

Optimierung von Saatgutbehandlungsmitteln mit Wirkung gegen Flugbrand an Gerste und Weizen (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) unter Nutzung verbesserter Verfahren zum Nachweis der Erreger

Optimisation of seed treatments with activity against loose smut of barley and wheat (*Ustilago nuda*, *U. tritici*)

FKZ: 06OE341

Projektnehmer:

Julius Kühn-Institut (JKI)
Institut für Biologischen Pflanzenschutz
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt
Tel.: +49 6151 407-0
Fax: +49 6151 407-290
E-Mail: bi@jki.bund.de
Internet: www.jki.bund.de

FKZ: 06OE349

Projektnehmer:

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
Institut für Pflanzenphysiologie (Bio 3)
Worringerweg 1, 52074 Aachen
Tel.: +49 241 80 26650
Fax: +49 241 80 22395
E-Mail: alan.slusarenko@bio3.rwth-aachen.de
Internet: www.bio3.rwth-aachen.de/

Autoren:

Koch, E.; Slusarenko, A.; Wunderle, J.; Zink, P.; Oberlik, M.; Gebremedhin, L.

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft (BÖLN)

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Verbundprojekt

Förderkennzeichen Nr.: 06OE341 und 06OE349

Laufzeit: 01.10.2008 - 30.03.2012

Abschlussbericht:

Optimierung von Saatgutbehandlungsmitteln mit Wirkung gegen Flugbrand an Gerste und Weizen (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) unter Verwendung verbesserter Verfahren zum Nachweis der Erreger



**Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Biologischen Pflanzenschutz**
Heinrichstraße 243
64287 Darmstadt
Dr. Eckhard Koch, Jan Wunderle, Petra Zink, Marc Orlik, L.
Gebremedhin



**Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen,
Abteilung Molekulare Phytopathologie**
52056 Aachen
Prof. A. Slusarenko



Untervertrag:
**Forschung & Züchtung Dottenfelderhof (Träger: Landbauschule
Dottenfelderhof e.V.), Dottenfelderhof**
61118 Bad Vilbel
Dr. H. Spieß

Inhalt

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	4
1.1 Planung und Ablauf.....	5
1.1.1 Arbeitsfeld I: Inokulationsverfahren	5
1.1.2 Arbeitsfeld II: Bekämpfungsverfahren.....	5
1.1.3 Arbeitsfeld III: Nachweisverfahren.....	5
1.2 Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Arbeitsfeld I: Entwicklung von Inokulationsverfahren	8
2.1.1 Parzellenversuche zur Erzeugung von befallenem Saatgut für Feldversuche	8
2.1.2 Einzelblüteninokulationen (nach Poehlmann 1945).....	8
2.1.3 Embryotest.....	9
2.2 Arbeitsfeld II: Entwicklung von Bekämpfungsverfahren	10
2.2.1 Hemmteste mit Mikroorganismen.....	10
2.2.2 Hemmteste mit Pflanzenextrakten.....	11
2.2.3 Saatgutapplikation	11
2.2.4 Keimteste zur Ermittlung der Phytotoxizität.....	12
2.2.5 Wirksamkeitstests im Gewächshaus.....	12
2.2.6 Wirksamkeitstests in Kleinparzellen	13
2.3 Arbeitsfeld III: Nachweisverfahren.....	13
2.3.1 Probenahme	13
2.3.2 Mikroskopie.....	13
2.3.3 ELISA.....	16
2.3.4 PCR	17
2.3.5 Versuche zur Anwendung der Nachweisverfahren	20
3. Ergebnisse	21
3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	21
3.1.1 Ergebnisse “Arbeitsfeld I: Inokulationsverfahren“	21

3.1.1.1	Erzeugung von infiziertem Saatgut für Feldversuche	21
3.1.1.2	Einfluss der Inokulumdichte (Spritzeninokulation nach Poehlmann) auf den Befallsgrad und die Keimfähigkeit des resultierenden Saatgutes	23
3.1.2	Ergebnisse “Arbeitsfeld: Bekämpfungsverfahren“	29
3.1.2.1	<i>In vitro</i> -Hemmaktivität von Pflanzenextrakten und Mikroorganismen.....	29
3.1.2.2	Keimversuche zur Ermittlung der Phytotoxizität	31
3.1.2.3	Versuche in Kleinparzellen	33
3.1.2.4	Wirksamkeitsversuche im Gewächshaus	45
3.1.3	Ergebnisse “Arbeitsfeld Nachweisverfahren“	48
3.1.3.1	Mikroskopie.....	48
3.1.3.2	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	50
3.1.3.3	Real-time PCR.....	54
3.1.3.4	Anwendung der Nachweisverfahren	60
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	67
4.	Zusammenfassung	69
5.	Gegenüberstellung der geplanten und tatsächlich erreichten Ziele	72
6.	Literaturverzeichnis.....	73
7.	Übersicht über bisher realisierte Veröffentlichungen.....	75

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Die Flugbrände an Gerste und Weizen (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) gehören zu den Pflanzenkrankheiten, für deren Bekämpfung es im Ökoanbau noch keine effizienten, einfach anzuwendenden Verfahren gibt. Die thermische Behandlung in Wasser (Heiß- und Warmwasserbeize) ist zwar sehr effektiv, kann aber leicht die Keimfähigkeit des Saatgutes beeinträchtigen. Da sich praktisch jeder Nutzer erst selbst eine solche Anlage konstruieren muss und dieses Verfahren darüber hinaus auch eine Rücktrocknung des behandelten Saatgutes erfordert, wird es in der Praxis kaum angewendet.

Als potentiell geeignete Agenzien für die Flugbrandbekämpfung im Ökoanbau kommen Stoffe natürlicher Herkunft in Frage. Systematische Untersuchungen zum Auffinden solcher Agenzien gibt es bisher kaum. Daher sollten im vorliegenden Projekt lebende Mikroorganismen, Kulturfiltrate von Mikroorganismen und Extrakte aus Material pflanzlicher Herkunft auf ihre Eignung als Saatgutbehandlungsmittel für die Flugbrandbekämpfung in Gewächshausversuchen und im Feld überprüft werden. Darüberhinaus sollten Methoden entwickelt werden, mit denen sich die Suche nach solchen Agenzien vereinfachen und beschleunigen lässt. Hierzu zählen zum Beispiel Inokulationsverfahren, mit denen sich mit Flugbrand befallenes Saatgut für Gewächshaus- und Feldversuche effizient erzeugen lässt. Weiterhin sollten Verfahren entwickelt werden, mit denen der Befall der Pflanze schon weit vor dem Erscheinen der Brandähre erkannt werden kann. Mit solchen Verfahren sollte es möglich sein, die Wirksamkeit potentieller Saatgutbehandlungsmittel früh zu erkennen und damit die Entwicklungszeit der Behandlungsmittel und -verfahren deutlich zu verkürzen. Für die Frühdiagnose sollten einerseits mikroskopische Verfahren und andererseits ein immunologischer (ELISA) und ein molekularer (Real-time PCR) Nachweis entwickelt werden. Schließlich sollten diese Nachweisverfahren genutzt werden, um einen Gewächshaus-Frühtest zur Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln und -verfahren mit Flugbrandwirkung zu entwickeln. Die wichtigsten wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele des Projektes waren:

- Entwicklung von arbeitssparenden Methoden zur Erzeugung von befallenem Saatgut in Freilandversuchen
- Klärung des Zusammenhangs zwischen Inokulumdichte bei der Einzelblüteninokulation und der resultierenden Saatgutqualität; Auffinden von Agenzien mit Flugbrandwirkung, deren Anwendung im Ökoanbau erlaubt ist
- Ermittlung der Wirksamkeit ausgewählter Mittel gegenüber *Ustilago nuda* an Sommer- und Wintergerste, *Ustilago tritici* an Winterweizen und *Ustilago avenae* an Sommerhafer
- Untersuchung verschiedener Verfahren auf Eignung für einen frühen Nachweis des Flugbrandpilzes in der Pflanze
- Nutzung der Nachweisverfahren zur Entwicklung einer Methode, mit der die Wirksamkeit potentieller Mittel in Gewächshausversuchen überprüft werden kann.

Die Flugbrandproblematik ist damit ein bedeutsames Wachstumshemmnis für den Ökologischen Landbau und stellt ein produktionstechnisches Problem dar, für das geeignete verlust- oder risikomindernde Lösungskonzepte fehlen. Das vorliegende Projekt folgt der Zielsetzung des Bundesprogramms Ökologischer Landbau, Schwachstellen in der ökologischen Erzeugung zu überwinden, indem Methoden für die Entwicklung von Bekämpfungsmöglichkeiten für eine wichtige

Krankheit im ökologischen Getreidebau erarbeitet werden. Es trägt dazu bei, Strategien für eine ökologische Züchtung zu entwickeln und den Anbau ohne die Anwendung chemisch-synthetischer Saatgutbehandlungsmittel zu ermöglichen. Schwerpunkt des Projektes waren anwendungsorientierte Untersuchungen in einem landwirtschaftlichen Unternehmen (Dottenfelderhof). Diese wurden durch Gewächshausarbeiten und anwendungsorientierte Grundlagenarbeiten (am JKI und an der RWTH Aachen) ergänzt.

