 6

## 8. Anhang A

Tab. A1: Verwendete Kulturmedien

<b>Czapek-Dox-Pepton-Agar (CzPep)</b>	
Saccharose (Serva)	30.00 g
NaNO <sub>3</sub> (Merck)	3.00 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (VEB Laborchemie Apolda)	0.50 g
KCl (Merck)	0.50 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Merck)	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	1.00 g
Pepton (aus Sojabohnenmehl papainisch verd.) (Merck)	
Agar Kobe I (Serva)	13.00 g
Aqua bidest.	1.00 l
pH-Wert 6.0	
<b>Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA)</b>	
Potato-Dextrose-Agar [LAB M (Roth)]	39.00 g
Aqua bidest.	1.00 l
pH-Wert 5.8	
<b>Malz-Pepton-Agar (MPA)</b>	
Malzextrakt (Difco)	30.00 g
Pepton (aus Sojabohnenmehl papainisch verd., Merck)	3.00 g
Agar Kobe I (Serva)	13.00 g
Aqua bidest.	1.00 l
pH-Wert 5.8	

**Tab. A2:** Puffer und Lösungen für ELISA

PBS	pH 7,4	Beschichtungspuffer	pH 9,6
NaCl	8 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,28 g	NaNO <sub>3</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l		
<hr/>		<hr/>	
Kopplungspuffer	pH 7,5	Konjugatpuffer	
NaCl	10 g	PBS-Tween	
NaHCO <sub>3</sub>	10 g	BSA	0,20%
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l		
<hr/>		<hr/>	
PBS-Tween	pH 7,4	Tris-HCl-Puffer	pH 8.0
PBS		Tris	60,5 g
Tween-20	0,05%	MgCl <sub>2</sub>	2,0 g
<hr/>		H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
Waschpuffer	pH 7,4	<hr/>	
PBS-Tween		0,05 M Tris-HCl	pH 8.0
(halbkonzentriert)		Tris	6,07 g
<hr/>		MgCl <sub>2</sub>	0,2 g
Extraktionspuffer		H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
PBS	100 ml	<hr/>	
PVP40.000	2,00%	Substrat-Puffer	pH 9.8
Trockenmilch	0,20%	Diethanolamin	97 ml
Tween-20	1 Tropfen	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	800 ml
		MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	203 mg

**Tab. A3: PTA-ELISA**

1. Coating:	Mycel in PBS-Tween mit Quarzsand mörsern und abzentrifugieren einstellen auf 10 µg / ml und 1 µg / ml Antigen (100 µl / well) Inkubation ÜN, 4 °C
2. Blockierung:	Platte am nächsten Tag nur ausschütten (nicht waschen!) blockieren mit PBS + 1 % TM (200 µl / well) Inkubation 1 h, 37 °C  4 x waschen mit PBS-Tween
3. Antikörper:	Kaninchenserum verdünnen ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ ) in PBS-Tween + 1 % TM (100 µl / well) Inkubation 2 h, 37 °C  4 x waschen mit PBS-Tween
4. Konjugat:	GaR 1:2000 verdünnen in 0,05 M Tris-HCl (pH 8.0) mit Tween und 1 % TM (100 µl / well) Inkubation 1 h, 37 °C  4 x waschen mit PBS-Tween
5. Substrat:	1 mg p-NPP in 1 ml Substratpuffer lösen (200 µl / well) Inkubation 1 h, RT
6. Messen:	ELISA-Reader 405 nm

**Tab. A4: DAS-ELISA**

1. Coating:	Beschichten der Platte mit polyklonalem IgG, vorher in Coatingpuffer verdünnen (1 µg / ml Endkonzentration) 100 µl / well, Inkubation 4 h, 37°C 4 x waschen mit PBS-Tween
2. Pflanzensaft:	Pflanzenblätter im Mörser zerkleinern und 1:20 in Extraktionspuffer verdünnen 100 µl / well, Inkubation ÜN, 4°C  4 x waschen mit PBS-Tween
3. Konjugat:	Das homologe polyklonale Konjugat in Extraktionspuffer nach Vorschrift verdünnen 100 µl / well, Inkubation 4 h, 37 °C  4 x waschen mit PBS-Tween
4. Substrat:	20 mg p-NPP in 20 ml Substratpuffer lösen (für 1 Platte) 200 µl / well, Inkubation 1 h, RT
5. Messen:	ELISA-Reader 405 nm

**Tab. A5: Puffer und Lösungen für Westernblot**

<b>Transferpuffer pH 8.3</b>	
Tris	6 g
Glycin	22,52 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 2 l
<b>Gelpuffer pH 8.8</b>	
1,88 M Tris/HCl	
<b>Kathodenpuffer</b>	
Tris	6,06 g
Glycin	28,82 g
SDS(Na-Dodecylsulfat)	2,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 2 l
<b>Probenpuffer</b>	
Gelpuffer	2 ml
SDS	0,2 g
Glycerin	5 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 µl
Bromphenolblau 1%	0,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	2,4 ml

