

Wunderle, J.U.; Koch, E.

Julius Kühn Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

Künstliche Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Flugbranderreger (*Ustilago nuda*) und Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten

Artificial inoculation of barley with the loose smut (*Ustilago nuda*) and mode of infection on the ovary

Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Prüfung künstlicher Inokulationsverfahren von Gerstenpflanzen mit dem Flugbranderreger (*Ustilago nuda*) und das Erlangen von Erkenntnissen zum genauen Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten. Diese Versuche sollten die Basis sein, um zukünftig hoch befällenes Saatgut in ausreichender Menge herstellen zu können, was für Folgeexperimente von großer Wichtigkeit wäre. Hierzu wurden drei Inokulationsmethoden – Inokulation mit der Spritze, Vakuuminfiltration und Besprühen mit Sporensuspension – hinsichtlich der erhaltenen Befallsraten und ihrem Einfluss auf die Keimfähigkeit miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Position des inokulierten Blütchens an der Ähre einen Einfluss auf den späteren Befall des daraus hervorgehenden Korns hat. Zu diesem Zweck wurden die Ähren zunächst per Spritze inokuliert und anschließend beim Ernten in jeweils drei Teile zerlegt und gesondert über einen Embryotest ausgewertet. Als aussichtsreichste Inokulationsmethode kristallisierte sich die Inokulation mit der Spritze heraus. Ein Einfluss der Ährenregion auf den späteren Befall konnte nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die zu einem besseren Verständnis des Infektionsverlaufes auf dem Fruchtknoten führen sollten. Hierfür wurde ein lactophenolbasierendes Autoklavieranfärbeverfahren verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion des Fruchtknotens nicht zwingend über die Narbe stattfinden muss, und dass der Pilz bei einer erfolgreichen Infektion die obersten Zellschichten der Fruchtknotenwand intrazellulär mit einer Infektionshyphye penetriert.

Stichwörter: Brandkrankheiten, Flugbrandbefall, Blüteninokulation

Abstract

The aim of this study was the examination of artificial inoculation techniques of barley with the pathogen (*Ustilago nuda*) and to obtain detailed new findings on the mode of infection on the ovary. These tests were designed to be the base to produce a sufficient amount of highly infected seeds, which would be of great importance for further experiments. Three inoculation techniques - by injection, vacuum infiltration or spraying with spore suspension - were compared with respect to the resulting infection rates and their influence on the germination rate. Moreover, it was evaluated, if the position of the inoculated floret on the ear has any influence on subsequent infection of the developing grain. Therefore the ears were inoculated by injection and, after harvesting, divided in three parts and separately evaluated with an embryo test. The most promising inoculation technique turned out to be inoculation by injection. An influence of the ear area on subsequent infection was not detected. In addition, microscopic analyses were carried out, which should provide a better understanding of the mode of infection on the ovary. A lactophenol-based autoclave staining technique was applied. The analysis showed that an infection of the ovary does not necessarily originate from the stigma, and that in case of an effective infection the fungus penetrates the uppermost cell layers of the ovary intracellularly with an infection hypha.

Keywords: smuts, loose smut, flower inoculation

Einleitung

Für Arbeiten mit samenbürtigen Pilzen ist es wichtig, über Saatgut mit möglichst hohen Befallsraten zu verfügen. Für den Flugbrand ist diese Anforderung nur sehr schwer zu erfüllen, da natürlich infizierte Saatgutchargen nur selten zu mehr als 10% befallen und die Methoden zur künstlichen Inokulation sehr arbeitsaufwendig sind. Eine mögliche Inokulationsmethode stellt die Einzelblüteninokulation per Hand mit einer Spritze dar (Poehlmann, 1945). Bei dieser Inokulationsmethode wird eine wässrige Sporensuspension mit Hilfe einer Injektionspritze in die Blütchen eingebracht. Jones und Dhitaphichit (1991) griffen diese Methode auf und erweiterten sie um die Bedingung, dass nur Einzelblüten inokuliert werden, die sich zu diesem Zeitpunkt in der Anthese befinden, alle anderen werden abpräpariert. Für die hier unternommenen Untersuchungen wurden, ähnlich wie von Jones und Dhitaphichit beschrieben, nur Ähren inokuliert, bei denen sich die Einzelblüten im Bereich der Ährenmitte in der Anthese befanden.