1.1 Planung und Ablauf

1.1.1 Arbeitsfeld I: Inokulationsverfahren

Geplant war zum einen die Entwicklung von Verfahren, mit denen sich mit Flugbrand befallenes Saatgut (Befall: > 5%) in Parzellenversuchen, also in größeren Mengen, erzeugen lässt. Der Infektionserfolg sollte nach der Ernte mikroskopisch anhand des Embryotestes ermittelt werden. Weiterhin war von Interesse, ob und wie sich die für die Blüteninokulation verwendete Sporendichte auf die Keimfähigkeit des Saatgutes auswirkt.

1.1.2 Arbeitsfeld II: Bekämpfungsverfahren

In Laborversuchen sollten Pflanzenextrakte und Kulturen von Mikroorganismen (Bakterien einschl. Streptomyceten sowie Pilze) auf Hemmung der Sporenkeimung untersucht werden. Ausgewählte Behandlungsmittel sollten zunächst auf mögliche negative Einflüsse auf das Keimverhalten des behandelten Saatgutes untersucht werden. Anschließend sollte in Gewächshausversuchen an hochgradig infizierter Sommergerste und / oder Sommerweizen die Wirksamkeit überprüft werden. Das dazu erforderliche Saatgut sollte beim Untervertragspartner hergestellt werden. Parallel sollten beim Untervertragspartner Feldversuche in Kleinparzellen an Sommer- und Wintergerste sowie an Winterweizen durchgeführt werden. Verschiedene Applikationsarten sollten verglichen werden. Für das letzte Jahr waren Feldversuche an verschiedenen Standorten auf größeren Flächen vorgesehen.

1.1.3 Arbeitsfeld III: Nachweisverfahren

Darüberhinaus war die Entwicklung eines Gewächshaustestes vorgesehen, mit dem sich bereits im Jugendstadium der Pflanze Saatgutbehandlungsmittel mit Wirksamkeit gegen Flugbrand erkennen lassen. Im Speziellen sollte ein effektiver und zuverlässiger Nachweis über eine lichtmikroskopische Methode, einen immunologischen Nachweis (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [ELISA]) und ein molekularbiologisches Verfahren (Real-time PCR) erarbeitet werden. Von den Nachweisverfahren sollte insbesondere die Entwicklung der Real-time PCR beim Partner RWTH Aachen, Institut für Pflanzenphysiologie, erfolgen. Die Verfahren sollten hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität miteinander verglichen werden. Darüberhinaus sollte die Praktikabilität der Durchführung exemplarisch überprüft werden.

1.2 Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Die Flugbrände des Getreides stellen im Ökoanbau ein großes Problem dar. Verschiedene Projekte des Bundesprogramms Ökologischer Landbau haben sich bereits mit Aspekten der Resistenzzüchtung gegen Flugbrände und der Flugbrandbekämpfung beschäftigt (03OE646, 02OE129, 02OE030, 03OE127/3). Was die direkte Bekämpfung, etwa durch eine Saatgutbehandlung betrifft, so ist diese insbesondere beim Gersten- und Weizenflugbrand extrem schwierig. Im Abschlussbericht des Projektes „Entwicklung und Darstellung von Strategieoptionen zur Behandlung von Saatgut im ökologischen Landbau (03OE127/3)“, in dem Saatgutbehandlungsverfahren für den Ökoanbau untersucht wurden, wird bei den schwer bekämpfbaren Krankheiten, für die noch Lösungen ausstehen, an erster Stelle der Gerstenflugbrand genannt.

Beim Gersten- und insbesondere beim Weizenflugbrand kommt ein Saatgutbefall von >10% in der Praxis nur selten vor, d.h. entsprechend hoch befallenes Saatgut steht meist nicht zur Verfügung. Für Arbeiten mit Gersten- oder Weizenflugbrand ist die Höhe des Saatgutbefalls daher ein limitierender Faktor. Inokulationsmethoden zur Herstellung von ausreichend hoch infiziertem Saatgut für Feldversuche sind kaum bekannt. In eigenen Vorversuchen konnte durch Ausspritzen von Sporensuspensionen in Wasser zum Zeitpunkt der Blüte keine deutliche Befallserhöhung erzielt werden.

Insbesondere wenn Nachweise des Pilzes in der Pflanze geführt werden sollen, wie auch bei Gewächshausversuchen zur Wirksamkeit, werden hoch infizierte Saatgutposten benötigt, denn bei einem geringen Prozentsatz infizierter Pflanzen muss der Probenumfang sehr viel höher sein als bei einem hoch infiziertem Saatgutposten. Die Herstellung ist einerseits durch die Infiltration einer Sporensuspension in die Blüte unter Vakuum möglich (Cherewick und Popp, 1945). Für dieses Verfahren wird allerdings eine spezielle Apparatur benötigt, deren Herstellung nur mit Aufwand und entsprechender Erfahrung möglich ist. Die zweite Möglichkeit ist die Einzelblüteninokulation. Hierbei wird ein Tropfen Sporensuspension oberhalb des Fruchtknotens platziert (Poehlmann 1945). Zwar ist bekannt, dass bei diesem Verfahren das Risiko einer Überinfektion besteht, die zur Bildung von Kümmerkorn führen kann. Systematische Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der zur Inokulation verwendeten Sporendichte und der Keimfähigkeit und dem Tausendkorngewicht des resultierenden Saatgutes liegen aber bisher nicht vor.

In der konventionellen Landwirtschaft ist die Bekämpfung des Flugbrandes mit chemischen Saatbeizmitteln üblich. Für den Ökoanbau ist die thermische Behandlung in Wasser (Heiß- und Wamwasserbeize) die einzige Methode zur Sanierung befallener Saatgutposten. Untersuchungen zur Bekämpfung des Flugbrandes durch eine Saatgutbehandlung mit anderen als chemisch-synthetischen Mitteln liegen kaum vor. Gelegentlich wird von solchen Mitteln berichtet. Beispielsweise ist in der älteren Literatur beschrieben, dass sich mit einer Tauchbeize in Kulturfiltraten bestimmter Actinomyceten eine völlige Befallsfreiheit von *U. nuda* und *U. tritici* erzielen ließ (Klinkowski 1953). Nach indischen Untersuchungen (Deepshikha et al. 2006) hatte das Neem-Insektizid Nimbicidine eine 100%ige Wirksamkeit gegen Weizenflugbrand. Derartige Ergebnisse stellen aber eine Ausnahme dar und es ist nicht

bekannt, ob sie überprüft wurden. Im Rahmen eines früheren Projektes wurde mit Pflanzenextrakten eine maximale Wirksamkeit von 30% beobachtet (02OE094). Im Projekt 03OE127/3 wurden mit 70% Ethanol bzw. mit dem ethanolhaltigen Mittel „Lebermoser“ gegen *U. nuda* an Wintergerste Wirkungsgrade um 60 %, an Sommergerste >90% erzielt. In späteren Versuchen konnten die Ergebnisse aber nicht uneingeschränkt reproduziert werden (Spieß, pers. Mitteilung).

Eine Befallsminderung oder Bekämpfung des Flugbrandes durch Steigerung der pflanzeigenen Abwehrkraft (Resistenzinduktion) nach Applikation entsprechender Saatgutbehandlungsmittel erscheint theoretisch möglich. Hierfür könnte unter anderem die Beobachtung sprechen, dass bei bestimmten, weniger anfälligen Sorten das Scutellum und der Embryo vom Pilz befallen werden, nach Einsetzen der Keimung der Vegetationspunkt aber befallsfrei bleibt (Popp 1951). Berichte über eine erfolgreiche Resistenzinduktion gegenüber dem Flugbrand stehen aber bisher noch aus.

Ein Nachteil für die Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln mit Wirksamkeit gegen Flugbrand ist der lange Zeitraum zwischen der Saatgutbehandlung und dem Erscheinen der Brandähre. Zur Ermittlung des Saatgutbefalls wird standardmäßig der sog. Embryotest (Morton 1991) durchgeführt. Er eignet sich aber nicht für die Bewertung der Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln. Dagegen sollte man mit Untersuchungen nach der Keimung bzw. an Jungpflanzen entscheiden können, ob sie mit dem Flugbrandpilz befallen sind, d.h. ob die Beizung wirksam war. Hierfür sind entsprechende Diagnoseverfahren notwendig.

Der mikroskopische Nachweis in Jungpflanzen wurde mehrfach geführt (Amos 1952, Malik und Batts 1960a,b). Allerdings wurden die Ergebnisse meist in Form von schematischen Zeichnungen dokumentiert, aussagekräftige fotografische Aufnahmen sind kaum vorhanden. Verschiedene Brandpilze konnten mit molekularen Methoden in der Pflanze diagnostiziert werden. Beispielsweise wiesen Banowetz (1984) und Kumar et al. (1998) den Brandpilz *Tilletia indica* unter Verwendung immunologischer Verfahren nach. Mit Hilfe eines DAS (Double antibody sandwich) -ELISA war es Eibel et al. möglich, *Tilletia caries* (Eibel et al. 2005a) und *U. nuda* bzw. *U. tritici* (Eibel et al. 2005b) in ihren Wirtspflanzen zu detektieren.

