

Untersuchung von Saatgutbehandlungsmitteln / Resistenzinduktoren mit Wirksamkeit gegen Gersten- und Weizenflugbrand (Ustilago nuda var. nuda u. U. nuda var. tritici)

Investigations with seed treatments / resistance inducing agents with efficacy against loose smut of wheat and barley (*Ustilago nuda* var. *nuda* and *tritici*)

FKZ: 02OE094

Projektnehmer:

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)
Institut für Biologischen Pflanzenschutz
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt
Tel.: +49 6151 407-227
Fax: +49 6151 407-290
E-Mail: eckhard.koch@jki.bund.de
Internet: <http://www.jki.bund.de>

Autoren:

Wächter, Rebecca; Löffler, Irene; Zink, Petra; Koch, Eckhard

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
53168 Bonn
Tel.: +49 228 6845-3280 (Zentrale)
Fax: +49 228 6845-2907
E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de
Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

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

**Untersuchung von Saatgutbehandlungsmitteln /
Resistenzinduktoren mit Wirksamkeit gegen Gersten- und
Weizenflugbrand (*Ustilago nuda* var. *nuda* und var. *tritici*)**

Abschlußbericht zum Forschungsprojekt Nr. 02OE094

Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Ausführende Stelle: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologischen Pflanzenschutz
Heinrichstr. 243
64287 Darmstadt

Antragsteller: Dr. Eckhard Koch

Bearbeiter: Petra Zink (15.07.2002 – 31.03.2003) ½ TA
Irene Löffler (01.06.2003 - 31.12.2003) ½ TA
(Dr. Rebecca Wächter 01.07.2002 – 31.12.2003)

Laufzeit: 1.07.2002 – 31.12.2003

Berichtszeitraum: 1.07.2002 – 31.12.2003

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Dr. K.-J. Müller, Getreidezüchtungsforschung Darzau, Darzau Hof, 29490 Neu Darchau

Dr. Hartmut Spieß, Institut für Biologisch-Dynamische Forschung, Zweigstelle Dottenfelder Hof,
Holzhausenweg, 61118 Bad Vilbel

Prof. Gerhard Wolf, Universität Göttingen, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz,
Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	5
1.1	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
1.2	Planung und Ablauf des Projektes	6
1.2.1	Erstellung infizierten Saatgutes	6
1.2.2	Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln im Gewächshaus	6
1.2.3	Optimierung des Nachweises mit ELISA	6
1.2.4	Optimierung von Applikation und Formulierung	6
1.2.5	Freilandversuche (Screening) an Sommergerste	6
1.2.6	Freilandversuche (Exaktversuche) an Wintergerste und Winterweizen	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Erstellen infizierten Saatgutes	9
2.1.1	Einzelblüteninokulation	9
2.1.2	Vakuuminfiltration	10
2.1.3	Methode <i>nach Kaur</i>	10
2.2	Embryotest	10
2.3	Mittelliste und Applikation ans Saatgut	11
2.3.1	Gelistete Pflanzenstärkungsmittel	11
2.3.2	Pflanzenschutzmittel	12
2.3.3	Resistenzinduktoren	12
2.3.4	Pflanzenextrakte	13
2.3.5	Saatgutbehandlung (mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel)	15
2.3.6	Mikrobielle Antagonisten	15
2.4	Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln unter kontrollierten Bedingungen	17
2.4.1	Phytotoxizitätstest	17
2.4.2	Mitteltest	17
2.5	Freilandversuche (Screening) an Sommergerste	18
2.6	Optimierung des Nachweises mit ELISA	18
2.6.1	Saatgut- und Pflanzenaufarbeitung	19
2.6.2	ELISA-Durchführung	20
2.7	Immunlokalisierung <i>in vitro</i>	22
3	Ergebnisse und Diskussion	25
3.1	Infiziertes Saatgut	25
3.2	Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln unter kontrollierten Bedingungen	26
3.2.1	Phytotoxizitätstest	26

3.2.2	Mitteltest	28
3.3	Freilandversuche (Screening) an Sommergerste	33
3.4	Optimierung des Nachweises mit ELISA	34
3.4.1	Pilzgehaltbestimmungen von infiziertem Saatgut	34
3.4.2	Pilzgehaltbestimmungen von infizierten Pflanzen	37
3.5	Immunlokalisierung <i>in vitro</i>	40
4	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	41
5	Zusammenfassung	43
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	45
7	Literaturverzeichnis	49

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

1.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Flugbrand der Gerste und des Weizens ist aufgrund seiner Biologie (Blüteninfektion, Lokalisierung des Myzels im Embryo) wesentlich schwieriger zu bekämpfen als der Steinbrand, dessen Sporen äußerlich am Korn haften. Informationen über Gerstensorten mit Resistenz gegen Flugbrand werden derzeit erarbeitet (Parallelprojekt Dr. Spieß/Dr. Müller, Fischer *et al.* 2002). Eine Bekämpfung mit chemischen Saatbeizmitteln wurde erst mit der Einführung systemischer Wirkstoffe in den 60er Jahren möglich. Im Ökolandbau, wo diese Mittel nicht erlaubt sind, ist die Warm- bzw. Heißwasserbeizung derzeit die einzige zur Verfügung stehende Bekämpfungsmethode. Da dieses Verfahren technisch sehr aufwendig ist (Vorhandensein entsprechender Behandlungsanlagen, Notwendigkeit der schonenden Rücktrocknung des Getreides) und kritisch in Bezug auf die Pflanzenverträglichkeit, ist es allerdings kaum als Routineverfahren geeignet, sondern findet bestenfalls in der Saatguterzeugung Verwendung. Ob Flugbrand mit alternativen Saatgutbehandlungsverfahren bekämpft werden kann, ist nicht bekannt. In Analogie zur Situation bei den chemischen Beizen erscheint es sehr schwierig, alternative Beizmittel mit systemisch-fungizider Wirkung zu finden. Entsprechende Untersuchungen wurden bisher nicht durchgeführt. Dagegen ist es wahrscheinlicher, dass sich über eine Steigerung der pflanzeigenen Abwehrkraft (Resistenzinduktion) durch Saatgutbehandlung eine Bekämpfung oder Befallsminderung erreichen lässt. So wäre es dankbar, dass an das Saatgut applizierte, wurzelbesiedelnde Bakterien Wirkstoffe produzieren, die in der Pflanze Resistenz induzieren (VanLoon *et al.* 1998). Durch Rhizobakterien induzierte systemische Resistenz gegen bodenbürtige und Blatt-Pathogene ist in verschiedenen Fällen beschrieben worden (Hoffland *et al.* 1997, Vogt & Buchenauer 1997). Mit chemischen Induktoren konnte gezeigt werden, dass durch Saatgutapplikation eine Resistenzinduktion möglich ist. Beispielsweise induzierte eine Samenbehandlung mit dem Naturstoff *Chitosan* eine systemische Resistenz gegen *Fusarium*-Fäule an Tomaten (Benhamou *et al.* 1994). Ob sich diese Resistenz auch gegen endophytische Pilze von Getreide, wie den Flugbrand richtet, ist bisher nicht untersucht worden. Es ist auch nicht bekannt, ob sich die genetisch bedingte Resistenz teilresistenter Sorten durch die Applikation von Resistenzinduktoren verstärken lässt.

Versuche mit Flugbränden sind sehr zeitaufwendig, da zwischen Behandlungstermin und Befallsbonitur mehrere Monate liegen. Bei Verwendung von Sommergetreide lässt sich dieser Zeitraum verkürzen. Im Institut für biologischen Pflanzenschutz arbeiten wir mit der amerikanischen Weizensorte *Apogee*, die speziell für die Anzucht unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet wurde (Bugbee *et al.* 1997). Bei 25°C schiebt diese Sorte bereits 30 Tage nach Auflaufen die Ähre. Sie eignet sich daher extrem gut für die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln gegen Brandpilze. Im Rahmen einer Dissertation wurde ein ELISA-Test entwickelt, der sich spezifisch für den Nachweis von *Ustilago nuda* var. *nuda* und var. *tritici* eignet. Nach Saatgutbehandlung mit einem wirksamen Beizmittel war der mit dem ELISA ermittelte Myzelgehalt bereits im 2-Blattstadium deutlich geringer als in den Kontrollpflanzen (Eibel 2002, Eibel *et al.* 2004). Die Verwendung des ELISA-Testes kann also die Befallsbonitur ergänzen, bei entsprechender Optimierung der Methode u.U. sogar ersetzen.

1.2 Planung und Ablauf des Projektes

Ziel des Projektes war die Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln für den Ökoanbau, die einen Schutz gegen Gersten- und Weizenflugbrand verleihen. Damit stünde dem Ökolandbau erstmals eine Möglichkeit zur Verfügung, befallenes Saatgut auf einem anderen Wege als mit der technisch aufwendigen Warmwasserbehandlung zu sanieren.

1.2.1 Erstellung infizierten Saatgutes

Im Falle der Weizensorte *Apogee* musste die Herstellung flugbrandbefallenen Saatgutes arbeitsaufwendig durch Einzelblüteninokulation erfolgen. Alternativ konnte die Inokulation durch Vakuum-infiltration zur Blüte vorgenommen werden. In eigenen Versuchen wurde mit beiden Methoden ein Saatgutbefall mit *U. nuda* var. *tritici* von ca. 50 % erzielt (ermittelt mit der Embryo-Anfärbemethode). Im Falle der Sommergerste sollte mit natürlich infiziertem Saatgut (bereitgestellt von Dr. Müller, Darzau) gearbeitet werden.

1.2.2 Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln im Gewächshaus

Als Saatgutbehandlungsmittel sollten Pflanzenstärkungsmittel und Pflanzenschutzmittel, soweit sie für den Ökoanbau geeignet sind, sowie andere Stoffe natürlichen Ursprungs untersucht werden (z.B. Pflanzenextrakte, Elot-Vis, Milsana, Goldrute; Mikroorganismen: FZB 24, Serenade, Bio-Pro, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*; Naturstoffe: Salicylsäure, Chitosan, Harpin-Protein). Die Auswahl sollte in Abstimmung mit Frau Dr. Jahn, BBA Kleinmachnow erfolgen, die die gleichen oder ähnliche Präparate auf Wirksamkeit gegen Steinbrand testet. In Vorversuchen sollten die Präparate durch Keimversuche auf Filterpapier auf phytotoxische Unbedenklichkeit untersucht werden. Im Falle der flüssig formulierten Präparate sollte die Wirksamkeit in einem ersten Schritt nach Quellenlassen des Saatgutes in den Präparaten getestet werden. Im zweiten Schritt bzw. im Fall der als Pulver formulierten Präparate wurden diese äußerlich an das Saatgut appliziert.

1.2.3 Optimierung des Nachweises mit ELISA

Die Bonitur der Wirksamkeit erfolgte an Hand des Ährenbefalls. Parallel sollte der Nachweis des Pilzes in der Pflanze zu einem früheren Zeitpunkt mit ELISA und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und optimiert werden.

1.2.4 Optimierung von Applikation und Formulierung

Ausgewählte, wirksame Präparate sollten in unterschiedlicher Aufwandmenge appliziert, und die Wirksamkeit ermittelt werden. Die Präparate sollten in unterschiedlichen Formulierungen unter Zusatz von Haftmitteln, Adjuvantien etc. appliziert werden.

1.2.5 Freilandversuche (Screening) an Sommergerste

In der Praxis ist *U. nuda* an Sommergerste, Wintergerste und Winterweizen wichtig. Bei der Planung der Feldversuche ist zu berücksichtigen, dass Sommer- und Wintergetreide zwar zu unterschiedlichen Zeiten ausgesät wird, das Ährenschieben aber fast zu gleicher Zeit erfolgt. Daher

sollten die ersten Feldversuche erst im Frühjahr 2003 an Sommergerste durchgeführt werden. Ca. 5 Präparate, die in den Gewächshausversuchen wirksam waren, sollten in einem orientierenden Versuch (2 Parzellen / Behandlung) an zwei Sommergerstensorten unterschiedlicher Resistenz (erarbeitet im parallel laufenden Projekt Dr. Spieß / Dr. Müller) überprüft werden.

1.2.6 Freilandversuche (Exaktversuche) an Wintergerste und Winterweizen

Im Herbst 2003 sollten Exaktversuche mit zwei Wintergerstensorten unterschiedlicher Anfälligkeit (Herkunft: Parallelprojekt von Dr. Spieß / Dr. Müller) und an einer Winterweizensorte mit je 3 Behandlungsmitteln angelegt werden.

Geplante Zeitskala

Teilaufgabe	2002			2003														
				6						12						18		
	Juli	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Juni	Juli	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez
Erstellung infizierten Saatgutes																		
Mitteleinsatz im Gewächshaus																		
ELISA / Färbung																		
Applikation / Formulierung																		
Sommergerste / Feldversuch																		
Wintergetreide / Feldversuch *																		

* Bonitur im Sommer 2004

2 Material und Methoden

2.1 Erstellen infizierten Saatgutes

Voraussetzung für das Screening von Mitteln gegen Flugbrand ist eine ausreichende Menge von hochinfiziertem Saatgut. Um Versuche im Gewächshausmaßstab durchführen zu können, sind Befallshöhen von mindestens 50 % nötig, eine Zahl, die nur durch künstliche Inokulation erreicht werden kann. Um ausreichende Mengen von hochinfiziertem Saatgut während des gesamten Projektzeitraumes zur Verfügung zu haben, wurde dieses ständig nachproduziert. Dafür eignete sich die amerikanische Weizensorte *Apogee* sehr gut, die speziell für die Anzucht unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet wurde (Bugbee *et al.* 1997). Diese Sorte zeichnet sich durch ihre hohe Anfälligkeit, ihre kurze Vegetationsdauer (sie erreicht bei 20°C bereits ca. 4 Wochen nach dem Auflaufen Entwicklungsstadium EC 75, Milchreife) und geringe Pflanzenhöhe (etwa 50 cm) als ideale Laborpflanze aus. Bei der Anzucht im Gewächshaus wurde das Saatgut in einem Gemisch aus kommerziellen Topf-Substrat (Fruhstorfer Erde Typ T, Fa. Archut, Lauterbach Wallenrod) und Sand (3:1 v/v) in Plastiktöpfen (18*18*18 cm) ausgesät und im Klimaraum bei 22°C unter 16 stündiger künstlicher Beleuchtung (Osram Vialox 400 W NAV-E) kultiviert. Zur Blüte erfolgte die künstliche Inokulation mit Brandähren der Sorte *Apogee* aus dem Mitteltest. Die inokulierten Pflanzen wurden markiert (Kürzen der Grannen) und ausreifen gelassen. Die reifen Körner wurden geerntet und stichprobenartig einem Embryotest (Kapitel 2.2) unterzogen, um die Befallshöhe zu ermitteln und dann bis zum Mitteltest (Kapitel 2.4.2) bei 4°C gelagert.

Das Sporenmaterial wurde in Form getrocknete, kompletter Brandähren der Sorte *Apogee* bei 4°C gelagert. Für die Inokulation über die Injektionsspritze und die Vakuuminfiltration wurde eine wässrige Sporensuspension erstellt, bei der die Sporen einer Brandähre in 100 ml Wasser suspendiert wurden. Die Keimfähigkeit der Sporen wurde je geernteter Charge getestet, indem 100 µl der Suspension auf Petrischalen mit Wasser-Agar ausplattiert wurden und nach 24 h bei RT die Anzahl gekeimter Sporen mikroskopisch bestimmt wurde. Nach der Inokulation wurden die markierten Pflanzen bis zur Abreife stehen gelassen. Die Ernte der inokulierten Körner erfolgte mit der Hand und die Körner wurden bei 4°C gelagert.

2.1.1 Einzelblüteninokulation

Zur Produktion befallenen Saatgutes erfolgte die Inokulation der Getreideblüte gezielt mit Hilfe einer Injektionsspritze direkt mit Sporensuspension (Poelman 1945, Fischer & Holton 1957, Jones & Dhitaphichit 1991) (Abb. 2.1.)

Abb. 2.1 Einzelblüteninokulation von *Apogee*



2.1.2 Vakuuminfiltration

Eine weitere Inokulationsmethode, die vor allem im Feld Anwendung fand, ist die von Moore (1936) beschriebene und von Oort (1939) und Cherewick & Popp (1950) weiterentwickelte Methode der partiellen Vakuuminfiltration. Die dazu notwendige Apparatur wurde im Rahmen der Dissertation von Eibel (2002) in der hauseigenen Werkstatt der BBA angefertigt und ist in der Arbeit genau beschrieben und abgebildet. Bei dieser Methode wird die blühende Ähre luftdicht in eine Inokulationskammer eingespannt, mit Sporensuspension geflutet und dann über eine Vakuumpumpe stoßweise evakuiert und wieder belüftet. Durch das Anlegen des Vakuums entweicht die Luft aus den sich weitenden Blüten, die dann bei der Rückkehr des Luftdrucks mit Inokulum gefüllt werden.

