



**Strategien zur Regulierung des Steinbrandes -
Teilprojekt A: Strategien zur Regulierung des
Steinbrandes (*Tilletia caries*) und des
Zwergsteinbrandes (*T. controversa*) unter besonderer
Berücksichtigung der Resistenz**

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

Auftragnehmer:

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)
Institut für biologischen Pflanzenschutz

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Strategien zur Regulierung des Steinbrandes

Teilprojekt A

Strategien zur Regulierung des Steinbrandes (*Tilletia caries*) und des Zwergsteinbrandes (*T. controversa*) unter besonderer Berücksichtigung der Resistenz

Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Abschlußbericht zum Forschungsprojekt Nr. 02OE085

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

Antragsteller: Dr. Eckhard Koch

Bearbeiter: Dr. Rebecca Wächter
Birgit Weihrauch

Laufzeit: 1.07.2002 – 31.12.2003 (Feldversuche bis Sommer 2004)

Berichtszeitraum: 1.07.2002 – 31.12.2003

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Dr. T. Miedaner, Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt, Fruhwirthstr. 21, 70593 Stuttgart

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

Dr. Berthold Heyden, Keyserlingk-Institut, Am Berge 10, 88682 Salem-Oberstenweiler

Dr. M. Jahn, Dr. F. Waldow, BBA-Kleinmachnow, Stahndorfer Damm 81, 14532 Kleinmachnow

Prof. Wolf, Institut für Pflanzenpathologie, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen

Prof. Ullrich-Eberius, Technische Universität Darmstadt, Institut für Botanik, Schnittspahnstr. 3-5, 64287 Darmstadt

U. Furth, LK Westfalen-Lippe, Landbau und Pflanzenschutz, Nevinghoff 40, 48147 Münster

W. Weng, Landesanstalt für Pflanzenschutz, Reinsburgstr. 107, 70179 Stuttgart

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	7
1.2.1	Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand	7
1.2.2	Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand	7
1.2.3	Charakterisierung des Resistenzgrades anhand eines Systems zur Frühdiagnose	7
1.2.4	Charakterisierung des Resistenzgrades anhand von Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze	7
1.2.5	Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung	7
1.2.6	Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Auswahl der 30 Weizensorten	9
2.2	Saatgutinokulation mit <i>Tilletia caries</i>	10
2.3	Feldversuche 2002-2004 zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand	10
2.4	Feldversuche 2002-2004 zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand	11
2.5	Pflanzenanzucht unter kontrollierten Bedingungen	11
2.5.1	Untersuchungen zur Charakterisierung des Resistenzgrades anhand der Frühsymptome und zur Korrelation "Frühsymptome- ELISA"	11
2.5.2	Untersuchungen zur Charakterisierung des Resistenzgrades und zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze anhand des ELISA-Testes	12
2.6	Untersuchungen zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze an Feldmaterial	12
2.7	Charakterisierung des Resistenzgrades mit dem ELISA-Test an Feldmaterial	13
2.8	ELISA (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)	13
2.8.1	Pflanzenaufarbeitung	13
2.8.2	ELISA-Durchführung	14
2.9	Immunlokalisierung	16
2.9.1	Antikörper	17
2.9.2	<i>In vitro</i> -Nachweis	17
2.10	Charakterisierung des Resistenzgrades mit Hilfe der PCR	18
2.11	Feldversuch 2003 / 2004 zur Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung	18
2.11.1	Polyversum	18
2.11.2	Elot-Vis	18
2.11.3	FZB 53	18

2.12	Feldversuch 2003 / 2004 zur Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment	19
3	Ergebnisse und Diskussion	21
3.1	Feldversuche zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand	21
3.2	Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand	24
3.3	Charakterisierung des Resistenzgrades anhand der Blattfrühsymptome	27
3.3.1	Vergleich von Blattfrühsymptomen unter kontrollierten Bedingungen und im Feld	27
3.3.2	Korrelation von Blattfrühsymptom und Ährensymptom	29
3.4	Der ELISA als Früherkennungsmethode	30
3.5	Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe des ELISA	31
3.6	Korrelation von Blattfrühsymptomen und Pilzgehalt im Vegetationspunkt	34
3.7	Entwicklung und Verteilung des Steinbranderregers in der heranwachsenden Pflanze	36
3.7.1	Entwicklung und Verteilung des Steinbranderregers im Laborweizen <i>Apogee</i>	37
3.7.2	Vergleich der Pilzverteilung in Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit	38
3.7.3	Histologische Untersuchungen des Steinbranderregers <i>in vitro</i>	41
3.8	Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe der PCR	42
3.9	Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung	42
3.10	Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment	42
4	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	43
5	Zusammenfassung	45
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	47
7	Literaturverzeichnis	51

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

1.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Steinbrand des Weizens ist eine klassische Getreidekrankheit, die man schon früh durch Saatgutbehandlung zu bekämpfen versuchte. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts begann man mit der züchterischen Bearbeitung der Brandresistenz (Hoffmann 1982). Noch in den 60er Jahren wurden Rassen des Steinbrandes und des Zwergsteinbrandes differenziert und resistente Herkünfte und Sorten selektiert und charakterisiert (Schuhmann 1966). Mit der zunehmenden Entwicklung hochwirksamer fungizider Beizmittel in den zurückliegenden Dekaden wurde die Entwicklung steinbrandresistenter Sorten nicht weiter verfolgt. Entsprechend wurden moderne Methoden für eine Frühselektion resistenten Zuchtmaterials bisher nicht entwickelt. Im Rahmen der Sortenzulassung findet keine Überprüfung der Steinbrandresistenz statt. In der jüngsten Vergangenheit zeigte sich immer wieder, dass der Befall mit Steinbrand und Zwergsteinbrand bei Unterlassung der chemischen Saatgutbeizung schnell ein wirtschaftlich relevantes Ausmaß erreichen kann. Bei der Bekämpfung des Steinbrandes kommt neben anbautechnischen Maßnahmen (Aussaat bei möglichst hoher Bodentemperatur) und der Bekämpfung durch Saatgutbehandlung der Sortenwahl eine wichtige Rolle zu. Allerdings ist über das Resistenzverhalten des gegenwärtigen Weizensortiments kaum etwas bekannt. Das gilt insbesondere für den Zwergsteinbrand. Verschiedene alternative Saatgutbehandlungsmittel wurden entwickelt (Spieß und Dutschke 1991). Ihre Wirksamkeit bzw. technische Handhabbarkeit ist aber oft nicht befriedigend. Inwieweit sich der Steinbrand durch Kombination (teil)resistenter Sorten mit alternativen Saatgutbehandlungsverfahren kontrollieren lässt, ist nicht bekannt.

Aufbauend auf Feldversuche von Dr. H. Spieß (Bad Vilbel, Dottenfelder Hof) wurden am Institut für biologischen Pflanzenschutz verschiedene Winterweizensorten auf Steinbrandresistenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Sorte *Tambor* einen vergleichsweise hohen Resistenzgrad (Befall <5%) aufwies. Andere Sorten mit geringerer Anfälligkeit waren *Aron*, *Toronto* und *Zentis*. Die verringerte Anfälligkeit war sowohl im Feldversuch anhand des Ährenbefalls wie auch im Gewächshaus anhand der auf den Blättern auftretenden Frühsymptome sichtbar. Bei einigen Sorten war die Anfälligkeit an zwei Versuchsstandorten verschieden, bei anderen dagegen gleich (Koch & Spieß 2002). Das deutet darauf hin, dass sowohl die Standorteigenschaften als auch die örtliche Zusammensetzung der Erregerpopulation den Befall beeinflussen. Dass der Steinbrand in unterschiedlich virulenten Rassen auftreten kann, ist aus älteren Untersuchungen bekannt (Faris 1924, Rodenhiser & Stakman 1927, Fischer & Holton 1957). Daher ist es derzeit nicht möglich, die genannten Sorten uneingeschränkt für alle Anbauggebiete zu empfehlen. Es sind also Feldversuche an verschiedenen Standorten notwendig, wobei zur Inokulation örtlich vorhandenes Inokulum verwendet werden muss.

Um zusätzliche Information zu den Rassen an den verschiedenen Standorten zu bekommen, ist die Verwendung eines Differentialsortiments notwendig. Die Rassen werden anhand der Beziehungen zwischen ihren Virulenz/Avirulenz-Genen und den Resistenzgenen des Wirtes definiert. Die klassische Gen-für-Gen Hypothese geht davon aus, dass jedem Resistenzgen im Wirt ein korrespondie-

rendes Avirulenzgen im Erreger gegenübersteht, das durch Mutation in ein Gen für Virulenz umgewandelt und damit die Resistenz durchbrochen werden kann. Dies führt zur Bildung neuer Rassen (Börner 1990). Sowohl Steinbrand als auch Zwergsteinbrand werden von denselben Resistenzgenen reguliert. Somit können die Daten über Steinbrand auch für Zwergsteinbrand angewendet werden, zumal bisher nur wenig Untersuchungen über das Virulenzspektrum von *T. controversa* durchgeführt wurden (Goates 1998, Hoffmann & Metzger 1967). Goates (1996) gibt ein Differentialsortiment (Tab. 2.3) mit 15 Linien bzw. Resistenzgenen (Bt1-Bt15) an. Untersuchungen über das Virulenzspektrum sind vor allen in den USA (Goates 1998, Hoffmann & Metzger 1967), Kanada (Gaudet & Puchalski 1989) und in Osteuropa (Mamluk 1997, Bartos *et al.* 1999) durchgeführt worden. In Westeuropa sind Arbeiten über das Virulenzspektrum der Brandpilze rar. Die jüngsten Untersuchungen in Deutschland wurden von Schuhmann (1966) durchgeführt. Der Autor stellte beim Steinbrand drei und beim Zwergsteinbrand acht unterschiedliche Rassen fest. Dazu verwendete er allerdings kein Sortensortiment mit definierten Resistenzgenen, sondern Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit.

Seit langem ist bekannt, dass sich der Befall mit Steinbrand schon wenige Wochen nach dem Auflaufen anhand von Frühsymptomen äußert. In den letzten Jahrzehnten ist dieses Merkmal allerdings kaum untersucht worden. Am Institut für biologischen Pflanzenschutz wurde beobachtet, dass resistente Sorten weniger häufig Frühsymptome zeigten als anfällige, dass sich die Frühsymptome bei den resistenten Sorten langsamer entwickelten als bei anfälligen, und dass bei den resistenten Sorten ein geringerer Anteil der Pflanzen mit Frühsymptomen auch Ährenbefall entwickelte (Koch & Spieß 2002). Durch Anfärbung und mikroskopische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich in Blättern, die Frühsymptome zeigen, Myzel des Pilzes befindet. Damit sind die Frühsymptome ein verlässlicher Indikator für die Gegenwart des Pilzes im Gewebe (Eibel & Koch, unveröffentlicht).

Weiterhin wurde ein ELISA-Test entwickelt, mit dem sich *T. caries* in der Pflanze quantifizieren lässt. Der Test zeigt eine Kreuzreaktion mit dem nahe verwandten Erreger des Zwergsteinbrandes (*T. controversa*), nicht aber mit anderen Brandpilzen. Darüber hinaus ist es uns gelungen, den Pilz im Gewebe mit der PCR-Methode nachzuweisen. Auch dieser Test ist sehr spezifisch und zeigt lediglich eine Kreuzreaktion mit *T. controversa* (Eibel 2002).

Derzeit wird am Institut für biologischen Pflanzenschutz ein Gewächshaus-Screening durchgeführt, in dem Pflanzenextrakte und Mikroorganismen auf Wirksamkeit gegen *T. caries* überprüft werden. Dabei wird die Wirksamkeit anhand der Frühsymptome beurteilt.

1.2 Planung und Ablauf des Projektes

Im Rahmen dieses Projektes sollten 30 Winterweizensorten und Zuchtlinien auf ihre Resistenz gegenüber Steinbrand unter Einbeziehung von Standortfaktoren untersucht werden. Parallel dazu sollte überprüft werden, in wie weit mit Hilfe der Blattfrühsymptome, dem quantitativen immunologischen Pilznachweis über ELISA und dem molekulargenetischen Pilznachweis über PCR eine Charakterisierung der Sortenresistenz möglich ist.

1.2.1 Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand

An fünf unterschiedlichen Standorten in Deutschland sollten Feldversuche mit Sorten, die in früheren Versuchen Resistenz oder Teilresistenz gezeigt haben, sowie mit weiteren, bisher noch nicht untersuchten Sorten / Zuchtstämmen (im folgenden als „Sorten“ zusammengefasst), angelegt werden. Die Inokulation des Saatgutes erfolgte mit einer standardisierten Sporenmenge. Das Sporenmaterial sollte dabei aus den jeweiligen geographischen Regionen stammen. Bonitiert wurde der Ährenbefall.

1.2.2 Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand

Wegen des räumlich begrenzten Auftretens dieser Krankheit war für den Zwergsteinbrand lediglich ein Feldversuch geplant. Versuchstandort war Temmenhausen, 660 m über NN. Da beim Zwergsteinbrand die Infektion im Feld von gekeimten Sporen im Boden ausgeht (Obst 1993), wurde hier die Bodenoberfläche mit Sporen inokuliert.

1.2.3 Charakterisierung des Resistenzgrades anhand eines Systems zur Frühdiagnose

Nach Anzucht unter kontrollierten Bedingungen sollte der Befall von Jungpflanzen anhand von **Frühsymptomen** am Blatt ermittelt und mit Hilfe des **ELISA-Testes** und / oder der **PCR-Methode** quantifiziert werden. Dazu wurden Sorten unterschiedlicher Resistenz mit standardisierten Sporenmengen inokuliert und im Pflanzenanzuchtraum ausgesät. Ziel war die Entwicklung eines Verfahrens zur frühzeitigen Erkennung resistenter Sorten.

1.2.4 Charakterisierung des Resistenzgrades anhand von Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze

Die Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der heranwachsenden Pflanze sollte durch Bonitur der Frühsymptome, mikroskopische Anfärbung, Quantifizierung mit dem ELISA und PCR-Nachweis charakterisiert werden.

1.2.5 Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung

In einem Parallelprojekt (Dr. Jahn, Dr. Waldow, BBA Kleinmachnow) wurden Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit mit standardisierten Sporenmengen inokuliert. Anschließend wurde eine Auswahl alternativer Saatgutbehandlungsmittel appliziert. Die Wirksamkeit wurde anhand der Frühsymptome evaluiert. In Absprache mit dem oben genannten Projekt und unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse aus dem laufenden Screening zur Überprüfung der Wirksamkeit von

Pflanzenextrakten und Mikroorganismen sollten selektierte Sorten / Mittelkombinationen im zweiten Jahr im Feldversuch überprüft werden. Bonitiert wird der Ährenbefall im Sommer 2004.

1.2.6 Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment

Ein Sortiment von Weizensorten / Herkünften, mit denen sich Populationen des Steinbrandes differenzieren lassen, wurde im ersten Jahr in Hohenheim vermehrt und im zweiten Jahr mit dem Sporenmaterial von jedem der fünf Versuchsstandorte inokuliert und an einem Versuchsstandort (Bad Vilbel) ausgesät. Bonitiert wird der Ährenbefall im Sommer 2004.

Zeitskala

Teilaufgabe (vergleiche obige Aufstellung)	2002			2003															
	July	Aug	Sep	6						12						18			
	July	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Juni	July	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	
Feldvers. Steinbrand*																			*
Feldvers. Zwergsteinbr*																			*
Frühdiagnose																			
Pilzverteilung																			
Resist. & Saatgutbeh.*																			*
Differentialsortiment*																			*

- Endbonitur im Sommer 2004

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der 30 Weizensorten

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Spieß (Institut für Biologisch Dynamische Forschung, Außenstelle Dottenfelder Hof) wurden Winterweizensorten, die für den Ökoanbau relevant sind bzw. sein könnten, ausgewählt (Tab. 2.1). Auswahlkriterium war in erster Linie die Backqualität, darüber hinaus wurde, soweit möglich, auf Resistenzen gegenüber Blattkrankheiten geachtet. Von einem Teil der ausgewählten Sorten lagen vereinzelte Untersuchungsergebnisse zur Anfälligkeit gegenüber *Tilletia caries* bereits vor. Fast die Hälfte des untersuchten Materials waren neuerlich zugelassene Sorten, über die noch keine Informationen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber Steinbrand vorlagen. Des Weiteren wurden 6 Zuchtlinien ausgewählt, von denen eine verminderte Anfälligkeit bereits bekannt ist bzw. zu vermuten war.

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der in den Versuchen verwendeten Winterweizensorten/-zuchtlinien

	Sorte	Anfälligkeit ¹	Bemerkung	Zulassungsjahr	Züchter
1	Altos		E-Weizen	2000	Hadmersleben
2	Arminius		A-Weizen	2002	Secobra
3	Aron	mittel	E-Weizen	1992	Semundo
4	Batis	sehr stark	A-Weizen	1994	Hermann Strube
5	Bussard	sehr stark	E-Weizen	1990	Lochow-Petkus
6	Cardos		A-Weizen	1998	Hadmersleben
7	Compliment		A-Weizen	2001	Leutewitz
8	Cubus		A-Weizen	2002	Lochow-Petkus
9	Elvis		A-Weizen	2002	Josef Breun
10	Enorm		E-Weizen	2002	Schweiger Weizen
11	Excellenz		A-Weizen	2002	Erhard Eger
12	Idol		A-Weizen	2001	Hadmersleben
13	Kontrast		A-Weizen	1990	Hadmersleben
14	Korund		A-Weizen	2000	Hadmersleben
15	Ludwig		A-Weizen	1998	Peter Franck
16	Mewa		A-Weizen	1998	Danko
17	Ökostar		A-Weizen	2002	Schweiger Weizen
18	Pegassos	gering	A-Weizen	1994	Hermann Strube
19	Tambor	tolerant	A-Weizen	1993	Semundo
20	Tarso	gering	A-Weizen	1994	Hadmersleben
21	Tiger		A-Weizen	2001	Peter Franck
22	Tommi		A-Weizen	2002	Nordsaat
23	Toni		A-Weizen	1997	Nordsaat
24	Toronto	mittel	A-Weizen	1990	Strengs Erben

	Zuchtlinien / Schwedische Sorte	Anfälligkeit ¹	Bemerkung		Züchter
25	Atar(o)	mittel		(2004 EU-Sorte)	Peter Kunz (CH)
26	Stava	tolerant			Svalöf Weibull (S)
27	Magnifik				Svalöf Weibull (S)
28	SW 51136		Zuchtmaterial		Svalöf Weibull (S)
29	Jakobi		Hofsorte		Heyden
30	Tataros	tolerant		(2002 EU-Sorte)	Hadmersleben

¹ Tolerant: < 5%; gering: < 8%; mittel: 8 - 20%; stark: 20-40%; sehr stark: > 40%; Nach Angaben von Koch u. Spieß (2002), Bartos (1997), Jan Jönssen (pers. Mitteilung), Nielsen & Christiansen (2000)

2.2 Saatgutinokulation mit *Tilletia caries*

Unbehandeltes Saatgut wurde von den jeweiligen Züchtern zur Verfügung gestellt. Für die Feldversuche wurde das Saatgut den Versuchsanstellern an den fünf Standorten zur Inokulation mit ihren jeweiligen lokalen Pilzsporen und anschließender Aussaat zugeschickt. Für den Standort Dahlem wurde die Inokulation des Saatgutes in der BBA Darmstadt vorgenommen. Da für Dahlem auch nach intensiver Recherche durch die BBA Kleinmachnow keine lokalen Sporen verfügbar waren, wurde auf Pilzsporen aus dem Raum Halle zurückgegriffen.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde das Saatgut mit 0,2 % Sporen (2 g Sporen pro kg Saatgut) inokuliert. Dabei wurde das Saatgut in einen Gefrierbeutel gegeben, die gesiebten Steinbrandsporen hinzugefügt und die Tüte aufgeblasen. Der so entstandene Luftsack wurde mit einem Klemmverschluss verschlossen und die Samen mit den Sporen ca. eine Minute geschüttelt.