Auch DNA-basierte Verfahren wurden zum Nachweis von Brandpilzen in der Pflanze angewendet. So wurden *T. caries* und *T. controversa* in Weizenkörnern und -pflanzen mit PCR-Verfahren nachgewiesen (Josefsen and Christiansen 2002; Eibel et al. 2005a; Kochanová et al. 2004; Kellerer et al. 2006; Roberts et al. 2007; Yuan et al. 2009; Zouhar et al. 2010). Willits und Sherwood (1999) und Shen et al. (2006) verfolgten die Ausbreitung von *Ustilago hordei* bzw. *Sporisorium reilianum* in unterschiedlich resistenten Gersten- und Maissorten mit der PCR. Die grundsätzliche Möglichkeit, auch im Falle von *U. nuda* DNA aus befallenen Pflanzen zu amplifizieren wurde erstmals von Bates et al. (2001) gezeigt.

Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass die allermeisten Untersuchungen zu Nachweisverfahren rein qualitativ sind. Nur ganz vereinzelt (z.B. Verma et al. 1984) wird das Ergebnis des Nachweises mit der Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln in Beziehung gebracht.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeitsfeld I: Entwicklung von Inokulationsverfahren

2.1.1 Parzellenversuche zur Erzeugung von befallenem Saatgut für Feldversuche

In drei aufeinanderfolgenden Jahren wurden auf dem Dottenfelderhof Parzellenversuche mit verschiedenen Inokulationsverfahren durchgeführt. Die untersuchten Getreidearten waren Winterweizen (Sorte `Akteur`), Wintergerste (wechselnde Sorten) und Sommergerste (Sorten `Danuta` und `Lawina`). Von jeder Getreideart bzw. -sorte wurden 16 laufende Meter Reihe (vier Reihen á 4m oder zwei Reihen á 8 m) zum Zeitpunkt der Blüte jeweils zweimal (im Abstand von wenigen Tagen) mit den in Tab. 2.1 genannten Verfahren inokuliert.

Tab. 2.1: Übersicht über die am Dottenfelderhof geprüften Inokulationsverfahren.

Behandlung		2009	2010	2011
1	Unbehandelt	X	X	X
2	Trockene Sporen über den blühenden Ähren durch Schütteln in einem Sieb ausstäuben.	X	X	X
3	Farbspritzpistole. Es handelt sich um eine Applikation, bei der die Sporensuspension (in Wasser) mit hohem Druck versprüht wird. Dabei entsteht ein dichter Sprühnebel, und evtl. werden auch Sporen in die Blütchen gepresst.	X	X	X
4	Wie 3, aber Suspension der Sporen in einer Nährlösung*.	-	X	-
5	Verwendung einer Airbrushpistole (Badger Airbrush). Die Sporen werden mit einem Trägermaterial (Aluminiumoxyd) gemischt ausgebracht.	X	X	X
6	Wie 5, aber Zusatz von Magermilchpulver und Glukose.		X	-
7	Wie 5, aber geringere Sporenkonzentration.	X	-	-
8	Verwendung eines Handgebläses (Zerstäuber) zur Ausbringung von Pflanzenschutzmittelstäuben. Als Füllmaterial dient Talkum.	X	-	-

*Nährlösung (KM S): 10mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 0.1% Asparagin, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.5mM Ca(NO₃)₂, 0.05mg/ml Thiamin, 10mM Glucose; einstellen auf pH 6.5-7.

2.1.2 Einzelblüteninokulationen (nach Poehlmann 1945)

Einzelblüteninokulationen wurden einerseits am Dottenfelderhof zur Erzeugung von hoch infiziertem Saatgut für Gewächshausversuche durchgeführt. Andererseits erfolgten Einzelblüteninokulationen auf dem Versuchsgelände des JKI in Darmstadt (Abb. 2.1A). Zum Zeitpunkt der Blüte wurden Sporensuspensionen unterschiedlicher Konzentration mit einer Spritze unter die Spelzen appliziert (Abb. 2.1B). Nach der Abreife wurden die Körner mit dem Embryotest auf Befall untersucht. In einigen Fällen wurden Keimversuche bzw. TGK-Bestimmungen durchgeführt.



Abb. 2.1: A. Versuchsanlage mit Vogelschutznetz; B: Blüteninokulation nach Poehlmann

2.1.3 Embryotest

Von jeder Behandlung wurden mindestens 3 x 100 Körner anhand des Embryotestes auf die Gegenwart von Flugbrandmyzel im Scutellum untersucht (Abb. 2.2). Der Embryotest wurde nach dem in Tab. 2.2 dargestellten Schema durchgeführt.

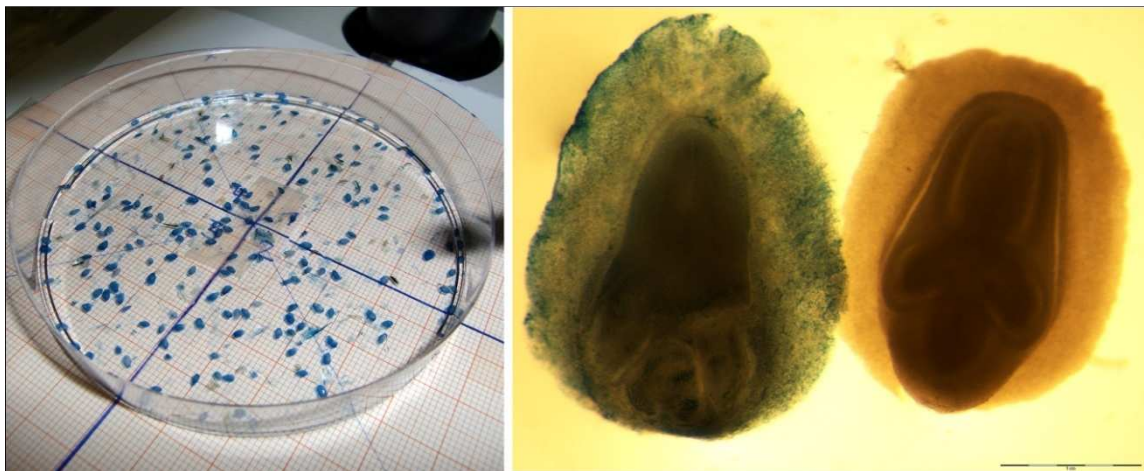
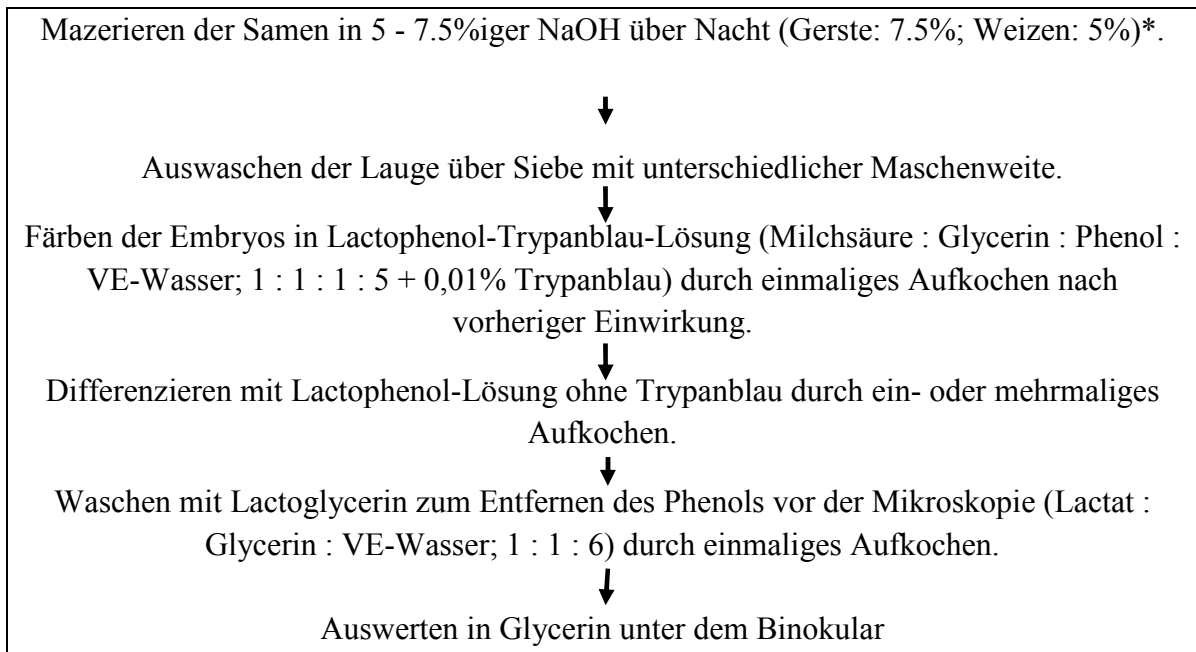


Abb. 2.2: Embryotest. Zur Auswertung unter dem Binokular vorbereitete Embryos (links) und Embryos (rechts) mit bzw. ohne Flugbrandmycel im Scutellum.