2.1.3 Methode *nach Kaur*

Bei dieser Form der Blüteninokulation nach *Kaur* (Kaur & Grewal 1999, 2000) werden am Anfang der Blüte (die mittleren Antheren des Blütenstandes sind sichtbar) die mittlere Blüte des dreiblütigen Ährchens entfernt, die Spitze des Ährchens abgeschnitten, so dass die Blüten von den Spelzen wie ein Trichter umhüllt sind. Die Ähre wird mit einer Papiertüte umschlossen, die unten mit einem Tacker fixiert wird (Abb. 2.2) und mit einer intakten Brandähre eingestaubt, dabei reicht eine Brandähre für 3 - 4 Ähren. Die Tüten werden mit einem Tacker oben verschlossen, mit der Ähre vorsichtig geknetet, um die Sporen gleichmäßig über die Ährchen zu verteilen und dann mit einer Sprühflasche befeuchtet. Über mehrere Pflanzen wird dann eine Plastiktüte für 3 - 4 Tage gestülpt (unten offen), um ein optimales Klima für die Infektion zu schaffen. Während dieser Zeit werden die Pflanzen gut gegossen.



A

bb. 2.2 Blüteninokulation *nach Kaur*. Ähren mit angeschnittenen Ährchen, in Papiertüten eingehüllt.

2.2 Embryotest

Der Befall des Saatgutes mit Flugbrand wurde in Anlehnung an eine von Morton (1961, 1967, Champion 1999) beschriebene Methode ermittelt. Bei diesem Embryotest wurde das zu untersuchende Saatgut zunächst über Nacht in einer 7 %igen NaOH-Lösung inkubiert, so dass durch die starke Aufquellung und Mazeration der Körner die Embryos frei lagen. Bei guter Ablösung der Embryos wurden sie mit Hilfe feinporiger Siebe vom restlichen Samengewebe abgewaschen, sonst mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig vom Endosperm getrennt. Die Embryos wurden in einer Lactophenol-Trypanblau-Lösung (s.u.) kurz aufgekocht. Dadurch klärten diese auf, während die Pilzhyphe tiefblau gefärbt wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Aufkochen in Lactophenol (s.u.) entfernt. Die Embryos wurden in Glycerin am Binokular mikroskopiert. Sie wurden als befallen eingestuft, wenn im Scutellum Flugbrand-Hyphe deutlich erkennbar waren (Abb. 2.3).

Lactophenol:
Milchsäure, Phenol, Glycerin, A.dest, im
Verhältnis 1:1:1:5

Lactophenol-Trypanblau:
Lactophenol mit 0,01 % Trypanblau

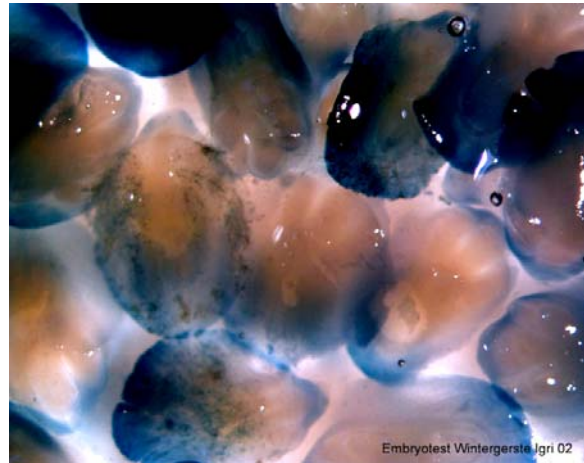


Abb. 2.3 Embryotest mit bräunlich gefärbten Pilzhyphe

2.3 Mittelliste und Applikation ans Saatgut

Als Saatgutbehandlungsmittel wurden Pflanzenstärkungsmittel und Pflanzenschutzmittel, soweit sie für den Ökoanbau geeignet sind, sowie andere Stoffe natürlichen Ursprungs untersucht. Die getesteten Antagonisten (pilzlichen und bakteriellen Ursprungs) wurden als bereits formulierte Präparate oder als Laborpräparationen appliziert. Die kommerziell verwendeten Präparate sind in Tab. 2.1 zusammengefasst. Allerdings waren die meisten der getesteten Mittel Pflanzenextrakte. Die gelisteten Pflanzenstärkungsmittel (mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel), das Pflanzenschutzmittel „Neem Azal“, die Resistenzinduktoren und die Pflanzenextrakte wurden zunächst auf ihre Phytotoxizität (Kapitel 2.4.1) überprüft, bevor sie im Mitteltest (Kapitel 2.4.2) mit der höchsten Konzentration ohne phytotoxische Eigenschaften eingesetzt wurden. Die mikrobiellen Antagonisten wurden direkt an Flugbrand-infiziertes Saatgut wie unten beschrieben appliziert und ohne vorherigen Phytotoxizitätstest auf ihre Wirkung getestet.

2.3.1 Gelistete Pflanzenstärkungsmittel

Die Pflanzenstärkungsmittel wurden mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel (s.u.) in Wasser angesetzt.

- Liste der Pflanzenstärkungsmittel
 - **Ökofluid** (Burckhart & Sohn, Jechtingen) Wirkstoff: Phosphorige Säure
 - **Elot-Vis** (Dr. Otto-LLB, Wittenberge) basiert auf alkoholischen Pflanzenextrakten
 - **Milsana** (Gebrüder Schätze, Bad Waldsee) Extrakt aus Sacchalin-Staudenknöterich
 - **EnviRepel** (Biodomo GmbH, Baden-Baden) basiert auf Knoblauch-Extrakt
 - **Messenger** (EDEN Bioscience, Mulhouse Cedex) Resistenzinduktor basiert auf dem Harpin-Protein
 - **Tillecur** (Gebrüder Schätze, Bad Waldsee) Der Wirkstoff basiert auf Gelbsenfmehl
 - **Kendal** (Gerlach, Hannover) Pflanzenextrakte, Kalium, Oligosaccharide

Formulierte Mikrobielle Mittel

- **Saatgutbehandlung**
Je 45 Flugbrand-infizierte Körner wurden mit 1 ml 1 %iger Methylcellulose angefeuchtet, abtropfen gelassen und in den pulverförmigen Präparaten (Phytovit, Pro Radix, FZB 24) gewälzt und ausgesät (Kapitel 2.4.2)
- **Phytovit** (Prophyta, Malchow Poel) *Bacillus subtilis*-Präparat
- **Pro Radix** (Sourconn Celaflor, Ingelheim) *Pseudomonas*-Präparat
- **FZB 24** (FZB Biotechnik, Berlin) *Bacillus subtilis*-Präparat

2.3.2 Pflanzenschutzmittel

- **Neem Azal** (Celaflor, Ingelheim) Extrakte aus dem Neembaum, Wirkstoff: Triterpenoid Azadirachtin, angesetzt in Wasser.

2.3.3 Resistenzinduktoren

Die Resistenzinduktoren wurden in Wasser angesetzt

- Liste der Resistenzinduktoren
 - **Chitosan 75/200/A3 und 90/10/A1** (Heppe GmbH Queis) basiert auf dem Polysaccharid Chitin
 - **Salicylsäure [SA]**
 - **Bion** (Novartis) SA-Analogum Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (BTH).

Tab. 2.1 In den Versuchen verwendete kommerzielle Präparate

Name	Zugelassenes Pflanzenstärkungsmittel	Zugelassenes Pflanzenschutzmittel	Wirksame Inhaltsstoffe	Als Resistenzinduktor beschrieben	Hersteller
Ökofluid*	+	-	Phosphorige Säure	+	Burckhart & Sohn, Jechtingen
Elot-Vis	+	-	Pflanzenextrakte	(+)	Dr. Otto LBB, Wittenberge
Milsana	+	-	Staudenknöterich-Extrakt	+	Gebr. Schätte, Bad Waldsee
EnviRepel	+	-	Knoblauch-Extrakt	-	Biodomo GmbH, Baden-Baden
Messenger*	+	-	Harpin-Protein	+	Eden Bioscience, Cedex
Tillecur	+	-	Gelbsenfmehl	-	Gebr. Schätte, Bad Waldsee
Kendal	+	-	Pflanzenextrakte	?	Gerlach, Hannover
Phytovit	+	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Prophyta, Malchow Poel
Pro Radix	+	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	Sourconn Celaflor, Ingelheim
FZB 24	+	-	<i>Bacillus subtilis</i>	+	FZB Biotechnik, Berlin
Neem Azal	-	+	Extrakte aus dem Neembaum	-	Sourconn Celaflor, Ingelheim
Chitosan	-	-	Chitin	+	Heppe, Queis
Salicylsäure*	-	-	Salicylsäure	+	Merck, Darmstadt
Bion*	-	-	Salicylsäure-Analogum	+	Novartis

*Verwendung im Ökolandbau nicht oder evtl. nur mit Einschränkung erlaubt.

2.3.4 Pflanzenextrakte

Wenn nicht anders beschrieben (siehe Liste), wurde je Extrakt zu den abgewogenen und gemahlten Pflanzenteilen 50 ml 50°C heißes, 0,0125 %iges Tween 80 zugegeben und eine Stunde unter Rühren inkubieren gelassen, um die Wirkstoffe aus dem Pulver zu extrahieren. Anschließend wurde der Extrakt durch ein Teesieb filtriert.

Bei der Auswahl der Pflanzenextrakte wurde in der ersten Projektphase auf die BBA-eigenen Sammlungen zurückgegriffen. Nach dem ersten Screening wurden gezielt Pflanzen mit gleichen Inhaltsstoffen von den Pflanzenextrakten, die bereits eine gewisse Wirkung gegen Flugbrand gezeigt hatten, ausgewählt.

Pflanzenextrakte aus der BBA eigenen Sammlung

- Rhabarber *Rheum rhabarbarum* Blätter, Wurzel BBA 2002
- Springkraut *Impatiens parviflora* BBA 2001
- Lampranthus *Lampranthus roseus* BBA 1999

- Sachalin-
 Staudenknöterich *Reynoutria sachalinensis* BBA 1998
- Goldrute *Solidago canadensis* BBA 2002
- Brennessel *Urtica dioica* BBA 2001
- Schöllkraut *Chenidonium majus* BBA 2002
- Efeu *Hedera helix* BBA 2002
- Stammlsg: 20 %ige Lösung in 80 % Ethanol
- Torfmoos *Sphagnum cristatum* BBA 2003
- 10 % Stammlsg. 1 g Moostrockenmasse auf 10 ml Ethanol
 (70 %) 2 h bei 60°C rühren, anschließend filtrieren und
 wieder auf 10 ml auffüllen.
- Löwenzahn *Leontodon nudicaulis* BBA 2001
- Knoblauch *Allium sativum* BBA 2002
- Nachtkerze *Oenothera biennis* BBA 2001
- Sonnenblume *Helianthus annuus* “San Luca” BBA 2001
- Cassia *Cinnamomun cassia* BBA 1998
- Lantana *Lantana camara* Blüten BBA 1999
- Schachtelhalm *Equisetum arvense* BBA 2001

Gezielte Auswahl nach Pflanzeninhaltsstoffen

Saponine: wachstumshemmende Wirkung auf Pilze und immunstimulierende Effekte

- Stechapfel *Datura stramonium* Blätter BBA 1999
- Seifenkraut *Saponariae alba* Wurzel Alfred Galke GmbH, Gittelde
- Primel *Primula spec.* Wurzel Galke
- Süßholz *Glycyrrhiza glabra* Wurzel Galke

Cumarine

- Bärenklau *Heracleum sphondylium* Kraut BBA, Galke
- Engelwurz *Angelika spec.* Kraut Galke
- Gartenraute *Ruta graveolens* Kraut Galke

Ätherische Öle (Campher & Cineol) antimikrobiell, wachstumshemmend und abtötend auf Bakterien und Pilze

•	Beifuß	<i>Artemisia vulgaris</i>	Kraut	BBA 2001
•	Anis	<i>Pimpinella anisum</i>	Kraut	Galke
•	Pfefferminze	<i>Menthae piperita</i>	Kraut	Galke
•	Lavendel	<i>Lavendula angustifolia</i>	Blüten	Galke
•	Nelken	<i>Dianthus spec.</i>	Kraut	Galke
•	Thymian	<i>Thymus vulgaris</i>	Kraut	Galke
•	Salbei	<i>Salvia officinales</i>	Kraut	Galke, BBA 2001
•	Eukalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Blätter	Galke
•	Rosmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Kraut	Galke
•	Wermut	<i>Artimesia pontice</i>	Kraut	Galke
•	Mistel	<i>Viscum album</i>	Kraut	Galke
•	Bimbernelle	<i>Sanguisorba minor</i>	Kraut	Galke

Pyrrrolizidinalkaloide

•	Beinwell	<i>Symphytum officinale</i>	Kraut	BBA
•	Sonnenhut	<i>Echinaceae purpurea</i>	Kraut	Galke
•	Huflattich	<i>Tussilago farfara</i>	Blätter	Galke
•	Borretsch	<i>Borrago officinalis</i>	Kraut	Galke
•	Pestwurz	<i>Petasites hybridicus</i>	Blätter, Wurzel	Galke
•	Fuchskreuz	<i>Senecio fuchsi</i>	Kraut	Galke

2.3.5 Saatgutbehandlung (mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel)

Das Saatgut wurde zwei Stunden bei RT in den in Wasser angesetzten Pflanzenstärkungsmitteln (mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel), dem Pflanzenschutzmittel *Neem Azal*, den Resistenzinduktoren und den Pflanzenextrakten vorgequollen, um dem potentiellen Wirkstoff den Weg bis zum Pathogen im Embryo zu ermöglichen. Anschließend wurde die Lösung bzw. der Pflanzenextrakt durch ein Teesieb abfiltriert und das Saatgut für den Phytotoxizitätstest auf Filterpapier ausgelegt oder für den Mitteltest ausgesät.

2.3.6 Mikrobielle Antagonisten

Präparate

- Saatgutbehandlung
 - Je 45 Flugbrand-infizierte Körner wurden mit 1 ml 1 %ige Methylcellulose angefeuchtet, abtropfen gelassen und in den pulverförmigen Präparaten gewälzt.
- Liste der getesteten Präparate
 - MBI 600 (Microbio Ltd., Bolder, USA) *Bacillus subtilis*-Präparat
 - Serenade (AgraQuest, Davis, Calif. USA) *Bacillus subtilis*-Präparat

Streptomyceten, Trichoderma und Pilz 5.6.2.0

- Saatgutbehandlung
Auf je eine gut bewachsene Petrischale wurde 1 ml 1 %iger Methylcellulose pipettiert und das Mycel mit einem Gummischaber abgelöst. Je 45 Flugbrand-infizierte Körner wurden mit der so entstandenen Suspension in der Petrischale gemischt und anschließend ausgesät.
- Pilz-Isolat 5.6.2.0
- Liste der getesteten Streptomyceten
 - FZB 53 (*S. graminifaciens*)
 - Fa Brain 5276 und 5361
 - Wolf 490
- Liste der getesteten Trichoderma
 - Tr. 21 69039
 - Vitalin T3 (Isol.)
 - PR9-10-9
 - P1 41302
 - *T. harzianum*

Weitere Bakterien

- Saatgutbehandlung
Flüssigkulturen wurden in TSB-Medium (Tryptic Soy Broth, Difco; 0370-01) Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon 30 g/l angesetzt:
1l Ansatz: 300 ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml füllen, Medium für die Kontrolle eingeschlossen, 20 min bei 121°C autoklavieren, über Nacht bei RT abkühlen lassen.
Von je einer Petrischale (1/10 TSA, Tryptic Soy Agar) aus der BBA-eigenen Stammhaltung die Bakterien auf die Flüssigkultur überimpfen (sterile Impföse) und 24 h auf einem Schüttler (175-200 Upm) bei 25-27°C (Überhitzungstemp. ~ 30°C) wachsen lassen.
Die Saatgutbehandlung erfolgte mit 45 *Ustilago*-infizierten Körnern in 100 ml-Plastikbechern. Je Ansatz wurde etwa 10 ml Flüssigkultur zugegeben, für die Kontrolle wurde das TSB-Medium verwendet, 1 h inkubieren gelassen, dann durch ein Teesieb abgesehen und ausgesät (Kapitel 2.4.2).
- Liste der getesteten Bakterien
III 232 • I 112 • U 410 • I 35b • I 124b • DSM 7527 • I 109 • 1.2.29.0 • II A3 (1.1.13.0) • III C5

2.4 Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln unter kontrollierten Bedingungen

2.4.1 Phytotoxizitätstest

Dem eigentlichen Mitteltest ging ein Phytotoxizitätstest des einzusetzenden Saatgutes voraus, bei dem die Pflanzenstärkungsmittel (mit Ausnahme der mikrobiellen Mittel), das Pflanzenschutzmittel „Neem Azal“, die Resistenzinduktoren und die Pflanzenextrakte in verschiedenen Konzentrationen an gesundes Saatgut appliziert wurden, um die höchst mögliche Mittelkonzentration ohne Keimungs- und Wachstumshemmung zu ermitteln. Bei dem Keimungstest wurde eine Mittelkonzentration von 10 % als oberste Grenze aus physiologischen und aus praxisrelevanten Methoden gesetzt. Die Pflanzenextrakte wurden, wenn nicht anders beschrieben, in 0,0125 %igem Tween 80 verdünnt, die anderen Mittel in Wasser. Durchgeführt wurden die Phytotoxizitätstests an den Weizensorten *Bussard* und *Apogee* und der Sommergerste *Lawina*.