Ein weiteres Verfahren für die Inokulation ist die erstmals von Moore (1936) beschriebene Vakuum-infiltration. Hierbei wird durch Anlegen eines Vakuums gewährleistet, dass sich keine Luft unter den Deckspezeln befindet, so dass nach Abbrechen des Vakuums das Inokulum ungehindert in die Einzelblüten einströmen kann.

Weiterhin muss für eine erfolgreiche Infektion die Keimfähigkeit der verwendeten Brandsporen beachtet werden. In Untersuchungen von Tapke (1953) nahm die Keimfähigkeit von bei Zimmertemperatur gelagerten Brandsporen bereits nach wenigen Monaten stark ab. Bei Temperaturen von 0-2 °C hingegen konnte auch ein ¾ Jahr nach der Ernte der Brandähren noch eine Keimfähigkeit von 50 % und mehr erreicht werden.

Für ein besseres Verständnis der Biologie des Erregers *U. nuda* wurden des Weiteren lichtmikroskopische Aufnahmen des Infektionsverlaufes auf dem Fruchtknoten angefertigt. In der Literatur sind verschiedene Färbemethoden beschrieben, die je nach Entwicklungszeitpunkt mehr oder weniger gut geeignet sind, den Pilz in der Pflanze sichtbar zu machen. Die wichtigste Methode zur Anfärbung von *U. nuda* dient der Bestimmung des Saatgutbefalls und wird als Embryotest (Morton, 1961 und 1967) bezeichnet. Der Pilz wird bei diesem Verfahren mit Lactophenol-Trypanblau dunkelblau eingefärbt. Zum Darstellen von *U. nuda* in auswachsenden Pflanzengewebe wie Internodien und Vegetationspunkten ist eine Anfärbung mit Baumwollblau (Popp, 1951) möglich, die von der Handhabung in vielen Punkten mit der Durchführung des Embryotestes nach Morton übereinstimmt. Eine weitere Möglichkeit, *U. nuda* im Gewebe mit herkömmlichen Farbstoffen und lichtmikroskopischen Methoden sichtbar zu machen, ist die Anfärbung über ein Autoklavierverfahren (Kavanagh und Mumford, 1960, Kollmorgen und Ballinger, 1987). Die eigentliche Anfärbung erfolgt hierbei durch Autoklavieren der Proben in einer Lösung aus Milchsäure und Eisessig mit Trypanblau (0,1 %). Kollmorgen und Ballinger benutzten dieses Verfahren allerdings zur Detektion von *Tilletia laevis* und *Tilletia tritici* in Weizensämlingen und nicht zum Nachweis von *U. nuda* in Gerstenpflanzen (*Hordeum sativum* L.).

Material und Methoden

Das Pflanzenmaterial wurde im Freiland angezogen. Hierzu wurde Sommergerste der Sorte Danuta von Hand in insgesamt 10 Doppelreihen (bestehend aus je 2 Einzelreihen im Abstand von 20 cm; Abstand zwischen den Doppelreihen 80 cm) à 7 m ausgesät. Nach dem Auflaufen wurden die Pflanzen mit Kalkammonsalpeter (28 % N) gedüngt und bei Bedarf bewässert.

Als Inokulationszeitpunkt wurde der Zeitraum vom Beginn des Antherenschiebens (EC 59-62; Zadoks et al., 1974) bis 5 Tage danach ausgewählt. Das Sporenmaterial stammte von frisch gebildeten Brandähren, die wenige Tage zuvor gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt worden waren. Die Sporensuspensionen wurden hergestellt, indem jeweils 15 Brandähren in ca. 500 ml H₂O (+ 0,01 % Tween 20) geschüttelt wurden, so dass sich die Sporen ablösten. Die so erhaltene Suspension wurde dann durch ein grobes Sieb gegeben und auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Für die Inokulation nach Poehlmann (1945) wurde mit Hilfe einer Injektionsspritze (Kanüle: 20 G x 1 ½“) die Deckspelze durchstoßen und die Sporensuspension (etwa 100 µl pro Einzelblüte) direkt auf den Fruchtknoten aufgetragen. In einem zusätzlichen Versuch wurden mit der Spritze inokulierte Ähren nach der Ernte mit einer Schere in drei Abschnitte zerteilt: „Oben“ (nur die oberen 4 Spindelstufen), „Mitte“ (die mittleren 5 Ährenspindeln) und „Unten“ (die unteren 4 Spindelstufen). Die Abschnitte wurden getrennt gedroschen und anschließend über einen Embryotest (Morton, 1961 und 1967) auf ihren Befall untersucht. Die Inokulation mittels Vakuuminfiltration (Moore, 1936) wurde mit einer Apparatur aus der hauseigenen Werkstatt durchgeführt. Hierzu wurden die zu inokulierenden Ähren möglichst luftdicht in die Inokulationskammer eingespannt, die dann über eine manuelle Vakuumpumpe evakuiert wurde. Anschließend wurde der Vakuumschlauch zur Pumpe verschlossen und der Zufuhrschlauch, der mit einem Behältnis mit Sporensuspension in Verbindung stand, geöffnet. Durch den anliegenden Unterdruck wurde das Inokulum in die Inokulationskammer gesogen, so dass die zu inokulierende Ähre umströmt wurde. Für die Inokulation durch Besprühen wurden die Versuchspflanzen dreimal täglich mit der Sporensuspension eingesprüht. Wegen der Variabilität im Blühzeitpunkt der Ähren wurden die Sprühinokulationen über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Es wurden jeweils ca. 1 l Sporensuspension pro Doppelreihe mit einer Handsprühflasche der Marke Gloria (floredda-combi, Feinsprüher 1 Liter) ausgebracht.