Tab. 2.2: Schema der Extraktion und Anfärbung im Embryo-Test



* Bei Weizen wurde teilweise bereits beim Mazerieren der Körner 0,01% Trypanblau hinzugefügt, um die Anfärbung zu verstärken.

2.2 Arbeitsfeld II: Entwicklung von Bekämpfungsverfahren

2.2.1 Hemmteste mit Mikroorganismen

Bei den Hemmhofstesten mit Bakterien wurden je 7 Isolate punktförmig auf eine große Petrischale (15cm) auf PDA überimpft. Nach 24stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten geöffnet und die Oberfläche Chloroformdämpfen ausgesetzt, um die gebildeten Kolonien abzutöten. Danach wurden Brandsporen von *U. nuda* auf die Petrischalen gesprüht. Nach zweitägiger Inkubation bei Raumtemperatur (Auskeimen der Sporen) wurde visuell geprüft, ob sich Hemmhöfe ausgebildet hatten. Die Hemmhofgröße wurde qualitativ bewertet.

Für die Hemmteste mit Streptomyceten wurden diese 10 Tage lang bei 30 °C in GYM (4g Glukose, 4g Hefeextrakt, 10g Malzextrakt pro Liter) auf einem Schüttler angezogen. Die filamentösen Pilze wurden in gleicher Weise bei 25 °C 5 Tage lang in Kartoffelextrakt-Glukose-Boullion (Roth) kultiviert. Anschließend wurde die Biomasse herunter zentrifugiert, der Überstand steril filtriert und vor dem Erkalten zu PDA gegeben (Endkonzentration: 10%). Als Kontrollen wurden Platten ohne Zusatz von Kulturfiltrat mitgeführt. Nach Ausgießen des Mediums wurden die Platten mit einer Sporensuspension (eine Spatelspitze *U. nuda*-Sporen in 10 ml sterilem VE-Wasser) mit einer Airbrush besprüht. Für eine bessere Auswertbarkeit wurden die Sporen so dünn aufgesprüht, dass sie auf der Petrischale möglichst einzeln zu liegen kamen. Die Auswertung erfolgte nach 24h durch Ermittlung der Keimrate (mindestens 100 Sporen) unter dem Mikroskop.

2.2.2 Hemmteste mit Pflanzenextrakten

Zur Herstellung der wässrigen Pflanzenauszüge wurden entsprechende Mengen an Pflanzenmaterial mit 50 °C heißem VE-Wasser übergossen und eine Stunde lang gerührt. Die Konzentrationen betragen 5 oder 10% (d.h. 5 g oder 10 g Pflanzenmaterial pro 100 ml VE-Wasser). Der so erhaltene Extrakt wurde durch eine Baumwollgaze gegossen und anschließend durch eine Porzellannutsche vakuumfiltriert und bei 3000 U/min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde sterilfiltriert. PDA-Medium (doppelt konzentriert) wurde nach dem Autoklavieren 1:1 mit dem Sterilfiltrat gemischt. Die Inokulation der Platten, die anschließende Inkubation sowie die Auswertung erfolgten wie oben für die Kulturfiltrate von Mikroorganismen beschrieben.

Die ethanolischen Auszüge wurden in einer Soxhlet-Apparatur hergestellt. Dazu wurden 7,5 g Pflanzenmehl mit 100 ml EtOH (96%) ca. 2 – 4 h lang in der Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend bis zur Trockne eingengt und mit 15ml Ethanol aufgenommen. Die so erhaltenen 50%igen Stamm-Extrakte wurden mit noch warmem, sterilem PDA auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Da das Gemisch einen gleichen Anteil EtOH enthielt, wurden Kontroll-Petrischalen mit den jeweiligen Ethanolanteilen mitgeführt. Die Inokulation der Platten, die anschließende Inkubation sowie die Auswertung erfolgten wie oben für die Kulturfiltrate von Mikroorganismen beschrieben.

2.2.3 Saatgutapplikation

Im Laufe des Projektes wurden verschiedene Arten der Saatgutapplikationen geprüft und angewendet. Bei Versuchen, in denen das Saatgut über einen bestimmten Zeitraum in Extrakte eingelegt wurde, wurde eine entsprechende Wasserkontrolle mitgeführt. Die Kontrollen erhielten keine Behandlung.

Mikroorganismen wurden als kommerziell erhältliche Mittel verwendet oder selbst in Schüttelkulturen (Bakterien, Streptomyceten) oder im Klein-Feststofffermenter auf Getreide angezogen (Trichoderma). Für die Applikation wurden frische oder gefriergetrocknete Kulturbrühen oder Konidiengranulate (hergestellt durch Wirbelschichttrocknung) verwendet. Die Herstellung der wässrigen und ethanolischen Pflanzenextrakte wurde bereits oben beschrieben. Weiterhin wurden getrocknete Pflanzenpulver verwendet sowie der kommerzielle Neem-Extrakt Nimbidine (flüssig).

Trockene Materialien wurden an das Saatgut gecoatet. Dazu wurde das Saatgut zunächst in Rundkolben mit wässriger Methylcelluloselösung (1-3%) vorbehandelt und anschließend mit den trockenen Materialien bestäubt oder versetzt. Extrakte von Pflanzen und Kulturen/Kulturfiltraten von Mikroorganismen (=Flüssigkeiten) wurden appliziert, indem die Körner für unterschiedlich lange Zeit in diese eingelegt wurden. Bei einer anderen Variante („Beizen“) wurde das Volumen der zu applizierenden Flüssigkeit oder Suspension so bemessen (z.B. 1ml pro 10g Saatgut), dass die Körner nach kurzzeitigem Schütteln nur

oberflächlich benetzt waren. Daneben gab es auch Kombinationen, beispielsweise zunächst „Beizen“ mit 70% EtOH, gefolgt von Applikation eines trockenen Pflanzenpulvers.



Abb. 2.3: Beispiele für gecoatetes Saatgut: *Pseudomonas* sp. IV298a (links), Rhabarberblätter (Pulver) (Mitte), Rhabarberwurzel (Pulver) (rechts)

2.2.4 Keimteste zur Ermittlung der Phytotoxizität

Insbesondere im Anfang des Projektes wurde jede im Feld geprüfte Variante zuvor auf Phytotoxizität überprüft. Jeweils 50 Körner wurden in ein Gemisch aus 1/3 Sand und 2/3 Fruhstorfer Erde Typ P ausgesät. Die Schalen wurden im Gewächshaus bei 15-20°C aufgestellt. Ausgewertet wurde nach 10 Tagen. Abhängig von der Art der im Versuch geprüften Mittel/Applikation blieb bei der Kontrolle das Saatgut gänzlich unbehandelt oder wurde unterschiedlich lange in Wasser eingelegt.

2.2.5 Wirksamkeitstests im Gewächshaus

Die Aussaat erfolgte in 18cm Töpfe (4-6 Töpfe à 15 Körner pro Variante) in ein Gemisch aus 1/3 Sand und 2/3 Fruhstorfer Erde Typ T. Sommergerste wurde nach der Aussaat direkt im Gewächshaus aufgestellt oder in einem Klimaraum bei 20 °C unter Kunstlicht kultiviert. Winterweizen wurde Ende November/ Anfang Dezember ausgesät, und die Töpfe wurden zunächst bei 15 °C aufgestellt. Nach erfolgter Keimphase wurden sie in ein nicht beheiztes Außengewächshaus gestellt, wo sie in der Regel 6 – 8 Wochen belassen wurden. Danach wurden die Pflanzen bis zum Erscheinen der Ähren im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.2.6 Wirksamkeitstests in Kleinparzellen

Die Feldversuche zur Wirksamkeit wurden am Dottenfelderhof, Gruppe Forschung & Züchtung (Bad Vilbel) durchgeführt. Außer beim Hafer wurde natürlich befallenes Saatgut verwendet, die Saatgutbehandlung erfolgte am Julius Kühn-Institut in Darmstadt. Die Versuche wurden in Kleinparzellen (8 Reihen, 1.5 x 4m) mit zwei Wiederholungen (Aussaat Herbst 2010 und Frühjahr 2011: drei Wiederholungen) angelegt. Nach dem Auflaufen erfolgte eine Bestandeszählung. Nach dem Ährenschieben wurde die Gesamtzahl der Ähren sowie die Zahl der Brandähren pro Parzelle ermittelt und der prozentuale Befall berechnet. Hafer wurde inokuliert, indem das Saatgut in Anlehnung an die Unterdruck-Inokulationsmethode von Nielsen (1976) bei -800 hPa für 10 Minuten in einer Suspension aus destilliertem Wasser und 5 g/l Flugbrandsporen belassen und anschließend an der Luft rückgetrocknet wurde.