2.3 Feldversuche 2002-2004 zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand

Für die **Feldversuche 2002/2003** erfolgte die Aussaat des mit Steinbrandsporen inokulierten Saatgutes an den Standorten Salem, Bad Vilbel, Darzau und Berlin-Dahlem im Zeitraum von Anfang Oktober bis Mitte November. Am Standort Münster wurde wegen schlechter Wetterverhältnisse erst Mitte Februar ausgesät. An allen Standorten wurden die Versuche als randomisierte Blockanlagen mit zwei Wiederholungen mit einer Nettogröße von 1m² je Parzelle (6 Drillreihen) angelegt. Bonitiert wurde der Anteil befallener Ähren an der Gesamtährenzahl pro Parzelle.

Für die **Feldversuche 2003/2004** an den verschiedenen Standorten wurden fünf Sorten aus den 30 ausgewählt und als Blockanlage mit drei Wiederholungen bei einer Nettogröße von 1m² je Parzelle ausgesät. Inokuliert wurde wie im Vorjahr mit den lokalen Sporen des jeweiligen Standortes. Für die Wiederholungsversuche an den Standorten Salem, Darzau, Münster und Berlin-Dahlem wurden fünf Sorten ausgewählt, die sich an diesen Standorten im vorherigen Feldversuch als gering bis mittel anfällig herausgestellt hatten, und die sich in ihren Verwandtschaftsbeziehungen unterschieden. Ausgewählt wurden die Sorten *Tommi* (Nordsaat), *Altos*, *Tataros* und *Korund* (Hadmersleben) und *Ataro* (vormals Zuchtlinie *Atar*, Sativa). Die Aussaat erfolgte an allen Standorten Mitte bis Ende Oktober 2003. Bonitiert wird der Anteil befallener Ähren an der Gesamtährenzahl pro Parzelle im Sommer 2004. Am Standort Bad Vilbel entspricht der Wiederholungsversuch der unbehandelten Kontrolle des Feldversuchs zur Kombination von

Sortenresistenz und Saatgutbehandlung (vergl. Kapitel 2.11).

2.4 Feldversuche 2002-2004 zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand

Das ungebeizte Saatgut wurde von den jeweiligen Züchtern zur Verfügung gestellt und Herrn Weng an der Landesanstalt für Pflanzenschutz in Stuttgart zugeschickt. Die Inokulation mit Zwergsteinbrand erfolgte durch Aufsprühen einer Sporensuspension (1g Sporen/m²) auf die Bodenoberfläche.

Für den **Feldversuch 2002/2003** am Standort Temmenhausen wurde eine Wiederholung pro Sorte mit je sechs Horsten in einer Reihe angelegt. Aussaat und anschließende Inokulation erfolgten am 2.10.02. Bonitiert wurde der Anteil befallener Ähren an der Gesamtährenzahl pro Parzelle am 8.07.03.

Für den Wiederholungsfeldversuch **2003/2004** wurden wie beim Steinbrand fünf Sorten ausgewählt, die sich im vorherigen Feldversuch als gering bis mittel anfällig herausgestellt hatten, und die sich in ihren Verwandtschaftsbeziehungen unterschieden. Ausgewählt wurden die Sorten *Tommi* (Nordsaat), *Ataro* (vormals Zuchtlinie *Atar*, Sativa), *Pegassos* (Fr. Strube), *Toronto* (Strengs Erben) und *Tarso* (Semundo). Die Saatform war wieder Horstsaat, diesmal in vierfacher Wiederholung. Bonitiert wird der Anteil befallener Ähren an der Gesamtährenzahl pro Parzelle im Sommer 2004.

2.5 Pflanzenanzucht unter kontrollierten Bedingungen

Bei diesen Versuchen wurde das mit Steinbrand inokulierte Saatgut (Kapitel 2.2) in ein Gemisch aus einem kommerziellem Topf-Substrat (Fruhstorfer Erde Typ T, Fa. Archut, Lauterbach Wallenrod) und Sand (3:1 v/v) in Plastiktöpfen (18*18*18 cm) ausgesät.

2.5.1 Untersuchungen zur Charakterisierung des Resistenzgrades anhand der Frühsymptome und zur Korrelation "Frühsymptome- ELISA"

Die 30 Weizensorten wurden mit Sporen vom Feldstandort Bad Vilbel inokuliert (siehe Kapitel 2.2) und bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (4°C und 15°C) auflaufen gelassen. Die „15°C-Charge“ wurden bis zum Stadium EC 10 (ca. 10 Tage) bei 15°C bei 16stündiger Beleuchtung (mit Metallhalogendampflampen und OSRAM Powerstar HQI-T 400W/D) angezogen, die „4°C-Charge“ wurde vier Wochen bei 4°C im Dunkeln gehalten. Die Pflanzen wurden dann bis zum Stadium EC 10 in 15°C auflaufen gelassen (s.o.) und dann wie die „15°C-Charge“ bei 20°C bis zum Stadium EC 14/20 (Vierblattstadium – teilweise Beginn der Bestockung) bei 16stündiger Beleuchtung (Leuchtstoffröhren OSRAM L 30W/77 Fluora und OSRAM L30W/21-840 Hellweiß Lumilux Coolwhite, abwechselnd angebracht) weiter kultiviert. Der potentielle Steinbrandbefall wurde zu den Entwicklungsstadien EC 12, 13 und 14 anhand von Blatt-Frühsymptomen bestimmt. Pro Sorte wurden 3 Töpfe à 15 Pflanzen (45 Pflanzen insgesamt pro Versuch) ausgesät. Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Zum Versuchsende (Stadium EC 20) wurden von jeder Sorte je 10 Pflanzen mit und ohne Frühsymptome mit den Wurzeln geerntet und für weitere Untersuchungen mit dem ELISA bei -20°C gelagert.

2.5.2 Untersuchungen zur Charakterisierung des Resistenzgrades und zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze anhand des ELISA-Testes

Für diese Versuche wurde inokuliertes bzw. nicht inokuliertes Saatgut verwendet. Nach der Aussaat in Erdtöpfe liefen die Pflanzen bei 15°C ca. 10 Tage bei 16stündiger Beleuchtung (Metallhalogendampflampen und OSRAM Powerstar HQI-T 400W/D) auf. Die weitere Anzucht erfolgte dann im Klimaraum bei 22°C ebenfalls unter 16stündiger künstlicher Beleuchtung (Osram Vialox 400 W NAV-E).

Um zu überprüfen, in wie weit sich der serologische ELISA-Test zur Frühdiagnose eignet (Kapitel 3.4), wurde auf die Sommerweizensorte „*USU-Apogee*“ (Bugbee *et al.* 1997) zurückgegriffen. 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) und geringe Pflanzhöhe (etwa 50 cm) als ideale Laborpflanze aus. Damit eignete sich diese Pflanze sehr gut als anfällige Modellpflanze für Untersuchungen zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze.

Für die Untersuchung zur Eignung des ELISA zur Charakterisierung der Resistenz (Kapitel 3.5) wurden exemplarisch vier Winterweizensorten mit unterschiedlicher Anfälligkeit (*Bussard*: hoch, *Aron*: mittel, *Tambor* und *Stava*: gering) untersucht. Diese Sorten wurden spätestens im Stadium EC 20 geerntet und für weitere Untersuchungen bei –20°C gelagert.

Für die Untersuchungen zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze (Kapitel 3.7) wurden für die Untersuchungen der ersten Keimlingsphase die Körner (jeweils inokuliert bzw. unbehandelt) auf Petrischalen mit feuchtem Filterpapier ausgelegt und bei 15°C für 6 Tage bei 16stündiger künstlicher Beleuchtung (mit Metallhalogendampflampen und OSRAM Powerstar HQI-T 400W/D) keimen gelassen. Embryo, Koeoptile und erstes Blatt von je 10 Einzelpflanzen wurden vereint, um auf ein ausreichend hohes Frischgewicht für den ELISA zu kommen und dann auf ihren Pilzgehalt hin untersucht. Für die Untersuchungen der späteren Entwicklungsstadien wurde Feldmaterial verwendet (Kapitel 2.6)

2.6 Untersuchungen zur Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze an Feldmaterial

Für die Untersuchungen zur Pilzverteilung in Sorten unterschiedlicher Resistenz (Kapitel 3.7.2) wurden in der Vegetationsperiode 2002/2003 die Sorten *Bussard*, *Aron*, *Stava* und *Tambor* auf dem Versuchsgelände der BBA Darmstadt ausgesät. Die Parzellengröße betrug 4 m². Je Sorte wurde eine Parzelle mit inokuliertem und eine mit nicht inokuliertem Saatgut ausgesät. Inokuliert wurde mit Sporen der BBA Darmstadt (0,2%). Die Aussaat erfolgte von Hand, mit einem relativ großen Abstand von 5 cm zwischen den Körnern und 10 cm zwischen den Reihen, um die Pflanzen auch im fortgeschrittenem Stadium auseinanderhalten zu können. Aussaattermin war der 17.10.02. Zu unterschiedlichen Stadien wurden je nach Größe der Pflanze 2 bis 10 Pflanzen geerntet und zur weiteren Aufarbeitung bei –20°C gelagert.

2.7 Charakterisierung des Resistenzgrades mit dem ELISA-Test an Feldmaterial

In Bezug auf die Eignung des ELISA zur Resistenzcharakterisierung konnten im Rahmen des Projektzeitraumes aus Zeitgründen nur fünf Sorten exemplarisch untersucht werden (Kapitel 2.5.2). Zur Ergänzung der Daten wurden daher für die Vegetation 2003/2004 auf dem Versuchsgelände der BBA Darmstadt zusätzlich acht Sorten (*Korund*, *Aron*, *Mewa*, *Cubus*, *Ökostar*, *Bussard*, *Batis* und *Cardos*) ausgesät. Sie wurden mit einem Sporenmix (0,2%) der fünf Herkünfte (Bad Vilbel, Berlin-Dahlem, Salem, Darzau und Münster) inokuliert. Die Parzellengröße (einfache Wiederholung) pro Sorte beträgt 3,5 m² mit 6 Reihen, wobei in die Randreihe die gebeizte Kontrolle (mit Arena C) gesät wurde. Aussaat erfolgte am 24.10.03. Es wurden jeweils 50 inokulierte Pflanzen und 10 gebeizte Pflanzen je Sorte zu zwei Zeitpunkten, 17.11.03 (EC 10) und am 16.12.03 (EC 13), geerntet. Das Material wurde bei -20°C gelagert. Die restlichen Pflanzen werden bis zum Erscheinen des Ährensymbols im Feld belassen, um die Ergebnisse von tatsächlichem Befall und der ELISA-Messung vergleichen zu können.

Zudem haben sich die Versuchsansteller der fünf Standorte bereit erklärt, je 50 Pflanzen pro Sorte aus dem Feldversuch 2003/2004 (Kapitel 2.3) spätestens im Stadium EC 20 zu ernten und an die BBA zur weiteren Aufarbeitung zu schicken. Die Frage nach dem zeitlichen Rahmen und der Finanzierung für die Pflanzenaufarbeitung und der ELISA-Messungen, sowie der Auswertung des Steinbrandbefalls am Standort Darmstadt ist bisher noch offen.

2.8 ELISA (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)

Der immunologische quantitative Nachweis von *Tilletia caries* in infizierten Pflanzen über den ELISA wurde im Rahmen der Dissertation von P. Eibel (2002) entwickelt. Der in Kaninchen hergestellte polyklonale Antikörper trägt die Bezeichnung T1 (Ident.-Nr. 10). 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 nur „Trockenübungen“ mit Proben bekannter Pilzmenge durchgeführt. Zudem konnte dabei das bisher am Institut praktizierte ELISA-Verfahren in der Dauer von vier ganzen auf zwei halbe Tage verkürzt werden.

2.8.1 Pflanzenaufarbeitung

Nach Anzucht der Pflanzen (Kapitel 2.5) wurden diese vorsichtig komplett aus dem Substrat entnommen, unter fließendem Leitungswasser gründlich von anhaftender Erde befreit und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die Ausbildung von Brandähren durch *T. caries* ist der Befall des Vegetationspunktes entscheidend (Popp 1951, Amos 1952, Hoffmann & Schmutterer 1999). Für die Untersuchungen, inwieweit der ELISA eine verlässliche Frühdiagnose erlaubt bzw. zur Einschätzung des Resistenzgrades dienen kann, wurden Pflanzen zwischen EC 10 und EC 20 untersucht. Hierfür wurde nur der Sprossabschnitt zwischen Korn und erster Blattspreite untersucht. Für die Untersuchungen zur Verteilung des Pilzes in der wachsenden Pflanze wurden alle Pflanzenteile (Blätter, Knoten, Ährenanlage) der unterschiedlichen Stadien getrennt aufgearbeitet. Das Material wurde gewogen (min. 0,05g, max. 0,2g), im Verhältnis 1:5 (w/v) in gekühltem Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert und bis 30 min bei 20.000 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.8.2 ELISA-Durchführung

Zum Nachweis von *T. caries* wurde ein direkter ELISA mit biotinyliertem IgG (nach Bieber 1990) (Biotinylierungsreagenz: Biotin-X-NHS, Sigma in Dimethylformamid, Serva, 1mg/ml) 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	1,44g
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 1N HCl auf pH 9,8 einstellen
A.dest	ad 50 ml	Immer frisch ansetzen!

Testansatz

Beschichtung	Je Kavität der Mikrotiterplatte 100 µl in Beschichtungspuffer verdünnter Erstantikörper (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 1h 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 1h 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) Inkubation 30 min 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: 400µg/ml), das als Antigen verwendet wurde, festgelegt und bei jeder ELISA-Messung parallel zu den Proben mitgemessen (Tab. 2.2). Dabei erwiesen sich folgende Verdünnungen als geeignet: 80, 40, 10, 4, 1 ng/ml Extraktionspuffer. Aus der ermittelten Regressionsgleichung wurden die Pilzgehalte der untersuchten Proben errechnet (Abb. 2.1). Dabei schwankten die Steigungswerte der Regressionsgerade zwischen 0,02 und 0,07 je nach verwendetem Antikörper.

Tabelle 2.2 Beispiel einer Konzentrationsreihe des Standards (Myzelextrakt von *Tilletia caries*) und den ermittelten optischen Dichten. Darunter abgebildet die zugehörige Kurve.

<i>Tilletia caries</i> -Lösung [ng / ml]	OD-Mittelwert (n=3)	Standardabweichung (n=3)
80	0,702	0,008
40	0,521	0,012
10	0,246	0,009
4	0,139	0,008
1	0,035	0,001

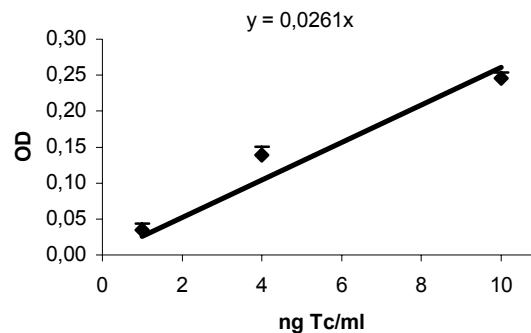


Abb. 2.1. Beispiel einer Regressionsgerade und -gleichung zur Bestimmung der Pilzgehalte

Für die endgültige Berechnung der Pilzgehalte infizierter Pflanzen wurden die ermittelten OD-Werte infizierter Einzelpflanzen mit dem Mittelwert ($n \geq 10$) der OD-Werte der gesunden Kontrolle der jeweiligen Sorte verrechnet.

2.9 Immunlokalisierung

Unterstützend zum quantitativen Pilznachweis über den ELISA sollte auch ein histologischer spezifischer und damit immunologischer Nachweis des Pilzes in der Pflanze erbracht werden. Dazu wurde der Pilz im Rahmen dieses Projekts zunächst *in vitro* nachgewiesen, bevor in einer Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der TU Darmstadt (Doris Kissel; voraussichtlicher Abschluss April 2004) *in vivo*-Untersuchungen zur Pilzlokalisierung in Sorten unterschiedlicher Resistenz durchgeführt wurden und werden.

2.9.1 Antikörper

Primäre Antikörper:

Polyklonales Antiserum gegen den Myzelextrakt von *Tilletia caries* (T1, Nr. 10), hergestellt in Kaninchen (zur Verfügung gestellt von Prof. Wolf, Göttingen) (Eibel 2002). Eingesetzte Verdünnung: 1:500 in 1%BSA in 0,1 M PBS.

Sekundäre Antikörper:

- Fluoreszein-Isothiocyant (FITC)-konjugierte Anti-Kaninchen IgG (Sigma F-6005) 1:100 in 1%BSA in 0,1 M PBS, grün fluoreszierend. Fluorescein-Isothiocyant wird maximal angeregt bei 492 nm und hat sein Emissionsmaximum bei 520 nm.
- Alexa 488-konjugierte Anti-Kaninchen IgG (Molekular Probes Leiden, Niederlande), 1:200 in 1%BSA in 0,1 M PBS eingesetzt, grün fluoreszierend. Alexa 488 absorbiert bei 485 nm und emittiert 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.

2.9.2 *In vitro*-Nachweis

Tilletia caries-Sporen isoliert aus Butten der Weizensorte *Apogee* wurden auf Wasseragar (mit den Antibiotika Rifampicin 10 mg/l und Streptomycin 50 mg/l versetzt) ausplattiert und 10 Tage bei 15°C keimen gelassen.

- Pilzmyzel („*Germination products*“ = ungekeimte und gekeimte Sporen, Promyzel, primäre und sekundäre Sporidien) mit 1 ml 0,1 M PBS von der Petrischale mit Hilfe eines Gummischabers abwaschen, in Eppendorfgefäß sammeln und 2 min bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, blocken mit 1ml 1% BSA in 0,1M PBS für 30 min bei RT.
- Aliquotieren in 100 ml-Ansätze und jeweils
 - 4 µl 1% BSA als Kontrolle bzw.
 - 2 µl Primären 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 µl des Sekundären Antikörpers in 1% BSA (1:100) 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)

2.10 Charakterisierung des Resistenzgrades mit Hilfe der PCR

Neben dem quantitativen immunologischen Nachweis des Pilzes über den ELISA sollte auch ein molekulargenetischer Ansatz über die PCR erfolgen, da diese Methode als sehr viel empfindlicher beschrieben wurde. Die Pflanzenaufarbeitung und der ELISA wurden wie in der Promotionsarbeit von P. Eibel (2002) beschrieben, durchgeführt.

2.11 Feldversuch 2003 / 2004 zur Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung

Inwieweit sich durch Kombination von Saatgutbehandlungsmitteln und gering anfälligen Sorten der Befall auf ein vertretbares Maß reduzieren lässt, sollte in einem Feldversuch ermittelt werden. Dazu wurden die Ergebnisse aus dem Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz (2002/2003) (vergl. Kapitel 3.1) zugrunde gelegt und fünf gering anfällige Sorten (*Aron*, *Ökostar*, *Korund*, *Ataro*) und eine anfällige Sorte (*Batis*) ausgewählt. Die Sorten wurden mit einem Sporengemisch von den fünf Standorten (Bad Vilbel, Darzau, Salem, Berlin-Dahlem und Münster) inokuliert (0,2%) und dann mit den gelisteten Pflanzenstärkungsmitteln *Polyversum* (5%) und *Elot-Vis* (8,5%), sowie dem experimentellen Präparat *FZB 53* (s.u.) und als Kontrolle mit Wasser behandelt (Applikation an das Saatgut erfolgte jeweils über Aufsprühen und nachfolgendes 24stündiges Trocknen; Behandlung unmittelbar vor der Aussaat). Die Aussaat erfolgte Ende Oktober 2003, bonitiert wird der Aufgang und die Befallshöhe im Sommer 2004.

2.11.1 Polyversum

Polyversum ist ein gelistetes Pflanzenstärkungsmittel der Firma BIOFA (Münsingen) zur vorbeugenden Anwendung gegen Schadpilze und basiert auf dem Pilz *Pythium oligandrum*.

2.11.2 Elot-Vis

Elot-Vis ist ein gelistetes Pflanzenstärkungsmittel der Firma Dr. Otto-LLB- (Wittenberge) zur vorbeugenden Anwendung gegen Schadpilze und basiert auf alkoholischen Pflanzenextrakten.