Die Embryotests wurden standardmäßig nach Morton (1961 und 1967) durchgeführt. Hierzu wurde das Saatgut für eine Mazeration der Körner in 5-10 % NaOH-Lösung über Nacht eingeweicht. Anschließend wurden die Embryonen von Endosperm, Schalengewebe und Spelzen befreit. Die Embryonen wurden in eine Lactoglyzerin-Trypanblau-Lösung (Glyzerin : Milchsäure (90 %) : Aqua dest.; 1:2:5; + 0,01 % Trypanblau) überführt und eine Minute aufgekocht. Die anfangs gelblich-braunen Embryonen werden hell und die Pilzhypen tiefblau eingefärbt. In einem nächsten Schritt wurde der überschüssige Farbstoff durch mehrmaliges (einminütiges) Aufkochen in Lactoglyzerin (Glyzerin : Milchsäure (90 %) : Aqua dest.; 1:2:5) entfärbt. Abschließend wurden die Embryonen unter dem Binokular auf Befall mit *U. nuda* untersucht. Das Originalprotokoll von Morton (1967) wurde somit minimal abgewandelt, indem auf die Verwendung des sehr giftigen Lösungsmittels Phenol verzichtet wurde, d.h. anstatt Lactophenol wurde Lactoglyzerin verwendet.

Weiterhin sollte der Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten genauer untersucht werden. Hierfür wurden infizierte Fruchtknoten über ein Autoklavierverfahren (Kollmorgen und Ballinger, 1987) angefärbt. Zunächst wurden die Fruchtknoten unter dem Binokular abpräpariert. Anschließend wurden sie in ein Gemisch (1:1 v/v) aus 24 % Ethanol und 30 % NaOH überführt und 45 Minuten autoklaviert. Es folgte ein Waschschrift in Aqua dest. (2-3mal). Danach wurden die Proben in ein Gemisch aus Ethanol (abs.) und Eisessig (3:1 v/v) überführt und erneut autoklaviert. Dies führt zu einer weiteren Aufhellung des Gewebes. Im anschließenden Färbeschritt wurde das Material in ein Gemisch aus 45 % Milchsäure und 45 % Eisessig + 0,1 % Trypanblau (2:1 v/v) übertragen und ein letztes Mal autoklaviert.

Ergebnisse

Da bei Versuchen mit *U. nuda* für die allermeisten Fragestellungen hoch infiziertes Saatgut benötigt wird und der natürliche Befall in der Regel deutlich unter 10 % liegt, sollten verschiedene Verfahren zur künstlichen Inokulation im Hinblick auf den Infektionserfolg geprüft werden (Tabelle 1). Die Inokulation mit der Spritze ergab einen mittleren Befall von 52 %. Der für die Vakuuminkokulation festgestellte Wert lag deutlich darunter (16 %). Das schwächste Ergebnis brachte die Inokulation durch Besprühen.