2.3 Arbeitsfeld III: Nachweisverfahren

2.3.1 Probenahme

Die Pflanzen wurden entweder zum Entwicklungsstadium EC 12 (3-Blatt-Stadium) oder zum Entwicklungsstadium EC 31 (1-Knoten-Stadium) abgeerntet und unter fließendem Wasser von anhaftender Erde befreit. Als Probenmaterial wurde der erste Zentimeter der auswachsenden Jungpflanze oberhalb der Kornbasis abpräpariert (EC 12) bzw. Pflanzenmaterial aus dem Nodienbereich (EC 31) entnommen und auf einer analytischen Waage (Modell AE 163, Fa. Mettler) auf ein Gewicht von 20 mg zurechtgestutzt. Das Kürzen der Pflanzen zum frühen Termin erfolgte vom Apex zur Basis.

2.3.2 Mikroskopie

Die unspezifische Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor und die Immunlokalisation unter Verwendung der für den ELISA hergestellten polyklonalen Antikörper wurden mit den folgenden Protokollen durchgeführt:

Blankophoranfärbung

1. Einlegen der Nodienlängsschnitte* über Nacht in ein Gemisch aus Chloralhydrat (5 g in 2 ml Aqua dest.) und Milchsäure (90%) (1 : 1; v/v). Aufhellen des Gewebes.
2. Abwaschen mit Aqua dest. (3X).

3. Überführen der Präparate auf einen Objektträger und Zugabe jeweils eines Tropfens Blankophor (0,1% in 0,1 M Tris/HCl- Puffer; pH 9,0) für 3 Minuten, sodass die Probe bedeckt ist.
4. Mikroskopieren in DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan; 25 mg/ml in PBS Glycerin; 1 : 10) bei einer Anregungswellenlänge von 395- 440 nm.

*Nodienlängsschnitte können zum Zeitpunkt EC 30 bereits ohne Binokular mit Hilfe einer Rasierklinge hergestellt werden.

Immunlokalisation

Herst. Steedman`s wax 450 g Polyethylenglykol 400 di-Stearat bei 60°C rühren, 50 g Cetylalkohol darin lösen und anschließend 2 h bei 60°C weiterrühren.

Steedman`s wax auf mit Alufolie ausgelegtem Tablett ausgießen und über Nacht bei Raumtemperatur aushärten lassen.

Der Steedman`s wax kann nun in Stücke gebrochen und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden.

Herst. Poly-L-Lysin OTs OTs mit ETOH reinigen und in Gestell trocknen.

Auftragen von 60 µl Poly-L-Lysin, mit zweitem OT luftblasenfrei abdecken und auf Reagenzglasgestell ablegen.

OTs für 2 h in feuchter Kammer inkubieren lassen.

Anschließend werden die beiden aufeinander liegenden OTs getrennt, mit Aqua dest. abgespült und über Nacht trocknen gelassen.

Die Poly-L-Lysin OTs können bei -18°C in Präparatekästen aufbewahrt werden.

Fixierung d. Gewebes 4% p-Formaldehyd: 8 g in 200 ml 0,1% PBS pH 5 (pH muss eingestellt werden!) für 2 h in heißem Wasserbad lösen.

Gewebe in p-Formaldehyd evakuieren. Gewebestücke müssen abgesunken sein bevor damit weitergearbeitet werden kann.

In MTSB für 3 X 10 min waschen.

In PBS für 1 X 15 min waschen.

- Entwässerung d. Gewebes* Jeweils für 30 min in 30%, 50%, 70%, 90%, 96% ETOH reinst. in PBS waschen.
- In 99,9% ETOH über Nacht bei 37°C inkubieren bis das Chlorophyll vollständig entfärbt ist.
- Für 30 min in 100% ETOH waschen.
- Einbettung* Gewebestücke für 1-2 h bei 37°C in 100% ETOH/Steedman`s wax (rein) 1 : 1 inkubieren bis diese zu Boden sinken.
- Anschließend über Nacht in 100% Steedman`s wax inkubieren.
- Schneiden* Die Probenmaterial enthaltenden Blöckchen aus Steedman`s wax werden mit selbigem auf einen Halter aufgeklebt und bei Raumtemperatur erhärten gelassen.
- Bei Raumtemperatur (nicht > 20°C) werden Schnitte mit einer Schnittdicke von 8-12 µm angefertigt und als Schnitketten auf den Poly-L-Lysin beschichteten OTs gesammelt.
- Zum Strecken der Schnitketten wird 3 X Aqua dest. unter die Schnitketten pipettiert und anschließend wieder abgesaugt.
- Die Präparate werden über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen.
- Entwachsen d. Schnitte* In Waschkammern werden je acht OTs entwachst. Hierzu werden sie zunächst für je 20 min in 96% und 90% ETOH, dann für je 15 min in 70% und 50% ETOH und anschließend für 5 min in 1 X PBS und für 30 min in 1 X MTSB gewaschen.
- Waschen der OTs für 10 min in 100% Methanol in vorgekühlter (-20°C) Waschkammer.
- Es folgen drei weitere Waschschritte für 30 min in 1 X MTSB, für 3 min in 1 X PBS mit 0,1% Tween 20 und erneut für 5 min in 1 X PBS.
- Antikörperapplikation* Die OTs werden in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Präparatekästen ausgelegt.
- Die Ränder der OTs werden nun mit Fettstift (PAP-pen) nachgezogen um zu gewährleisten, dass die in Folge aufgetragenen Suspensionen nicht vom OT herunterlaufen.

Alle OT's werden für 1,5 h bei 37°C zum Blockieren mit 1% BSA in 0,1 X PBS vorinkubiert.

Auftragen von 100 µl Primärantikörpern je OT, Abdeckeln mit zweitem OT und 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank inkubieren lassen.

Antikörper mit Pipette absaugen und OT für 30 min in 1 X MTSB waschen.

Auftragen von 200 µl Sekundärantikörpern je OT und für 2 h bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

Antikörper mit Pipette absaugen (ggf. mit Filterpapier).

Waschen der Präparate für 2 X 5 min in 1 X PBS.

Auftragen von ca. 60 µl DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan; 25 mg/ml in PBS Glycerin; 1 : 10) auf die Mitte des OTs und luftblasenfrei mit großem Deckglas abdeckeln.

Lagern der Präparate bei 4°C in feuchter Kammer (über mehrere Wochen möglich).

2.3.3 ELISA

Zum Nachweis von *U. nuda* wurde ein direkter ELISA mit biotinylierten Antikörpern verwendet. Die Detektion erfolgte mit StrAP (Streptavidin-Alkalische-Phosphatase). Die Tests wurden in Mikrotiterplatten (Nunc Wiesbaden, U96 Maxisorp, transparent) an einem Reader der Firma Tecan durchgeführt. Die Protein-Extraktion bzw. der ELISA-Nachweis erfolgten nach folgenden Protokollen:

Protein-Extraktion

Überführen des Probenmaterials in mit 300 µl Extraktionspuffer (PBS + 0,05% Tween 20, 0,2% Polyvinylpyrrolidone₄₀₀₀₀) befüllte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße.

Homogenisieren der Probe für ca. 60 s mit speziellen Pistillen (Fa. VWR International GmbH, 64301 Darmstadt).

Zentrifugieren der erhaltenen Suspension für 10 min bei 30.000 g (4°C) und anschließendes sofortiges Einfrieren bei -18°C.

ELISA-Nachweis

<i>Coating</i>	Je Kavität der Mikrotiterplatte wurden 100 µl in Beschichtungspuffer verdünnte IgG (1 : 500) pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte mit einem Deckel als Verdunstungsschutz versehen.
<i>Waschen</i>	3 X 3 Minuten mit Spritzflasche (Waschpuffer) waschen.
<i>Blocken</i>	Zugabe von 0,2% BSA ¹ (Bovine Serum Albumin) in Beschichtungspuffer (100 µl/Kavität).
<i>Waschen</i>	3 X 3 Minuten mit Spritzflasche (Waschpuffer) waschen.
<i>Probenaufgabe</i>	Je Kavität werden 100 µl in Extraktionspuffer aufgearbeitete Probe, sowie das Antigen in verschiedenen Verdünnungen als Standard und reiner Extraktionspuffer als Referenz aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei 37°C.
<i>Waschen</i>	3 X 3 Minuten mit Spritzflasche (Waschpuffer) waschen.
<i>Konjugation</i>	Je Kavität werden 100 µl in Konjugatpuffer verdünnte StrAP-Lösung (1 : 7500) aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei 37°C.
<i>Waschen</i>	3 X 3 Minuten mit Spritzflasche (Waschpuffer) waschen.
<i>Enzym-Substrat</i>	Je Kavität werden 100 µl Substrat-Lösung (1 mg pNPP/ml) aufgetragen und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
<i>Messung</i>	Die Extinktion wird bei 405 nm (bei einer Referenzwellenlänge von 592 nm) nach 60 min, 90 min und 120 min gemessen.