2.11.3 FZB 53

Das Isolat des Streptomyceten *FZB 53* wurde von der Firma FZB Biotechnik (Berlin) zur Verfügung gestellt. Da es bisher keine Untersuchungen über die Wirksamkeit von gelagertem, bereits an das Saatgut appliziertem Myzel gibt, wurde ein möglichst kurzer Zeitraum zwischen Sporulation, Applikation ans Saatgut und Aussaat angestrebt. *FZB 53* wurde auf GYM-Medium (s.u.) drei Wochen bei Raumtemperatur kultiviert. Das sporulierende Myzel wurde mit Tween-Wasser (0,125%) abgewaschen, die Suspension 20 min. bei 8000 rpm und 15°C zentrifugiert (Beckman J2-21M/E, Rotor JA20), das Pellet mit 6,25 ml 1%iger Methylcellulose resuspendiert und gleichmäßig auf die Körner (125 g) verteilt. Das behandelte Saatgut wurde 24 Stunden trocknen gelassen und innerhalb der nächsten 48 Stunden in Bad Vilbel ausgesät. (Nach der ersten Anzucht und Applikation an das Saatgut waren die Wetterbedingungen zur Aussaat Anfang Oktober nicht günstig. Die mit *FZB 53* behandelten Körner aus der ersten Anzucht wurden bei 4°C gelagert und Ende Oktober zusammen mit einer neuen, frischen Charge ausgesät. Auf diese Weise erhalten wir nun zudem Informationen über die Lagerfähigkeit von *FZB 53*).

GYM-Medium (Glucose-Yeast-Malt extract-Agar)

Ansatz für einen Liter:

D(+)-Glucose (wasserfrei)	4g
Hefeextrakt	4g
Malzextrakt	10g
CaCO ₃	2g
Agar	12g

- Mit H₂O_{dest} auf 1l auffüllen
- Mit 10N NaOH auf pH 7,5 einstellen und in der Mikrowelle aufkochen
- Autoklavieren
- Auf 45-50°C abkühlen lassen, CaCO₃ durch Schwenken vom Boden lösen, dann ca. 1 cm dicke Platten gießen (1l ergibt 40-50 Platten)
- Fest werden lassen, in Beuteln bei 8°C lagern, bei kurzfristiger Lagerung besser bei RT.

2.12 Feldversuch 2003 / 2004 zur Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment

Um die Sporenherkünfte der fünf Standorte (Berlin-Dahlem, Salem, Bad Vilbel, Münster, Darzau) bezüglich ihrer Virulenz charakterisieren zu können, wurde von Dr. Blair Goates (USDA/ARS Aberdeen, Idaho, USA) ein Differentialsortiment, bestehend aus 16 Weizenlinien (siehe Tab. 2.3) zur Verfügung gestellt und 2002/2003 an der Universität Hohenheim (Landessaatzuchtanstalt) unter Leitung von Dr. Miedaner vermehrt.

Zur Inokulation für den Feldversuch 2003/2004 wurde für jeden der fünf Standorte ein Sporengemisch der Butten aus den 30 Winterweizensorten, die in den Feldversuchen 2002/2003 zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand (Kapitel 2.3) im Sommer geerntet worden waren, verwendet. Die 14 Winterweizensorten wurden mit den fünf Sporengemischen inokuliert (1g/1kg) und in einfacher Wiederholung auf Parzellen mit 1m² Nettogröße Anfang Oktober 2003 ausgesät. Die beiden Sommerweizensorten werden im Frühling 2004 in gleicher Weise inokuliert und ausgesät. Bonitiert wird der Anteil befallener Ähren auf die Gesamtährenanzahl pro Parzelle im Sommer 2004.

Tabelle 2.3 Differentialsortiment mit den Resistenzgenen Bt1 – Bt15 gegen Weizensteinbrand nach Goates (1996) (CI = Cereal investigation number; PI = USDA plant introduction number)

Heines VII	Bt-0	PI 554099 Bt-9
PI 554101	Bt-1	PI 554118 Bt-10
PI 554097	Bt-2	PI 554119 Bt-11
Ridit	Bt-3	PI 119333 Bt-12
CI 1558	Bt-4	Thule III Bt-13
Hohenheimer	Bt-5	Doubbi Bt-14 Sommerweizen
Rio	Bt-6	Carleton Bt-15 Sommerweizen
PI 554100	Bt-7	PI 173437 Bt-P
PI 554120	Bt-8	

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Feldversuche zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand

Die Befallsbonitur erfolgte anhand des Anteils kranker Ähren und fand (abhängig vom jeweiligen Standort) von Juni bis August 2003 statt.

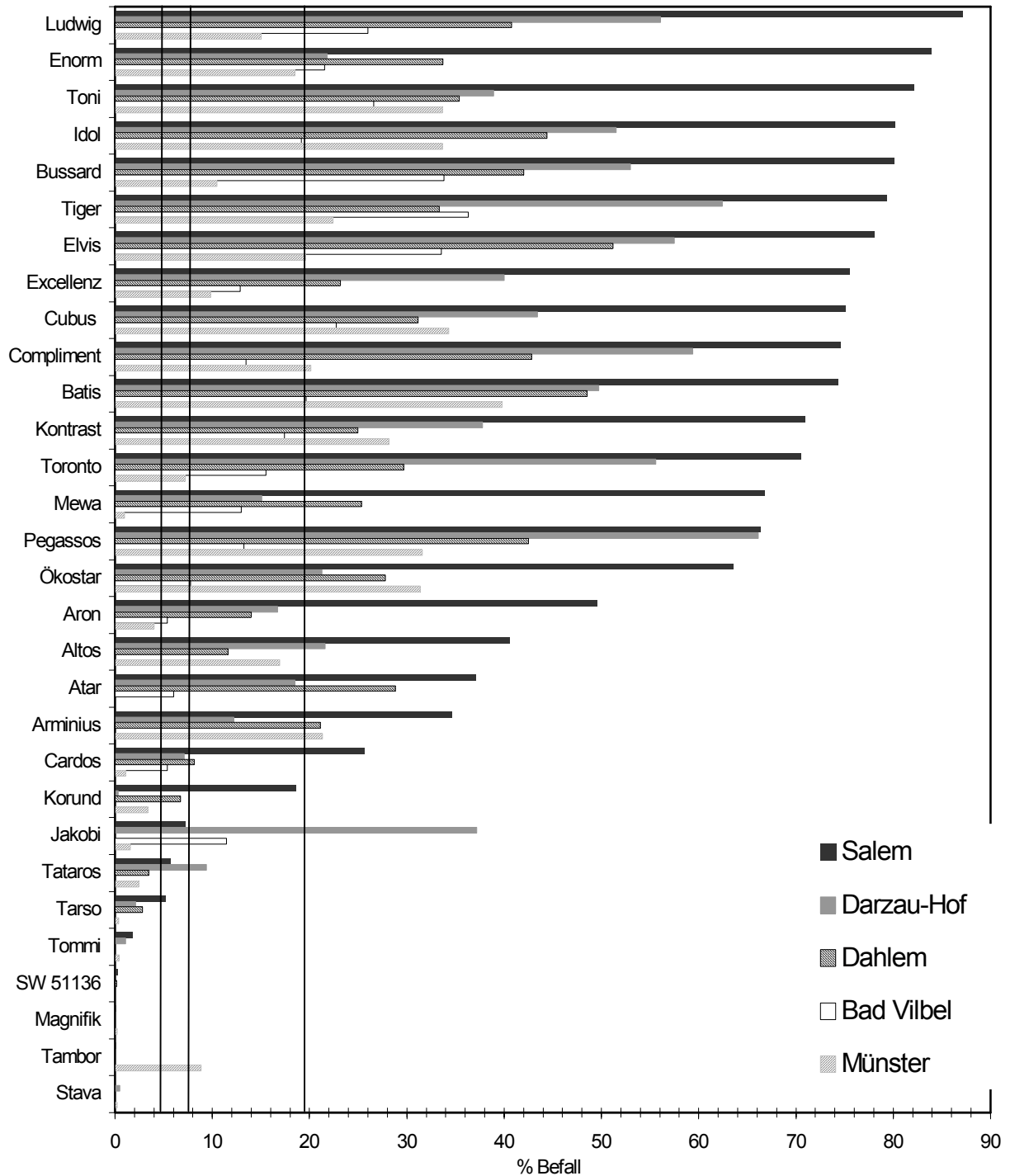


Abb. 3.1 Steinbrandbefall (Ährensymptom) im Feld von 30 Sorten / Zuchtlinien an fünf Standorten. Wegen Auswinterung liegen zum Befall der Sorten *Altos*, *Arminius* und *Tataros* am Standort Bad Vilbel keine Daten vor.

Da eine offizielle Einstufung der Sortenanfälligkeit gegen Steinbrand durch das Bundessortenamt bisher nicht erfolgt, wird hier die von Dr. Spieß verwendete Einteilung verwendet: Danach wird eine Sorte mit einem Steinbrandbefall von $< 5\%$ als tolerant bezeichnet. Wir übernehmen hier diese Einteilung, wobei wir uns der Problematik bewusst sind, dass bei unterschiedlichem Befallsdruck auch eine andere Einteilung resultieren kann. Die Stufen der Anfälligkeit gegenüber Steinbrand werden wie folgt eingeteilt und sind als Hilfsstriche in Abb. 3.1 eingezeichnet.

Gering:	$< 8\%$
Mittel	8 - 20%
Stark	20-40%
Sehr stark	$> 40\%$

Der absolute Befall ist in der Vegetationsperiode 2002/2003 an den einzelnen Standorten sehr unterschiedlich ausgefallen (Abb. 3.1), was auf den zum Teil sehr späten Aussaattermin und die unterschiedlichen Witterungsbedingungen zurückzuführen sein dürfte. Pro Parzelle ergab sich im Mittel eine Gesamtzahl von 300 Ähren. Bei einer Gesamtzahl von unter 20 Ähren wurde die Parzelle nicht in die Auswertung miteinbezogen. Der südlichste Standort Salem hatte mit Abstand den höchsten Befall (über 80 % bei den anfälligen Sorten). Bad Vilbel und Münster hatten vergleichsweise niedrige Befallshöhen mit maximal 40 %. Der Standort Bad Vilbel hatte im Frühjahr 2003 sehr ungünstige Witterungsverhältnisse und damit starke Auswinterungen. Am Standort Münster konnte durch schlechte Witterung erst im Februar 2003 ausgesät werden.

Hervorzuheben ist hier jedoch, dass sich, unabhängig vom sehr unterschiedlich starken Infektionsdruck an den einzelnen Standorten, an allen Standorten die Sorten *Tambor*, *Tommi*, *Tarso*, und die Zuchtlinie *Tataros* als „geringanfällig“ ($< 8\%$ Befall) auszeichneten und die schwedischen Sorten *Stava*, *Magnifik* und Zuchtlinie *SW 51136* „tolerant“ ($< 5\%$ Befall) waren.

Um die Standortbedingungen mit den unterschiedlichen Sporenherkünften besser vergleichen zu können, wurde in Abb. 3.2. eine relative Auftragung der Befallshöhe gewählt. Dabei wurde die anfälligste Sorte des jeweiligen Standorts 100% gesetzt. Generell zeigten die anfälligen Sorten mit einem Befall von $> 20\%$ an allen Standorten einen starken bis sehr starken Befall, während sich die tolerant und gering anfälligen Sorten an allen Standorten durch geringen Befall auszeichneten. Das deutet darauf hin, dass die Faktoren Standort bzw. Sporenherkunft keinen sehr großen Einfluss auf das Resistenzverhalten haben.

Eine Ausnahme stellte die *Hofsorte Jakobi* dar, die sich an ihrem „Ursprungsort“ im Raum Salem durch eine geringe Steinbrandanfälligkeit auszeichnet. In vorangegangenen Versuchen an den Standorten Darzau und Bad Vilbel konnte wiederholt eine starke Anfälligkeit beobachtet werden (Dr. B. Heyden, Dr. K.-J. Müller, pers. Mitteilung). Diese Beobachtung konnte auch in diesem Versuch bestätigt werden. Allerdings zeigte *Jakobi* auch an den Standorten Münster und Dahlem (Sporenherkunft Raum Halle) nur eine geringe Anfälligkeit. Die Resistenz scheint sich also nicht auf Sporenrasen aus dem südlichen Bodenseeraum zu beschränken.

Vom Gesamtbild abweichende Ergebnisse liefert auch der Standort Münster. Die als tolerant bekannte Sorte *Tambor*, die auch in den hier beschriebenen Versuchen an den Standorten Darzau, Bad Vilbel, Salem und Berlin-Dahlem nur geringen Befall zeigte, war in Münster stark anfällig.

Dagegen war die sonst anfällige Sorte *Mewa* am Standort Münster tolerant. In wie weit sich dies mit der späten Aussaat im Februar erklären lässt, ist unklar. Ein Einfluss der Sporenerkunft kann jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Für eine bessere Einschätzung wären Wiederholungsversuche notwendig.

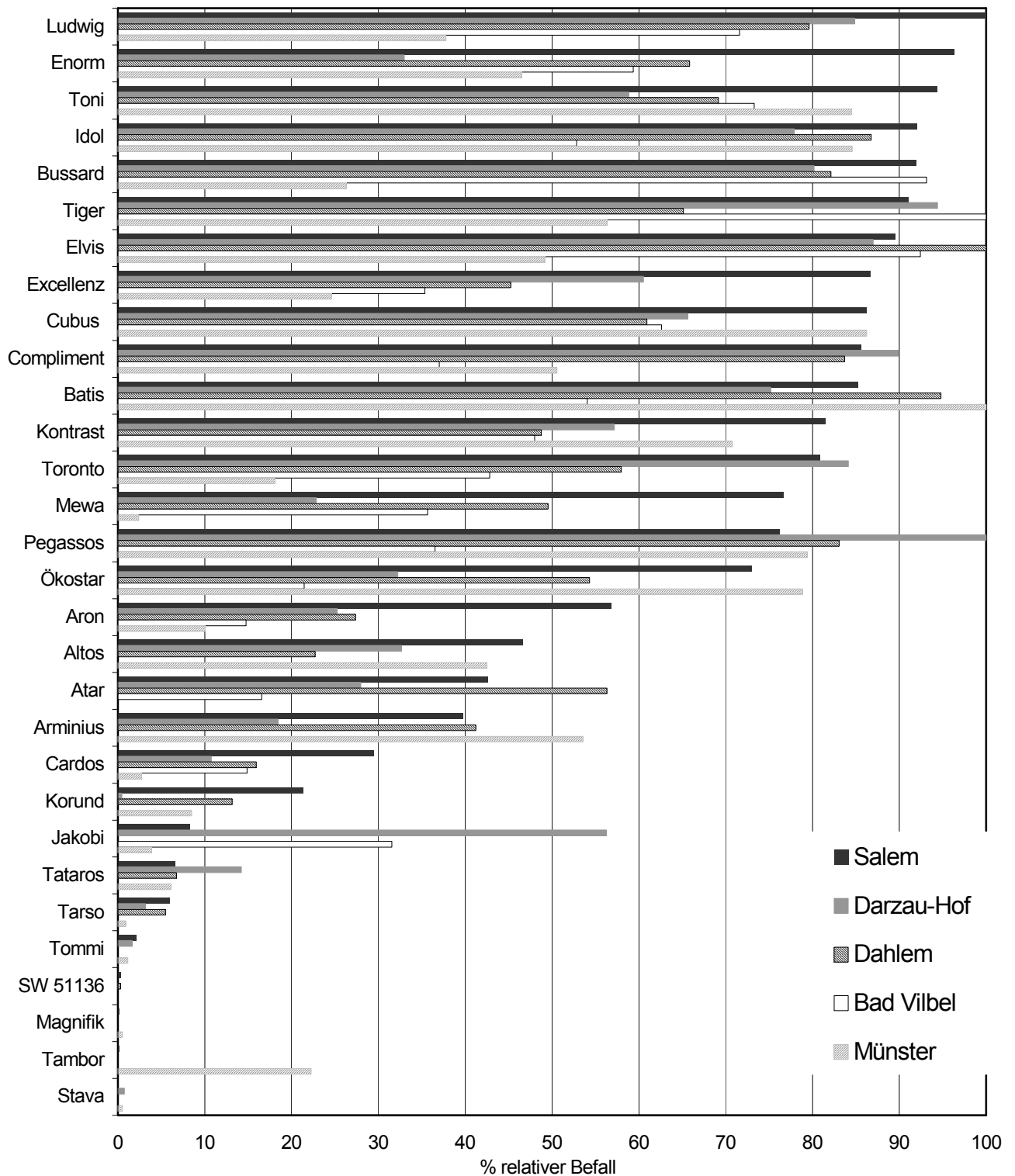


Abb. 3.2 Relativer Steinbrandbefall von 30 Sorten an fünf Standorten (die Sorte mit der höchsten Anfälligkeit des jeweiligen Standorts wurde 100% gesetzt).

Tabelle 3.1 fasst die Sorten zusammen, die sich an fast allen Standorten gegen *Tilletia caries* als tolerant (< 5 %) bzw. gering anfällig (< 8 %) erwiesen (Ausnahmen sind in Klammern in der Spalte Befall (%) herausgestellt). Fünf der sechs Sorten kommen von Semundo-Hadmersleben, von denen wiederum vier als Elter in ihrem Stammbaum die Sorte *Taras* haben. Damit ist es wahrscheinlich, dass die Resistenzgene dieser vier Sorten aus *Taras* stammen. In diesem Fall wäre die genetische Basis der Resistenz vergleichsweise eng. Eine Prüfung der Steinbrandresistenz von *Taras* hat bisher noch nicht stattgefunden (Richter, pers. Mitteilung).

Tab. 3.1 Befall in % der toleranten und gering anfälligen Sorten / Zuchtlinien an den untersuchten fünf Standorten

	Befall (%)	Herkunft	Zulassungsjahr	V - schaft
<i>Tommi</i>	0,68 ± 0,07	Nordsaat	2002	
<i>Tambor</i>	(8,86 in Münster)	(Hadmersleben)	1993	<i>Taras</i> -Linie
<i>Tarso</i>	2,10 ± 1,88	(Hadmersleben)	1994	<i>Taras</i> -Linie
<i>Tataros</i>		Semundo (Hadmersleben)	2003	<i>Taras</i> -Linie
<i>Cardos</i>	(25,68 in Münster)	(Hadmersleben)	1998	<i>Taras</i> -Linie
<i>Korund</i>	(18,63 in Münster)	Semundo (Hadmersleben)	2000	<i>Apollo*Zentos</i>
Sc che Sort				
<i>Stava</i>	0,14 ± 0,20	Semundo (Swalöf Weibull)		
<i>Magnifik</i>	0,07 ± 0,09	Semundo (Swalöf Weibull)		
<i>SW 51136</i>		Semundo (Swalöf Weibull)		
<i>Jakobi</i>	(37,20 in Darzau; 11,46 in Bad Vilbel)	Keyserlingk-Institut (Hofsorte)		

3.2 Feldversuch zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand

Beim Zwergsteinbrand sind samenbürtige Infektionen für die Infektion der Pflanzen weniger relevant. Die Hauptinfektion geht von Sporen nahe oder auf der Bodenoberfläche aus. Die Keimung findet nur bei Schwachlicht unter Kurztagbedingungen, Temperaturen zwischen -2°C und 10°C über eine Dauer von 2-3 Monaten (Obst 1993) und einer hohen Feuchtigkeit statt. Da man diese Bedingungen normalerweise nur unter einer geschlossenen Schneedecke findet, tritt Steinbrand hauptsächlich in höheren Lagen auf (Mathre 1998).

Für die Überprüfung der Sortenresistenz wurde der Standort Temmenhausen (660 m über NN) ausgewählt. Der Befall des Zwergsteinbrandes fiel im Vergleich zum Steinbrand relativ niedrig aus, mit einem maximalen Befall von 14 % bei der Sorte *Enorm*. (Abb. 3.3).