Da im infizierten Saatgut das Pilzmyzel im Embryo lokalisiert ist, wurde das Saatgut 2 h in den angesetzten Mitteln in den unterschiedlichen Konzentrationen vorgequollen, um das Eindringen des Wirkstoffs bis zum infizierten Embryo zu garantieren. Der Test wurde in Petrischalen mit feucht gehaltenem Filterpapier durchgeführt, wobei jeweils 15 Körner mit drei Wiederholungen (insgesamt 45 Körner) für vier Tage bei 21°C zur Keimung gebracht wurden. Als Kontrolle diente die Saatgutbehandlung mit dem jeweiligen Lösungsmittel. Die höchste Konzentration (maximal 10 %), die keine phytotoxische Wirkung auf das Keimungsverhalten zeigte, wurde für den Mitteltest eingesetzt.

2.4.2 Mitteltest

Um in einem möglichst kurzen Zeitraum eine hohe Anzahl von Mitteln auf ihre Wirksamkeit gegenüber Flugbrand testen zu können, wurde das Screening mit der amerikanischen Weizensorte *Apogee* (Kapitel 2.1) durchgeführt. Für den Mitteltest im Gewächshaus wurde das Saatgut der künstlich infizierten Chargen (aus verschiedenen Ernten und Inokulationsmethoden) mit möglichst 50 % Befall eingesetzt. Die Befallshöhe wurde exemplarisch an 10 bis 30 Körnern von jeder Charge mit Hilfe des Embryotests (Kapitel 2.2) bestimmt.

Saatgutbehandlung und Anzucht

Jeweils 45 Körner pro Mittel (als Kontrolle diente das jeweilige Lösungsmittel) wurden mit der im Phytotoxizitätstest bestimmten Mittelkonzentration behandelt und in drei Erdtöpfe (18*18*18 cm) à 15 Pflanzen gesät. Als Anzuchtserde wurde ein Gemisch aus kommerziellen Topf-Substrat (Frühstorfer Erde Typ T, Fa. Archut, Lauterbach Wallenrod) und Sand (3:1 v/v) gewählt. Die Anzucht erfolgte im Klimaraum bei 22°C unter 16 stündiger künstlicher Beleuchtung (Osram Vialox 400 W NAV-E). Ausgewertet wurde die Anzahl der Brandähren pro Pflanze verglichen mit der Kontrolle.

Saatgut- und Keimlingsbehandlung

Um eine mögliche Wirkungssteigerung von Pflanzenextrakten, die im Verlauf des Projektzeitraumes eine gewisse Wirkung gezeigt hatten, zu bewirken, wurde neben der Saatgutbehandlung zusätzlich eine Keimlingsbehandlung 6 Tage nach der Aussaat (EC 10) vorgenommen.

Dazu wurden die Pflanzenextrakte nach der Extraktion in heißem Tween (Kapitel 2.3.4) nach dem Abfiltrieren ein weiteres Mal durch ein Teesieb mit zwei Lagen Gaze filtriert. Der gut filtrierte Extrakt wurde dann auf die Keimlinge gesprüht, als Kontrolle wurde 0,0125 %iges Tween 80 verwendet.

2.5 Freilandversuche (Screening) an Sommergerste

Für den Freilandversuch am Standort Darzau im Frühjahr 2003 waren bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich Pflanzenextrakte getestet worden, so dass sich die Varianten in erster Linie aus den bis dahin ermittelten besten Pflanzenextrakten (Beinwell, Bärenklau, Beifuß und Stechapfel) zusammensetzten. Auf persönliche Mitteilung von Dr. Spieß (Dottenfelder Hof), der in Vorjahren gute Ergebnisse mit Knoblauchextrakten erzielt hatte, wurden als weitere Varianten Knoblauchextrakt, sowie „EnviRepel“, ein auf Knoblauch basierendes Pflanzenstärkungsmittel, hinzugenommen. Aus der Gruppe der mikrobiellen Antagonisten wurde zudem *Streptomyces graminifaciens* aufgrund seiner guten Wirksamkeit gegen Steinbrand getestet. Als Positivkontrolle unter den biologischen Verfahren war die Warmwasserbeize vorgesehen. Für die Kontrolle wurde sowohl eine unbehandelte, als auch eine vorgequollene/rückgetrocknete Variante eingesetzt.

Als Saatgut wurde die Sommergerste *Lawina* mit einem natürlichen Befall von 6,7 % verwendet. Pro Variante wurden 3000 Körner (150 g) eingesetzt. Bei der Behandlung der Pflanzenextrakte bzw. mit „EnviRepel“ wurde das Saatgut eine Stunde in den Mitteln vorquellen gelassen und dann über Nacht rückgetrocknet. Für die Behandlung mit *Streptomyces* wurden 2 g sporulierende Bakterien von Petrischalen mit einem Gummischaber mit 20 ml 1 %iger Methylcellulose abgewaschen, mit dem Saatgut gemischt und über Nacht getrocknet. Die Warmwasserbeize wurde von Dr. Müller durchgeführt.

Die Aussaat erfolgte Anfang März am Standort Darzau Hof auf 2*5 m² großen Parzellen pro Variante.

2.6 Optimierung des Nachweises mit ELISA

Der immunologische quantitative Nachweis von *Ustilago nuda* in infiziertem Saatgut und infizierten Pflanzen über den ELISA wurde im Rahmen der Dissertation von P. Eibel (2002) entwickelt. Die im Rahmen dieser Dissertation in Kaninchen hergestellten polyklonalen Antikörper tragen die Bezeichnung U1 (Ident-Nr. 989) und U2 (Ident-Nr. 991). U1 erkennt Antigene, die durch Extraktion eines MPB-Kulturfiltrats gewonnen wurden, während sich U2 gegen Antigene aus einem Myzelextrakt (löslichen Cytoplasmaproteinen) richtet. Für den ELISA wurde ausschließlich der Antikörper U2, und zwar aus der letzten Blutabnahme (III), im Anschluss an die sogenannte „Booster-Injektion“, verwendet, weil hier nach Eibel (2002) das ELISA-Signal im Vergleich zu den früheren Blutabnahmen bzw. dem Antikörper U1 am stärksten war.

Voraussetzung für den ELISA als Frühdiagnosesystem war ein standardisiertes Testverfahren, das in fortlaufenden Versuchen reproduzierbare Werte lieferte. Um dies zu erreichen, wurden in den ersten Wochen des Berichtszeitraumes „Trockenübungen“ mit Proben bekannter Pilzmenge

durchgeführt.

Für die Ausbildung von Brandähren durch *Ustilago nuda* ist der Befall des Vegetationspunktes entscheidend (Popp 1951, 1959, Amos 1952, Hoffmann & Schmutterer 1999). Mit der Blüteninfektion befällt der Flugbrand bereits das sich entwickelnde Korn. Das gesunde Korn ist dann von dem infizierten nicht zu unterscheiden. Mit der Keimung des Saatgutes wird auch der Pilz wieder aktiv. Hat er zu diesem Zeitpunkt den Vegetationspunkt nicht besiedelt, ist dies nun sein vorrangiges Ziel. Die Besiedlung muss erfolgt sein, bevor der Vegetationspunkt als Ährenanlage in den Spross entwächst (Ohms & Bever 1995). Um mit Hilfe des ELISA eine quantitative Frühdiagnose des Befalls zu einem möglichst frühen Zeitpunkt zu optimieren, wurde neben dem Saatgut auch der Bereich um den Vegetationspunkt von Pflanzen im Stadium EC 14/20 und die Knoten von Pflanzen im Stadium EC 31 untersucht, weil sich in diesen der Pilz nach erfolgter Besiedelung des Vegetationspunktes anreichert (Malik & Batts 1960a, 1960b, Sorauer 1962).

2.6.1 Saatgut- und Pflanzenaufarbeitung

Für den Nachweis des Pilzes im **Saatgut** wurde das einzelne Korn (ca. 0,03 g) in einem Eppendorfgefäß mit 300 µl Extraktionspuffer (siehe Lösungen Kapitel 2.6.2) bei 4°C einen Tag lang vorgequollen. Anschließend wurde das Korn mit einer Schere möglichst klein geschnitten, weitere 200 µl Extraktionspuffer zugegeben und mit einem Eppendorfmörser zu Pulver gemahlen. Das Kornextrakt wurde 30 min unter langsamem Schütteln inkubiert und dann 30 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die ELISA-Messung abgenommen und bei -20°C gelagert. Für die Untersuchung von Flugbrand-infizierten Saatgutchargen wurden i.d.R. 100 Körner pro Charge auf ihren Pilzgehalt untersucht.

Für den Nachweis des Pilzes in der **Pflanze** wurde das Saatgut der jeweiligen Sorte in einem Gemisch aus kommerziellem Topf-Substrat (Fruhstorfer Erde Typ T, Fa. Archut, Lauterbach Wallerod) und Sand (3:1 v/v) in Plastiktöpfen oder Plastikschalen ausgesät und im Klimaraum bei 22°C unter 16 stündiger künstlicher Beleuchtung (Osram Vialox 400 W NAV-E) kultiviert. In den Stadien EC 14/20 und in dem Knotenstadien EC 31 wurden die Pflanzen vorsichtig komplett aus dem Substrat herausgenommen, unter fließendem Leitungswasser gründlich von anhaftender Erde befreit und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur Erstellung des Pflanzenextrakts wurde bei den Pflanzen im Stadium EC 14/20 der Sprossansatz mit dem Vegetationspunkt untersucht. Bei den Pflanzen im Stadium EC 31 wurden neben dem unteren Sprossabschnitt zudem die Bereiche um die Knoten auf ihren Pilzgehalt untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde gewogen (min. 0,05 g, max. 0,2 g), im Verhältnis 1:5 (w/v) in gekühltem Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert und 30 min bei 20.000 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.6.2 ELISA-Durchführung

Zum Nachweis von *Ustilago* wurde ein direkter ELISA mit biotinyliertem IgG verwendet. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat. Die ELISA-Tests wurden in Mikrotiterplatten (Well Immuno Platten transparent U96 Maxisorp, [449824] Nunc Wiesbaden) ausgeführt. Der Testansatz wurde im Rahmen des Projektes optimiert. Die endgültige Durchführung wird im folgenden beschrieben:

Lösungen

- **PBS** (Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) (pH 7,2 – 7,4) (Casper & Meyer 1981)

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,44 g
KCl	0,2 g
(NaN ₃	0,2 g)
A.dest	ad 1000ml

- **Extraktionspuffer** PBS-Tween (PBS + 0,05 % Tween 20) und 0,2 % PVP₄₀₀₀₀

- **Beschichtungspuffer** pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
(NaN ₃	0,2 g)
A.dest	ad 1000ml

- **Waschpuffer** halbkonz. PBS-Tween

- **Konjugat-Puffer** PBS-Tween und 0,2 % BSA (Bovine Serum Albumin)

- **Substrat-Puffer** pH 9,8

Diethanolamin (DEA)	4850 µl	
A.dest	30 ml	mit 1 N HCl auf pH 9,8 einstellen
A.dest	ad 50 ml	Immer frisch ansetzen!

Testansatz

Beschichtung	Je Kavität der Mikrotiterplatte 100 µl in Beschichtungspuffer verdünnte IgG (1:750) Inkubation der Mikrotiterplatte bei 4°C über Nacht (in Folie, um Verdunstung zu verhindern)
Waschen	3 * 3 min mit Waschpuffer (Spritflasche) kann dann trocken bis zu einer Woche im Kühlschrank bei 4°C lagern (in einer Plastiktüte)
Blocken	Zugabe von 0,2 % BSA in Beschichtungspuffer 100 µl je Kavität, Inkubation 30 min bei 37°C
Waschen	3 * 3 min mit Waschpuffer (Spritflasche)
Probenaufgabe	Je Kavität Zugabe von 100 µl in Extraktionspuffer aufgearbeiteter Probe, sowie Antigen (Verdünnungsreihe s.u.) zur Überprüfung der Bindung und Färbung als Standard und mind. drei Kavitäten mit Extraktionspuffer als Referenz. Inkubation der Mikrotiterplatte 1 h bei 37°C (oder bei 4°C über Nacht).
Waschen	3 * 3 min mit Waschpuffer (Spritflasche)
Kopplung der biotinytierten IgG:	Je Kavität 100 µl verdünnte biot. IgG (1:750) Inkubation der Mikrotiterplatte bei 4°C über Nacht (oder 1 h bei 37°C)
Waschen	3 * 3 min mit Waschpuffer (Spritflasche)
Konjugation der StrAP	Je Kavität 100 µl in Konjugatpuffer verdünnte StrAP-Lösung (Streptavidin-AP-conjugate, Roche Mannheim) (1:7500) 30 min Inkubation bei 37°C
Waschen	3 * 3 min mit Waschpuffer (Spritflasche)
Zugabe des Enzym-Substrats	Je Kavität 100 µl Substratlösung (1 mg pNPP (4-Nitrophenyl-phosphat Biomol) / ml Substratpuffer) Inkubation im Dunkeln bei RT
Messung	Messen der OD bei 405 nm (Referenzwellenlänge 592 nm) nach 60 und 120 min

Die Messung erfolgte in einem Mehrstrahlphotometer (Modell „Spectra Mini“ Fa. Tecan, Crailsheim) mit Hilfe der Software („Easybase“ und „Easyfit“, Vers. 7.31 Fa Tecan, Crailsheim).

Zur Bestimmung der Pilzgehalte in den zu untersuchenden Proben wurde eine Standardreihe aus Verdünnungsstufen des Myzelextraktes (Stammlösung: 1300 µg/ml), der als Antigen verwendet wurde, festgelegt und bei jeder ELISA-Messung parallel zu den Proben mitgemessen. Dabei erwiesen sich folgende Verdünnungen als geeignet: 13, 65, 130, 650 und 1300 ng/ml Extraktionspuffer (Tab. 2.2). Aus der ermittelten Regressionsgleichung wurden die Pilzgehalte der untersuchten Proben errechnet (Abb. 2.4).

Tab. 2.2 Beispiel einer Konzentrationsreihe des Standards (Myzelextrakt von *Ustilago nuda*) und den ermittelten optischen Dichten. Darunter abgebildet die zugehörige Kurve.

<i>Ustilago nuda</i> - Verdünnungsreihe [ng / ml]	OD-Mittelwert (n=3)	Standardabweichung (n=3)
13	0,013	0,003
65	0,130	0,010
130	0,160	0,003
650	0,819	0,020
1300	1,165	0,035

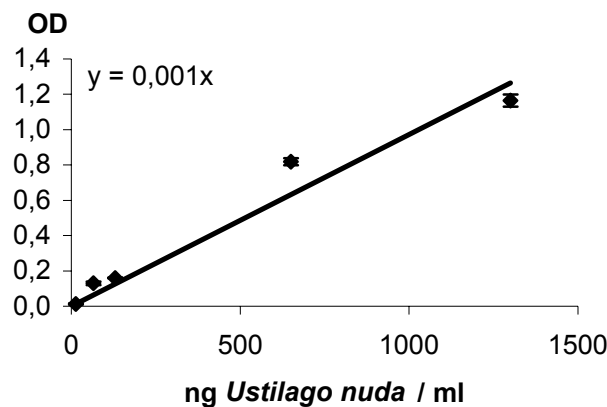


Abb. 2.4. Beispiel einer Regressionsgerade und -gleichung zur Bestimmung der Pilzgehalte

2.7 Immunlokalisierung *in vitro*

Unterstützend zum quantitativen Pilznachweis über den ELISA sollte auch ein histologischer spezifischer und damit immunologischer Nachweis des Pilzes in der Pflanze erbracht werden. Da sich die immunhistologischen Untersuchungen *in planta* als sehr aufwendig herausstellten, konnte im Rahmen dieses Projektes der Pilz zunächst nur *in vitro* nachgewiesen werden.