¹ Anstelle von BSA kann auch Trockenmilchpulver verwendet werden.

2.3.4 PCR

Die PCR-Arbeiten wurden beim Projektpartner RWTH Aachen, Abteilung Molekulare Phytopathologie, durchgeführt. Es wurde ein PCR-Cycler der Firma Applied Biosystems (7300er Serie) verwendet. Die Detektion erfolgte mit SYBR-Green. Es wurden je untersuchter Probe sowohl ein Triplet an Reaktionen mit wirtsspezifischen Primern als auch ein Triplet mit pathogenspezifischen Primern untersucht. Die Ergebnisse für die Wirts-DNA dienten in diesem Zusammenhang zum einen als interner Standard, auf den später die Pathogen-DNA-Gehalte bezogen werden konnten. Zum anderen gaben sie Aufschluss darüber, wie gut die DNA-Extraktion im Einzelfall funktioniert hatte. Die DNA-Extraktion bzw. der PCR-Nachweis wurden nach folgenden Protokollen durchgeführt:

DNA-Extraktion

Probenaufschluss

Einsatz von 20 mg Pflanzenmaterial in 400 µl PL1 (Bezeichnung aller für die DNA-Extraktion verwendeten Puffer und Materialien entsprechend dem NucleoSpin Plant II, Nucleic Acid Purification Kit von Macherey und Nagel).

Homogenisierung des Pflanzenmaterials nach Zugabe von 10-15 Glaskügelchen je Probe in einem 2 ml-Rundboden-Eppi bei 1 X 20 s bei 5000 rpm (Paqlab Homogenisator, Precellys 24).

Für 3 min stehen lassen und anschließendes Herunterzentrifugieren des gebildeten Schaums für 15 s bei 11000 g.

Zugabe von 10 µl RNase A und anschließende Inkubation für 10 min bei 65°C.

Lysataufreinigung 11000 g.

Filtration in NucleoSpin Filter (violetter Ring) für 2 min bei

DNA-Bindung

Zugabe von 450 µl PC-Puffer.

DNA-Bindung in NucleoSpin Plant II Column (grüner Ring) und anschließendes Zentrifugieren für 1 min bei 11000 g.

Waschen d. Membran

Zugabe von 700 µl PW2-Puffer und anschließendes Zentrifugieren für 1 min bei 11000 g.

Zugabe von 200 µl PW2-Puffer und anschließendes Zentrifugieren für 2 min bei 11000 g.

Lösen der DNA

Zugabe von 50 µl PE-Puffer (70°C) und anschließende Inkubation für 5 min bei 70°C.

Zentrifugieren für 1 min bei 11000 g.

Aufbewahren der gewonnenen Probe für einige Tage bei 4°C bzw. für einige Monate bei -18°C.

Real-time PCR-Protokoll

Vorbereitung

Verdünnen der cDNA in Aqua dest. auf 4000 ng, 400 ng und 40 ng *U. nuda*-DNA/ml und 8000 ng, 800 ng und 80 ng *Hordeum vulgare*-DNA/ml.

Verdünnen der Primer Stammlösungen (1 : 10).

Mastermixherstellung

Ansetzen von 5,0 µl SYBR-Green Mix + 1 µl Primer + 2,0 µl Aqua dest. zu einem Gesamtvolumen von 8,0 µl.

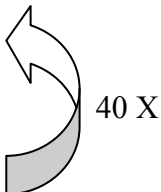
Pipetieren d. Q-PCR

Ansetzen von 2,0 µl Template + 8,0 µl Mastermix/well.

Abdeckeln der Platte mit Cover (gut festkleben!).

Aufbewahren der Platte bis zur Verwendung im Kühlschrank.

Real-time PCR-Programm

- 1.) 10' → 95°C (Denaturierung)
 - 2.) 30" → 95°C (Denaturierung)
 - 3.) 1' → 60°C (Primerhybridisierung)
 - 4.) 1' → 72°C (Elongation)*
 - 5.) 5' → 72°C (abschließende Elongation)
 - 6.) ∞ → 4°C (Aufbewahrung)
- 

* Nach Abschluss von Schritt (4) wird 39 X zurück zu Schritt (2) gesprungen → 40 Zyklen.

Tab. 2.3: Auftragsschema der Proben für die Real-time PCR. Es wurden je drei Kavitäten (à 2 µl Probe) mit 4000 ng, 400 ng und 40 ng *U. nuda*-DNA/ml und 8000 ng, 800 ng und 80 ng *H. vulgare*-DNA/ml befüllt. Drei Negativkontrollen (NK; Aqua dest.) dienen als Standard. Die restlichen 72 Kavitäten wurden mit Proben unbekannter DNA-Konzentrationen bestückt. Da mit je drei Replikaten und einem internen Standard pro Probe gearbeitet wurde, konnten auf einer Platte jeweils nur zwölf Proben ausgewertet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1300 ng/ml	1300 ng/ml	1300 ng/ml	650 ng/ml	650 ng/ml	650 ng/ml	130 ng/ml	130 ng/ml	130 ng/ml	65 ng/ml	65 ng/ml	65 ng/ml	Standard
B	13 ng/ml	13 ng/ml	13 ng/ml	LW	LW	LW	PK	PK	PK	LW (Ers.)	LW (Ers.)	LW (Ers.)	
C	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12	
D	Probe 13	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 17	Probe 18	Probe 19	Probe 20	Probe 21	Probe 22	Probe 23	Probe 24	
E	Probe 25	Probe 26	Probe 27	Probe 28	Probe 29	Probe 30	Probe 31	Probe 32	Probe 33	Probe 34	Probe 35	Probe 36	
F	Probe 37	Probe 38	Probe 39	Probe 40	Probe 41	Probe 42	Probe 43	Probe 44	Probe 45	Probe 46	Probe 47	Probe 48	
G	Probe 49	Probe 50	Probe 51	Probe 52	Probe 53	Probe 54	Probe 55	Probe 56	Probe 57	Probe 58	Probe 59	Probe 60	
H	Probe 61	Probe 62	Probe 63	Probe 64	Probe 65	Probe 66	Probe 67	Probe 68	Probe 69	Probe 70	Probe 71	Probe 72	

2.3.5 Versuche zur Anwendung der Nachweisverfahren

Saatgutbehandlung mit nichtchemischen Mitteln und Verfahren

Es wurden folgende Behandlungen durchgeführt:

H ₂ O-Kontrolle:	2 h bei Raumtemperatur quellen lassen
Heißwasserbeize:	4 h bei 25°C - 27°C vorquellen lassen 10 min bei 48°C - 50°C behandeln
Warmwasserbeize:	2 h bei 45°C
Ethanol (70%):	1 ml Ethanol (70%) auf 10 g Saatgut applizieren 10 min im Rundkolben schütteln
Rhabarberwurzel (2,5%):	5 g Rhabarberwurzelpulver in 200 ml H ₂ O für 1 h bei 50°C rühren, 2 h bei Raumtemperatur quellen lassen
Pestwurz (5%):	10 g Pestwurzpulver in 200 ml H ₂ O für 1 h bei 50°C rühren, 2 h bei Raumtemperatur quellen lassen

Nach der Behandlung wurden die Proben über Nacht unter dem Abzug in mit Rundfilterpapier (Modell 595, Schleicher & Schuell, 37586 Dassel) ausgelegten Petrischalen trocknen gelassen. Als chemische Referenz wurde eine Behandlung mit Raxil (Wirkstoff Tebuconazol) mitgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Ergebnisse "Arbeitsfeld I: Inokulationsverfahren"

3.1.1.1 Erzeugung von infiziertem Saatgut für Feldversuche

Die aus der Literatur bekannte Inokulationsmethode, bei der mit Hilfe einer Spritze eine Sporensuspension in die Blüte appliziert wird (Poehlmann 1949) ermöglicht es, hoch infiziertes Saatgut herzustellen. Da der Arbeitsaufwand hierbei allerdings sehr hoch ist, können mit dieser Methode nur geringe Mengen an infiziertem Saatgut, etwa für Gewächshausversuche, hergestellt werden. Eigene Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass selbst mehrfaches Ausspritzen von Sporensuspensionen zum Zeitpunkt der Blüte zu keiner deutlichen Erhöhung des Befallsgrades führte. Unter natürlichen Bedingungen werden trockene Sporen vom Wind auf benachbarte Pflanzen getragen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen daher Methoden, bei denen die Sporen als Stäube ausgebracht wurden. Einziges Verfahren der Ausbringung als Suspension war die Verwendung einer Farbspritzpistole. Hierbei entstehen starke Sprühnebel, und evtl. werden Sporen in die Blüten gepresst.