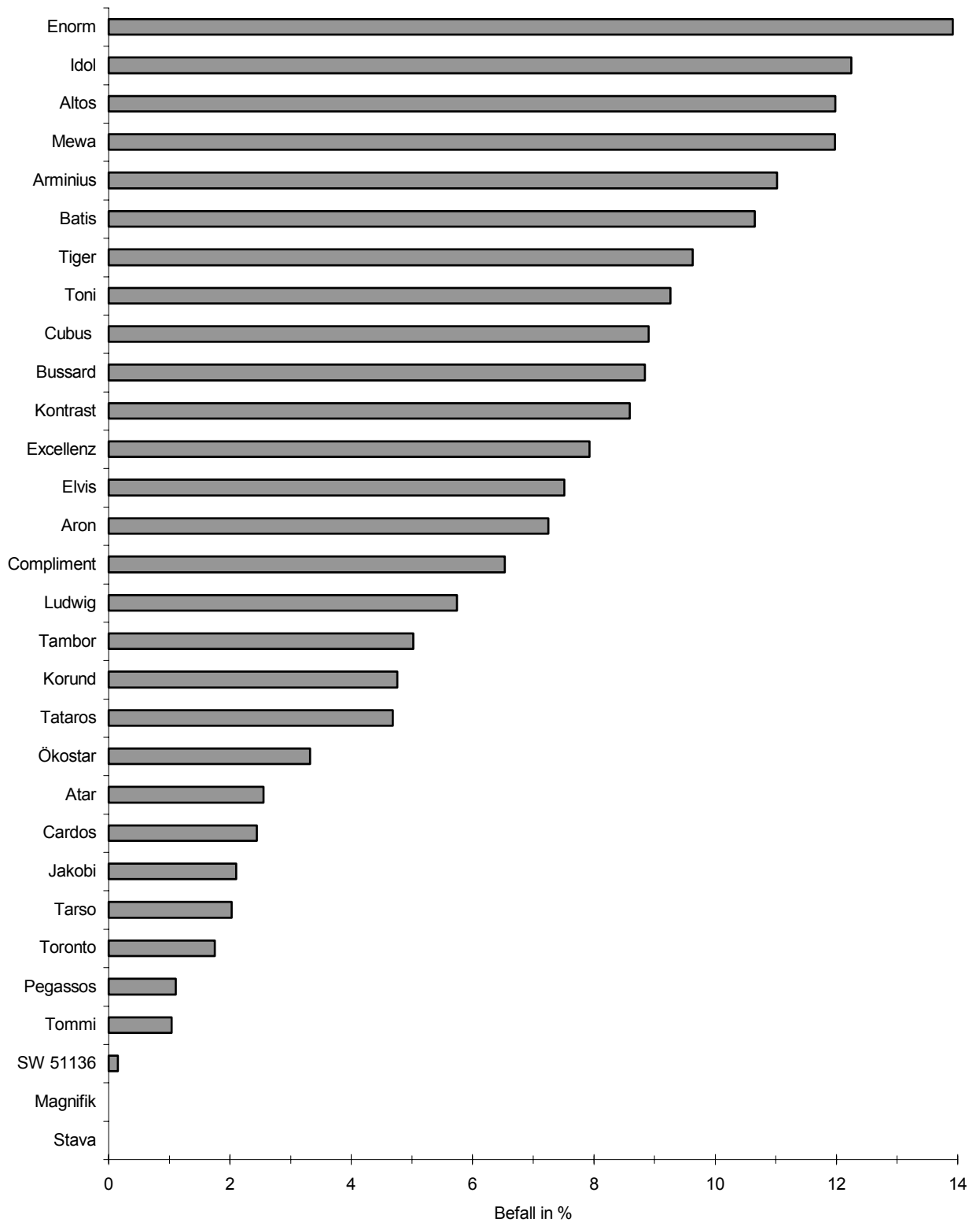


Abb. 3.3 Ergebnis der Resistenzprüfung an 30 Winterweizensorten/-zuchtlinien gegenüber Zwergsteinbrand am Standort Temmenhausen, 660 m über NN.

Tab. 3.2 Liste der Sorten/Zuchtlinien mit vergleichsweise geringem Zwergsteinbrandbefall (hier: < 5%) am Standort Temmenhausen

	Befall (%)	Herkunft	Zulassungs- jahr
Sorte			
<i>Tommi</i>	1,04	Nordsaat	2002
<i>Pegassos</i>	1,11	Strube	1994
<i>Toronto</i>	1,75	Strengs Erben	1990
<i>Tarso</i>	2,03	Semundo (Hadmersleben)	1994
<i>Cardos</i>	2,44	Semundo (Hadmersleben)	1998
<i>Atar(o)</i>	2,55	Sativa	2003
<i>Ökostar</i>	3,32	Schweiger Weizen	2002
<i>Tataros</i>	4,68	Semundo (Hadmersleben)	2003
<i>Korund</i>	4,76	Semundo (Hadmersleben)	2000
<i>Tambor</i>	5,02	Semundo (Hadmersleben)	1993
Schwedische Sorte / Zuchtlinie			
<i>Stava</i>	0,00	Semundo (Swalöf Weibull)	
<i>Magnifik</i>	0,00	Semundo (Swalöf Weibull)	
<i>SW 51136</i>	0,15	Semundo (Swalöf Weibull)	
<i>Jakobi</i>	2,1	Kaiserlingk-Institut (Hofsorte)	

Gegenüber dem Steinbrand zeigte beim Zwergsteinbrand ein höherer Anteil der Sorten einen Befall < 5%. Allerdings lassen sich diese Werte nur bedingt vergleichen, da das Befallsniveau in den Steinbrandversuchen höher war. Außerdem wurde die Resistenz gegenüber dem Zwergsteinbrand nur an einem Ort / in einem Versuch geprüft. Damit ist nicht bekannt, in welchen Grenzen der Befall variieren kann. In der Literatur werden Befälle in den gleichen Größenordnungen wie bei *Tilletia caries* (Befallshöhen von über 60% sind keine Ausnahmen) genannt (Schuhmann 1966, Weng 1998). Interessant war, dass einige Sorten, wie *Ökostar* oder *Atar(o)*, die gegenüber dem Steinbrand eine starke Anfälligkeit zeigten, sich gegenüber dem Zwergsteinbrand als vermindert anfällig zeigten. *T. caries* und *controversa* stehen sich taxonomisch sehr nahe und werden von einigen Autoren als Varianten einer Art diskutiert (Russel & Mills 1993, 1994, Shi *et al.* 1996, Hoffmann & Schmutterer 1999). Kreuzungen zwischen den beiden Pilzen sind nachgewiesen (Silbernagel 1964, zitiert in Russel & Mills 1993). Nach Fischer *et al.* (2002) wird der Befall mit *T. caries* und *T. controversa* von denselben Resistenzgenen reguliert. Die unterschiedliche Anfälligkeit der Sorten *Ökostar* und *Atar(o)* gegenüber den beiden Pilzen lassen allerdings zwergsteinbrandspezifische Resistenzgene bei diesen Sorten vermuten. Wiederholungen dieser Versuche wären für eine sichere Aussage allerdings dringend nötig.

3.3 Charakterisierung des Resistenzgrades anhand der Blattfrühsymptome

Blattfrühsymptome (Chlorotische Flecken an den Blattspreiten) (Abb. 3.4) sind bis zum jetzigen Zeitpunkt die einzige Früherkennungsmethode für einen potentiellen Steinbrandbefall, die bereits mehrfach in der Literatur zitiert wird (Johnston & Lefebvre 1939, Kendrick & Purdy 1959, Agrios 1988, Becker 1992, Hoffmann & Schmutterer 1999). Während der Pilzbefall als Auslöser für die Blattsymptome unbestritten ist, ist die Eignung der Frühsymptome für die Bewertung der Sortenresistenz allerdings noch unklar. Koch & Spieß (2002) vermuten, dass dem Ährensymptom normalerweise das Frühsymptom vorausgeht. Dagegen berichten Borgen & Kristensen (2003) von Sorten, die Ährenbefall, aber kein Frühsymptom zeigen.



Abb.3.4 Apogee mit Blattsymptomen im Stadium EC 13

3.3.1 Vergleich von Blattfrühsymptomen unter kontrollierten Bedingungen und im Feld

Abb. 3.5 vergleicht die Blattfrühsymptombonitur nach Anzucht der Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen (4°C und 15°C) (vergl. Kapitel 2.5.1) mit der Bonitur der Frühsymptome des Feldversuchs in Bad Vilbel (Kapitel 2.3). Bonitiert wurde auf dem Feld Anfang März 2003 im Stadium EC 20 (Beginnende Bestockung). Die einzelnen Pflanzen waren in diesem Stadium noch deutlich voneinander zu unterscheiden. Durch den kalten und trockenen Januar und Februar hatte es starke Auswinterungen gegeben. Daher wurden je nach Zustand der Parzelle min. 10 und max. 50 Pflanzen auf Blattsymptome bonitiert.

Im Pflanzenanzuchtraum führte das Auflaufen bei 15°C meist zu einem höheren Anteil von Pflanzen mit Blattfrühsymptomen als bei der Auflauftemperatur 4°C (Abb. 3.5). Dies entsprach nicht den Erwartungen, da davon auszugehen war, dass der Pilz bei den tieferen Temperaturen sehr viel mehr Zeit und damit bessere Möglichkeiten hat, sich in der Pflanze auszubreiten und dass sich dies in der Stärke der Frühsymptome ausdrücken würde. Aus den Ergebnissen ließe sich eher der umgekehrte Schluss ziehen, dass nämlich der Pilz bei wärmeren Temperaturen (hier 15°C) bessere Bedingungen für eine schnelle Wirtsbesiedelung vorfindet. Dem stehen allerdings Feldbeobachtungen entgegen, wonach der (Ähren-)Befall durch tiefere Temperaturen tendenziell gefördert wird.

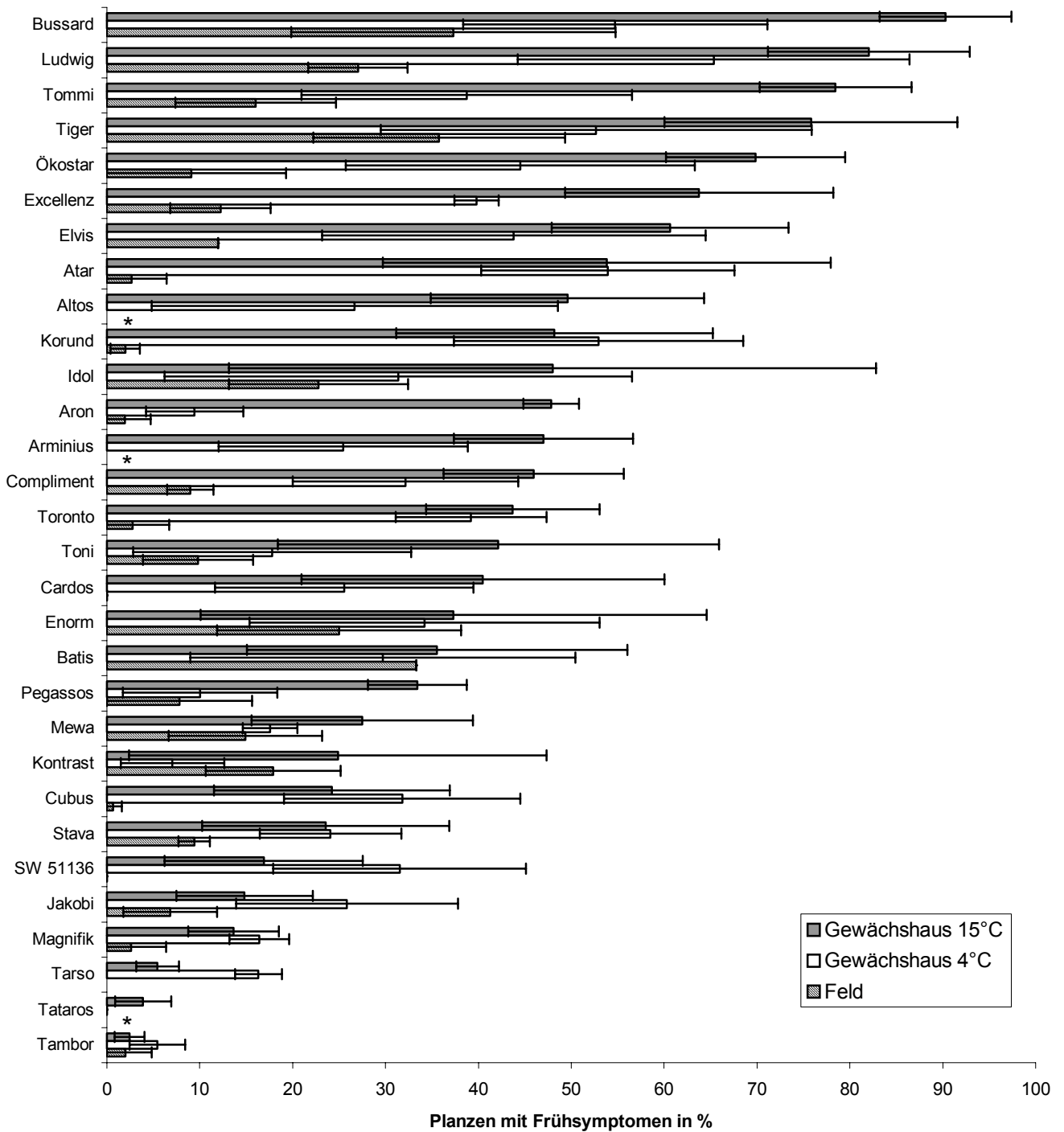


Abb. 3.5 Vergleich des Anteils von Pflanzen mit Blattfrühsymptomen bei Anzucht unter kontrollierten Bedingungen (Bonitur zu EC 14) bzw. am Standort Bad Vilbel (Bonitur zu EC 20). (Anzuchtbedingungen der 15°C Variante: 10 Tage bei 15°C, gefolgt von 14 Tagen bei 20°C; 4°C Variante: 1 Monat bei 4°C, gefolgt von 10 Tagen bei 15°C und 14 Tagen bei 20°C). Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Versuchen mit drei Töpfen à 15 Pflanzen pro Sorte. *= ausgewinterte Sorte)

Insgesamt gesehen waren die Frühsymptome unter kontrollierten Bedingungen zwar bei der 15°C Variante tendenziell verstärkt, unterschieden sich aber nicht signifikant von der 4°C Variante. Die

Bonitur der Feldversuche zeigte für einige Sorten allerdings deutlich andere Ergebnisse. Zum einen war der Anteil symptomtragender Pflanzen deutlich niedriger (was aber auch auf die starken Auswinterungen zurückzuführen sein kann), auf der anderen Seite hatten einige Sorten, die unter kontrollierten Bedingungen starke Symptome gezeigt hatten, im Feld wenig bzw. keine Symptome (z.B. *Atar*, *Korund*, *Toronto*).

Inwieweit sich die Blattsymptome als Frühdiagnose zur Charakterisierung des Resistenzgrades eignen, wird im folgenden Kapitel 3.3.2 behandelt, in dem der tatsächliche Ährenbefall am Standort Bad Vilbel mit den Frühsymptomen der Gewächshauspflanzen und der Feldpflanzen in Beziehung gesetzt wird.

3.3.2 Korrelation von Blattfrühsymptom und Ährensymptom

Wie in Abb. 3.6 deutlich wird, zeigen einige Sorten starke Frühsymptome bei hohem Ährenbefall. Bei anderen Sorten ist der Ährenbefall deutlich geringer als der Frühsymptombefall.

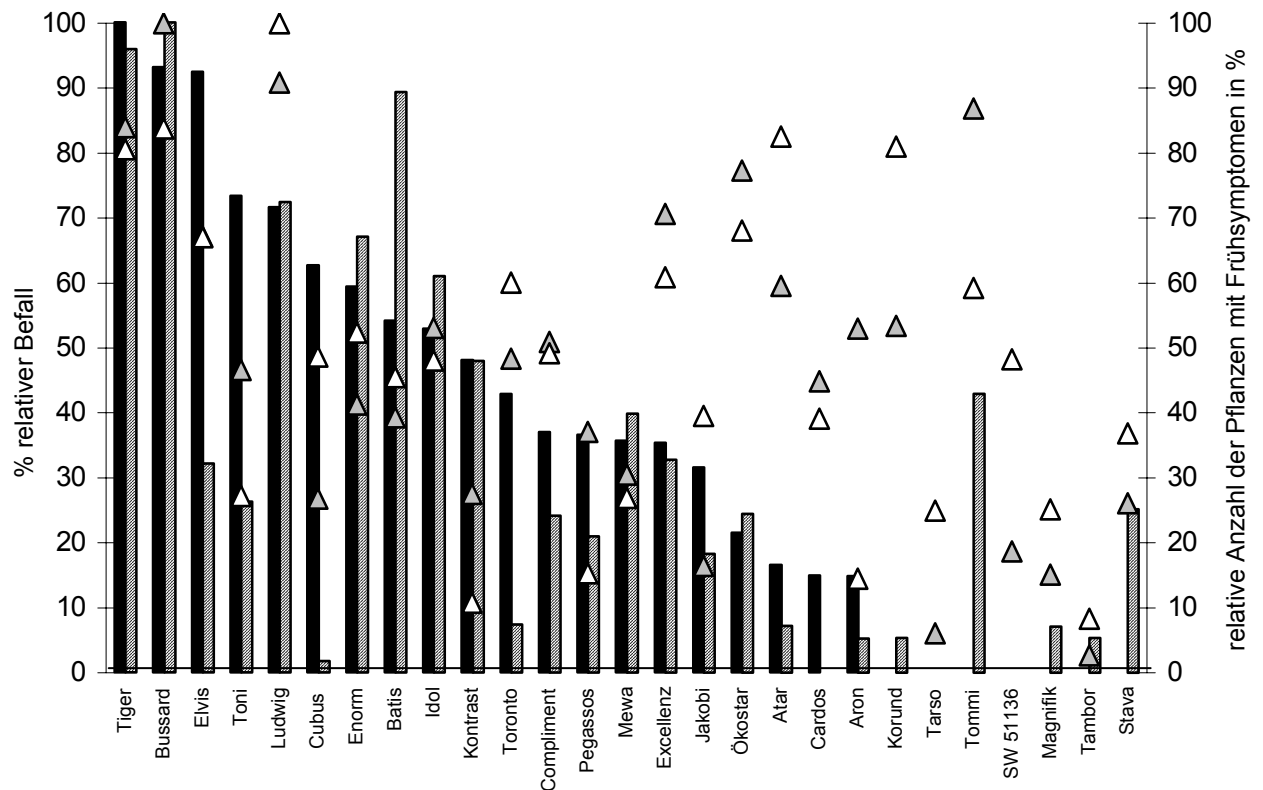


Abb. 3.6 Relativer Vergleich der Blattsymptome im Feld (gestreifter Balken) und unter kontrollierten Bedingungen (Dreieck) bei 4°C (weißes Dreieck) und 15°C (graues Dreieck) mit dem tatsächlichen Steinbrandbefall (schwarzer Balken, Ährensymptom) am Standort Bad Vilbel. Die Sorte mit dem höchsten Befall bzw. der größten Pflanzenanzahl mit Frühsymptomen in der jeweiligen Anzuchtsvariante (Feld, 4°C, 15°C) wurde 100% gesetzt.

Dabei zeigten die Frühsymptome der Feldpflanzen noch eine deutlich bessere Korrelation zum Ährenbefall der Feldpflanzen als die Frühsymptome der Pflanzen der gleichen Sorte, die unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden (unabhängig von der Auflauftemperatur). Auffällig war die mangelnde Korrelation gerade bei vielen der wenig anfälligen bzw. toleranten Sorten: Sie zeigten besonders bei der Anzucht unter kontrollierten Bedingungen teilweise starke Symptome, hatten im Feld aber keinen oder nur einen geringen Ährenbefall. Gerade bei den schwedischen Herkünften (*Stava*, *Magnifik* und *SW 51136*) fiel während der Bonitur auf, dass die (anfangs stark ausgeprägten) Symptome auf die jungen Blätter beschränkt blieben. Hier wäre bei einer differenzierteren und länger durchgeführten Bonitur (unter Einschluss der höheren Blattetagen) sicher eine bessere Korrelation zum Ährensymptom zu erwarten. Der erforderliche Aufwand (Zeitdauer, evtl. Vernalisation der Pflanzen) erscheint aber nicht praxisgerecht. Offensichtlich wird die Form der Resistenz, die eine Unterdrückung der Pilzentwicklung erst zu einem späteren Stadium beinhaltet, von der Frühdiagnose über die Blattsymptome nicht erfasst. Beispiele hierfür sind die Sorten *Tommi* und *Korund*.