Antikörper

Primäre Antikörper:

Für die Immunlokalisierung wurden beide im Rahmen der Dissertation von P. Eibel (2002) entwickelten polyklonalen Antikörper gegen *Ustilago nuda* (U1 und U2) auf ihre Immunantwort gegen Flugbrandmyzel überprüft.

- U1 (Ident-Nr. 989 III, dritte Blutabnahme) richtet sich gegen Antigene, die durch Extraktion eines MPB-Kulturfiltrats gewonnen wurden
- U2 (Ident-Nr. 991 II, zweite Blutabnahme) gegen Antigene aus einem Myzelextrakt (löslichen Cytoplasmaproteinen)
- Eingesetzte Verdünnung: 1:500 in 1 % BSA in 0,1 M PBS

Sekundäre Antikörper:

- Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierte Anti-Kaninchen IgG (Sigma F-6005) 1:100 in 1 % BSA in 0,1 M PBS, grün fluoreszierend. Fluorescein-Isothiocyanat wird maximal

angeregt bei 492 nm und hat sein Emissionsmaximum bei 520 nm.

- Alexa 568-konjugierte Anti-Kaninchen IgG ((Molekular Probes Leiden, Niederlande), 1:200 in 1 % BSA in 0,1 M PBS eingesetzt, rot fluoreszierend. Alexa 568 absorbiert bei 579 nm und emittiert bei 601 nm.

Immunlokalisierung von Flugbrandmyzel

Ustilago nuda var. *tritici*-Sporen von Flugbrandähren der Weizensorte *Apogee* wurden auf Wasseragar (mit den Antibiotika Rifampicin 10 mg/l und Streptomycin 50 mg/l versetzt) ausplattiert und 1 Tag bei RT keimen lassen.

- Pilzmyzel mit 1 ml 0,1 M PBS von der Petrischale mit Hilfe eines Gummischabers abwaschen, in Eppendorf sammeln und 2 min bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, blocken mit 1 ml 1 % BSA in 0,1 M PBS 30 min bei RT.
- Aliquotieren in 100 ml-Ansätze und jeweils mit
 - 2 µl 1 % BSA als Kontrolle
 - 2 µl Primärer Antikörper (entspricht 500facher Verdünnung) in 1 % BSA zufügen.
- Inkubation über Nacht bei 4°C (oder eine Stunde bei 37°C).
- Zweimal waschen mit 100 µl 0,1 % BSA (zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Zugabe von 1 bzw. 0,5 µl des Sekundären Antikörpers in 1 % BSA (1:100; 1:200) auf 100µl Probe
- Inkubation eine Stunde bei 37°C (oder bei 4°C über Nacht)
- Zweimal waschen mit 100 µl 0,1 % BSA (zentrifugieren , aber nur beim ersten Mal den Überstand verwerfen.)
- Auf Objektträgern in 1,4, Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO)(Sigma) zur mikroskopischen Auswertung einbetten.

Mikroskopiert wurde am Zeiss Axioskop im UV-Licht (Filtersatz 09, Em.: > 515 nm, Ex.: 450-490 nm)

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Infiziertes Saatgut

Für die geplanten **Freilandversuche** an den Standorten Darzau und Dottenfelder Hof im Frühjahr und Herbst 2003 in Zusammenarbeit mit Dr. K-J. Müller und Dr. Spieß wurde eine Reihe von natürlich infizierten Saatgutposten auf ihre Befallshöhe mit Flugbrand mit Hilfe des Embryotests (Kapitel 2.2) untersucht (Tab. 3.1). Einzelne Saatgutposten wurden zudem auf ihre Befallshöhe mit dem ELISA (Immunnachweis von Einzelkörnern mit spezifischem *Ustilago*-Antikörper) überprüft (vergl. Kapitel 3.4). Mittlerweile liegen für eine Anzahl der Saatgutposten zudem auch die tatsächlichen Befallshöhen aus Freilandversuchen vor, so dass die Korrelation zwischen Embryotest und Ährensymptom (Tab. 3.1) und im Kapitel 3.4 auch mit dem ELISA überprüft werden konnte.

Tab 3.1. Befallshöhen von mit Flugbrand natürlich infizierten Saatgutposten bestimmt über den Embryotest im Vergleich zu der tatsächlichen Befallshöhe (n.b. nicht bekannt).
Verhältnis = [Ährensymptom]/[Embryotest]

Versuchssaatgut	Herkunft	Embryotest Befallshöhe (n = 100 – 300)	Freilandversuch Ährensymptom	Verhältnis
Winterweizen				
WW 29/97 Saat	Dottenfelder Hof	3,0 %	n.b.	
WW Ki 9/98	“	0,0 %	n.b.	
WW Ki 9 / 98 02 Hi. Acker	“	0,0 %	n.b.	
WW Ki 9 / 98 02 H. d. Garten	“	0,8 %	n.b.	
WW 29/97 02 Pfaffenwald	“	0,0 %	n.b.	
WW Bussard 02 Pfaffenwald	“	0,0 %	n.b.	
WW Bussard 02 Hölle 1	“	0,0 %	n.b.	
WW Hof Bussard	“	0,9 %	n.b.	
Wintergerste				
WG Igr1 01	“	6,0 %	13,0 %	2,17
WG Romania 01	“	0,5 %	0,6 %	1,20
WG Venus 01	“	2,6 %	4,7 %	1,81
WG Blanca 02	“	2,7 %	2,2 %	0,81
WG Candesse 02	“	3,7 %	2,3 %	0,61
WG Igr1 02	“	11,4 %	8,0 %	0,70
WG Intro 02	“	1,9 %	1,1 %	0,57
WG Ludmilla	“	3,0 %	3,1 %	1,03
WG Romania 02	“	1,1 %	0,6 %	0,54
WG Silke 02	“	3,8 %	1,6 %	0,42
WG Svenja 02	“	3,8 %	3,7 %	0,97
WG Venus 02	“	4,1 %	4,7 %	1,14
WG Astrid	“	0,0 %	0,0 %	1,00
Sommergerste				
SG L1	Darzau Hof	0,0 %	n.b.	
SG L2 Lawina	“	3,7 %	6,7 %	1,81
SG N1	“	0,0 %	n.b.	
SG N2	“	1,4 %	n.b.	
SG Ismene	LPP Mainz	9,7 %	8,3 %	0,85
Sommerweizen				
SW Mainz	LPP Mainz	10,0 %	11,7%	1,17

Vergleicht man die Befallshöhen, ermittelt über den Embryotest mit dem tatsächlichen Befall, so ist eine gute Korrelation nicht immer gegeben. Dabei gibt in vielen Fällen der Embryotest eine zu hohe Prognose für den Befall ab. Der histologische Nachweis des Pilzes über den Embryotest zeigt vor allem die angefärbten Pilzhyphen auf dem Scutellum. Eine Aussage, in wie weit der Pilz bereits in den Vegetationspunkt vorgedrungen ist, kann nur schwer gemacht werden. Allerdings scheint gerade dies ein Kriterium für den Befall und die spätere Induktion der Brandähre zu sein. Untersuchungen von Batts & Jeater (1958) zeigten, dass bei resistenten Sorten die Pilzhyphen auf dem Scutellum verbleiben und ein weiteres Vordringen zum Vegetationspunkt verhindert wird. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass sich der Embryotest allein für anfällige Sorten zur Befallsprognose eignet, nicht jedoch für weniger anfällige Sorten. Ob in unseren Versuchen ähnliche Mechanismen wirksam waren, ist allerdings nicht bekannt.

Für das Screening unter **kontrollierten Bedingungen** wurde die Laborsorte *Apogee* aufgrund ihrer kurzen Vegetationsperiode verwendet und die Befallshöhe des künstlich infizierten Saatgutes vor dem Mitteltest stichprobenartig mit dem Embryotest getestet. Dabei sollten die Saatgutchargen eine Mindestbefallshöhe von 40 % haben.

Leider zeigten im Verlauf des Projektzeitraumes die Saatgutposten immer geringere Befallshöhen, so dass die Optimierung der Herstellung hochinfizierten Saatgutes zum vorrangigen Problem wurde. Dabei zeigte sich, dass die Methode nach *Kaur* (Kapitel 2.1.3) zu den besten Ergebnissen führte, wengleich in den Vorjahren auch die herkömmliche Einzelblüteninokulation (Kapitel 2.1.1) und auch die Vakuumfiltration (Kapitel 2.1.2) zu Befallshöhen von bis zu 80 % geführt hatten (Eibel 2002). Eine mögliche Ursache könnte in den extrem heißen Sommermonaten zu finden sein, da dadurch auch die „kontrollierten Bedingungen“ nicht immer gewährleistet waren. Bei dem Vergleich der Ergebnisse des Embryotests mit dem tatsächlichen Ährensypptom der unbehandelten Kontrolle des Mitteltests stimmten die Befallshöhen teilweise sehr gut überein, teilweise lagen die tatsächlichen Befallshöhen unter denen des Embryotests. Da mit dem Saatgut als begrenzender Faktor für ein erfolgreiches Screening sparsam umgegangen werden musste, konnte nur mit einer geringen Anzahl von 30 Körnern eine Abschätzung mit dem Embryotest erfolgen, so dass auch hier die Anzahl für eine echte statistische Vorhersage nicht gewährleistet war (In offiziellen Prüfungen zur Saatgutgesundheit werden über 1000 Körner untersucht).

3.2 Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln unter kontrollierten Bedingungen

3.2.1 Phytotoxizitätstest

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Phytotoxizitätstests der Pflanzenextrakte, der gelisteten Pflanzenstärkungsmittel, der Resistenzinduktoren und des Pflanzenschutzmittels „Neem Azal“ an Weizen (*Bussard, Apogee*) und Gerste (*Lawina*). Die maximal eingesetzte Konzentration der untersuchten Präparate betrug 10 %. Das eingesetzte Lösungsmittel war bei den Pflanzenextrakten 0,0125 % Tween 80 (wenn anders, dann in Klammern angegeben), bei den anderen Mitteln Wasser.

Pflanzenextrakte

<i>Name</i>	Höchste Konzentration ohne phytotoxische Wirkung (max. 10 %)	<i>Name</i>	Höchste Konzentration ohne phytotoxische Wirkung (max. 10 %)
<i>Allium sativum</i>	10 %	<i>Menthae piperita</i>	10 %
<i>Angelika spec.</i>	10 %	<i>Oenothera biennis</i>	10 %
<i>Artemisia vulgaris</i>	8 %	<i>Petasites hybridicus</i>	4 %
<i>Artimesia pontice</i>	10 %	<i>Pimpinella anisum</i>	8,5 %
<i>Borrago officinalis</i>	10 %	<i>Primula spec.</i>	10 %
<i>Chenidonium majus</i>	1 %	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	8 %
<i>Cinnamomun cassia</i>	5 %	<i>Rheum rhabarbarum</i> Blätter Wurzel	0,5 % 5 %
<i>Datura stramonium</i>	5 %	<i>Rosmarinus officinalis</i>	10 %
<i>Dianthus spec</i>	0,5 %	<i>Ruta graveolens</i>	10 %
<i>Echinaceae purpurea</i>	10 %	<i>Salvia officinales</i> BBA-Sammlung Kraut (Galke)	1 % 10 %
<i>Equisetum arvense</i>	3 % (H ₂ O)	<i>Sanguisorba minor</i>	10 %
<i>Eucalyptus globulus</i>	10 %	<i>Saponariae alba</i>	5 %
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	10 %	<i>Senecio fuchsi</i>	10 %
<i>Hedera helix</i>	1 % (4 % Ethanol)	<i>Solidago canadensis</i>	2 %
<i>Helianthus annuus</i>	3 %	<i>Sphagnum cristatum</i>	5 % (H ₂ O)
<i>Heracleum sphondylium</i>	4 %	<i>Symphytum officinale</i>	4 %
<i>Impatiens parviflora</i>	7,5 %	<i>Thymus vulgaris</i>	10 %
<i>Lampranthus roseus</i>	5 %	<i>Tussilago farfara</i>	10 %
<i>Lantana camara</i>	5 %	<i>Urtica dioica</i>	10 %
<i>Lavendula angustifolia</i>	5 %	<i>Viscum album</i>	10 %
<i>Leontodon nudicaulis</i>	3 %		

Gelistete Pflanzenstärkungsmittel	Höchste Konzentration ohne phytotoxische Wirkung (max. 10 %)	Resistenzinduktoren	Höchste Konzentration ohne phytotoxische Wirkung (max. 10 %)
Ökofluid	4 %	Chitosan 75/200/A3	10 %
Elot-Vis	8,5 %	Chitosan 90/10/A1	10 %
Milsana	10 %	Salicylsäure	0,1 %* (0,05 %)
Messenger	10 %* (1 %, 10 %)	Bion	100 ppm * (10 ppm, 100 ppm)
EnviRepel	5 %		
Tillecur	4 %	Biologisches Pflanzenschutzmittel	
Schachtelhalmkonzentrat Plus	3 %	Neem Azal	3 %

*höchste eingesetzte Konzentration im Phytotoxizitätstest (eingesetzte Konzentration im Mitteltest)

3.2.2 Mitteltest

Die folgenden Tabellen zeigen die Wirksamkeit der verschiedenen Behandlungen ermittelt mit dem Laborweizen *Apogee*. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus einem Versuch mit drei Töpfen (mit je 15 Pflanzen) angegeben. Die Wirksamkeit bezieht sich jeweils auf den Mittelwert aus den Befallshöhen der drei Töpfe mit den Kontrollpflanzen (Behandlung mit Tween oder Wasser), die zeitgleich und unter den gleichen Bedingungen mitgewachsen sind. Dabei ergaben sich in den Versuchen in der Kontrolle Befallshöhen von 30 bis 60 %. Versuche, in denen die Kontrolle Befallshöhen unter 30 % Befall zeigten, wurden nicht ausgewertet und mit einer anderen Flugbrand-infizierten Saatgutcharge wiederholt. Mittel, die eine gewisse Wirksamkeit zeigten, wurden in einem Wiederholungsversuch getestet, in einigen Fällen, aufgrund der hohen Standardabweichung, mit sechs statt mit drei Töpfen, um eine bessere Aussage zu erhalten.

Pflanzenextrakte

<i>Name</i> (eingesetzte Konz.)	Wirkung in % (± Standardabw.)	<i>Name</i> (eingesetzte Konz.)	Wirkung in % (± Standardabw.)
<i>Allium sativum</i> (7,5 %, 10 %) 10 % 7,5 % 1. Versuch 2. Versuch	≤ 0,00 ≤ 0,00 ≤ 0,00	<i>Menthae piperita</i> (10 %)	≤ 0,00
<i>Angelika spec.</i> (10 %)	27,19 (± 17,25)	<i>Oenothera biennis</i> (10 %)	4,92 (± 0,61)
<i>Artemisia vulgaris</i> (6 %) 1. Versuch 2. Versuch	60,13 (± 39,87) ≤ 0,00	<i>Petasites hybridicus</i> (4 %)	10,30 (± 50,28)
<i>Artemisia pontice</i> (10 %)	1,63 (± 20,44)	<i>Pimpinella anisum</i> (8,5 %)	≤ 0,00
<i>Borrago officinalis</i> (10 %)	10,43 (± 29,83)	<i>Primula spec.</i> (10 %)	4,82 (± 14,88)
<i>Chenidonium majus</i> (1 %)	≤ 0,00	<i>Reynoutria sachalinensis</i> (8 %)	≤ 0,00
<i>Cinnamomun cassia</i> (5 %)	≤ 0,00	<i>Rheum rhabarbarum</i> Kraut (0,5 %) Wurzel (5 %)	16,67 (± 10,23) ≤ 0,00
<i>Datura stramonium</i> (7,5 %) 1. Versuch 2. Versuch	38,60 (± 26,32) ≤ 0,00	<i>Rosmarinus officinalis</i> (10 %)	0,65 (± 24,85)
<i>Dianthus spec</i> (0,5 %)	12,04 (± 38,60)	<i>Ruta graveolens</i> (10 %)	30,23 (± 32,17)
<i>Echinaceae purpurea</i> (10 %)	27,72 (± 6,22)	<i>Salvia officinales</i> BBA-Sammlung (1 %) Galke (10 %)	15,88 (± 37,34) 2,72 (± 0,44)
<i>Equisetum arvense</i> (3 %)	≤ 0,00	<i>Sanguisorba minor</i> (10 %)	22,80 (± 10,65)
<i>Eucalyptus globulus</i> (10 %)	30,04 (± 32,38)	<i>Saponariae alba</i> (5 %)	32,90 (± 6,37)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> (10 %)	34,44 (± 24,15)	<i>Senecio fuchi</i> (10 %)	9,13 (± 10,75)