Tab. 1 Befall der Körner mit *U. nuda* (ermittelt im Embryotest) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen Verfahren

	Inokulationsmethode								
	Spritze			Vakuum			Sprühen		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Befall (absolut) ¹	28/49	13/30	22/42	7/42	5/53	11/48	2/51	2/62	2/67
Summe	63/121			23/143			6/180		
Befall [%]	57,1	43,3	52,4	16,7	9,4	22,9	3,9	3,2	3,0
Mittelwert	52,1			16,1			3,3		

¹ Anzahl befallener Embryos/ Anzahl untersuchter Embryos

Da bekannt war, dass der Befall von *U. nuda* die Vitalität des Kornes beeinflussen kann, sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Inokulationsmethoden die Keimrate beeinflussen. Die Keimfähigkeit nahm in der Reihenfolge Sprühen – Vakuum – Spritze ab (Tabelle 2). Damit ist offensichtlich, dass der Befall und die Keimrate negativ korreliert waren (vergl. Tabelle 1). Mit 54 % lag die Keimrate der aus der Inokulation mit der Spritze hervorgegangenen Körner um ca. 40 % niedriger als bei der Kontrolle.

Tab. 2 Einfluss des Inokulationsverfahrens auf die Keimfähigkeit der Körner

	Inokulationsmethode			Nicht inokulierte Kontrolle
	Spritze	Vakuum	Sprühen	
Gekeimte Pflanzen ¹	54/100	67/100	89/100	91/100
Keimung [%]	54	67	89	91

¹ Anzahl gekeimter Pflanzen/ Anzahl ausgesäter Körner

Um abschließend zu testen, ob der Infektionserfolg von der Position der jeweiligen Blüten innerhalb der Ähre abhängt, wurden die Ähren von Pflanzen, die mit der Spritze inokuliert worden waren, nach der Ernte in drei Abschnitte aufgeteilt. Die Körner aus diesen Teilstücken wurden dann getrennt dem Embryotest unterzogen (Tabelle 3). Es ist ersichtlich, dass der Befall der Körner nicht von der Position der Blüten, aus denen diese Körner hervorgegangen sind, abhängig ist.

Tab. 3. Befall der Körner mit *U. nuda* (ermittelt im Embryotest) aus verschiedenen Ährenabschnitten

	Ährenabschnitt		
	„Oben“ ¹	„Mitte“ ²	„Unten“ ³
Befall (absolut) ⁴	20/46	25/58	25/62
Befall [%]	43,5	43,1	40,3

¹ Körner aus den oberen vier Spindelstufen; ² Körner aus den mittleren fünf Spindelstufen; ³ Körner aus den unteren vier Spindelstufen; ⁴ Anzahl befallener Körner/ Anzahl untersuchter Körner

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung zum Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten sind zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt. In Abbildung 1 A sind zwei Eindringungsstellen auf der äußersten Zellschicht des Fruchtknotens sichtbar. Das ist der Startpunkt der Infektion durch *U. nuda*. Die folgenden Abbildungen B-D zeigen Infektionshyphen, mit denen *U. nuda* in die oberste Zellschicht der Fruchtknotenwand eindringt. Der Pilz wächst hier also intrazellulär. Die Zellkerne der infizierten Wirtszellen befanden sich bei fast allen untersuchten Präparaten stets in der Nähe der Infektionsstelle. In Abbildung 1 E-H sind zwei Infektionsstellen und die sich daraus entwickelnden Hyphen sichtbar. *U. nuda* konnte bei diesem Präparat bis in die zweite Zellschicht des Fruchtknotens intrazellulär nachgewiesen werden.