Aus dem zuvor Gesagten geht hervor, dass die Bonitur der Blattsymptome eine relativ einfache Methode der Steinbrandfrühdiagnose ist. Auch wenn die Diagnose auf dem Feld bessere Korrelationen zum Ährensymptom ergeben hat, so ist ihre Durchführung unter Feldbedingungen doch sehr mühselig und nicht im großen Maßstab durchführbar. Zudem können gerade im Feld Überlagerungen der Symptome mit denen anderer Schadorganismen bzw. Umwelteinflüssen auftreten und damit die Boniturergebnisse verfälschen. Wesentlich besser eignet sich diese Methode bei der Pflanzenanzucht unter kontrollierten Bedingungen. Da eine enge Korrelation zwischen Frühsymptomen im Pflanzenanzuchtraum und Ährensymptom im Feld aber nur bei einzelnen Sorten gegeben ist, sind die Frühsymptome kein generell geeignetes Merkmal zur Bewertung der Resistenz. Bei ausgewählten, hoch anfälligen Sorten können sie allerdings als verlässlicher Indikator für eine erfolgte Infektion herangezogen werden, etwa bei der Selektion von Saatgutbehandlungsmitteln.

3.4 Der ELISA als Früherkennungsmethode

Eine alternative, sehr viel objektivere Früherkennungsmethode könnte die quantitative Bestimmung des Pilzgehaltes in der Pflanze sein, wobei als Arbeitshypothese eine Korrelation zwischen Resistenzgrad und Pilzgehalt (je anfälliger die Sorte, desto besser die Entwicklung des Pilzes und um so höher sein Gehalt) angenommen wurde. Durch den immunologischen Nachweis des Pilzes mittels ELISA lässt sich der Befall in der Pflanze quantifizieren. Im Rahmen dieses Projektes sollte überprüft werden, ob sich der ELISA als Früherkennungsmethode zur Vorhersage des Ährenbefalls eignet, in wie weit eine Korrelation zu den Blattfrühsymptomen besteht, und ob er sich zur Charakterisierung der Sortenresistenz eignet. Da sich der Pilz während der Pflanzenentwicklung vorwiegend im Vegetationspunkt aufhält, wurde für die Untersuchungen der Resistenzcharakterisierung ausschließlich der Bereich um den Vegetationspunkt untersucht.

Die Eignung des ELISA als Früherkennungsmethode wurde schwerpunktmäßig an der Laborsorte *Apogee* durchgeführt, da sie auch bei der Anzucht unter kontrollierten Bedingungen in relativ kurzer Zeit in allen Stadien zur Verfügung steht und sich zudem durch hohe Anfälligkeit auszeichnet.

ELISA-Untersuchungen des Vegetationspunktes von 50 infizierten und 25 gesunden Einzelpflanzen zeigten einen signifikanten Unterschied im Pilzgehalt zwischen gesunden und infizierten Pflanzen (Abb. 3.7). Unter Zugrundelegung eines Grenzwertes von 0,05 OD wären 78% der infizierten Pflanzen befallen gewesen. Dies ist in Übereinstimmung mit bisher unveröffentlichten Ergebnissen, wonach die Sorte *Apogee* unter den gleichen Versuchsbedingungen hochanfällig ist. Im Durchschnitt von fünf Versuchen hatten die Pflanzen einen Ährenbefall von ca. 70% (Koch *et al.*, unveröffentlicht). Da bei allen untersuchten Sorten auch die gesunden Pflanzen im ELISA Werte bis zu 0,05 OD zeigten, wurde bei jedem Versuch die gesunde Kontrolle als Negativkontrolle mitgemessen und der OD-Mittelwert der gesunden Pflanzen von den mit Steinbrand-inokulierten Pflanzen abgezogen.

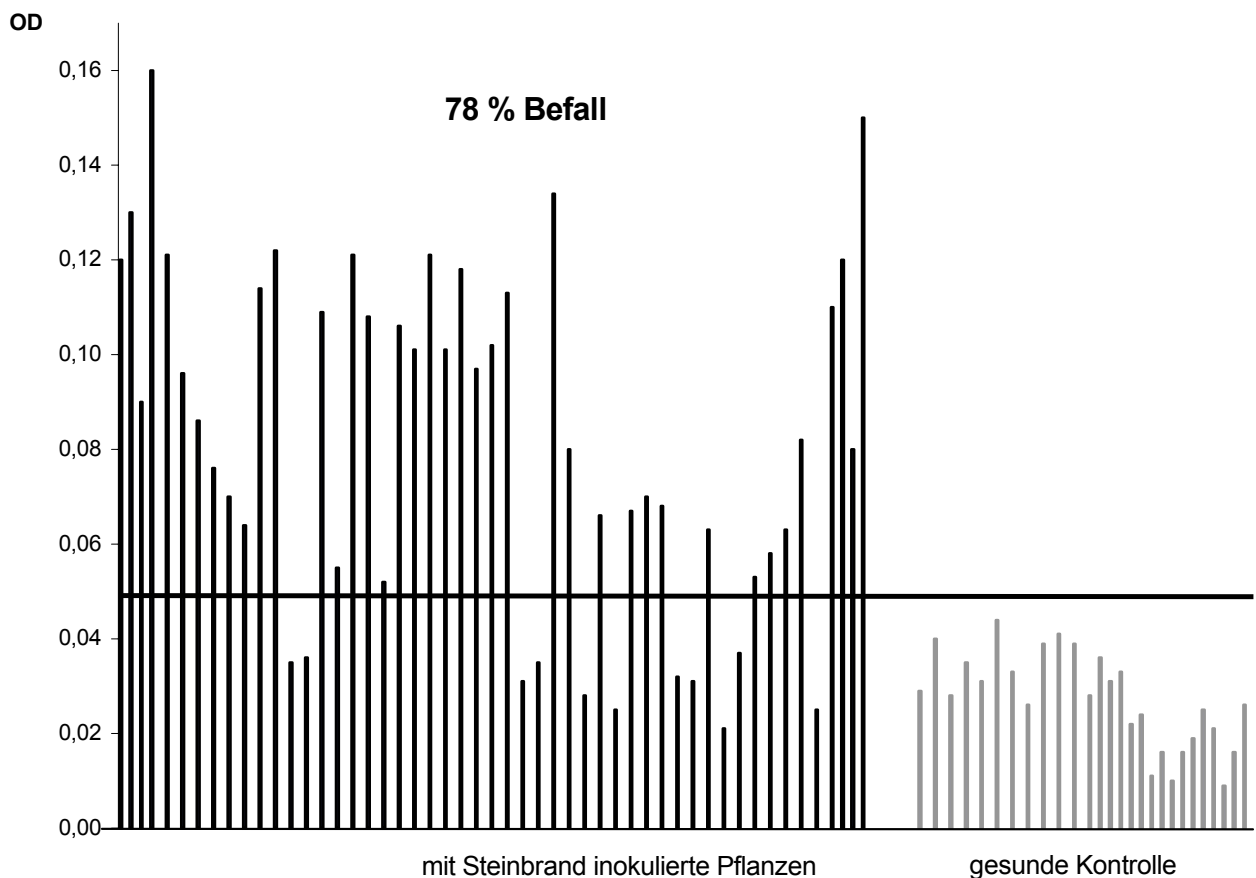


Abb. 3.7 Optische Dichte ermittelt über den ELISA von infizierten und gesunden Einzelpflanzen der Sorte *Apogee* im Stadium EC 14/20.

Demnach eignet sich der ELISA sehr gut als quantitatives Frühdiagnosesystem. Notwendige Voraussetzung für eine gute Voraussage ist jedoch eine Mindestanzahl von ca. 50 infizierten Einzelpflanzen.

3.5 Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe des ELISA

Parallel zur Früherkennung des Steinbrandbefalls wäre eine Einschätzung des Resistenzgrades der Sorten anhand des Pilzgehaltes mittels der quantitativen Bestimmung des ELISA erstrebenswert. Dazu wurden fünf Sorten exemplarisch ausgewählt, von denen bereits aus Feldversuchen Erkennt-

nisse zu ihrer Anfälligkeit gegenüber Steinbrand vorlagen: Die sehr stark anfälligen Sorten *Apogee* und *Bussard*, die gering anfällige Sorte *Aron* und die toleranten Sorten *Tambor* und *Stava* (Im Verlauf des Projektes konnte diese Einstufung in den Feldversuchen an allen Standorten bestätigt werden; vergl. Kap. 3.1). Vorversuche an Pflanzen zwei verschiedener Vegetationsstadien (EC 10 und EC 20) zeigten eine bessere Korrelation zum bekannten Resistenzgrad im älteren Stadium EC 20. Für den Versuch wurden Pflanzen verwendet, die unter kontrollierten Bedingungen aus inokulierten Samen herangewachsen waren. Pro Sorte wurden die Vegetationspunkte von je 45 bis 50 Einzelpflanzen im Entwicklungsstadium EC 14/20 auf ihren Pilzgehalt untersucht

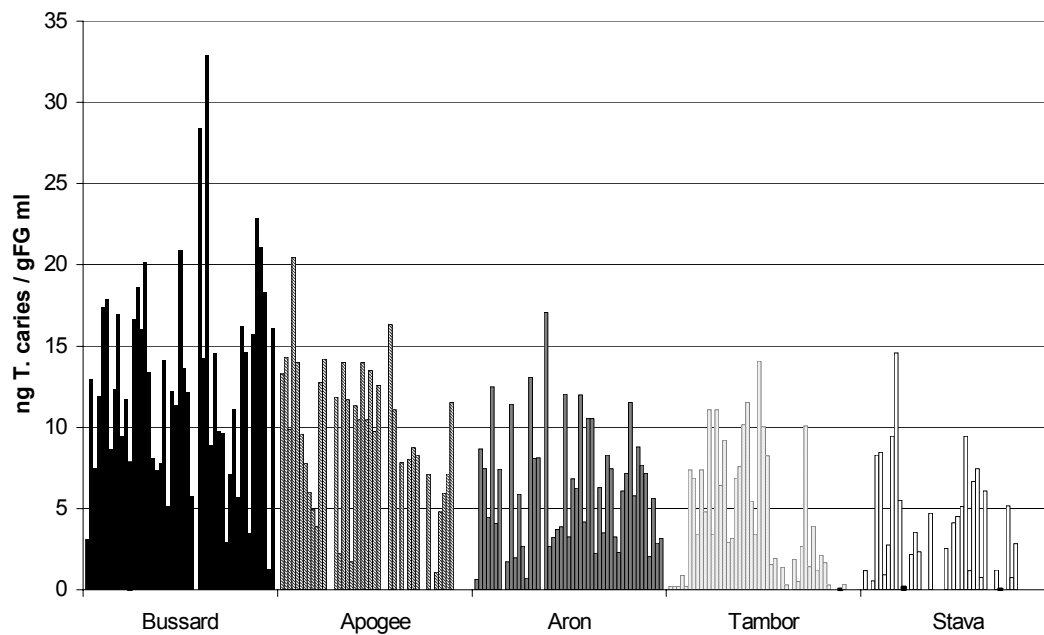


Abb. 3.8. *Tilletia caries* Gehalte in Einzelpflanzen von Sorten unterschiedlichen Resistenzgrades (EC 14/20)

Abb. 3.8 zeigt das Ergebnis der ELISA-Messungen an den 50 Einzelpflanzen je Sorte. Die Auftragung der Einzelwerte zeigt, dass allein der Pilzgehalt in der Einzelpflanze nicht auf den Resistenzgrad schließen lässt. Zwar erreichen einzelne Pflanzen der anfälligen Sorte *Bussard* höhere Werte als tolerante Sorten, es gibt allerdings auch eine Reihe von *Bussard*-Pflanzen mit geringem Pilzgehalt. Fasst man die Einzelwerte durch Bildung des Mittelwertes zusammen (Abb. 3.9), so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem Resistenzgrad. Um das zu verdeutlichen, wurde in Abb. 3.9 der Ährenbefall der Sorten am Standort Bad Vilbel eingefügt. Nach unserer Einschätzung sollte für solche Untersuchungen zur Charakterisierung des Resistenzgrades ein Probenumfang von mindestens 45 Einzelpflanzen je Sorte zur Verfügung stehen.

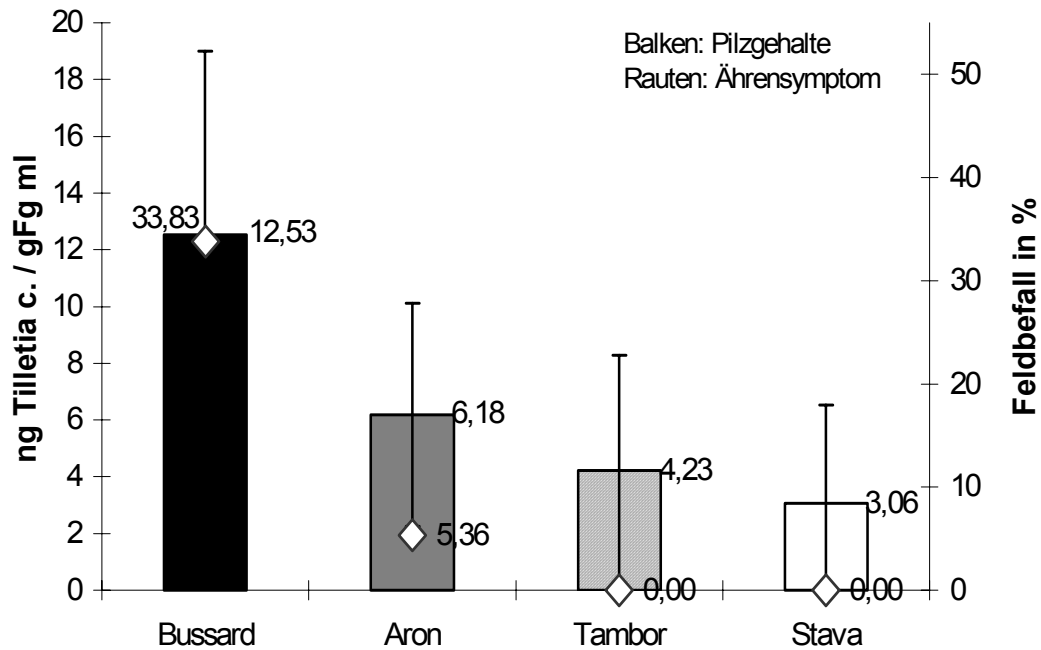


Abb. 3.9. Vergleich der *Tilletia caries* Gehalte (Mittelwerte und Standardabweichungen von 50 Einzelpflanzen je Sorte, siehe Abb. 3.8) bei Anzucht unter kontrollierten Bedingungen mit dem Steinbrandbefall (Ährensymptom) im Feldversuch am Standort Bad Vilbel (vergl. Kap. 3.1)

Die Aufarbeitung einer so großen Probenanzahl ist allerdings mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Daher wurde als Alternative zu den zahlreichen Einzelwertmessungen untersucht, wie sich das Zusammenfassen von Einzelproben auf das Ergebnis auswirkt (Abb. 3.10). Dazu wurden die Vegetationspunkte von je 10 Einzelpflanzen in einem Ansatz aufgearbeitet. Pro Sorte wurden insgesamt 40 Pflanzen untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 3.10 dargestellt. Die Mittelwerte der vier Einzelmessungen erlauben wieder eine Differenzierung der Sorten nach ihrem Pilzgehalt.

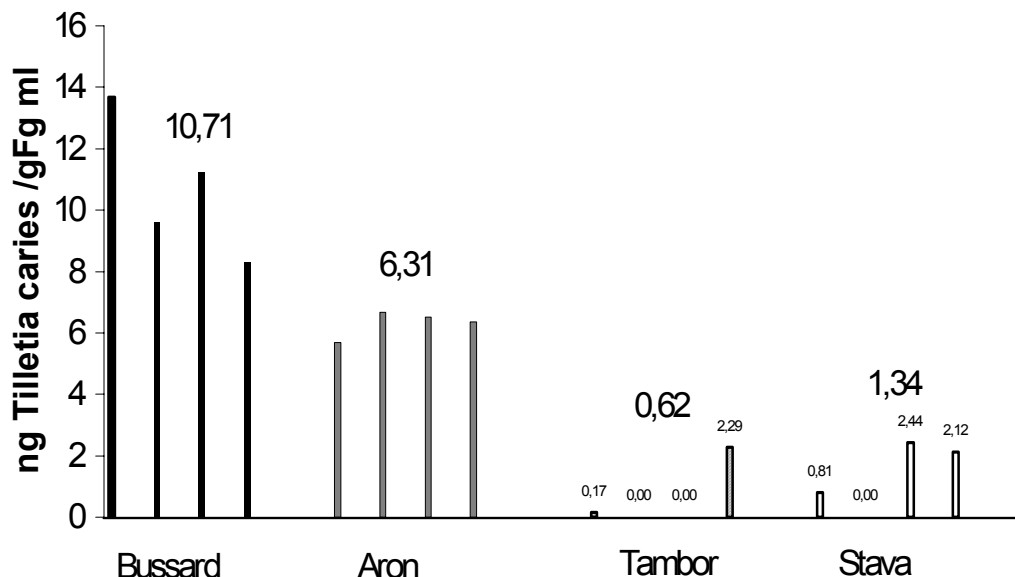


Abb. 3.10 Gepoolte *Tilletia caries* - Gehalte von Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit. Die Vegetationspunkte von je 10 Einzelpflanzen einer Sorten (Mittelwert oberhalb angegeben) wurden gemeinsam aufgearbeitet und der Pilzgehalt dieses gepoolten Extraktes bestimmt.

Bussard und *Aron* lassen sich voneinander unterscheiden und haben beide deutlich höhere Pilzgehalte als *Tambor* und *Stava*. Im Unterschied zur Mittelwertbildung aus 50 Einzelproben (vergl. Abb. 3.9) weist hier allerdings *Tambor* einen niedrigeren Pilzgehalt auf als *Stava*.

In ihrer Gesamtheit deuten die bisherigen Ergebnisse aber dennoch darauf hin, dass mit Hilfe des ELISA eine Unterscheidung in sehr stark, mittel und gering anfällig gemacht werden kann. Eine Feinabstufung, wie zwischen gering anfällig und tolerant scheint demnach nicht möglich zu sein.

An fünf exemplarisch ausgewählten Sorten konnte der Pilzgehalt mit Hilfe des ELISA quantifiziert werden. Bei Einbeziehung von Extrakten aus einer großen Anzahl von Einzelpflanzen (mind. 45) ergab sich eine gute Korrelation zum Ährenbefall im Feld und damit zum Resistenzgrad. Um abschätzen zu können, ob diese Methode universell zur Charakterisierung der Steinbrandresistenz geeignet ist, und wie weit Abstufungen der Anfälligkeiten von sehr stark bis gering bzw. tolerant gemacht werden können, bedarf es noch der Prüfung einer größeren Anzahl Sorten.

3.6 Korrelation von Blattfrühsymptomen und Pilzgehalt im Vegetationspunkt

Inwieweit das Vorkommen von Blattsymptomen mit dem Pilzgehalt im Vegetationspunkt der Pflanze korreliert, wurde an den 30 Weizensorten überprüft. Dazu wurden nach Abschluss des Versuchs zur Charakterisierung des Resistenzgrades anhand der Blattfrühsymptome (Kapitel 3.3.1) die Vegetationspunkte von je 10 Pflanzen mit und ohne Frühsymptomen jeder Sorte der 15°C Variante im EC 14/20 Stadium einem ELISA unterzogen. Da die Inokulation mit den Sporen der Herkunft Bad Vilbel erfolgt war, sind die Sorten in Abb. 3.11 nach ihrer Anfälligkeit, die sie im Feldversuch 2002/2003 gezeigt hatten, sortiert. Dabei fallen zunächst die großen Unterschiede der Pilzgehalte bei den einzelnen Sorten ins Auge, die im wesentlichen auch ihre Anfälligkeit im Feld widerspiegeln. Gerade bei den gering anfälligen Sorten ist auch nur ein geringer Pilzgehalt zu finden. Eine eindeutige Korrelation bei allen Sorten ist allerdings nicht gegeben. So zeigen die Sorten *Mewa* und *Cubus* trotz hoher Anfälligkeit einen geringen Pilzgehalt und die Sorten *Excellenz* und *Compliment*, die im Feldversuch mittel anfällig waren, die höchsten Pilzgehalte. In diesem Versuch sind allerdings auch nur 10 Pflanzen, zudem vorsortiert nach dem Vorhandensein von Frühsymptomen, auf ihren Pilzgehalt hin untersucht worden. Schon in Kapitel 3.5 (Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe des ELISA) hat sich bei der Untersuchung der fünf exemplarisch gewählten Sorten herausgestellt, dass aufgrund der großen Streuung, für eine gute Vorhersage des Resistenzgrades, Mittelwerte aus einer grösseren Pflanzenzahl (etwa 50) erforderlich sind.