<i>Hedera helix</i> (1 %)	4,18 (± 25,64)	<i>Solidago canadensis</i> (2 %)	7,06 (± 19,84)
<i>Helianthus annuus</i> (3 %)	2,16 (± 10,12)	<i>Sphagnum cristatum</i> (2 %) 1. Versuch 2. Versuch	22,61 (± 16,42) ≤ 0,00
<i>Heracleum sphondylium</i> (4 %) 1. Versuch 2. Versuch	48,83 (± 21,93) 3,93 (± 13,94)	<i>Symphytum officinale</i> (3 %) 1. Versuch 2. Versuch	41,79 (± 5,58) ≤ 0,00
<i>Impatiens parviflora</i> (7,5 %)	8,94 (± 9,19)	<i>Thymus vulgaris</i> (10 %)	8,96 (± 18,20)
<i>Lampranthus roseus</i> (5 %)	3,61 (± 28,92)	<i>Tussilago farfara</i> (10 %)	17,27 (± 31,75)
<i>Lantana camara</i> (5 %)	≤ 0,00	<i>Urtica dioica</i> (10 %)	≤ 0,00
<i>Lavendula angustifolia</i> (5 %)	7,49 (± 33,63)	<i>Viscum album</i> (10 %)	≤ 0,00
<i>Leontodon nudicaulis</i> (3 %)	3,09 (± 3,34)		

Gelistete Pflanzenstärkungsmittel	Wirkung in % (± Standardabw.)	Resistenzinduktoren	Wirkung in % (± Standardabw.)
Ökofluid (4 %)	≤ 0,00	Chitosan 75/200/A3 (10 %)	8,91 (± 3,37)
Elot-Vis (8,5 %)	15,09 (± 17,43)	Chitosan 90/10/A1 (10 %)	16,04 (± 21,30)
Milsana (10 %)	26,90 (± 14,62)	Salicylsäure (0,05 %)	≤ 0,00
EnviRepel (5 %) 1. Versuch 2. Versuch	41,96 (± 34,77) 24,96 (± 39,97)	Bion 100 ppm 10 ppm	15,17 (± 9,64) 8,94 (± 9,19)
Messenger 1% 10%	35,25 (± 35,51) 23,98 (± 40,94)		
FZB 24 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	12,88 (± 23,35) 11,82 (± 28,62)	Biologisches Pflanzenschutzmittel	
Tillecur (4 %)	≤ 0,00	Neem Azal (3 %)	27,63 (± 37,28)
Phytovit 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	23,04 (± 55,68) ≤ 0,00		
Pro Radix 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	69,70 (± 42,85) 6,87 (± 44,45)		
Kendal 1 % 0,5 % 0,25 %	16,97 (± 19,45) 27,85 (± 51,78) ≤ 0,00		

Mikrobielle Antagonisten

Streptomyzeten	Wirkung in % (± Standardabw.)	Trichoderma	Wirkung in % (± Standardabw.)
FZB 53	≤ 0,00	Tr. 21 69039	≤ 0,00
Fa Brain 5276	3,00 (± 16,50)	Vitalin T3 (Isol.) 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	49,49 (± 71,42) 7,82 (± 23,77)
Fa Brain 5361	≤ 0,00	PR9-10-9 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	64,58 (± 26,84) ≤ 0,00
Wolf 490	≤ 0,00	P1 41302 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	38,78 (± 43,93) ≤ 0,00
		<i>T. harzianum</i>	≤ 0,00
		Pilz 5.6.2.0 1. Versuch (3 Töpfe) 2. Versuch (6 Töpfe)	33,92 (± 17,75) 1,76 (± 43,80)
Weitere Bakterien			
III 232	≤ 0,00	<i>Bacillus subtilis</i>	
I 112	≤ 0,00	MBI 600	≤ 0,00
U 410	≤ 0,00	Serenade	≤ 0,00
I 35b	≤ 0,00		
I 124b	≤ 0,00		
DSM 7527	≤ 0,00		
I 109	≤ 0,00		
1.2.29.0	21,19 (± 22,10)		
II A3 (1.1.13.0)	8,05 (± 13,03)		
III C5	≤ 0,00		

Mit den Pflanzenextrakten, die im ersten Screening eine Wirksamkeit von über 30 % zeigten, wurden Wiederholungsversuche unter den gleichen Bedingungen, aber auch mit längerer Vorquellungszeit (5 h statt 2 h) und erhöhter Konzentration durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 dargestellt. Leider konnten die hohen Wirkungsgrade des ersten Screenings weder im Wiederholungsversuch, noch durch längere Einwirkungszeit des Extraktes bzw. höhere Extraktkonzentration verifiziert werden.

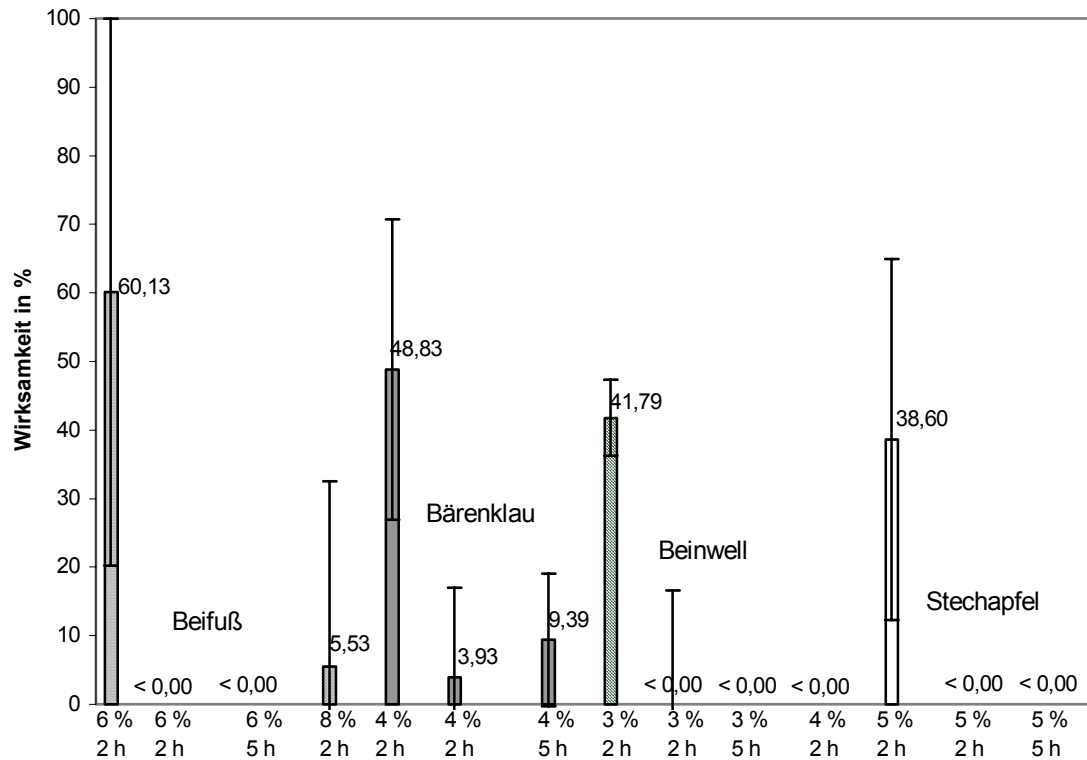


Abb. 3.1 Wirkung von Pflanzenextrakten bei 2 bzw. 5 stündiger Vorquellung des Flugbrand-infizierten Saatgutes und unterschiedlichen Konzentrationen

Zusätzlich wurden von den Pflanzenextrakten, die im ersten Screening eine gewisse Wirksamkeit zeigten, neben der Saatgutbehandlung eine zusätzliche Keimlingsbehandlung im Stadium EC 10 durchgeführt. Dabei konnten immerhin für die Pflanzenextrakte Bärenklau und Stechapfel wieder gewisse Wirksamkeiten von 21 % bzw. 28 % erreicht werden (Abb. 3.2), nachdem durch die alleinige Saatgutbehandlung selbst mit längerer Einwirkungszeit bzw. erhöhter Konzentration die anfangs erreichten Wirksamkeiten von 48 % bzw. 38% nicht reproduziert werden konnten (Abb. 3.1).

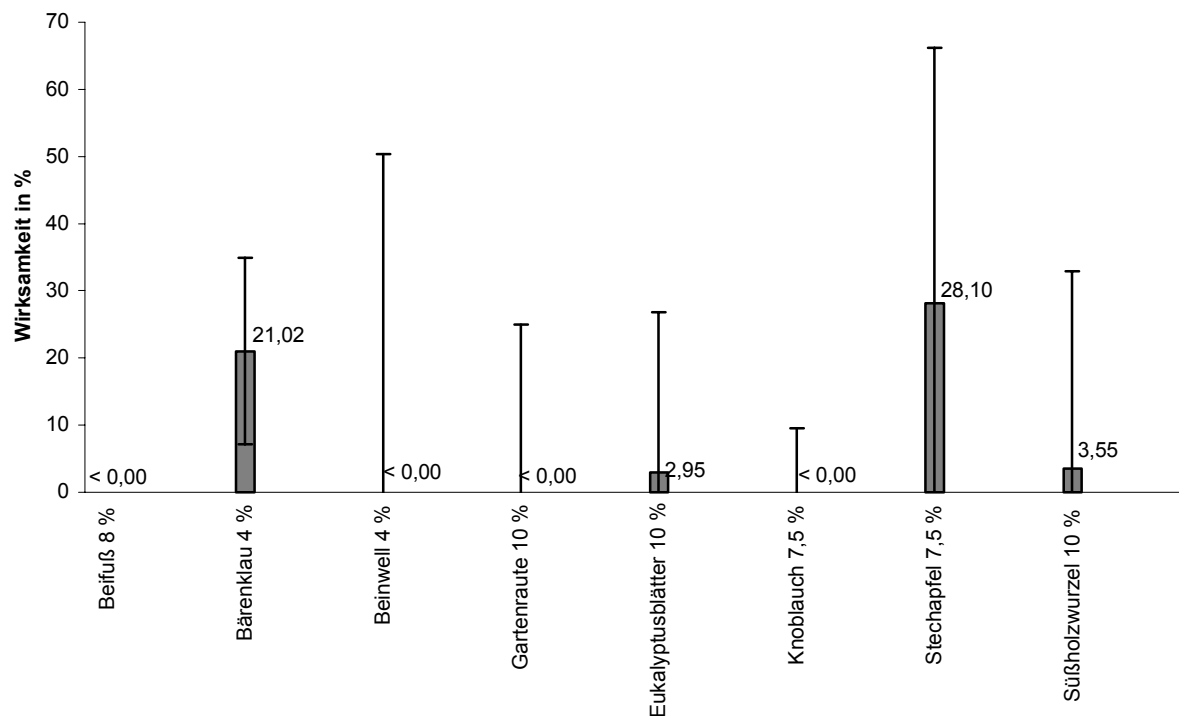


Abb. 3.2 Wirkung von Pflanzenextrakten appliziert als Saatgutbehandlung und zusätzlicher Keimlingsbehandlung

Die höchsten, im ersten Screening ermittelten Wirksamkeiten sind im folgenden zusammengefaßt:

- **Pflanzenextrakten:**
Beifußkraut (60,13 %), Bärenklaukraut (40,83 %), Beinwellkraut (41,79 %), Gartenrautenkraut (30,23 %), Eukalyptusblätter (30,04 %), Stechapfelkraut (38,60 %), Süßholzwurzel (34,44 %), Seifenkrautwurzel (32,90 %)
- **den Pflanzenstärkungsmittel:**
das auf Knoblauch basierende EnviRepel (41,96 %) (das Pflanzenextrakt aus Knoblauch zeigte keine Wirkung) und Pro Radix (69,70 %)
- **und den mikrobiellen Antagonisten ausschließlich aus der Gruppe der Trichoderma das Isolat Vitalin T3 (49,49 %), PR9-10-9 (64,58 %), P1 41302 (38,78 %) und der Pilz 5.6.2.0 (33,92 %)**

Leider ließen sich die Wirksamkeiten nicht reproduzieren. Auch mit einer zusätzlichen Keimlingsbehandlung konnten die Wirkungen weder bestätigt, noch erhöht werden.

3.3 Freilandversuche (Screening) an Sommergerste

Der Freilandversuch an der Sommergerste *Lawina* zeigte mit im Mittel 1136 ± 78 Ähren pro Parzelle (5 m^2) eine normale Bestandesdichte. Allein die Variante Knoblauch hatte mit 19 und 28 Ähren in den beiden Parzellen nahezu keinen Aufgang. Auf die Variante Warmwasserbeize musste aufgrund schlechter Keimung in den Vortests (pers. Mittlg. Müller) verzichtet werden.

Die mit Hilfe des Embryotests zuvor ermittelte Befallshöhe aus 300 zufällig gewählten Körnern von 3,7 % war im Feldversuch mit im Mittel 6,68 % deutlich höher. Dabei zeigte sich, dass die Quellung keinen Einfluss auf die Befallshöhe hatte. Beide Varianten lagen mit einem Befall von $6,25 \pm 1,68$ % (unbehandelt) und $6,7 \pm 0,75$ % (vorgequollen) im gleichen Größenbereich.

Die Pflanzenextrakte, die unter kontrollierten Bedingungen Wirkungsgrade von 40 – 60 % gezeigt hatten, zeigten zwar auch im Freiland eine gewisse Wirksamkeit, jedoch lag diese mit max. 30 % deutlich niedriger (Abb. 3.3). Auch das auf Knoblauch basierende Pflanzenstärkungsmittel „Envi-Repel“ konnte keine höhere Wirkung erzielen. Zu Knoblauch als Pflanzenextrakt konnte aufgrund schlechten Aufgangs (< 5%) keine Aussage gemacht werden. Allerdings zeigen die in der Zwischenzeit ermittelten Ergebnisse aus dem Mitteltest unter kontrollierten Bedingungen keine Wirkung. *Streptomyces graminifaciens* zeigte keine Wirkung auf den Flugbrandbefall, ein Ergebnis, das inzwischen auch unter kontrollierten Bedingungen bestätigt wurde.

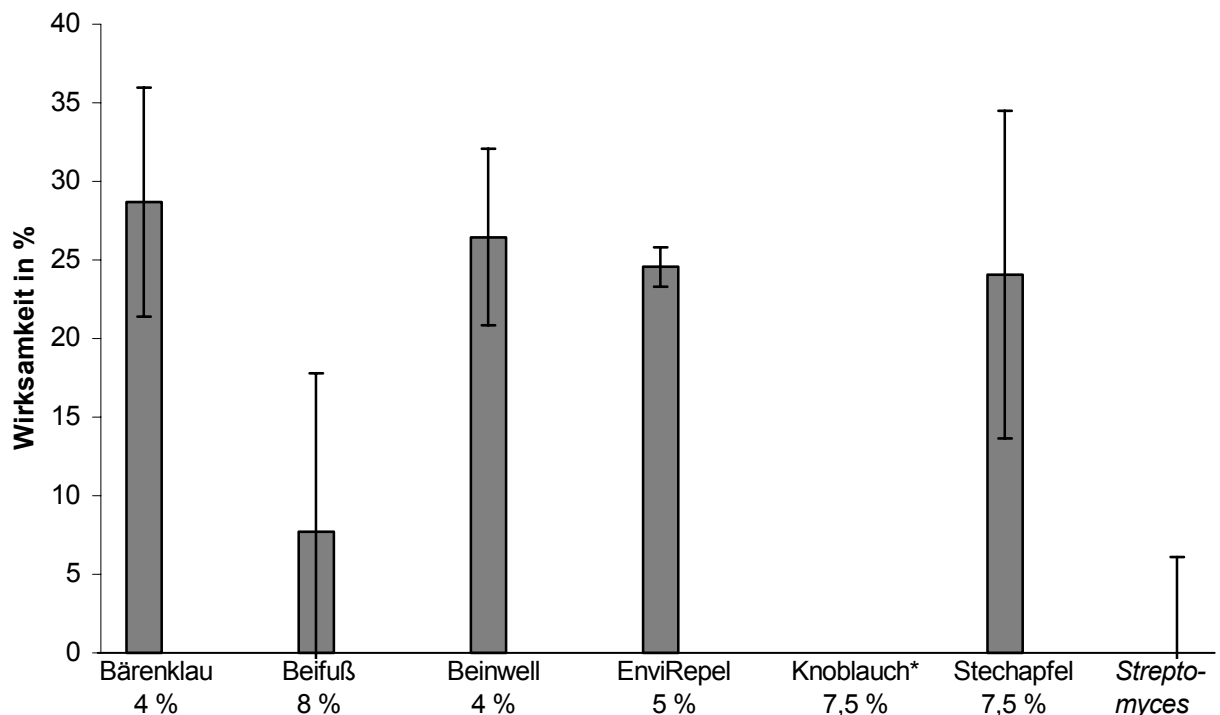


Abb. 3.3 Wirkung ausgewählter Behandlungsmittel im Freilandversuch am Standort Darzau Frühling / Sommer 2003 an der Sommergerste *Lawina*. Die unbehandelte Kontrolle hatte einen Befall von $6,68 \pm 1,38$ %. * Die Variante Knoblauch wurde mit einem Aufgang von < 5 % nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Insgesamt konnte also eine gewisse Wirksamkeit der Pflanzenextrakte Bärenklau, Beifuß, Beinwell und Stechapfel und des Pflanzenstärkungsmittel „EnviRepel“ im Freilandversuch an Gerste bestätigt werden, allerdings lag die Wirksamkeit mit max. 30 % weit unter einem praxisrelevanten Maß.