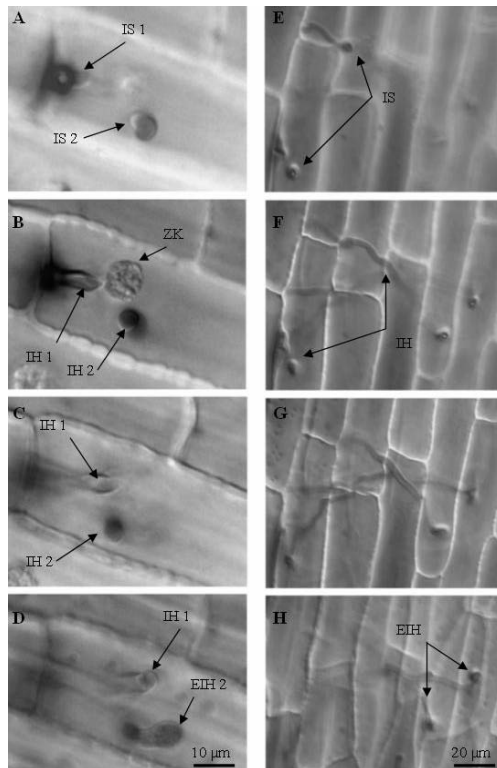


Abb. 1 Eindringen zweier Infektionshyphen (A-D) bzw. mehrerer Infektionshyphen (E-H) in die obersten Zellschichten der Fruchtknotenwand. Um einen räumlichen Eindruck zu vermitteln, ist jeweils ein Bildverlauf dargestellt, wobei in Abb. 1A bzw. E auf die Oberfläche der äußeren Gewebeschicht fokussiert wurde. Die Bilder B-D bzw. F-H zeigen die tiefer liegenden Gewebeschichten. (IS): Infektionsstelle; (ZK): Zellkern; (IH): Infektionshyphen; (EIH): Ende der Infektionshyphen.

Bei allen beobachteten Eindringungsstellen war eine Verbindung zu pilzlichen Strukturen auf der Oberfläche nicht vorhanden, weil sich diese offensichtlich durch die Präparation abgelöst hatten. Es ist daher nicht bekannt, ob die Eindringung direkt aus keimenden Sporen, oberflächlichen Hyphen oder appressorienartigen Strukturen erfolgte.

Diskussion

Mit einem mittleren Befall von 52 % ergab die Inokulation der Blüten mit der Spritze den höchsten Befallswert, gefolgt von der Vakuuminfiltration mit 16 % und der Inokulation durch Besprühen mit lediglich 3 % (Tabelle 1). In Untersuchungen von Panday und Gautam (1989) war die Vakuuminfiltration mit über 80 % Infektionserfolg das zuverlässigste Inokulationsverfahren. Auch Cherewick und Popp (1950) sowie Shands und Schaller (1946) sprechen sich für die Inokulation mittels Vakuuminfiltration aus, da diese in ihren Versuchen im Vergleich zur Inokulation mit der Spritze effektiver und praktikabler war. In Bezug auf die Praktikabilität konnte diese Einschätzung im Rahmen der eigenen Versuche nicht bestätigt werden, denn mit beiden Methoden konnten nahezu identische Stückzahlen an Ähren pro Stunde inokuliert werden. Für die Inokulationsmethode mit der Spritze wurden jedoch viel höhere Befallsraten ermittelt. Sehr wahrscheinlich waren die niedrigen Befallsraten der Methode Vakuuminfiltration darauf zurückzuführen, dass die Abdichtung zwischen Halm und Kammer oft ungenügend war, so dass nur ein Teilvakuum entstand. Für weitere Versuche müsste die Konstruktion der Apparatur daher noch verbessert werden. Der geringe Infektionserfolg, der selbst nach 30fachem Besprühen mit einer Sporensuspension in Wasser erreicht wurde zeigt eindrücklich, dass dieses Verfahren für die Erzeugung von hoch infiziertem Saatgut nicht geeignet ist. Für die Inokulation durch Besprühen mit einer Sporensuspension liegen unseres Wissens in der Literatur keine Vergleichsdaten vor.

Erwartungsgemäß wurde die Keimfähigkeit der Körner durch den Pilzbefall vermindert. Besonders nach der Inokulation mit der Spritze traten Kümmerkorn und teilweise schwarz verfärbte, ganz offensichtlich nicht mehr keimfähige Körner auf. Dies stimmt gut mit den von Oertel (1955) ermittelten Daten überein, in dessen Versuchen der Anteil an Kümmerkorn bei dem mit der Spritze inokulierten Saatgut im Mittel um 23 % höher war als nach

Vakuuminfiltration. Hierin spiegelt sich die Tatsache wider, dass es sich bei der Spritzeninokulation um ein invasives Verfahren handelt, bei dem die Deckspelze durchstoßen wird und Sporen in unnatürlich hohen Konzentrationen direkt auf den Fruchtknoten gelangen und somit schnell zu einer Überinfektion führen können.

Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass es keinen Einfluss der ausgewählten Ährenregion auf den Infektionserfolg zu geben scheint (Tabelle 3). Das war unerwartet, da aus der Literatur bekannt ist, dass eine erfolgreiche Infektion in engem Zusammenhang mit dem Blühzeitpunkt steht (optimal: Beginn der Anthese+5 Tage danach), und dieser sich für Einzelblüten bestimmter Ährenregionen stark unterscheiden kann (Jones und Dhitaphichit, 1991).