Die Ergebnisse der Versuche zur Erzeugung von infiziertem Saatgut für Feldversuche sind in Abb. 3.1 und 3.2 dargestellt. In der Vegetationsperiode 2008/09 wurde einmalig ein Versuch an Winterweizen 'Akteur' auch auf dem JKI-Versuchsgelände in Darmstadt durchgeführt (Abb. 3). Dabei stimmten die erhaltenen Ergebnisse mit den in mehrjährigen Versuchen am Dottenfelderhof gewonnenen (Abb. 4) gut überein.

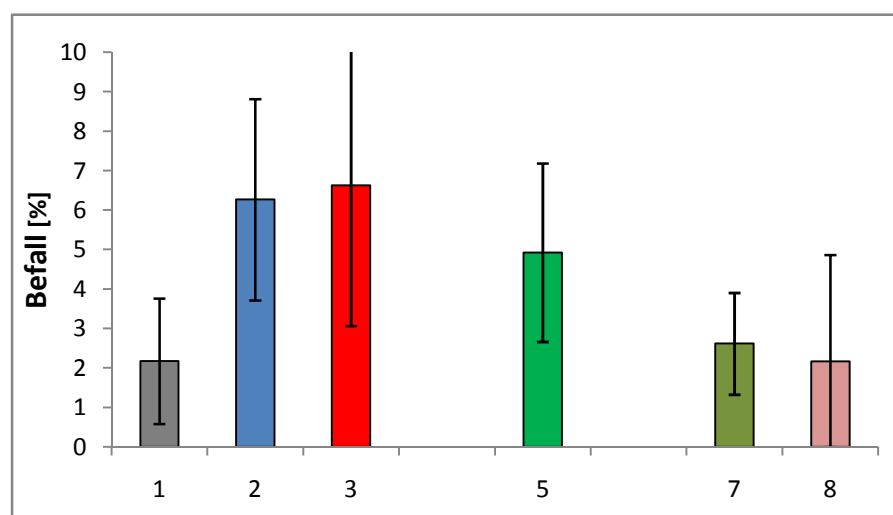


Abb. 3.1: Ergebnis des Inokulationsversuchs an Winterweizen ('Akteur') (JKI-Versuchsfläche in DA; Vegetationsperiode 2008/09) Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 x 100 Embryos. Inokulationsverfahren vergl. Tab. 2.1.

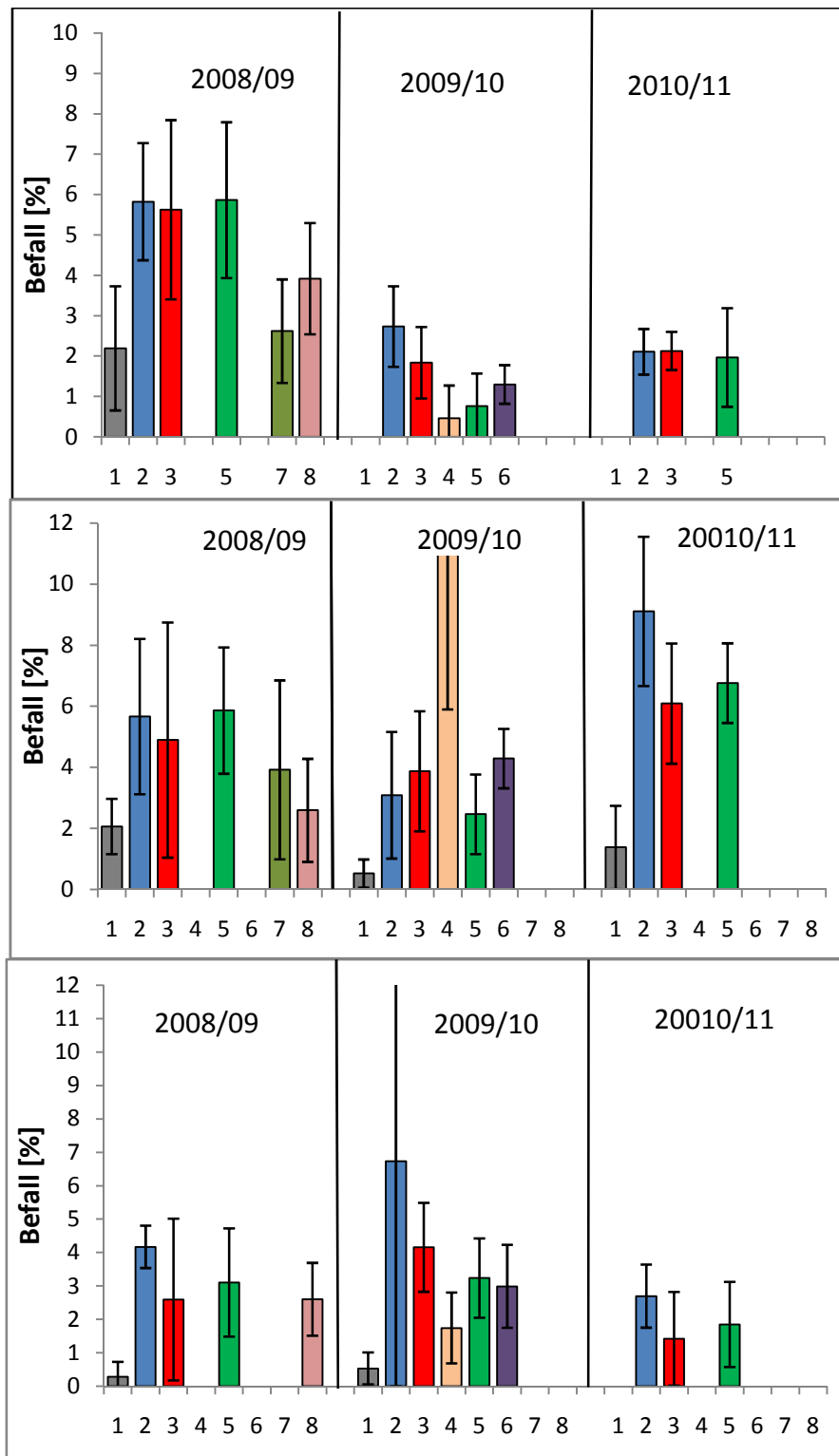


Abb. 3.2: Ergebnis der Inokulationsversuche an Winterweizen (oben), Sommergerste (Mitte) und Wintergerste (unten) am Standort Dottenfelderhof. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 x 100 Embryos pro Verfahren. Inokulationsverfahren vergl. Tab. 1.

Die meist hohe Standardabweichung der Mittelwerte (Abb. 3.1 u. 3.2) spiegelt den vergleichsweise geringen Probenumfang (Auswertung von 3 mal mindestens 100 Embryos) wider. Aufgrund des mit der Embryoextraktion und der Auswertung am Binokular verbundenen Zeitaufwandes war eine größere Probenzahl aber nicht möglich. Die durchschnittliche Befallshöhe unterlag jahresbedingten Schwankungen, die bei Weizen am stärksten ausgeprägt waren. Sofern auch in den unbehandelten Kontrollen (Verfahren 1) Befall auftrat, war dieser stets geringer als in den Behandlungen. Im ersten Versuchsjahr hatte sich eine relative Vorzüglichkeit für die Verfahren 2 (Stäuben), 3 (Ausbringung mit Farbspritzpistole) und 5 (Ausbringung mit Airbrush, hohe Sporenkonzentration) angedeutet. Darum wurden die Varianten 7 (Airbrush, geringe Sporenkonzentration) und 8 (Handgebläse) in den Folgejahren nicht mehr fortgeführt. Die in 2009/10 neu hinzugenommenen Varianten 4 (Suspension in Nährlösung, Ausbringung mit Farbspritzpistole) und 6 (Zusatz von Glucose und Magermilchpulver zu den Sporen, Ausbringung mit Airbrush) zeigten keinen generellen Vorteil und wurden in 2010/11 nicht fortgeführt. Damit liegen für die Varianten 2, 3 und 5 Ergebnisse aus drei Jahren vor. Die Ergebnisse deuten die höchste Effektivität für das Ausstäuben trockener Sporen an, gefolgt von der Ausbringung einer Sporensuspension mit der Farbspritzpistole und der Ausbringung trockener Sporen mit der Airbrush. Dabei ist der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle eindeutig. Zwischen den Behandlungen sind die Unterschiede aber nicht signifikant.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass mit den hier geprüften Verfahren der künstlichen Inokulation Saatgut mit ca. 2- 5 % Flugbrandbefall erzeugt werden kann. In Einzeljahren kann der erzielte Befall auch wenige Prozentpunkte höher sein.