3.4 Optimierung des Nachweises mit ELISA

Um den ELISA als immunologische Nachweismethode mit spezifischen Antikörpern gegen *Ustilago nuda* var. *nuda/tritici* zur Früherkennung von Flugbrand infiziertem Saatgut und Pflanzen einsetzen zu können, wurde die Methode in den ersten Wochen des Berichtszeitraumes standardisiert und optimiert. Hierdurch konnte dabei das bisher am Institut praktizierte ELISA-Verfahren in der Dauer von vier ganzen Tagen auf zwei halbe Tage verkürzt werden.

3.4.1 Pilzgehaltbestimmungen von infiziertem Saatgut

Erste Versuche mit einer künstlich infizierten Saatgutcharge der Sorte *Apogee* mit einem Befall von 90 % nach Embryotest zeigten signifikante Unterschiede in den *Ustilago*-Gehalten zu gesunden Einzelkörnern (Abb. 3.4). Von den 12 Körnern, die aus inokulierten Blütchen gebildet worden waren, hatten 11 einen signifikant erhöhten OD-Wert, was mit dem genannten Wert des Embryotests (90 %) übereinstimmt.

Das gesunde Saatgut zeigte ebenfalls eine geringe OD von bis zu 0,1, was einem Pilzgehalt von 0,18 µg *Ustilago nuda* /Korn ml entsprechen würde, so dass damit alle Werte bis 0,2 µg *Ustilago n.* /Korn ml unter der Nachweisgrenze des ELISA liegen.

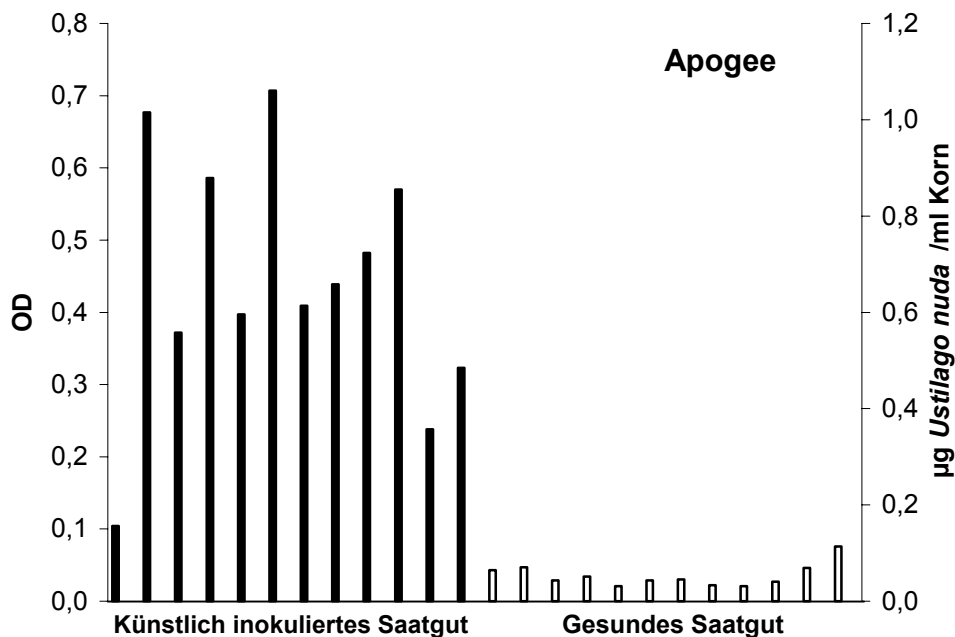


Abb. 3.4 OD- Werte und Pilzgehalte in µg *Ustilago nuda* /ml Korn von künstlich inokuliertem (schwarze Balken) und gesunden (weiße Balken) Saatgut der Sorte *Apogee*.

Die folgenden Abbildungen 3.5 bis 3.9 zeigen die Flugbrandgehalte von je 100 untersuchten

Körnern (Ausnahme WW *Ki 9/98 02 Hi* mit nur 25 untersuchten Körnern) unterschiedlich hoch natürlich infizierter Saatgutchargen.

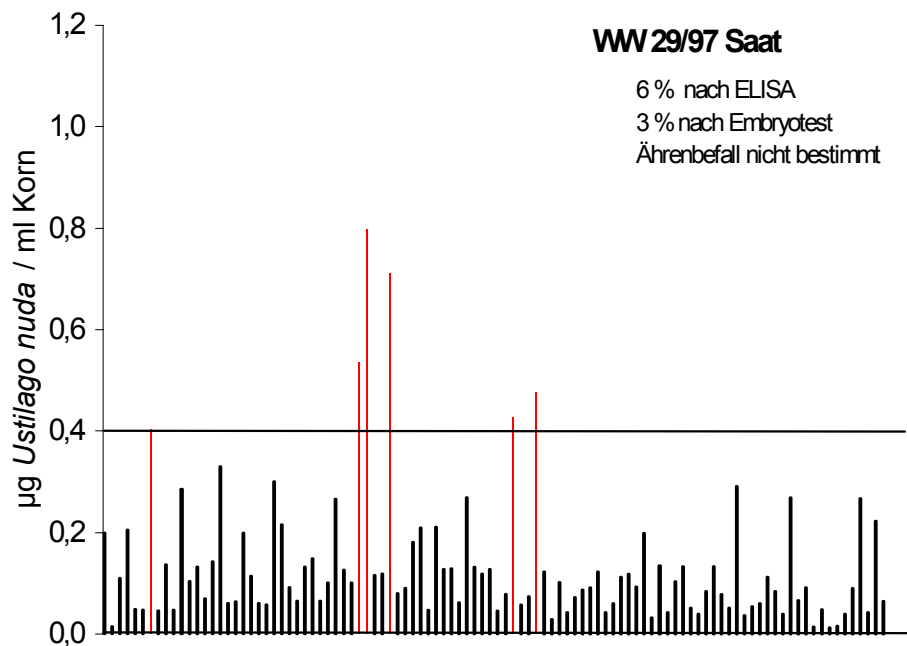


Abb. 3.5 Flugbrandgehalte von natürlich infiziertem Saatgut des Winterweizens „29/97 Saat“ vom Standort Dottenfelder Hof. Ährenbefall im Feld: nicht bestimmt , Prognose nach Embryotest: 3 %.

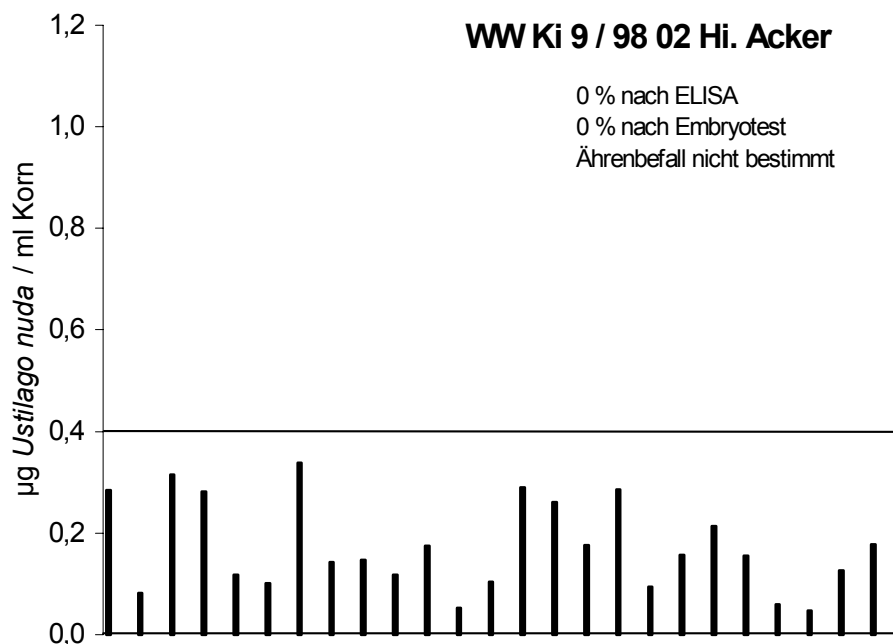


Abb. 3.6 Flugbrandgehalte von natürlich infiziertem Saatgut des Winterweizens „Ki 9/98 02 Hi. Acker“ vom Standort Dottenfelder Hof. Ährenbefall im Feld: nicht bestimmt , Prognose nach Embryotest: 0 %.

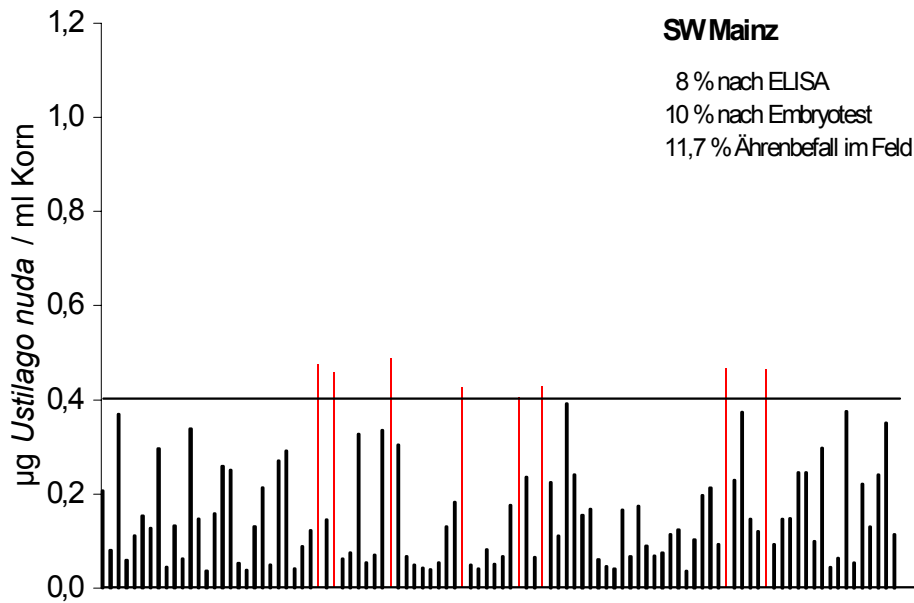


Abb. 3.7 Flugbrandgehalte von natürlich infiziertem Saatgut des Sommerweizens „Mainz“ vom Standort LPP Mainz. Ährenbefall im Feld: 11,7 % , Prognose nach Embryotest: 10 %.

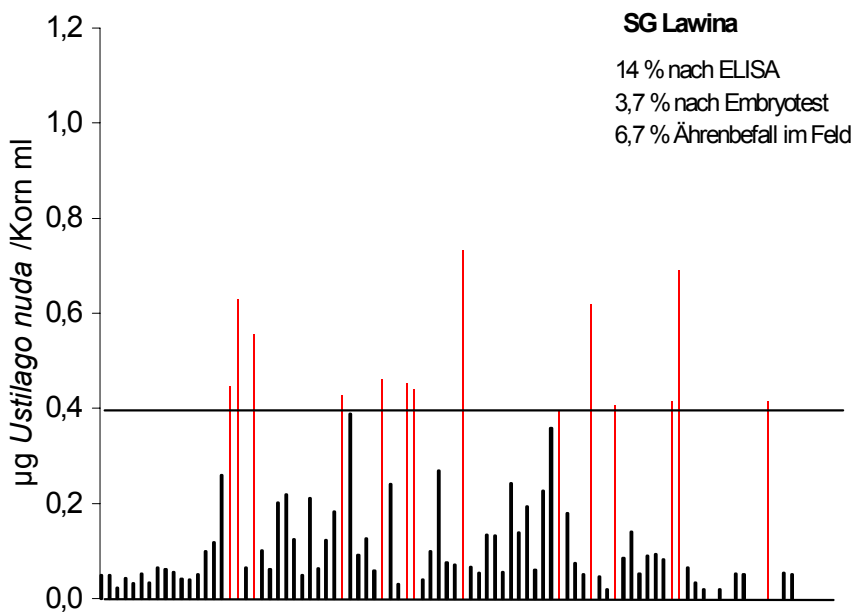


Abb. 3.8 Flugbrandgehalte von natürlich infiziertem Saatgut der Sommergerste „Lawina“ vom Standort Darzau Hof. Ährenbefall im Feld: 6,7 % , Prognose nach Embryotest: 3,7 %.

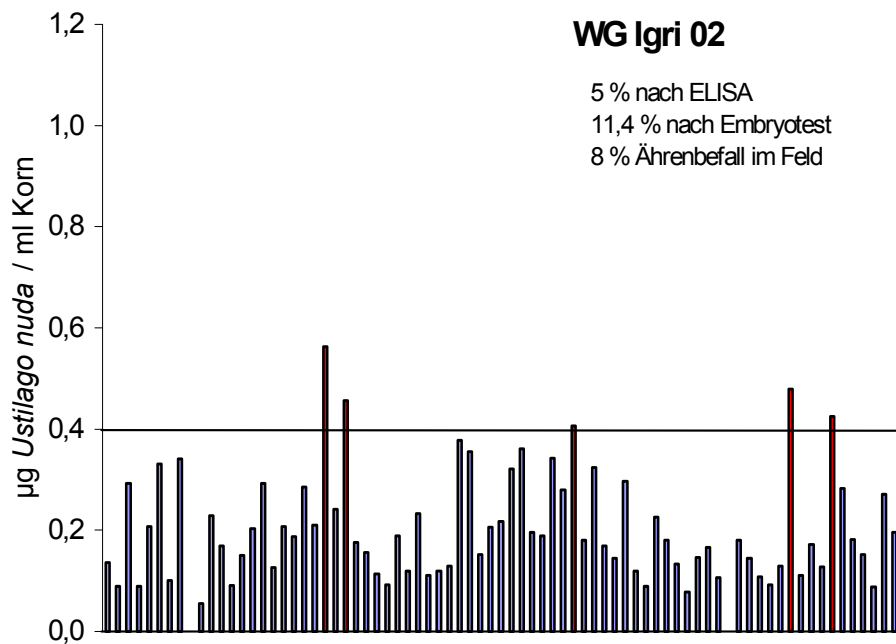


Abb. 3.9 Flugbrandgehalte von natürlich infiziertem Saatgut der Wintergerste „Igrı 02“ vom Standort Dottenfelder Hof. Ährenbefall im Feld: 8 % , Prognose nach Embryotest: 11,4 %.

Legt man bei den untersuchten Saatgutchargen die für das gesunde Saatgut ermittelte Nachweisgrenze von $0,2 \mu\text{g } Ustilago / \text{Korn ml}$ zugrunde (Abb. 3.4), dann ergibt sich ein viel zu hoher Wert als Prognose für den tatsächlichen Feldbefall. Ein Gehalt von mindestens $0,4 \mu\text{g } Ustilago / \text{Korn ml}$ scheint realistischer zu sein und gibt eine bessere Prognose für das tatsächliche Ährensymptom. Damit scheint eine gewisse Mindestmenge an Pilz im Saatgut Voraussetzung für die Induktion einer Brandähre zu sein. Dies scheint plausibel, da über den ELISA der Pilzgehalt im gesamten Korn bestimmt wird. In den Untersuchungen von Eibel (2002) hatten auch die Kornhälften ohne den Embryo von flugbrandbefallenem Saatgut hohe Pilzgehalte. Entscheidend ist jedoch ausschließlich der Befall des Vegetationspunktes.

Allerdings war bei der Pilzgehaltsbestimmungen mit dem ELISA mit bis zu 100 untersuchten Körnern und einem empirisch festgelegten Grenzwert von $0,4 \mu\text{g}$ Flugbrand / Korn ml noch immer eine recht hohe Abweichung in beide Richtungen (zu hoch, zu niedrig) zu verzeichnen. Die Untersuchung einer noch größeren Anzahl von Einzelkörnern könnte zu einer besseren Prognose führen, scheint jedoch aufgrund des sehr hohen Arbeitsaufwandes nicht praxisgerecht. Insgesamt erscheint die Ermittlung des Saatgutbefalls mit der Methode des ELISA also noch sehr problematisch.