Was die Korrelation von Blattfrühsymptom und Pilzgehalt betrifft, so hatten fast alle Sorten einen höheren Pilzgehalt in den Pflanzen mit Frühsymptomen im Vergleich zu den Pflanzen ohne Frühsymptome. Eine gute Korrelation zwischen Frühsymptom und Pilzgehalt ist aber wie bei der Korrelation zwischen Frühsymptom und Ährensymptom (Kapitel 3.3.2) sortenabhängig. So zeigt die anfällige Sorte *Bussard* eine enge Beziehung zwischen Frühsymptom, Pilzgehalt und Ährensymptom.

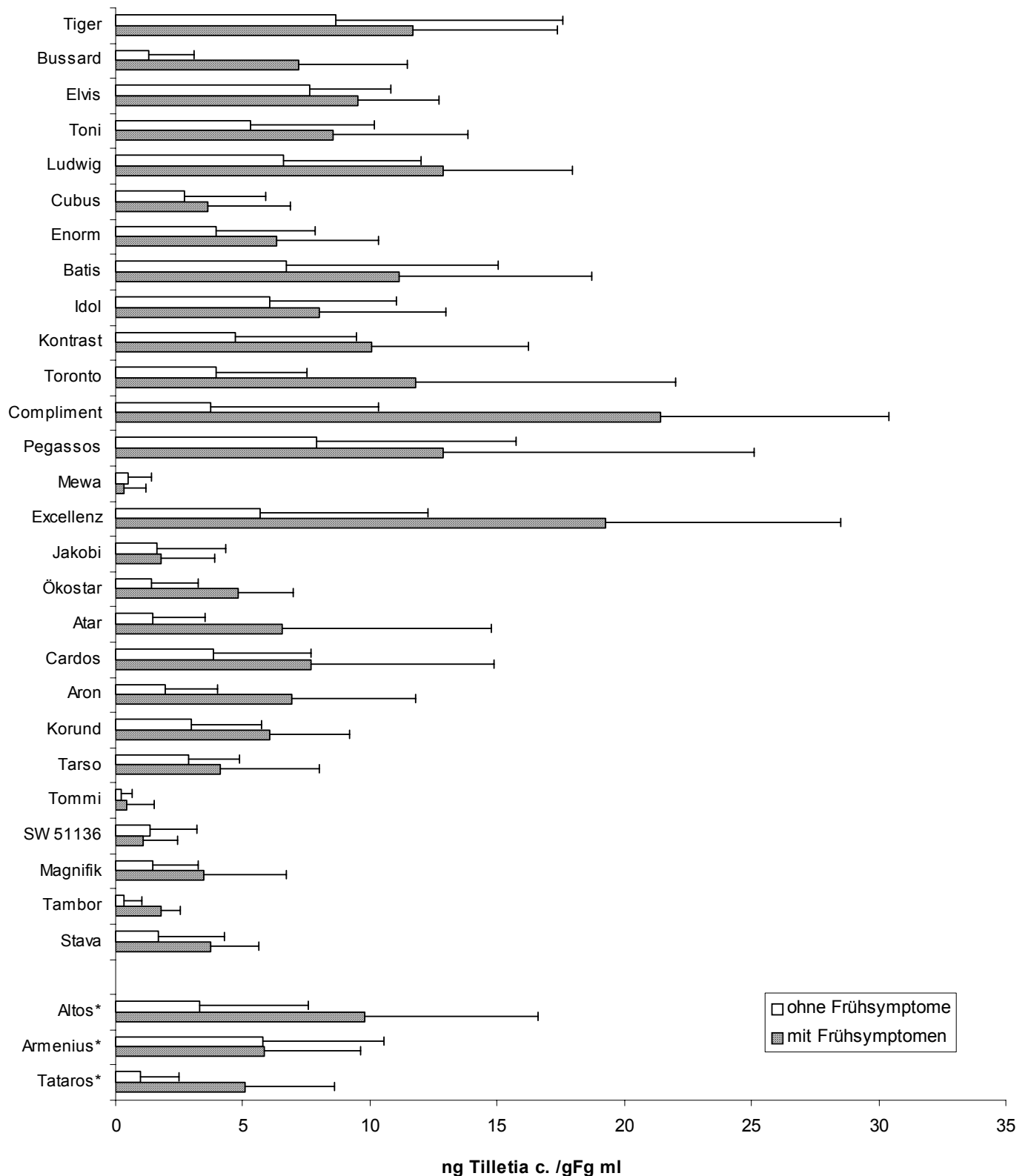


Abb. 3.11 *Tilletia* Gehalte der Vegetationspunkte der 30 Weizensorten mit und ohne Frühsymptome angezogen im Pflanzenanzuchtraum, inokuliert mit den Sporen der Herkunft Bad Vilbel. (Mittelwerte und Standardabweichung aus je 10 Pflanzen) (Sortiert nach Anfälligkeit von gering bis stark nach dem diesjährigen Feldversuch am Standort Bad Vilbel, * ausgewinterte Sorte)

Allerdings hatte eine ganze Reihe von Pflanzen der anfälligen Sorten ohne Frühsymptome dennoch einen relativ hohen Pilzgehalt (>5 ng/gFG ml, vergl. Kapitel 3.7.1), der zu einem Ährensymptom führen könnte. Auf der anderen Seite hatten unter den gering anfälligen Sorten wie *Stava*, *Tambor*, *SW 51366*, *Magnifik* und *Tommi* die Pflanzen mit Frühsymptomen nur wenig höhere Pilzgehalte als die Pflanzen ohne Frühsymptome. Ob dieser geringe Pilzgehalt zu einem Ährensymptom geführt hätte, ist fraglich.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass auf der einen Seite ein hoher Pilzbefall des Vegetationspunktes (gerade bei den anfälligen Sorten) auch ohne Erscheinen von Frühsymptomen begleitet sein kann. Andererseits lässt das Erscheinen von Frühsymptomen (gerade bei den gering anfälligen Sorten) nicht unbedingt auf einen erhöhten Pilzgehalt im Vegetationspunkt schließen.

Die Rolle der Frühsymptome wird damit komplizierter als angenommen. Ob es sich um Restmyzel des Pilzes handelt, das auf dem Weg zum Vegetationspunkt in den Blättern verbleibt (Abb. 3.12) oder als Teil einer Pathogenantwort verstanden werden muss, ist unklar. In jedem Fall würde die fehlende Korrelation zwischen Frühsymptom und Pilzgehalt bei den gering anfälligen Sorten die schlechte Korrelation zwischen Frühsymptom und Ährenbefall (Kapitel 3.3.2) gerade bei diesen Sorten erklären.

3.7 Entwicklung und Verteilung des Steinbranderregers in der heranwachsenden Pflanze

Anatomische Untersuchungen über das Eindringen und die Ausbreitung von *Tilletia*-Arten in Getreidepflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wirtspflanze wurden bereits 1958 von Hansen durchgeführt. Durch Anfärbung der Hyphen mit einer Baumwollblaulösung nach Popp (1951) und der *Gramschen Färbung* (Woolman 1930) konnte gezeigt werden, dass der Pilz die äußeren Schichten der Koleoptile intrazellulär durchdringt, die weitere Ausbreitung jedoch interzellulär verläuft. Durch seine enge Anpassung an die Zellwände ist er ungefärbt nicht zu finden. Bei *Tilletia caries* konnte nach 50 Tagen bei 30% der Pflanzen (anfällige Winterweizensorte Ackermans Herold) Myzel im Vegetationspunkt gefunden werden (Hansen 1958). Erst mit der Besiedlung des Vegetationspunktes, der späteren Ährenanlage, durch den Pilz ist der Ausbruch der Krankheit möglich.

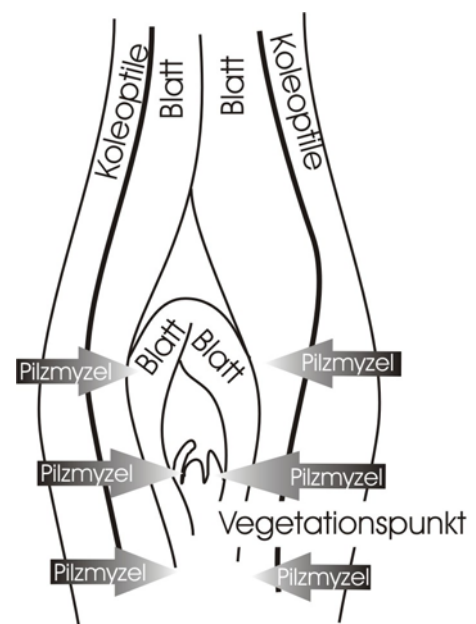


Abb. 3.12 Weg des Pilzes zum Vegetationspunkt beim Weizenkeimling (verändert nach Hansen 1958)

Mit Hilfe des ELISA bestand nun erstmals die Möglichkeit, den Weg des Pilzes in der Pflanze zum einen spezifisch und im besonderen quantitativ zu verfolgen. Dazu wurden Pflanzenproben zu verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet und die einzelnen Pflanzenorgane getrennt nach Koleoptile, Vegetationspunkt, Blättern (Scheide und Spreite) der Haupt- und Seitentriebe, Knoten,

Abb. 3.13 Entwicklungsstadien des Weizens (am Beispiel der Laborsorte *Apogee*)

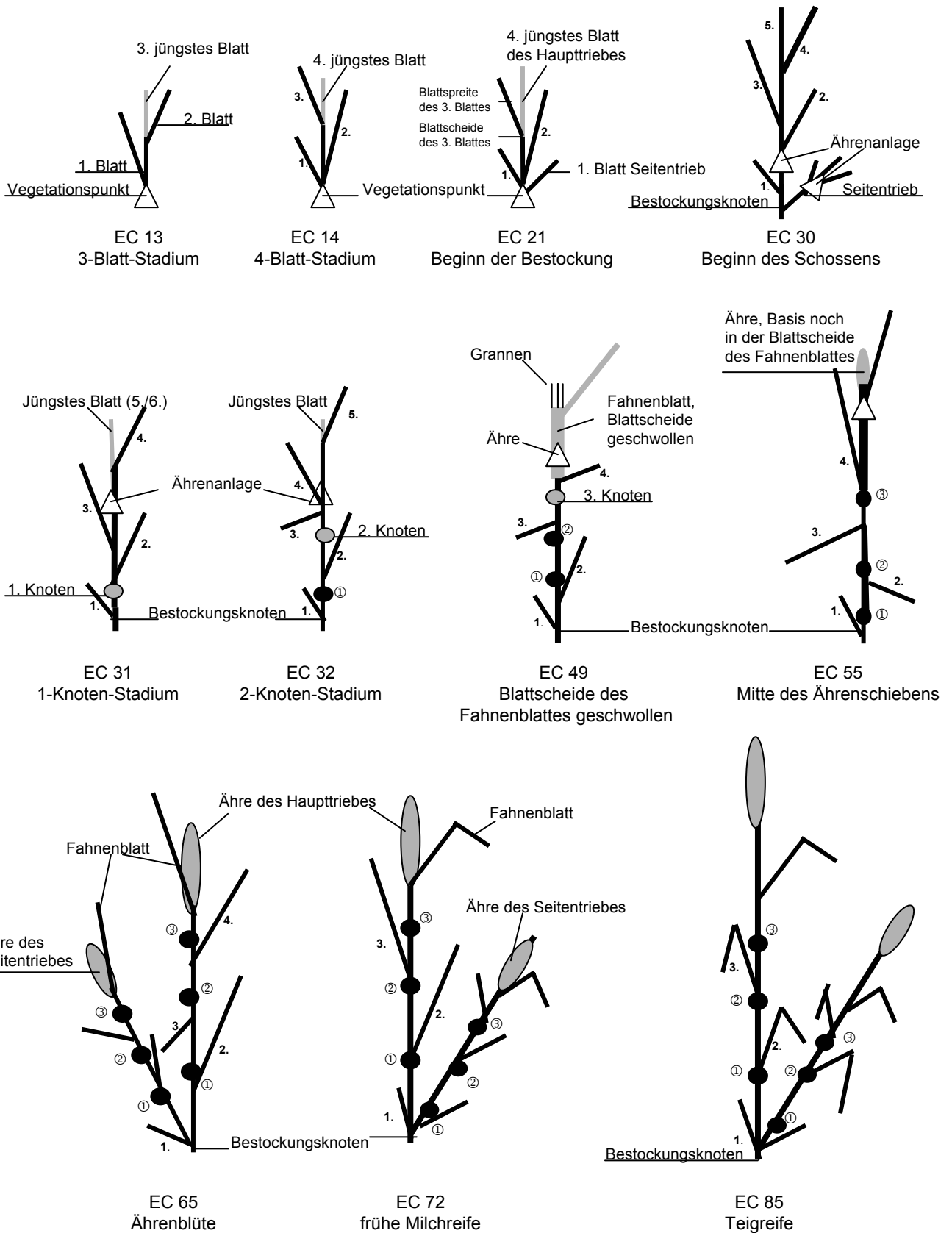


Tabelle 3.3 *Tilletia caries*- Gehalte (ng/gFGml) in APOGEE in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschieden nach Frühsymptomen (FS)

n.u. : nicht untersucht

	EC 13			EC 14			EC 21	Pflanze 1		Pflanze 2	
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Haupttrieb	Seitentrieb	Haupttrieb	Seitentrieb	
Vegetationspunkt	40,74	30,06	35,18	3,30	5,08	36,51	91,89	n.u.	15,45	n.u.	
Blatt 1	0,00	4,31	0,00	0,00	6,89	12,51	37,23	2,04	0,00	0,00	
Blatt 2	9,83	2,74	4,31	0,00	0,00	0,00	0,00	n.u.	0,00	n.u.	
Blatt 3	8,25	12,19	8,25	0,00	0,00	8,07	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
Blatt 4	n.u.	n.u.	n.u.	0,00	1,20	13,39	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	

	EC 30 mit FS				ohne FS	EC 31 mit FS		ohne FS		EC 32 mit FS		
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 1	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3
Bestockungsknoten	9,02	12,66	14,74	0,00	0,00	n.u.	n.u.	2,38	0,00	n.u.	n.u.	n.u.
Blatt 1	8,08	13,92	9,30	8,58	2,01	n.u.	n.u.	0,00	0,00	n.u.	n.u.	n.u.
Blatt 2	4,49	n.u.	n.u.	n.u.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.u.	4,01	n.u.
1. Knoten	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Blatt 3	6,19	28,78	24,73	17,71	0,00	1,78	8,34	0,00	0,00	n.u.	n.u.	n.u.
2. Knoten	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	9,46	n.u.	n.u.
Blatt 4	16,39	43,20	24,99	n.u.	0,00	2,32	4,97	0,00	0,65	3,70	3,71	n.u.
Blatt 5	n.u.	11,22	9,87	14,93	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	2,46	n.u.	3,17
Ährenanlage	n.u.	21,54	59,83	26,97	n.u.	10,59	8,46	1,88	3,79	8,25	n.u.	8,45

	EC 49 ohne FS		mit FS		EC 55	EC 65		EC 72		EC 85	
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Haupttrieb	Seitentrieb	Haupttrieb	Seitentrieb	Haupttrieb	Seitentrieb
Bestockungsknoten	n.u.	n.u.			4,27	0,69	n.u.	0,00	n.u.	0,00	n.u.
Blatt 1	0,00	n.u.	0,00	n.u.	37,73	0,00	n.u.	16,94	n.u.	16,24	n.u.
Blatt 2	n.u.	n.u.	0,00	n.u.	n.u.	0,00	n.u.	7,36	n.u.	5,52	n.u.
1. Knoten	n.u.	n.u.	1,48	n.u.	20,30	0,00	0,00	28,17	11,19	0,00	14,36
Blatt 3	0,00	n.u.	1,13	2,13	12,20	n.u.	n.u.	8,73	n.u.	n.u.	n.u.
2. Knoten	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	9,67	0,00	0,00	8,41	11,34	0,00	1,74
Blatt 4	0,00	0,00	2,16	1,77	57,68	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
3. Knoten	0,00	n.u.	n.u.	4,76	n.u.	329,43	0,00	9,30	18,05	0,00	7,58
Fahnenblatt	n.u.	n.u.	n.u.	5,35	11,11	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Ähre	4,70	n.u.	16,24	14,52	34,19	0,00	4,63	520,11	705,91	0,00	478,51

Ährenanlage und Ähre auf ihren Pilzgehalt untersucht.

Im Rahmen einer Diplomarbeit sollte zudem die Entwicklung und Verteilung des Steinbranderregers in Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit untersucht werden, um eventuell Rückschlüsse auf die Resistenzmechanismen bzw. ihren Zeitpunkt und ihren Ort ziehen zu können. Ausgewählt wurden die Sorten *Bussard* (hoch anfällig), *Aron* (anfällig), sowie die gering anfälligen Sorten *Tambor* und *Stava*. Neben den Laboranzuchten (Keimlingsstadium) und den unter kontrollierten Bedingungen angezogenen Pflanzen (bis zum Stadium EC 20) wurde für die älteren Stadien auch auf Feldproben (Kapitel 2.6) zurückgegriffen. Die quantitativen Untersuchungen mit Hilfe des ELISA sollten zudem mit histologischen Untersuchungen mit Hilfe unspezifischer Myzelfärbungen wie Trypanblau und der spezifischen Immunfärbung unterstützt werden. Da die Diplomarbeit noch nicht abgeschlossen ist, können im Rahmen dieses Berichtes nur erste Ergebnisse vorgestellt werden.

3.7.1 Entwicklung und Verteilung des Steinbranderregers im Laborweizen *Apogee*

Im Fall des Laborweizens *Apogee*, einer Sorte ohne Vernalisationsbedürfnis, konnten alle Entwicklungsstadien ohne nennenswerten Aufwand unter kontrollierten Bedingungen angezogen werden. Abb. 3.13 gibt einen Überblick über die untersuchten Entwicklungsstadien von EC 13 bis EC 85 mit der Reihenfolge der gebildeten Blätter und Knoten. Besondere Bedeutung kam dabei der Lokalisierung des Vegetationspunktes und seiner Entwicklung zur Ährenanlage und letztendlich zur Ähre zu, da seine Besiedlung durch den Pilz entscheidend für den Ausbruch der Krankheit ist. In Tabelle 3.3 sind die gemessenen *Tilletia*-Gehalte in ng/gFG ml der jeweiligen Stadien in den einzelnen Pflanzenorganen für bis zu vier Einzelpflanzen aufgelistet. Dabei wurde in Pflanzen mit und ohne Frühsymptome unterschieden. Legt man die gute Korrelation zwischen Frühsymptom und Ährensymptom der Sorte *Apogee* zugrunde, lässt sich ein Grenzwert von $>5\text{ng/gFG ml}$ Pilzgehalt im Vegetationspunkt bzw. in der Ährenanlage als nötige Menge Pilz für eine erfolgreiche Infektion, sprich für ein Ährensymptom, ableiten.