**Tab. A6:** Blot mit immunologischem Nachweis

<p>Probe mit Probenpuffer 1:1 mischen 5' 100 °C → 4 °C</p> <p>Elektrophorese 10 % Trenngel und 5 % Sammelgel herstellen 15 µl Probe auftragen Kathodenpuffer einfüllen Stromstärke 25 mA bis Farbstoff an Gelende</p> <p>Blot Blotpapier und Membran (Hybond C) in Transferpuffer legen Blot in Apparatur (BioRad) aufbauen 30' 200 mA blotten</p> <p>Färbung 15' waschen in Puffer pH 8.0 + 5 % Trockenmilch in Puffer pH 8.0 verdünntes Antiserum 1 h inkubieren 3 x waschen in Puffer pH 8.0 in Puffer pH 8.0 verdünnten Antikörper 1 h inkubieren 10' waschen in Puffer pH 8.0 10' waschen in Puffer pH 9.0 Substratlösung auf Membran geben 3' Entwicklung 2 x mit Aqua dest. Spülen, Membran trocknen</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 9. Anhang B

**Tab. B1:** Infizierte Pflanzen nach künstlicher Infektion (Freilandnachbau)

Sorte	Gesamt Ähren	Flugbrandähren	% infizierte
Amaretto	1173	237	20
Combi	973	51	5
Devon	1152	218	19
Durabon	964	0	0
Durafit	1168	1	0
Eminent	1235	229	19
Fasan	868	0	0
Gabo	921	0	0
Hatri	913	139	15
Lavett	1016	247	24
Logo	1008	0	0
Megadur	681	2	0
Melon	1134	270	24
Monsun	999	193	19
Munk	977	77	8
Naxos	1189	55	5
Nilex	910	0	0
Passat	895	255	28
Perdix	1177	258	22
Picolo	890	3	0
Quattro	1181	272	23
Taifun	1028	246	24
Thasos	1174	376	32
Triso	1145	479	42

**Tab. B2:** Tukey-Test der Winterweizensorten 2006 (Fortsetzung auf folgenden Seiten)

Sorte	Mittelwert	Tukey-Test <sup>1)</sup>
Toronto	0.79017	A
Astron	0.69585	A B
Opus	0.31767	B C
Terrier	0.29563	B C
Korund	0.24262	C
Koch	0.18526	C
Madrid	0.17593	C
Wenga	0.15700	C
Compliment	0.15015	C
Aspirant	0.14815	C
Atlantis	0.14659	C
Akteur	0.12346	C
Idol	0.12012	C
Paroli	0.11111	C
Campari	0.10101	C
Excellenz	0.09390	C
Tarso	0.09259	C

Bussard	0.08772	C
Tulsa	0.08626	C
Asketis	0.07286	C
Altos	0.06260	C
Winnetou	0.06088	C
Maltop	0.05926	C
Carolus	0.03472	C
Novalis	0.03268	C
Exsept	0.03268	C
Zentos	0.03003	C
Solitär	0.02525	C
Certo	0.00000	C
Alitis	0.00000	C
Alidos	0.00000	C
Borneo	0.00000	C
Akratos	0.00000	C
Elvis	0.00000	C
Empire	0.00000	C
Enorm	0.00000	C
Ebi	0.00000	C
Dekan	0.00000	C
Aristos	0.00000	C
Flair	0.00000	C
Champion	0.00000	C
Frodin	0.00000	C
Gaston	0.00000	C
Greif	0.00000	C
Cardos	0.00000	C
Batis	0.00000	C
Biscay	0.00000	C
Hybnos 2B	0.00000	C
Hybred	0.00000	C
Buteo	0.00000	C
Kanzler	0.00000	C
Capnor	0.00000	C
Kontrast	0.00000	C
Kornett	0.00000	C
Centrum	0.00000	C
Lahertis	0.00000	C
Limes	0.00000	C
Ludwig	0.00000	C
Contra	0.00000	C
Magnus	0.00000	C
Cubus	0.00000	C
Mandub	0.00000	C
Manhattan	0.00000	C
Maverick	0.00000	C
Mikon	0.00000	C
Milvus	0.00000	C
Moldau	0.00000	C
Monopol	0.00000	C
Noah	0.00000	C
Amply	0.00000	C

Olivin	0.00000	C
Arminius	0.00000	C
Aron	0.00000	C
Pegassos	0.00000	C
Petrus	0.00000	C
Piko	0.00000	C
Privileg	0.00000	C
Qualibo	0.00000	C
Quebon	0.00000	C
Ramiro	0.00000	C
Ranger	0.00000	C
Reaper	0.00000	C
Redford	0.00000	C
Renan	0.00000	C
Ritmo	0.00000	C
Romanus	0.00000	C
SW Maxi	0.00000	C
SW Topper	0.00000	C
Skater	0.00000	C
Sobi	0.00000	C
Sokrates	0.00000	C
Creativ	0.00000	C
Striker	0.00000	C
Tambor	0.00000	C
Dream	0.00000	C
Drifter	0.00000	C
Tiger	0.00000	C
Tommi	0.00000	C
Toni	0.00000	C
Toras	0.00000	C
Estica	0.00000	C
Transit	0.00000	C
Travix	0.00000	C
Trend	0.00000	C
Florida	0.00000	C
Türkis	0.00000	C
Vergas	0.00000	C
Wasmo	0.00000	C
Hermann	0.00000	C
Heroldo	0.00000	C
Hybnos 1	0.00000	C
Ökostar	0.00000	C

<sup>1)</sup> Buchstaben unterscheiden sich mit  $P = 0.05$