3.4.2 Pilzgehaltbestimmungen von infizierten Pflanzen

Da beim Flugbrand der Pilz bereits im Saatgut vorhanden ist, könnte eine Frühdiagnose zu einem späteren Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung möglicherweise eine bessere Prognose für das Ährensymptom liefern, da auf diese Weise nur der Pilzgehalt der infektiösen Hyphen im Vegetationspunkt bestimmt wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die natürlich infizierte Wintergerste *Igri 02* im EC 14 Stadium (Vierblattstadium) und der künstlich infizierte Laborweizen *Apogee* im EC 20 (Beginn der Bestockung) und im Stadium EC 31 (Knotenbildung) mit Hilfe des ELISA untersucht. Dabei wurden die Pflanzenbereiche Sprossansatz mit Vegetationspunkt (EC 14/20) bzw. mit Bestockungsknoten (EC 31) und der Knoten des Haupttriebs getrennt untersucht. Danach ergab sich für die Untersuchungen des Sprossansatzes im Stadium EC 14 der natürlich infizierten Wintergerste *Igri 02* eine Prognose von 14 % Befall über den ELISA (Abb. 3.10), was deutlich höher über den ermittelten 5 % des Saatgutes (Abb. 3.9) liegt. Die Abweichung zum Ergebnis des Embryotests ist moderat zum tatsächlichen Feldbefall (8 %), allerdings immer noch sehr groß.

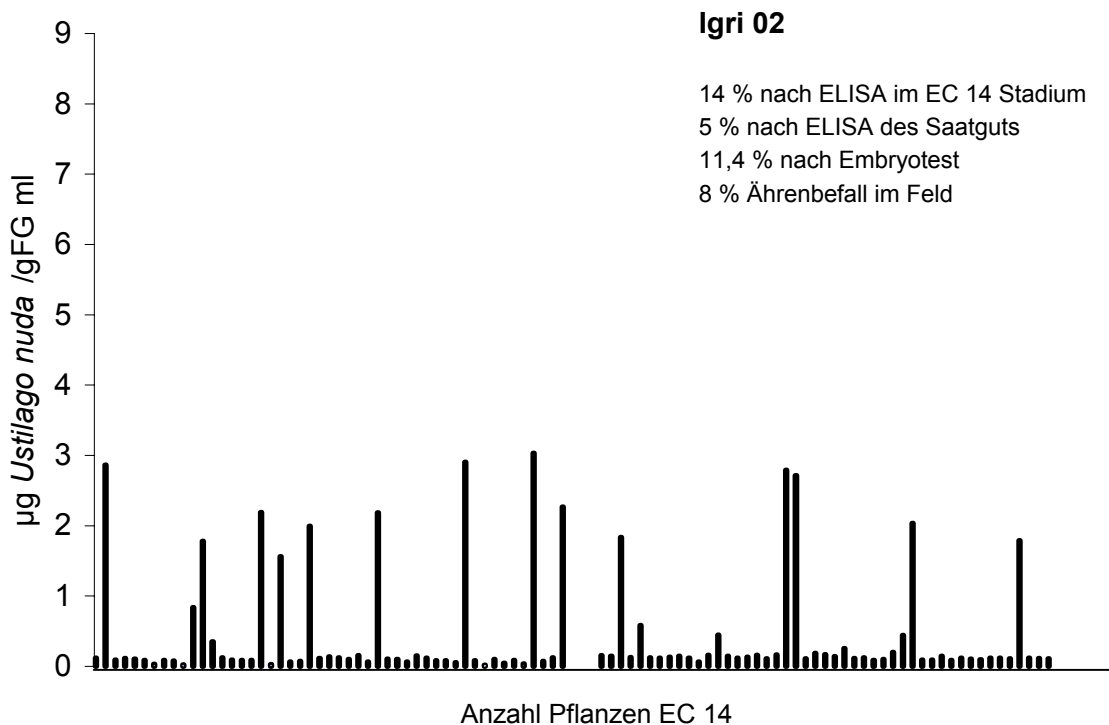


Abb. 3.10 Flugbrand-Gehalte des Sprossansatzes mit Vegetationspunkt der Wintergerste *Igri 02* (aus natürlich infiziertem Saatgut) im EC 14 Stadium mit einem Feldbefall von 8 % und 11,4 % nach Embryotest.

Untersuchungen des Sprossansatzes der künstlich infizierten Sorte *Apogee* zum Beginn der Bestockung zeigten einen Befall von 31 % bei der unbehandelten Variante. Allerdings gab es auch bei der gebeizten Charge einige Pflanzen mit recht hohen Pilzgehalten (Abb. 3.11).

Im späteren Knotenstadium (Abb. 3.12) zeichnete sich deutlich eine Anreicherung des Pilzes im Knoten ab, wobei Pilzgehalte bis zu 9 µg / gFG ml erreicht werden. Aus den erhöhten Gehalten im Sprossansatz und dem ersten Knoten lässt sich ein Befall von 35 % prognostizieren. Der tatsächliche Befall lag jedoch mit 42 % etwas höher. Wie bei den Untersuchungen im EC 20 Stadium waren die Pilzgehalte der gebeizten Charge nicht signifikant niedriger als die der unbehandelten Variante.

Damit konnte im Rahmen dieses Projektzeitraumes der ELISA weder an Saatgut noch an Jungpflanzen (unabhängig von der Art der Inokulation: künstlich oder natürlich infiziert) die Höhe des Ährenbefalls zufriedenstellend vorhersagen.

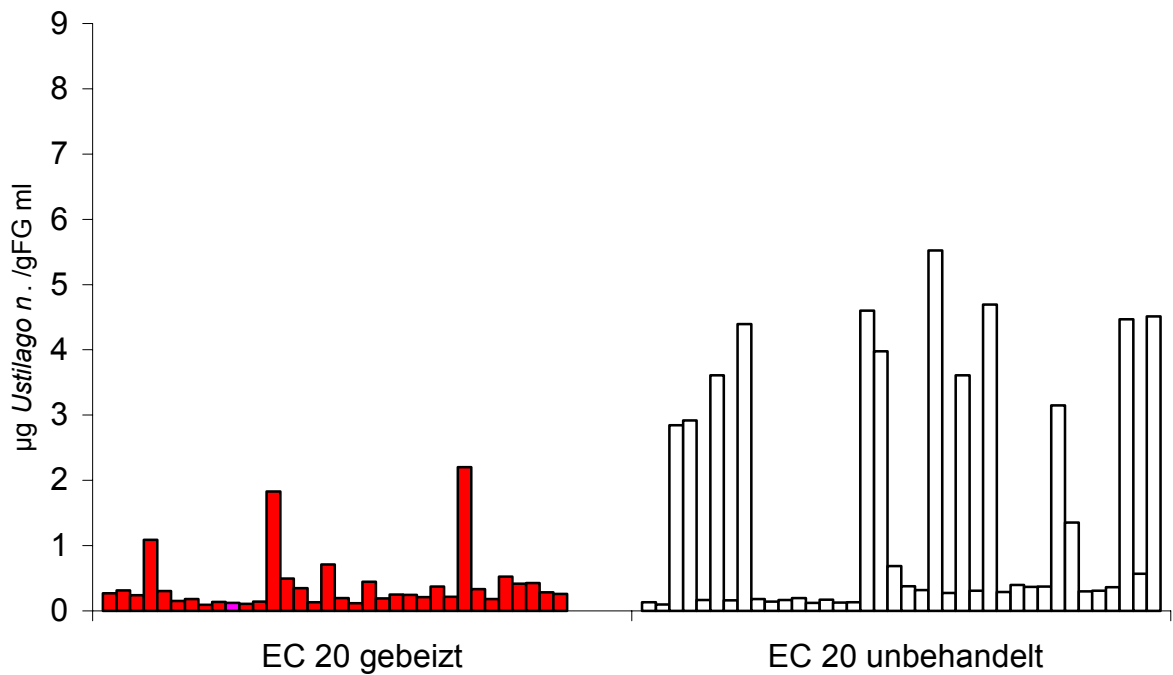


Abb. 3.11 Flugbrand-Gehalte des Sprossansatzes mit Vegetationspunkt der Sorte *Apogee* (aus künstlich infiziertem Saatgut) im EC 20 Stadium von gebeiztem Saatgut (rot gefüllt) und unbehandeltem Saatgut (weiße Balken) von *Apogee* mit einem Befall von 42 % (Ährensymptom von 45 Pflanzen) und 47 % nach Embryotest.

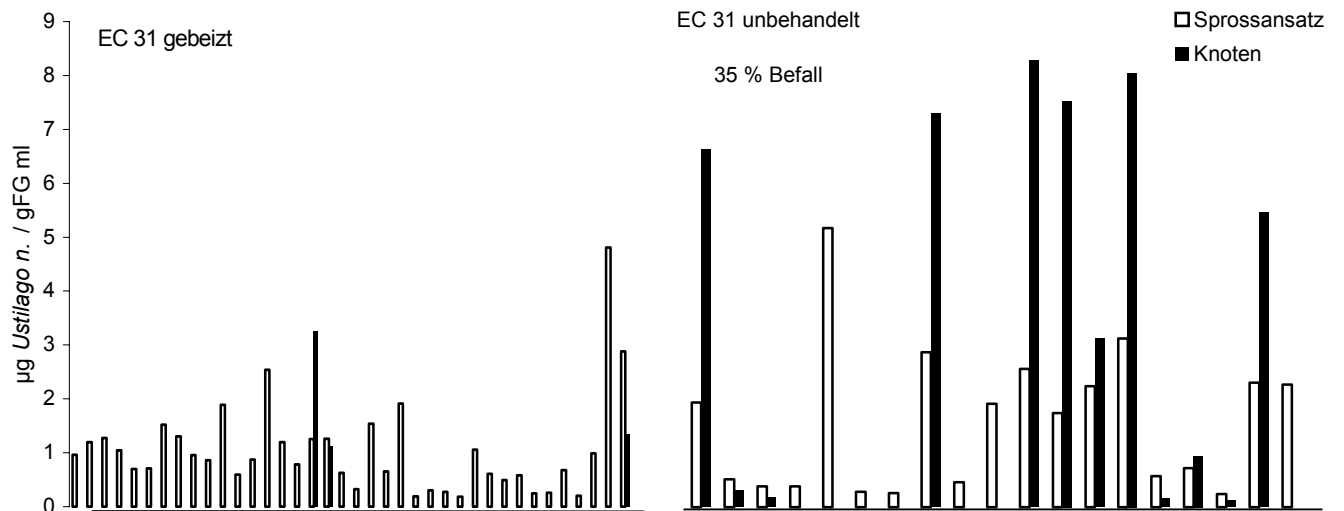


Abb. 3.12 Flugbrand-Gehalte des Sprossansatzes mit Bestockungsknoten (weiße Balken) und des ersten Knotens (schwarze Balken) der Sorte *Apogee* (aus künstlich infiziertem Saatgut) im EC 31 Stadium von gebeiztem Saatgut und unbehandeltem Saatgut mit einem Befall von 42 % (Ährensymptom von 45 Pflanzen) und 47 % nach Embryotest.

3.5 Immunlokalisierung *in vitro*

Von den beiden untersuchten Antikörpern gegen *Ustilago nuda*, U1 und U2, zeigte nur der Antikörper U1 (Ident-Nr. 989, richtet sich gegen Antigene, die durch Extraktion eines MPB-Kulturfiltrats gewonnen wurden) eine gute Immunantwort. Mit dem Antikörper U2 (Ident-Nr. 991), der gegen Antigene aus einem Myzelextrakt (löslichen Cytoplasmaproteinen) gerichtet ist, konnte der Pilz über die Immunlokalisierung nicht detektiert werden.

Für die sekundären Antikörper zeigten sowohl der FITC- (Abb. 3.13) als auch der ALEXA-Farbstoff gute Fluoreszenzen. Der ALEXA-Farbstoff überzeugte allerdings durch seinen sparsamen Einsatz (Verdünnung von 1:200, statt 1:100) bei gleichbleibender farblicher Intensität und ist durch seine rote Fluoreszenz einem grün fluoreszierendem Farbstoff vorzuziehen, da Vortests zeigten, dass das Pflanzenmaterial teilweise eine grüne Eigenfluoreszenz hat (Abb. 3.14), die die Detektion mit einem grün fluoreszierenden Sekundäntikörper unnötig erschweren würde.

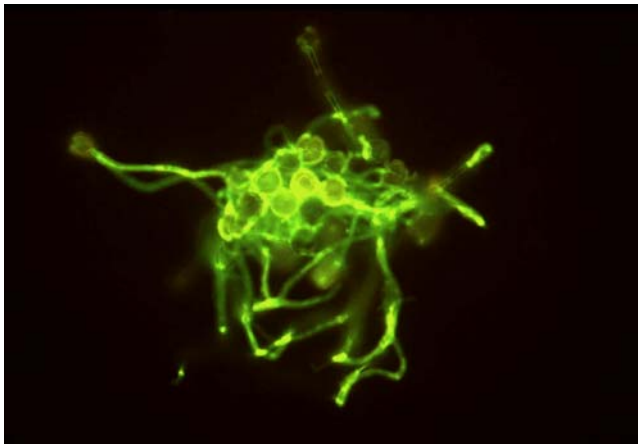


Abb. 3.13. Immunmarkierung keimender *Ustilago*-Sporen

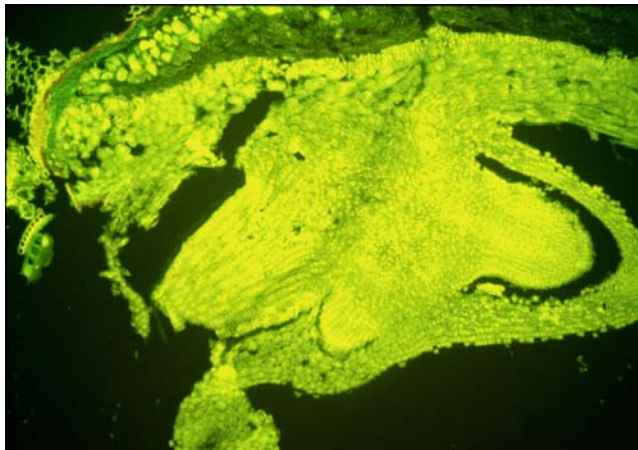


Abb. 3.14. Grün-gelbe Eigenfluoreszenz eines Weizenkeimlings (Querschnitt) im UV-Licht

4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

In dem 19-monatigen Untersuchungszeitraum ist klar geworden, dass eine Bekämpfung des Flugbrandes über das Saatgut mit biologischen Mitteln sehr problematisch ist. Aus den Arbeiten sind keine Saatgutbehandlungsmittel hervorgegangen, die unmittelbar in der Praxis angewendet werden können. Es wurden aber wichtige Ergebnisse bzw. Erkenntnisse für zukünftige Arbeiten gewonnen:

- Für eine große Anzahl von Pflanzenextrakten und kommerziellen Präparaten wurden phytotoxisch unbedenkliche Konzentrationen für die Samenbehandlung ermittelt.
- Das Ergebnis, dass einige Extrakte unter kontrollierten Bedingungen Wirksamkeit besaßen, die sich auch im Feldversuch andeutete, könnte Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein. Allerdings müssten parallel die Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit geklärt werden.
- Zukünfte Arbeiten sollten auch Kombination aus Saatgutbehandlung und Blattapplikationen (mit Resistenzinduktoren) in Erwägung ziehen. Ebenso wäre an Blütenspritzungen zu denken.
- Als dauerndes, alles überlagerndes Problem hat sich die Verfügbarkeit geeigneten Saatgutes erwiesen. Der Befall von natürlich infiziertem Saatgut ist für die hier durchgeführten Versuche in der Regel zu gering. Daher muss auf Saatgut aus künstlicher Inokulation zurückgegriffen werden, das aber häufig sehr hohe Pilzgehalte und ein vermindertes TKG aufweist. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass der Pilz nicht nur im Embryo lokalisiert ist. Es gibt Berichte aus der Praxis, nach denen der Ährenbefall im Feld deutlich höher war als aufgrund des Embryobefalls zu erwarten. Sollte hier evtl. Myzel außerhalb des Embryos eine Rolle spielen? Zwar dürfte in den allermeisten Fällen nur das Myzel im Embryo epidemiologisch relevant sein. Trotzdem ist es fraglich, ob sich Saatgut aus künstlicher Inokulation in Bezug auf die Bekämpfbarkeit des Pilzes mit „milden“ Mitteln ähnlich verhält wie Saatgut mit natürlichem Befall.
- Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung des ELISA für einen Nachweis des Pilzes im Saatgut in der hier verwendeten Form wenig geeignet ist. Zum Nachweis in der wachsenden Pflanze wurden weitaus erfolversprechendere Ergebnisse erzielt. Allerdings wären weitere Versuche an einer größeren Pflanzenzahl nötig.