Von den untersuchten inokulierten Pflanzen waren nicht alle auch vom Pilz erfolgreich infiziert, zeigten also auch keine ausreichend erhöhten Pilzgehalte ($>5\text{ng/gFG ml}$), um ein Ährensymptom zu induzieren. Bestätigt wurde wieder die sehr gute Korrelation von Blattfrühsymptomen und hohen *Tilletia*-Gehalten in Blättern und Vegetationspunkt bzw. Ährenanlage für die Sorte *Apogee*. Bei den befallenen Pflanzen war im Dreiblattstadium (EC 13) bis zur Bestockung (EC 21) der höchste Pilzgehalt im Vegetationspunkt zu finden. Vereinzelt konnten auch hohe Pilzgehalte in den Blättern gemessen werden, die zum einen auf Restmyzel (in den Blättern verblieben, nach deren Durchdringung und Wachstum in Richtung Vegetationspunkt (siehe Abb. 3.12)) zurückzuführen sein können, zum anderen jedoch auch auf die „Fehlbesiedelung“ von Blattprimordien im Vegetationspunkt und das passive Mitwachsen in den sich dann entwickelnden Blättern. Mit Beginn des Schossens (EC 30) wird der Vegetationspunkt durch das einsetzende Streckungswachstum in den Blattscheiden nach oben geschoben und wird zur Ährenanlage. In diesem Stadium waren bei jeder der vier untersuchten Pflanzen in fast allen Pflanzenorganen hohe Pilzgehalte zu finden, sowohl im Bestockungsknoten am Halmgrund, als auch in den Blättern und den Ährenanlagen. Mit Bildung der Knoten (EC 31, EC 32) fand eine Konzentration auf die Ährenanlage statt und diese Entwicklung setzte sich bis zur Bildung der Ähre fort. Mit dem Sichtbarwerden des eigentlichen Krankheitsbildes (d.h. der Bildung der Brandähre) erhöhten sich die Pilzgehalte in der Ähre im Vergleich zu den Pilzgehalten des Vegetationspunktes bzw. der

Ährenanlage der jüngeren Stadien um das 100fache.

Die Quantifizierung des Pilzes mit Hilfe des ELISA bestätigt ältere (histologische) Untersuchungen, wonach für die Ausbildung des Ährensymptoms die Besiedelung des Vegetationspunktes bzw. der Ährenanlage entscheidend ist. Hohe Pilzgehalte auch in anderen Pflanzenorganen, wie den Blättern oder den Knoten, weisen zwar auf eine starke Ausbreitung des Pilzes hin, haben aber letztlich keine direkte Auswirkung auf das Ährensymptom. Allerdings ist bei starker Pilzausbreitung die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Ährenanlage befallen wird, entsprechend hoch.

3.7.2 Vergleich der Pilzverteilung in Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit

Abb. 3.14. zeigt eine Aufsicht auf die Koleoptile eines Weizenkeimlings. Bei den angefärbten Bereichen handelt es sich offensichtlich um Stellen, an denen der Pilz versucht hat, in die Pflanze einzudringen.

Beim Vergleich der Pilzausbreitung in Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit beschreibt Hansen (1958) eine Resistenzform, bei der der Pilz nicht in der Lage ist, in die Pflanze einzudringen. Erfolgt dagegen eine Infektion, so werden die ersten Anzeichen eines Befalls in einer Verdickung der Epidermis deutlich. In anfälligen Sorten durchbrechen die Hyphen die Epidermis unter sichtbarer Einschnürung und gelangen in das Zelllumen. Die durchbrochene Wand schwillt an und bildet eine Hülle um den Pilz.

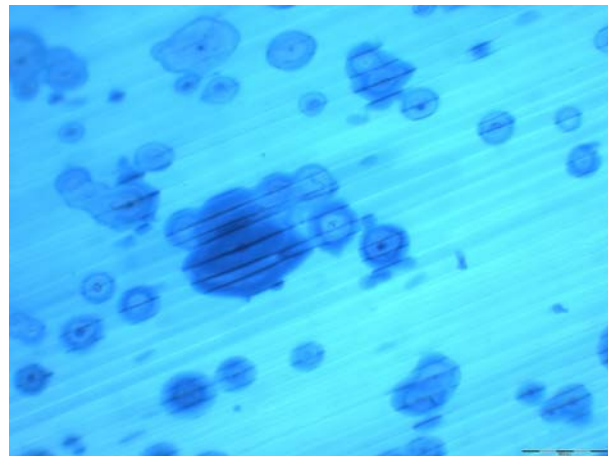


Abb. 3.14 Infektionspunkte an der Koleoptile (Trypanblau)

Bei einigen resistenten Sorten scheint der Pilz nicht in der Lage zu sein, diese Umhüllungsscheiden der Epidermis zu durchbrechen. Bei anderen resistenten Sorten drang der Pilz zwar in die Pflanze ein, erreichte jedoch nicht den Vegetationspunkt (Fernandez *et al.* 1978).

Um Rückschlüsse auf ihre Resistenzmechanismen ziehen zu können, wurden die exemplarisch ausgewählten Sorten in verschiedenen Stadien mit dem ELISA untersucht (Kapitel 2.5.2). Im Keimlingsstadium waren die Pilzgehalte von Embryo und Koleoptile bei allen untersuchten Sorten unabhängig von ihrer Anfälligkeit sehr hoch, d.h. eine Differenzierung war nicht möglich. Im ersten Blatt, das in dem untersuchten Stadium noch fast vollständig von der Koleoptile umschlossen war, konnten nur bei der Sorte Bussard hohe *Tilletia*-Gehalte gemessen werden, bei allen anderen waren die Werte sehr niedrig. Die Ergebnisse sind hier bewusst nicht dargestellt, weil sich die Präparation des Embryos aus dem Keimling als kompliziert darstellte und eine Verfälschung der Messergebnisse durch Pilzmyzel von der Keimlingsoberfläche nicht ausgeschlossen werden kann.

Für die Untersuchungen der älteren Stadien wurde auf Feldmaterial (Kapitel 2.6) zurückgegriffen,

da nur dort die Sorten zum Schossen kamen. Untersucht wurden je Sorte 5 bis 10 Pflanzen der Stadien EC 13 (Dreiblattstadium) und EC 20 (Bestockung) (Abb. 3.15), sowie EC 31 (Schossen und Knotenbildung) (Abb. 3.16). Da die Freilandpflanzen im Vergleich zu den Pflanzen, die unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden, im EC 13 bis EC 20 Stadium noch sehr klein waren, wurde für den ELISA die Gesamtpflanze genommen, da eine Auftrennung in Blätter und Vegetationspunkt keine ausreichende Frischgewichtsmenge erbracht hätte. Anders als bei der Anzucht unter kontrollierten Bedingungen waren die *Tilletia*-Gehalte der Freilandpflanzen im EC 13 Stadium bei allen Sorten, auch bei der anfälligen Sorte *Bussard* noch sehr gering, so dass eine Einschätzung ihres Resistenzgrades zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich war. Obgleich die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt bereits vier Wochen alt waren, war eine deutliche Besiedelung durch den Pilz anscheinend noch nicht erfolgt. Im Alter von 8 Wochen (Beginn der Bestockung) dagegen konnten die Sorten anhand der Pilzgehalte differenziert werden, im gleichen Maße wie das auch bei den Versuchen unter kontrollierten Bedingungen in diesem Stadium möglich war (Kapitel 3.5), obgleich sie im Anzuchtraum das Stadium EC 20, bedingt durch die höheren Temperaturen, bereits nach vier Wochen erreicht hatten. Das deutet darauf hin, dass die Entwicklung des Pilzes in der Pflanze parallel zur Pflanzenentwicklung verläuft. Zumindest in diesen jungen Stadien der Pflanzenentwicklung scheint die Meinung, dass tiefe Temperaturen einseitig die Entwicklung des Pilzes fördern, so generell nicht zuzutreffen.

Die Pilzverteilung in der Pflanze im Stadium EC 31 (Abb. 3.16) bestätigt auch für die Freilandsorten die Beobachtung an der Modellsorte *Apogee*, dass für den Ausbruch der Krankheit die Infektion der Ährenanlage entscheidend ist. Und so finden wir auch bei den exemplarisch gewählten Sorten die höchsten Pilzgehalte immer in der Ährenanlage. Pflanzen, die ausschließlich in anderen Pflanzenorganen hohe Pilzwerte haben, nicht jedoch in der Ährenanlage, werden auch keine Ährensymptom zeigen. Wie bei der Sorte *Apogee* zeigte von den Freilandsorten die anfällige Sorte *Bussard* eine gute Korrelation zwischen Frühsymptomen und erhöhtem Pilzgehalt in der Ährenanlage. Bei den mittel bis gering anfälligen Sorten *Aron*, *Tambor* und *Stava* konnte man dagegen nicht von fehlenden Frühsymptomen auf einen geringen Pilzgehalt in der Ährenanlage schließen. Dies bestätigt die Beobachtungen der Versuche zur Korrelation Frühsymptom-Ährenbefall (Kapitel 3.3.2) und zur Korrelation Frühsymptom-Pilzgehalt (3.6).

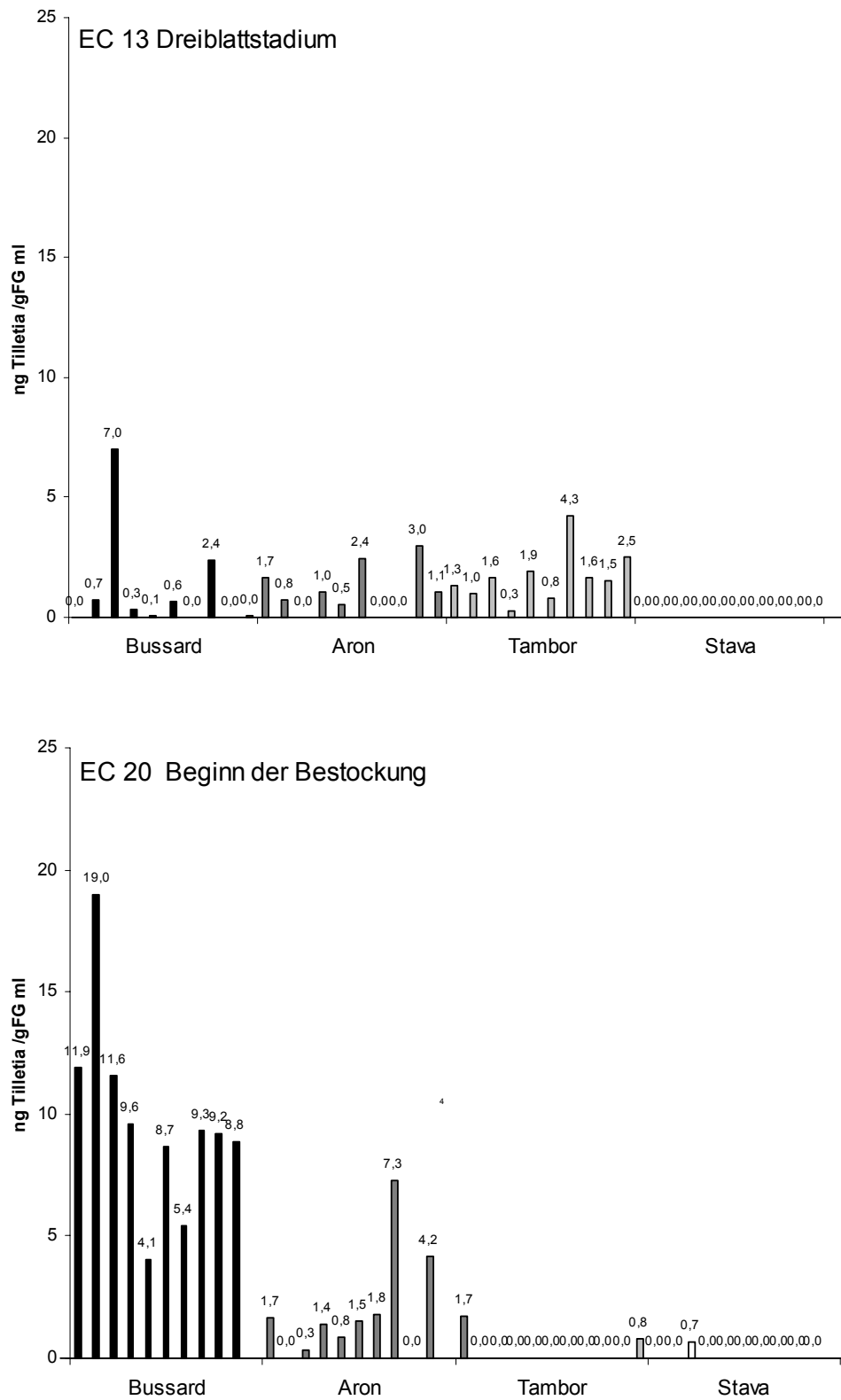


Abb. 3.15 *Tilletia* Gehalte von Einzelpflanzen Sorten unterschiedlicher Resistenz in den Stadien EC 13 und EC 20 (Feldmaterial)

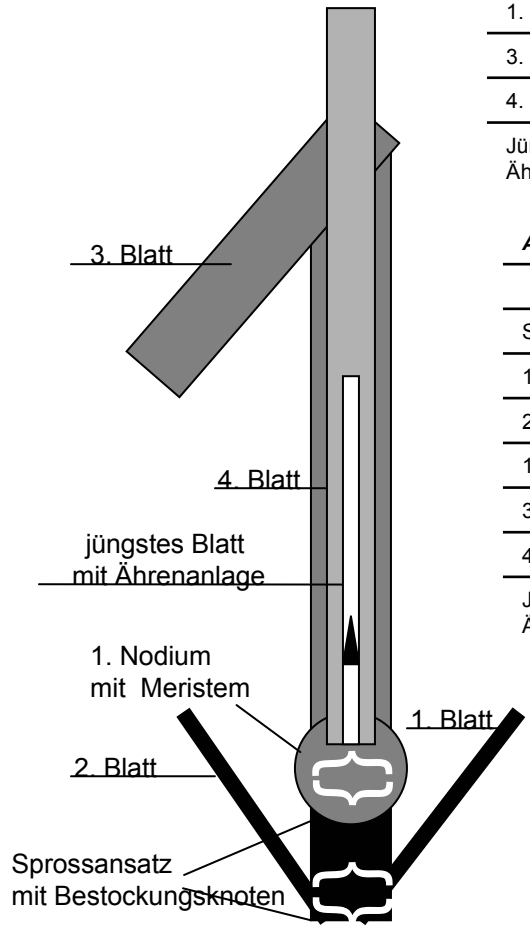
Abb. 3.16 Entwicklung und Verteilung des Pilzes Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit im Stadium EC 31 (Steinbrandgehalte in ng / gFG ml) (n.u.: nicht untersucht)

BUSSARD	Ohne Frühsymptome		Mit Frühsymptomen	
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Pflanze 2
Sprossansatz	1,88	0,63	7,90	9,64
1. Blatt	0,00	0,00	n.u.	n.u.
2. Blatt	0,00	0,00	n.u.	8,90
1. Knoten	4,69	2,54	46,51	n.u.
3. Blatt	1,19	0,00	8,63	6,03
4. Blatt	2,17	0,07	15,57	4,43
Jüngstes Blatt mit Ährenanlage	4,61	0,66	26,26	54,21

ARON	Ohne Frühsymptome		Mit Frühsymptomen	
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 1	Pflanze 2
Sprossansatz	0,00	0,00	70,42	2,97
1. Blatt	0,46	0,00	0,00	n.u.
2. Blatt	n.u.	0,00	0,00	0,35
1. Knoten	0,27	0,00	0,00	0,72
3. Blatt	0,12	0,00	0,00	1,4
4. Blatt	n.u.	0,00	5,55	2,08
Jüngstes Blatt mit Ährenanlage	0,67	22,1	36,73	0,45

TAMBOR	Ohne Frühsympt.	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4
	Sprossansatz	0,00	4,19	0,00	36,62
1. Blatt	0,00	87,65	0,00	25,43	
2. Blatt	0,00	3,90	0,00	2,3	
1. Knoten	0,00	4,26	0,00	4,08	
3. Blatt	0,00	3,82	0,00	0,00	
4. Blatt	2,16	119,74	0,00	0,00	
Jüngstes Blatt mit Ährenanlage	0,00	49,34	1,22	0,00	

STAVA	Ohne Frühsympt.	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4
	Sprossansatz	29,56	1,9	30,96	0,00
1. Blatt	0,00	0,00	0,00	5,68	
2. Blatt	4,15	0,00	0,00	30,30	
1. Knoten	0,00	0,00	0,00	2,07	
3. Blatt	20,14	0,00	4,78	0,00	
4. Blatt	0,00	0,95	0,00	0,00	
Jüngstes Blatt mit Ährenanlage	0,00	0,00	0,00	36,56	



Die Frage nach Zeitpunkt und Ort der Resistenzmechanismen der Sorten *Stava* und *Tambor* lässt sich durch diese Untersuchungen nicht hinreichend klären. Die Interpretation der Ergebnisse wird insbesondere dadurch erschwert, dass wegen des Arbeitsaufwandes zu allen Stadien und bei allen Sorten nur eine begrenzte Anzahl von (zufällig ausgewählten) Einzelpflanzen untersucht werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass es zwischen Einzelpflanzen eine erhebliche Variabilität gibt. Dennoch sind gewisse sortenspezifische Gemeinsamkeiten erkennbar. Bei *Stava* konnte in den frühen Stadien kein Pilz nachgewiesen werden, was zunächst auf eine Eindringungsresistenz schließen lässt. Im Stadium EC 31 enthielten dennoch drei der vier Pflanzen (alle ohne Frühsymptom) den Pilz, in einem Fall sogar in der Ährenanlage. In den untersuchten Pflanzen der Sorte *Tambor* war zu EC 13 eindeutig Pilz nachzuweisen, d.h. der Pilz war in die Pflanze eingedrungen. Warum im Stadium EC 20 in keiner der untersuchten Pflanzen Pilz vorhanden war, ist nicht bekannt. Im Stadium EC 31 war bei einer Pflanze die Ährenanlage befallen. Bei einer *Tambor*- und zwei *Stava*-Pflanzen waren in anderen Teilen als der Ährenanlage hohe Pilzgehalte vorhanden. Das deutet darauf hin, dass diese Sorten über Abwehrmechanismen verfügen, die auch nach dem Eindringen in die Pflanze wirksam sind. Bei *Aron* war bei zwei der vier untersuchten Pflanzen die Ährenanlage befallen, wobei eine der Pflanzen kein Frühsymptom gezeigt hatte. Bei *Bussard* ließen sich die Pflanzen ohne Frühsymptome deutlich von denen mit Frühsymptomen unterscheiden: Letztere zeigten in allen untersuchten Teilen einschließlich der Ährenanlagen durchweg höhere Pilzgehalte.

3.7.3 Histologische Untersuchungen des Steinbranderregers *in vitro*

Spezifische histologische Untersuchungen an infizierten Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit sollten die quantitativen ELISA-Messungen in der Fragestellung nach den möglichen Resistenzmechanismen unterstützen.

Voraussetzung dafür war zunächst die histologische Immunerkennung des Pilzes *in vitro*. Da je nach Pflanzenorgan (Keimling oder Blatt) unterschiedliche Eigenfluoreszenzen des Gewebes unter UV-Licht auftreten, die die Fluoreszenz des markierten Pilzes überdecken könnten, wurden verschiedene sekundäre Antikörper auf ihre Eignung überprüft. Die Immunmarkierung zeigte gute Ergebnisse für alle Fluoreszenzfarbstoffe. Die Hyphen und die verschiedenen Keimungsstadien des Pilzes wurden vom Antikörper erkannt und markiert (Abb. 3.17 und 3.18). Allein die Sporen wurden nicht markiert, was die Beobachtung von Eibel (2002) bestätigt, der über den ELISA keine Wechselwirkungen mit Brandsporenextrakt erhielt. Da der Antikörper gegen den Myzelextrakt hergestellt wurde, ist dies nicht weiter erstaunlich. Die *Alexa*-Farbstoffe waren, unabhängig von ihrer Fluoreszenzfarbe, dem *FITC* eindeutig vorzuziehen. Die Fluoreszenz war bei den *Alexa*-konjugierten Antikörpern deutlich stärker und zeigte auch bei größerer Verdünnung (1:200 statt 1:100) eine sehr gute Fluoreszenz.