Aus dem oben Gesagten lässt sich folgern, dass das Aussprühen von Sporensuspensionen zur Erzielung eines hohen Infektionsgrades nicht geeignet ist. Dagegen ist die Blütcheninokulation mit der Injektionsspritze ein praktikables und effektives Verfahren, welches jedoch hinsichtlich der erzielten Keimraten noch weiter optimiert werden müsste. Erste Untersuchungen in dieser Richtung weisen darauf hin, dass ein Verdünnen des Inokulums zu einer deutlichen Verbesserung der Keimrate führen kann, ohne dabei die Infektionsrate herabzusetzen. Eine abschließende Bewertung der Vakuuminokulation ist aufgrund der genannten Probleme mit der Apparatur nicht möglich. Zumindest konnte bezüglich des Zeitaufwandes ein deutlicher Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Inokulation mit der Injektionsspritze nicht festgestellt werden.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen zum Infektionsverlauf konnte gezeigt werden, dass die Infektion über die Fruchtknotenwand stattfindet (Abbildung 1 A-D). Dies steht im Gegensatz zur Darstellung von Agrios (2005) im Lehrbuch „Plant Pathology“, wonach der Pilz über die Narben infiziert. Diese Darstellung geht offensichtlich auf Lang zurück, nach dem die Infektion sowohl durch die Fruchtknotenwand als auch über die Narbe erfolgen kann (zitiert bei Pedersen (1957)). Im letzteren Fall soll der Pilz den Weg des Pollenschlauches nehmen. Diese Art der Infektion konnte von Pedersen allerdings nicht bestätigt werden, obwohl er häufig auskeimende Sporen auf den Narbenästen beobachtete. In den eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass sich die Brandsporen in großer Zahl an Griffeln und Narben ansammelten. Auch Malik und Batts (1960) beschreiben nur die Infektion über die Fruchtknotenwand. Wie auch bei Pedersen (1957) und Malik und Batts (1960) wuchsen die in die Fruchtknotenwand eindringenden Hyphen stets intrazellulär.

Literatur

- Agrios, G.N., 2005: Plant Pathology. Academic Press, London (UK).
- Cherewick, W.J.; Popp, W., 1950: A modification of Moore's method of inoculating wheat and barley with loose smut. *Phytopathology* **40**, 1054-1056.
- Jones, P., Dhitaphichit, P., 1991: Comparison of responses to floret and seedling inoculation in wheat-*Ustilago tritici* and barley-*U. nuda* combinations. *Plant Pathology* **40** (2), 268-277.
- Kavanagh, T., Mumford, D.L., 1960: Modification and adaption of Popp's technique to routine detection of *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. in barley embryos. *Plant Disease Reporter* **44**, 591.
- Kollmorgen, J.F., Ballinger, J., 1987: Detection and morphology of hyphae of common bunt fungi (*Tilletia laevis* and *T. tritici*) in wheat seedling. *Transactions of the British Mycological Society* **88** (4), 555-559.
- Malik, M.M.S., Batts, C.C.V., 1960: The infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society* **43**, 117-125.
- Moore, M.B., 1936: A method for inoculating wheat and barley with loose smut. *Phytopathology* **26**, 397-400.
- Morton, D.J., 1961: Trypan blue and boiling lactophenol for staining and clearing barley tissues infected with *Ustilago nuda*. *Phytopathology* **51**, 27-29.
- Morton, D.J., 1967: Method for the detection of *Ustilago nuda* mycelium in barley kernels. In: *The American Phytopathological Society (Hrsg.): Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology*. Freeman, W.H. and Company, San Francisco (USA).
- Oertel, C., 1955: Untersuchungen zur Biologie des Gerstenflugbrandes (*Ustilago nuda* (JENS.) Kellerm. et SW.). Dissertation, Landwirtschaft. Fak. Halle.
- Panday, D.K., Gautam, P.L., 1989: Comparison of inoculation techniques for loose smut of wheat. *Plant disease research* **4** (2), 167-169.
- Pedersen, P.N., 1957: Infection of barley by loose smut, *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.. *Friesia* **5**, 341-348.
- Poehlmann, J.M., 1945: A simple method of inoculating barley with loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Popp, W., 1951: Infection in seeds and seedling of wheat and barley in relation to development of loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Shands, H.L., Schaller, C.W., 1946: Response of spring barley varieties to floral loose smut inoculations. *Phytopathology* **36**, 534-548.
- Tapke, V.F., 1931: Influence of humidity on floral infection of wheat and barley by loose smut. *Journal of agricultural Research* **43**, 503-516.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974: A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.