5 Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war es, alternative Saatgutbehandlungsmittel mit systemisch fungizider oder resistenzinduzierender Wirkung gegen *Ustilago nuda* zu finden.

Es wurden 41 Pflanzenextrakte, 23 Mikroorganismen, 7 Pflanzenstärkungsmittel, 4 Resistenzinduktoren und ein biologisches Pflanzenschutzmittel als Samenbehandlung erprobt. Unter kontrollierten Bedingungen konnte an der Weizensorte *Apogee* eine Wirksamkeit von 30 bis 60 % in der Gruppe der Pflanzenextrakte gefunden werden: Beifußkraut (60,13 %), Beinwellkraut (41,79 %), Bärenklaukraut (40,83 %), Stechapfelkraut (38,60 %), Süßholzwurzel (34,44 %), Seifenkrautwurzel (32,90 %), Gartenrautenkraut (30,23 %) und Eukalyptusblätter (30,04 %). Aus der Gruppe der Pflanzenstärkungsmittel erzielte das auf Knoblauch basierende „EnviRepel“ eine Wirksamkeit von 41,96 % und das *Pseudomonas*-Präparat „Pro Radix“ 69,70 %. Aus der Gruppe der mikrobiellen Antagonisten konnten neben dem Pilzisolat 5.6.2.0 (33,92 %) ausschließlich einige Isolate aus der Gruppe der *Trichoderma* erhöhte Wirksamkeiten erreichen: Isolat Vitalin T3 (49,49 %), Rostock PR9-10-9 (64,58 %) und P1 41302 (38,78 %).

Allerdings ließen sich die anfangs ermittelten Wirksamkeiten nicht reproduzieren, und auch mit einer zusätzlichen Keimlingsbehandlung konnten die Wirkungen weder bestätigt, noch erhöht werden.

In einem Feldversuch an Sommergerste wurden neben Pflanzenextrakten der mikrobielle Antagonist FZB 53 auf Wirksamkeit gegenüber Flugbrand überprüft. Dabei ließ sich bei den Extrakten von Beinwell, Bärenklau, Stechapfel und Beifuß eine Wirksamkeit zwar tendenziell bestätigen, allerdings war der Wirkungsgrad mit ≤ 30 % zu gering für die Anwendung in der Praxis.

Zudem wurde ein System zur Frühdiagnose mit Hilfe eines immunologischen Nachweises über ELISA weiterentwickelt und standardisiert. Infiziertes Saatgut konnte eindeutig von gesundem Saatgut mit Hilfe des ELISA unterschieden werden. Bei Untersuchungen junger Pflanzen konnte der Flugbranderreger in den Stadien EC 14 und EC 30 nicht nur im Vegetationspunkt, sondern auch in den Knoten der Haupt- und Seitentriebe nachgewiesen werden. Eine hinreichend exakte Vorhersage des späteren Ährenbefalls konnte allerdings weder durch ELISA-Messungen von bis zu 100 Einzelkörnern noch durch Untersuchungen des Sprossansatzes oder der Knoten von Jungpflanzen getroffen werden. Eine bessere Prognose könnte möglicherweise durch die Isolierung des Vegetationspunktes und dessen Pilzgehaltbestimmung in verschiedenen Jungstadien erreicht werden.

In dem 19-monatigen Untersuchungszeitraum ist klar geworden, dass eine Bekämpfung des Flugbrandes über das Saatgut mit biologischen Mitteln problematisch ist. Da das Pilzmyzel im Innern des Embryos lokalisiert ist, müssen in den Behandlungsmitteln potentiell vorhandene fungizide Wirkstoffe in ausreichender Menge bzw. Konzentration bis zum Embryo vordringen, oder es müsste eine Resistenzinduktion der Pflanze ausgelöst werden. Nach den vorliegenden Erfahrungen scheint eine Beschränkung auf die Samenbehandlung nicht sinnvoll. Eine zusätzliche Behandlung zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt (Keimlingsstadium) könnte eventuell die Wirksamkeit steigern. Eine weitere Strategie wäre es, die Infektion durch Mittelapplikation während der Blütezeit zu verhindern.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

- **Erstellung infizierten Saatgutes**

PLANUNG: Im Falle der Weizensorte *Apogee* musste die Herstellung flugbrandbefallenen Saatgutes arbeitsaufwendig durch Einzelblüteninokulation erfolgen. Alternativ konnte die Inokulation durch Vakuuminfiltration zur Blüte vorgenommen werden. In eigenen Versuchen wurde mit beiden Methoden ein Saatgutbefall mit *U. nuda* var. *tritici* von ca. 50 % erzielt (ermittelt mit der Embryo-Anfärbemethode). Im Falle der Sommergerste sollte mit natürlich infiziertem Saatgut (bereitgestellt von Dr. Müller, Darzau) gearbeitet werden.

ERREICHTES ZIEL: Die Erstellung von hoch infiziertem Saatgute als Voraussetzung für die Mitteltestung im Gewächshausmaßstab erwies sich im Laufe des Projektes als nicht standardisierbar und bedurfte einer ständigen Optimierung und Anpassung. Trotz gleicher Inokulationsmethoden unterschieden sich die geernteten Saatgutchargen erheblich in ihren Infektionsstufen. Mit der Einführung der Inokulationsmethode nach *Kaur* hoffen wir nun eine Methode gefunden zu haben, die dem Pilz optimale Infektionsbedingungen gibt. In wie weit diese Methode jedoch über einen langen Zeitraum kontinuierlich hoch infiziertes Saatgut liefern kann, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht ermittelt werden.

Für den Freilandversuch wurden verschiedene natürlich infizierte Saatgutposten auf ihre Befallshöhe hin untersucht und im Fall der Sommergerste die Sorte *Lawina* (6,7 % Befall im Feld) für den Mitteltest ausgewählt.

- **Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln im Gewächshaus**

PLANUNG: Als Saatgutbehandlungsmittel sollten Pflanzenstärkungsmittel und Pflanzenschutzmittel, soweit sie für den Ökoanbau geeignet sind, sowie andere Stoffe natürlichen Ursprungs untersucht werden. Die Auswahl erfolgte in Abstimmung mit Frau Dr. Jahn, BBA Kleinmachnow, die die gleichen oder ähnliche Präparate auf Wirksamkeit gegen Steinbrand testet. In Vorversuchen sollten die Präparate durch Keimversuche auf Filterpapier auf phytotoxische Unbedenklichkeit untersucht werden. Im Falle der flüssig formulierten Präparate sollte die Wirksamkeit in einem ersten Schritt nach Quellenlassen des Saatgutes in den Präparaten getestet werden. Im zweiten Schritt bzw. im Fall der als Pulver formulierten Präparate sollten diese äußerlich an das Saatgut appliziert werden.

ERREICHTES ZIEL: Im Rahmen dieses Projektes wurden 41 Pflanzenextrakte, 7 gelistete Pflanzenstärkungsmittel, ein biologisches Pflanzenschutzmittel, 4 Resistenzinduktoren und 23 mikrobielle Antagonisten auf ihre Wirksamkeit gegenüber Flugbrand unter kontrollierten Bedingungen an der Winterweizensorte *Apogee* getestet. Dabei konnten aus der Gruppe der Pflanzenextrakte eine maximale Wirksamkeit von 60,13 % (Beifußkraut), aus der Gruppe der Pflanzenstärkungsmittel eine maximale Wirksamkeit von 69,70 % (Pro Radix) und aus der Gruppe der mikrobiellen Antagonisten das *Trichoderma*-Isolat „PR9-10-9“ eine Wirksamkeit

von 64,58 % zeigen. Leider ließen sich die anfangs ermittelten Wirksamkeiten in keiner Wiederholung bestätigen und auch mit einer zusätzlichen Keimlingsbehandlung konnten die Wirkungen weder bestätigt noch erhöht werden.

- **Optimierung des Nachweises mit ELISA**

PLANUNG: Die Bonitur der Wirksamkeit erfolgte an Hand des Ährenbefalls. Parallel sollte der Nachweis des Pilzes in der Pflanze zu einem früheren Zeitpunkt mit ELISA und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und optimiert werden.

ERREICHTES ZIEL: Der ELISA zur Früherkennung von Flugbrand-infiziertem Saatgut und Pflanzen konnte standardisiert und dabei das Verfahren in der Dauer von vier ganzen Tagen auf zwei halbe Tage verkürzt werden. Infiziertes Saatgut konnte eindeutig von gesundem Saatgut mit Hilfe des ELISA unterschieden werden. Eine Vorhersage zur Befallshöhe der Saatgutchargen war allerdings weder durch ELISA-Messungen von bis zu 100 Einzelkörnern noch durch Untersuchungen des Sprossansatzes oder der Knoten von Jungpflanzen zufriedenstellend möglich. Eine Erhöhung der Probenanzahl könnte eine bessere statistische Vorhersage liefern, bedeutet aber hohen Zeit- und Arbeitsaufwand und scheint damit nicht praxisgerecht.

Die Immunmarkierung des Pilzes konnte im Rahmen dieses Projektes erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden. Der Nachweis *in planta* konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

- **Optimierung von Applikation und Formulierung**

PLANUNG: Ausgewählte, wirksame Präparate sollten in unterschiedlicher Aufwandmenge appliziert und die Wirksamkeit ermittelt werden. Die Präparate sollten in unterschiedlichen Formulierungen unter Zusatz von Haftmitteln, Adjuvantien etc. appliziert werden.

ERREICHTES ZIEL: Da im Rahmen des Projektes keine Mittel mit ausreichend hoher und kontinuierlicher Wirksamkeit gegenüber Flugbrand gefunden werden konnte, entfiel dieser Punkt. Allein bei den Pflanzenextrakten, die eine gewisse Wirksamkeit bis 60 % gezeigt hatten, wurde durch Erhöhung der Konzentration und Verlängerung der Zeit des Quellenlassens versucht, die Wirksamkeit zu steigern, allerdings ohne Erfolg.

- **Freilandversuche (Screening) an Sommergerste**

PLANUNG: In der Praxis ist *U. nuda* an Sommergerste, Wintergerste und Winterweizen wichtig. Bei der Planung der Feldversuche ist zu berücksichtigen, dass Sommer- und Wintergetreide zwar zu unterschiedlichen Zeiten ausgesät wird, das Ährenschieben aber fast zu gleicher Zeit erfolgt. Daher sollten die ersten Feldversuche erst im Frühjahr 2003 an Sommergerste durchgeführt werden. Ca. 5 Präparate, die in den Gewächshausversuchen wirksam waren, sollten in einem orientierenden Versuch (2 Parzellen / Behandlung) an zwei Sommergerstensorten unterschiedlicher Resistenz (erarbeitet im parallel laufenden Projekt Dr. Spieß / Dr. Müller) überprüft werden.

ERREICHTES ZIEL: Zum Zeitpunkt des Freilandversuchs an der Sommergerste im Frühjahr 2003 standen nur die Ergebnisse aus dem Screening der Pflanzenextrakte zur Verfügung, so dass aus diesen die besten für den Freilandversuch ausgewählt wurden. Da bei den natürlich befallenen Sorten der Befall relativ niedrig war, wurde bei der Planung des Freilandversuches die geplante Kombination mit unterschiedlich resistenten Sorten zugunsten einer Erhöhung der Mittelanzahl zurückgestellt. So wurde nur mit einer anfälligen Sorte (*Lawina*, natürlicher Befall 6,7 %) und insgesamt 10 Varianten (inklusive Kontrolle und Warmwasserbeize) der Freilandtest durchgeführt. Als Ergebnis konnte zwar eine gewisse Wirksamkeit der Pflanzenextrakte Bärenklau, Beifuß, Beinwell und Stechapfel und des Pflanzenstärkungsmittel „EnviRepel“ im Freilandversuch an Gerste bestätigt werden, allerdings lagen diese mit max. 30 % weit unter einem praxisrelevanten Wirkungsgrad.

- **Freilandversuche (Exaktversuche) an Wintergerste und Winterweizen**

PLANUNG: Im Herbst 2003 sollten Exaktversuche mit zwei Wintergerstensorten unterschiedlicher Anfälligkeit (Herkunft: Parallelprojekt von Dr. Spieß / Dr. Müller) und an einer Winterweizensorte mit je 3 Behandlungsmitteln angelegt werden.

ERREICHTES ZIEL: Da im Freilandversuch an Sommergerste keine ausreichenden Wirksamkeiten der untersuchten Mittel festgestellt werden konnten, und zum Zeitpunkt der Aussaat des Freilandversuchs des Wintergetreides im Herbst 2003 noch keine weiteren Mittel mit erfolgversprechenden Wirksamkeiten gefunden worden waren, wurde auf den Freilandversuch an Wintergetreide verzichtet.

7 Literaturverzeichnis

- Amos W. (1952) Über die Entwicklung des Flugbrandmyzels in infizierten Weizenpflanzen. Dissertation, TH Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Batts C.C. & Jeater A. (1958) The reaction of wheat varieties to loose smut as determined by embryo, seedling, and adult plant tests. *Annals of Applied Biology* **46**, 23-29.
- Benhamou N., Lafontaine P.J., Nicole M. (1994) Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* **84**, 1432-1444.
- Bugbee B., Koerner G., Albrechtsen R., Dewey W., Clawson S. (1997) Registration of „USU-Apogee“ Wheat. *Crop Science* **37**, 620.
- Casper R. & Meyer S. (1981) Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **33**, 49-54.
- Champion R. (1999) Erkennen und Bestimmen samenübertragbarer Pilze. Pflanzenschutznachrichten Sonderausgabe Bayer.
- Cherewick W.J. & Popp W. (1950) A modification of Moore's Method of Inoculating Wheat and Barley with Loose Smut. *Phytopathology* **40**, 1054-1056.
- Eibel P. (2002) Entwicklung und Erprobung immunologischer und molekulargenetischer Methoden zur Frühdiagnose von *Ustilago nuda* und *Tilletia caries* in Gerste und Weizen. Dissertation, Universität Göttingen, Der andere Verlag, Osnabrück.
- Eibel P., Wolf G.A. & Koch E. (2004) Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Ustilago nuda* (Jens.) Rostrup. Eingereicht bei *European Journal of Plant Pathology*.
- Fischer G.H. & Holton C.S. (1957) Biology and control of the smut fungi. The Ronald Press Company, New York (USA).
- Fischer K., Schön C.C. & Miedaner T. (2002) Chancen der Resistenzzüchtung gegen Brandpilze bei Weizen für den ökologischen Pflanzenbau. Landessaatuchtanstalt Universität Hohenheim.
- Hoffland E., Bakker P.A.H.M., VanLoon L.C. (1997) Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathology* **87**, 138.
- Hoffmann J.A. & Schmutterer H. (1999) Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Eugen Ulmer, Stuttgart.

- 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**, 268-277.
- Kaur J. & Grewal A.S. (1999) Effect of cultural methods on the expression of loose smut of wheat. *Plant Disease Research* **14**, 122-125.
- Kaur J. & Grewal A.S. (2000) An ideal method for inoculation of wheat with loose smut pathogen. *Plant Disease Research* **15**, 34-37.
- Malik M.M.S. & Batts C.C.V. (1960a) The infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.). *Trans. Brit. mycol. Soc.* **43**, 117-125.
- Malik M.M.S. & Batts C.C.V. (1960b) The development of loose smut (*Ustilago nuda*) in the barley plant, with observations on spore formation in nature and culture. *Trans. Brit. mycol. Soc.* **43**, 126-131.
- 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 Phytopathology Society (Hrsg.): Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology. Freeman W.H. and Company, San Francisco (USA).
- Ohms R.E. & Bever W.M. (1955) Types of seedling reaction of Kawvale and Wabash winter wheat to three physiologic races of *Ustilago tritici*. *Phytopathology* **45**, 513-516.
- Oort A.J.P. (1939) Inoculation experiments with Loose smut of wheat and barley (*Ustilago tritici* and *U. nuda*). *Phytopathology* **29**, 717-728.
- Poehlman J.M. (1945) A simple method of inoculation barley with loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Popp W. (1951) Infection in seeds and seedlings of Wheat and Barley in relation to development of Loose Smut. *Phytopathology* **41**, 261-275.
- Popp W. (1959) A new approach to the embryo test for predicting loose smut of wheat in adult plant. *Phytopathology* **49**, 75-77.
- Sorauer P. (1962) Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Dritter Band: Pilzliche Krankheiten und Unkräuter, Basidiomyceten. Parey Verlag Berlin, Hamburg.

- Vogt W., Buchenauer H (1997) Steigerung der biologischen Bekämpfung der Auflaufkrankheit und des Echten Mehltaus an Gurke durch Kombination von antagonistische fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämmen und Resistenzinduktoren. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **104**, 272-280.
- VanLoon L.C., Bakker P.A.H., Pieterse C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-484.