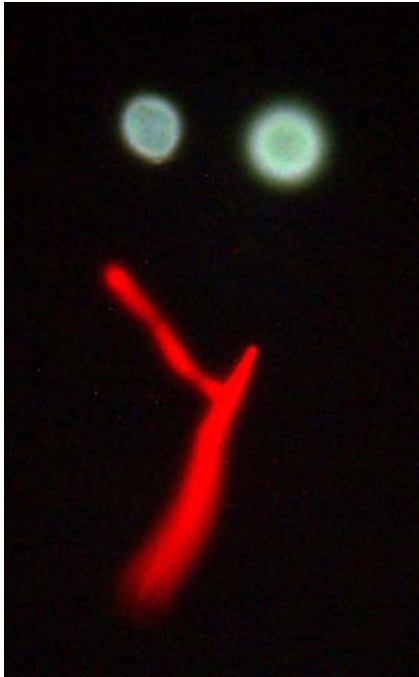


Abb. 3.17 *In-vitro* Markierung mit FITC konjugiertem Antikörper (1:100) Keimende Spore (die Spore zeigt gelbe Eigenfluoreszenz), fusionierende primäre Sporidien und sekundäre Sporidie.

Abb. 3.18 Keimschlauch markiert mit Alexa 568 (rot fluoreszierend) (1:200); Sporen mit blauer Eigenfluoreszenz

Weiterführende Arbeiten zur Immunfluoreszenzmarkierung *in vivo* an Sorten unterschiedlicher Resistenz werden derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt. Voraussichtlicher Abschluss ist Ende April.

3.8 Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe der PCR

Im Rahmen unserer Arbeiten gelang es nicht, den von Eibel (2002) etablierten PCR-Nachweis des Pilzes in der Pflanze zu verifizieren. Die intensive Beschäftigung mit der PCR hätte einen großen Zeitaufwand bedeutet. Da sich zu diesem Zeitpunkt das Frühdiagnosesystem über den ELISA bereits als erfolgsversprechend abzeichnete, wurden die Arbeiten mit der PCR zunächst zurückgestellt.

3.9 Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung

Endbonitur im Sommer 2004

3.10 Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment

Endbonitur im Sommer 2004

4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

- In den Feldversuchen zum Resistenzverhalten an verschiedenen Standorten konnten Weizensorten mit Toleranz bzw. geringer Anfälligkeit gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand gefunden werden (darunter auch solche, die bisher nicht dafür bekannt waren). Diese Sorten können den Ökolandwirten für den Anbau empfohlen werden. Pflanzenzüchter können das genannte Material im Rahmen der Resistenzzüchtung verwenden.
- Bei unseren Arbeiten zur Entwicklung eines Verfahrens zur frühzeitigen Erkennung resistenter Sorten zeigte die Frühdiagnose über ELISA nicht nur den Befall der Pflanze, sondern erlaubte bei entsprechend hoher Probenzahl (ca. 50 Pflanzen) auch eine gute Einschätzung ihres Resistenzgrades. Die Verifizierung dieses Verfahrens an einer größeren Anzahl von Sorten vorausgesetzt, könnte dieses Frühdiagnosesystems für den Einsatz in der Resistenzzüchtung oder bei der Bewertung im Rahmen der Sortenzulassung zum Einsatz kommen.
- Die Bonitur von Frühsymptomen an Jungpflanzen eignet sich aufgrund der Sortenabhängigkeit der Reaktion nicht für eine Charakterisierung der Sortenresistenz. Bei Verwendung einer geeigneten Sorte (*Apogee*, *Bussard*) ist ihre Verwendung im Rahmen von Screenings zum Auffinden von Saatbeizmitteln gegen Steinbrand aber weiterhin empfehlenswert.
- Von den derzeit noch laufenden Feldversuchen werden weitere verwertbare Ergebnisse erwartet: Aussagen zur Kombinierbarkeit von Sortenresistenz und alternativen Saatgutbehandlungsmitteln (anwendbar in der Praxis) und Ergebnisse zum Virulenzspektrum des Steinbrandes in Deutschland (anwendbar in der Pflanzenzüchtung).

5 Zusammenfassung

In **Feldversuchen** wurden 30 Weizensorten an fünf verschiedenen Standorten auf ihre natürliche Resistenz gegenüber Steinbrand und an einem Standort gegenüber Zwergsteinbrand untersucht. Dabei waren die Sorten/Zuchtlinien *Tommi*, *Tambor*, *Tarso*, *Tataros*, *Cardos*, *Korund*, *Stava*, *Magnifik*, *SW51126* und *Jakobi* tolerant bis gering anfällig gegenüber *Tilletia caries*. Bei einigen Sorten wurden an den verschiedenen Standorten unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Diese Unterschiede könnten auf Standortfaktoren (Aussaatzeitpunkt, Witterung) oder Unterschiede in der genetischen Konstitution des Erregers zurückzuführen sein.

Im Zwergsteinbrandversuch zeigten die Sorten/Zuchtlinien *Tommi*, *Pegassos*, *Toronto*, *Tambor*, *Tarso*, *Tataros*, *Ataro*, *Ökostar*, *Cardos*, *Korund*, *Stava*, *Magnifik*, *SW51126* und *Jakobi* eine vergleichsweise geringe Anfälligkeit.

Zur **Charakterisierung der Resistenz** wurde ein **System zur Frühdiagnose** des Befalls mit Hilfe eines **immunologischen Nachweises über ELISA** standardisiert und an ausgewählten Weizensorten angewandt. Bei Untersuchungen des Vegetationspunktes im Stadium EC 20 konnte anhand der Pilzgehalte von 45 Einzelpflanzen eine Voraussage über den Resistenzgrad getroffen werden. Damit sind die bisherigen Ergebnisse zur immunologischen Früherkennung erfolversprechend. Um dieses Frühdiagnoseverfahren universell einsetzen zu können, sind allerdings Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Sorten nötig.

Zudem wurde das Auftreten von **Blattchlorosen** als Vorhersagekriterium für den Steinbrandbefall sowohl an einem Feldstandort (Bad Vilbel) als auch im Pflanzenanzuchtraum überprüft. Dabei zeigten die im Feld bonitierten Blattchlorosen eine bessere Korrelationen mit dem Ährensymptom als die Pflanzen, die unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden. Grundsätzlich ist diese Übereinstimmung aber sortenabhängig. Daher eignet sich die Methode nicht generell zur Charakterisierung der Resistenz. Bei Verwendung einer geeigneten Sorte ist die Nutzung der Frühsymptome als Indikator für eine erfolgte Infektion, etwas bei Untersuchungen zur Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln, allerdings eine zeitsparende und einfache Methode.

Die Entwicklung des Steinbranderreger und seine **Verteilung** in der wachsenden Pflanze wurde an ausgewählten Sorten mit verschiedenen Verfahren untersucht. Für die histologischen Untersuchungen mit Hilfe der Immunmarkierung wurden zunächst erfolgreich *in-vitro*-Färbungen durchgeführt. Die sehr aufwendigen *in-planta*-Untersuchungen erfolgen zur Zeit im Rahmen einer Diplomarbeit. Mit Hilfe des immunologischen ELISA-Nachweises konnte der Pilz in der anfälligen Sorte *Apogee* zu verschiedenen Entwicklungsstadien in verschiedenen Pflanzenteilen quantitativ bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass ein Pilzgehalt von über 5 ng/gFGml in der Ährenanlage ab Stadium EC 31 für die Induktion einer Brandähre nötig ist. Untersuchungen von Sorten mit geringer Anfälligkeit sollten Erkenntnisse zu ihren Resistenzmechanismen liefern. Die Ergebnisse von ELISA-Untersuchungen zu verschiedenen Entwicklungsstadien scheinen daraufhin zu deuten, dass die Sorten *Tambor* und *Stava* einerseits bereits das Eindringen des Pilzes erfolgreich abwehren können. Daneben verfügen diese Sorten über weitere Resistenzmechanismen, die in späteren Stadien wirksam werden..

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

- **Feldversuche zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Steinbrand**
PLANUNG:
An fünf unterschiedlichen Standorten in Deutschland sollten Feldversuche mit Sorten, die in früheren Versuchen Resistenz oder Teilresistenz gezeigt haben, sowie mit weiteren, bisher noch nicht untersuchten Sorten / Zuchtstämmen, angelegt werden. Das Sporenmateriale stammte dabei aus den jeweiligen geographischen Regionen. Bonitiert wurde der Ährenbefall. Mit selektierten Sorten sollte der Versuch 2003/2004 wiederholt werden.
ERREICHTES ZIEL:
Die Feldversuche mit den 30 Winterweizensorten wurden erfolgreich an den fünf Standorten in der Vegetationsperiode 2002/2003 durchgeführt. Ca. 10 Sorten zeigten eine verminderte Anfälligkeit, so dass der Wiederholungsversuch wie geplant mit einer Selektion von fünf Sorten in der Vegetationsperiode 2003/2004 durchgeführt wird.

- **Feldversuche zur Ermittlung der Sortenresistenz gegenüber Zwergsteinbrand**
PLANUNG:
Wegen des räumlich begrenzten Auftretens dieser Krankheit war für den Zwergsteinbrand lediglich ein Feldversuch geplant. Versuchstandort war Temmenhausen.
ERREICHTES ZIEL:
Wie beim Steinbrand wurde der Feldversuch mit den 30 Winterweizensorten erfolgreich am Standort Temmenhausen in der Vegetationsperiode 2002/2003 durchgeführt. Auch hier zeigte eine Reihe von Sorten Toleranz gegenüber Zwergsteinbrand, so dass wie geplant ein Wiederholungsversuch mit einer Selektion von fünf Sorten in der Vegetationsperiode 2003/2004 durchgeführt wird.

- **Charakterisierung des Resistenzgrades anhand eines Systems zur Frühdiagnose**
PLANUNG:
Nach Anzucht unter kontrollierten Bedingungen sollte der Befall von Jungpflanzen anhand von Frühsymptomen am Blatt ermittelt und mit Hilfe des ELISA-Testes und / oder der PCR-Methode quantifiziert werden. Ziel war die Entwicklung eines Verfahrens zur frühzeitigen Erkennung resistenter Sorten.
ERREICHTES ZIEL:
Die auftretenden Blattfrühsymptome an Jungpflanzen wurden nicht nur unter kontrollierten Bedingungen an allen 30 Winterweizensorten bonitiert, sondern, um eine direkte Korrelation zum Ährensymptom zu haben, auch an einem der fünf Feldstandorte (Bad Vilbel). Dabei zeigte sich, dass die Blattfrühsymptome sortenabhängig auftreten und sich damit nicht generell zur Charakterisierung der Resistenz eignen.
Parallel wurde ein Verfahren zur Frühdiagnose mit Hilfe des ELISA an fünf exemplarisch ausgewählten Sorten erfolgreich etabliert. Um die Eignung des Verfahrens eingehender prüfen

zu können zu prüfen, wurde im Oktober 2003 auf dem Versuchsfeld der BBA ein zusätzlicher Feldversuch mit acht der 30 Sorten ausgesät und zu zwei Frühstadien geerntet. Zudem wurden von den Jungpflanzen der Feldversuche 2003/2004 an den fünf Standorten von den Versuchsanstellern zusätzlich Pflanzenproben genommen und der BBA zugeschickt. Die finanzielle und personelle Frage nach der Pflanzenaufarbeitung und der ELISA-Durchführung ist allerdings noch offen. Von der Entwicklung eines Verfahrens über die PCR wurde abgesehen, da die PCR eher qualitative, nicht jedoch die benötigten quantitativen Ergebnisse liefert.

- **Charakterisierung des Resistenzgrades anhand von Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der Pflanze**

PLANUNG:

Die Entwicklung und Verteilung des Pilzes in der heranwachsenden Pflanze sollte durch Bonitur der Frühsymptome, mikroskopische Anfärbung, Quantifizierung mit dem ELISA und PCR-Nachweis beschrieben werden.

ERREICHTES ZIEL:

Die Entwicklung und Verteilung des Pilzes wurde an der Laborsorte *Apogee* in allen wichtigen Entwicklungsstadien anhand der Frühsymptome und der Quantifizierung mit dem ELISA charakterisiert. Die alternative Nachweismethode über die PCR brachte auch nach mehreren Versuchen keine zufriedenstellenden Ergebnisse und wurde aus Zeitgründen zugunsten des ELISA eingestellt. Betreffend der geplanten unterstützenden histologischen Untersuchungen bestand im Herbst 2003 die Möglichkeit, eine Diplomandin mit dieser sehr arbeits- und zeitintensiven Arbeit zu betrauen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten nun nicht nur unspezifische Pilzanfärbungen mit herkömmlichen Färbemethoden durchgeführt werden, sondern auch spezifische Immunlokalisierungen mit dem vorliegenden Antikörper vorgenommen werden. Um mehr Erkenntnisse über die Resistenzmechanismen zu bekommen, wurden neben der anfälligen Laborsorte *Apogee* auch Sorten mit geringer Anfälligkeit eingeschlossen. Die zu untersuchenden Sorten werden zu verschiedenen Entwicklungsstadien histologisch, aber auch mit Hilfe des ELISA, sowie in Bezug auf Enzymaktivitäten untersucht. Die Diplomarbeit wird voraussichtlich Ende April beendet sein.

- **Kombination von Sortenresistenz und Saatgutbehandlung**

PLANUNG:

In Gewächshausversuchen sollten Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit mit standardisierten Sporenmengen inokuliert, und anschließend mit alternativen Saatgutbehandlungsmitteln (vergl. Parallelprojekt Dr. Jahn) behandelt werden. Selektierte Sorten / Mittelkombinationen sollten im zweiten Jahr im Feldversuch überprüft werden. Bonitiert wird der Ährenbefall im Sommer 2004.

ERREICHTES ZIEL:

In Absprache mit dem Parallelprojekt (Dr. Jahn / Dr. Waldow, Kleinmachnow) wurden Kombination von Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit (nach Bonitur des Feldversuchs im ersten Jahr) und alternativen Saatgutmitteln ausgewählt und am Standort Bad Vilbel Ende Oktober 2003 ausgesät.

- **Charakterisierung der Sporenherkünfte mit einem Differentialsortiment**

PLANUNG:

Sporenmaterial der fünf Versuchsstandorte sollte unter Feldbedingungen mit einem Differentialsortiment in Bezug auf sein Virulenzspektrum analysiert werden.

ERREICHTES ZIEL:

Ein Sortiment von Weizensorten / Herkünften, mit denen sich Populationen des Steinbrandes differenzieren lassen, wurde von Dr. Blair Goates (USDA/ARS Aberdeen, Idaho, USA) zur Verfügung gestellt und 2002/2003 an der Landessaatzuchtanstalt in Stuttgart (Dr. Miedaner) vermehrt. Im Herbst 2003 wurde das Material wie geplant mit dem Sporenmaterial der fünf Standorte inokuliert und am Standort Bad Vilbel ausgesät. Der Ährenbefall wird im Sommer 2004 bonitiert.

7 Literaturverzeichnis

- Agrios G.N. (1988) Plant Pathology. Academic Press, London (UK).
- Amos W. (1952) Über die Entwicklung des Flugbrandmyzels in infizierten Weizenpflanzen. Dissertation, TH Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Bartos P., Sip V., Vacke E., Stucklikova E., Blazková V. & Chrpová J. (1999). Erfolge und Perspektiven der Weizenzüchtung auf Krankheitsresistenz. Bericht über die 50. Arbeitstagung 1999 der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, BAL Gumpenstein, 23-25. November 1999: 111-117.
- Becker J. (1992) Untersuchungen zur Bekämpfung des Weizensteinbrandes (*Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint.) mit nährstoffreichen organischen Substanzen und Mikroorganismen . Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Bieber F. (1990) Biotinylierung monoklonaler Antikörper. In Peters, J.H.; Baumgarten H. (Hersg.): Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag Berlin.
- Borgen A. & Kristensen L. (2000) Macroscopic leaf symptoms in wheat infected by *Tilletia caries*. European Journal of Plant Pathology
- Börner H. (1990) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart.
- 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.
- Eibel P. (2002) Entwicklung und Erprobung immunologischer und molekulargenetischer Methoden zur Frühdiagnose von *Ustilago nuda* und *Tilletia caries* in Gerste und Weizen. Diss. Göttingen, Der andere Verlag, Osnabrück.
- Fernández J.A., Rubén D. & Schafer J.F. (1978) Histological aspects of dwarf bunt resistance in wheat. *Phytopathology* **68**, 1417-1421.
- Fischer G.W. & 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. *Landessaatzuchtanstalt Universität Hohenheim*.

- Gaudet D.A. & Puchalski B.J. (1989) Status of bunt resistance in western canadian spring wheat and triticale. *Canadian Journal of Plant Science* **69**, 797-804.
- Goates B.J. (1998) Host resistance to dwarf bunt of wheat. Pages 317-326 in *Bunts and Smuts of Wheat: An International Symposium, August 17-20, 1997*. North American Plant Protection Organization Ottawa.
- Goates B.J. (1996) Common bunt and dwarf bunt. Pages 12-25 in Wilcoxson R.D. and E.E. Sari (eds.): *Bunt and smut diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. CIMMYT Mexico.
- Hansen F. (1958) Anatomische Untersuchungen über Eindringen und Ausbreitung von *Tilletia*-arten in Getreidepflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wirtspflanze. *Phytopathologische Zeitschrift* **34**, 169-208.
- Hoffmann J.A. (1982) Bunt of wheat. *Plant Disease* **66**, 979-986.
- Hoffmann J.A. & Schmutterer H. (1999) *Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hoffmann J.A. & Metzger R.J. (1976) Current status of virulence genes and pathogenic races of the wheat bunt fungi in the northwestern USA. *Phytopathology* **66**, 657-660.
- Johnston C.O. & Lefebvre C.L. (1939) A chlorotic mottling of wheat leaves caused by infection of bunt *Tilletia laevis*. *Phytopathology* **29**, 456-458.
- Kendrick E.L. & Purdy L.H. (1959) A seedling reaction of wheat indicative of bunt infection. *Phytopathology* **49**, 130-132.
- Koch E. & Spiess H. (2002) Characterisation of leaf symptoms of common bunt (*Tilletia caries*) and relationship to ear attack in nine wheat varieties. *Journal of Plant Diseases and Protection* **109**, 159 – 165.
- Mamluk O.F. (1998) Bunts and smuts in North Africa and the Near East. Pages 103-108. *Wheat: Prospects for Global Improvement*. Kluwer Academic Press Niederlande.
- Mathre D.E. (1998) Dwarf bunt – a quarantine perspective. Pages 61 – 68 in *Bunts and Smuts of Wheat: An International Symposium, August 17-20, 1997*. North American Plant Protection Organization Ottawa.
- Nielsen B.J. & Christiansen S. (2000) Resistance against seed borne diseases in Danish wheat and barley varieties. *Proceedings from the Third Meeting in the Danish Cereal Network*, Danish Institute of Agricultural Sciences: 8-10.

- Obst A. (1993) Krankheiten und Schädlinge des Getreides. Thomas Mann Verlag.
- Popp W. (1951) Infection in seeds and seedlings of Wheat and Barley in relation to development of Loose Smut. *Phytopathology* **41**, 261-275.
- Russel B.W. & Millis D. (1993) Electrophoretic karyotypes of *Tilletia caries*, *T. controversa*, and their F1 progeny: Further evidence for conspecific status. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 66-74.
- Russel B.W. & Millis D. (1994) Morphological, physiological, and genetic evidence in support of a conspecific status for *Tilletia caries*, *T. controversa*, and *T. foetida*. *Phytopathology* **84**, 576-582.
- Schuhmann G. (1966) Untersuchungen über die physiologische Spezialisierung von *Tilletia caries* (D.C.) Tul. und *Tilletia controversa* Kühn in Deutschland und das Resistenzverhalten von Weizensorten. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* **117**.
- Shi Y.L., Loomis P., Christian D., Carris L.M. & Leung H. (1996) Analysis of the genetic relationship among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. *Phytopathology* **86**, 311-318.
- Silbernagel M.J. (1964) Compatibility between *Tilletia caries* and *T. controversa*. *Phytopathology* **54**, 1117-1120.
- Spieß H. & Dutschke J. (1991) Bekämpfung des Weizensteinbrandes (*Tilletia caries*) im Biologisch-Dynamischen Landbau unter experimentellen und praktischen Bedingungen. *Gesunde Pflanzen* **43**, 264-270.
- Weng W (1998) Prüfungsergebnisse- Zwergsteinbrand und Steinbrand 1998. Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart
- Woolman H.M. (1930) Infection phenomena and host reaction caused by *Tilletia tritici* in susceptible and nonsusceptible varieties of wheat. *Phytopathology* **20**, 637-652.