3.1.1.2 Einfluss der Inokulumdichte (Spritzeninokulation nach Poehlmann) auf den Befallsgrad und die Keimfähigkeit des resultierenden Saatgutes

Der Zusammenhang zwischen Inokulumdichte bei der Spritzeninokulation und dem Flugbrandbefall des resultierenden Saatgutes wurde erstmals in einem Versuch an der Wintergerste 'Igrí' überprüft. Die Erhöhung der Sporenkonzentration führte zu einer Steigerung des Befalls (Abb. 3.3). Da parallel zu dieser Befallssteigerung ein Rückgang der Keimfähigkeit beobachtet wurde, wurde in den weiteren Versuchen auch die Keimfähigkeit berücksichtigt, teilweise auch das Tausendkorngewicht. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (Sommergerste 'Danuta' 2010, 'Maltasia' 2011) führte die Erhöhung der Sporenkonzentration zu einer mehr oder weniger linearen, deutlichen Befallserhöhung. Meist wurden Befallsgrade von >60% erreicht. Eine Ausnahme bildete die Sommergerstensorte Ingmar, die offensichtlich eine Resistenz gegen den Flugbrand aufweist. Allerdings ging der höhere Befall mit einem Rückgang der Keimfähigkeit und des Tausendkorngewichtes einher, was bei

Gewächshausversuchen, in denen solches Saatgut verwendet wird, sehr nachteilig ist. Interessanterweise war dieser Zusammenhang bei der Sommerweizensorte Eminent weitaus weniger ausgeprägt. Ähnliche Beobachtungen, d.h. durchweg gute bis sehr gute Keimfähigkeit trotz sehr hohen Saatgutbefalls mit *U. tritici*, waren zuvor mit anderen Flugbrand-infizierten Saatgutposten von Weizen gemacht worden.

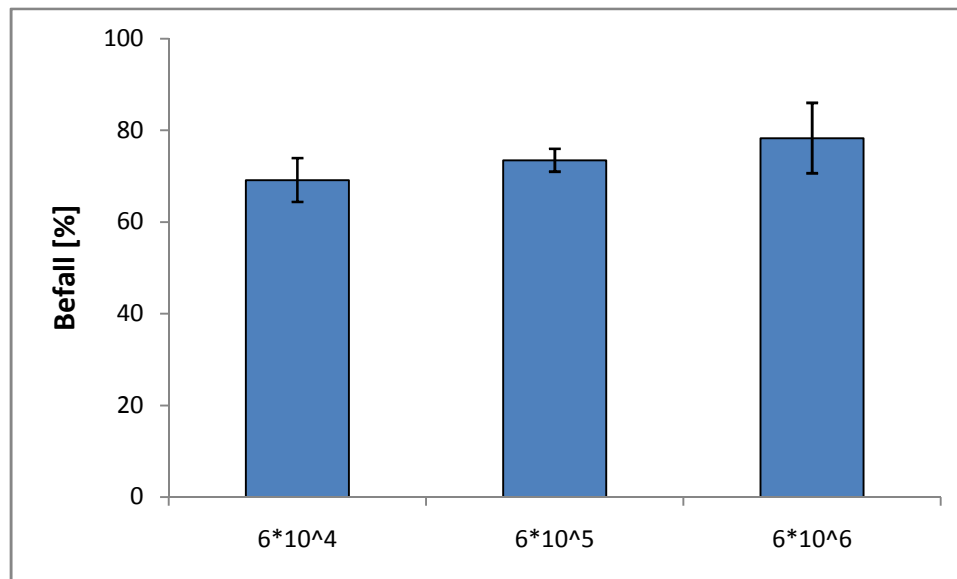


Abb. 3.3: Einfluss der Inokulumdichte mit *U. nuda*-Sporen auf den Saatgutbefall. Wintergerste 'Igri', Vegetationsperiode 2008/09.

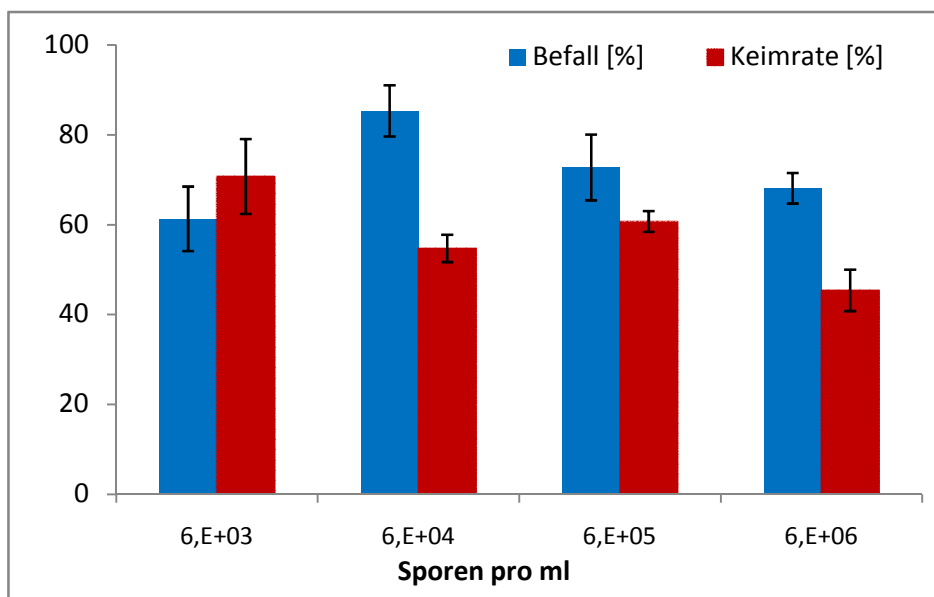
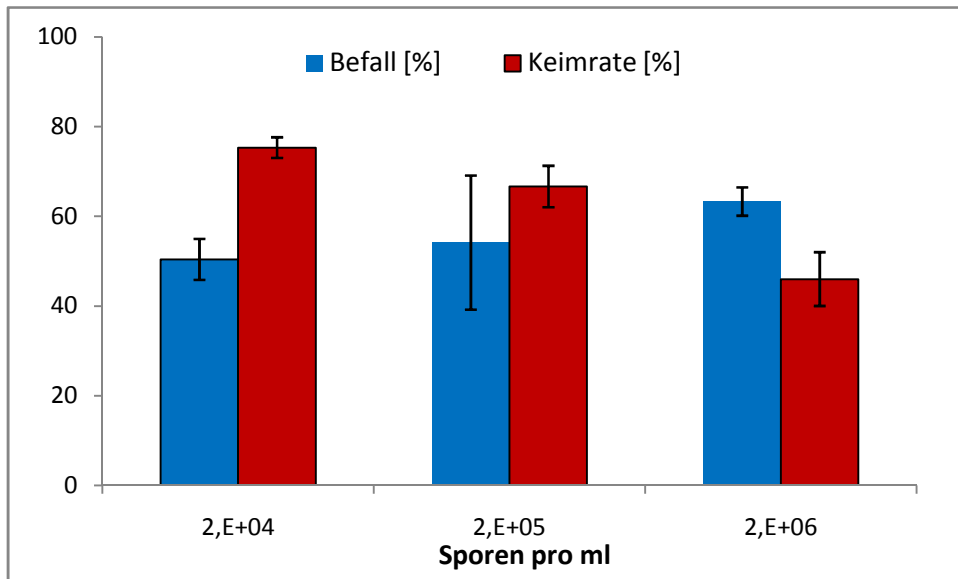


Abb. 3.4: Einfluss der Inokulumdichte mit *U. nuda*-Sporen auf den Saatgutbefall und die Keimfähigkeit. Sommergerste 'Danuta', Vegetationsperioden 2009 (oben) und 2010 (unten). Die Konzentration von 6×10^6 Sporen pro ml entspricht 100mg Sporen pro Liter.

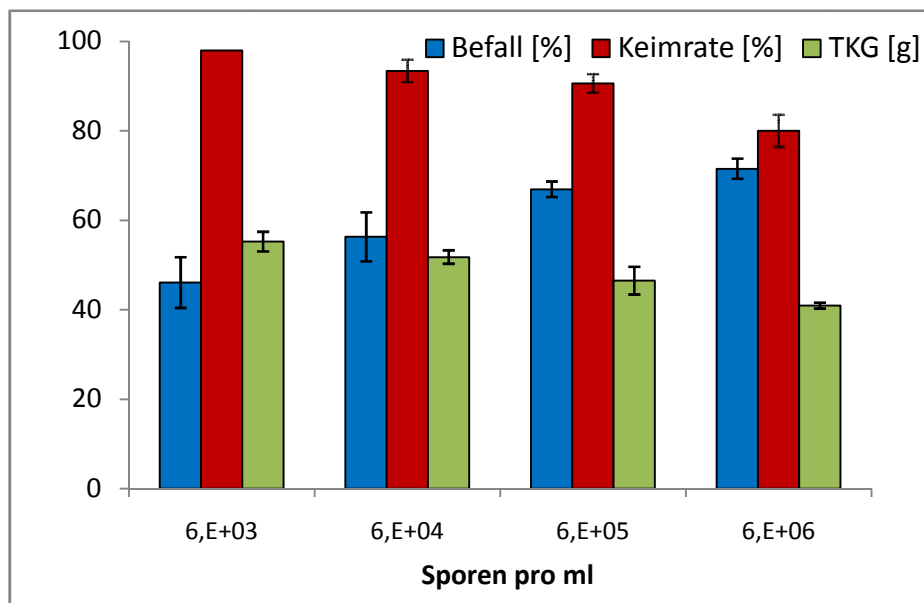
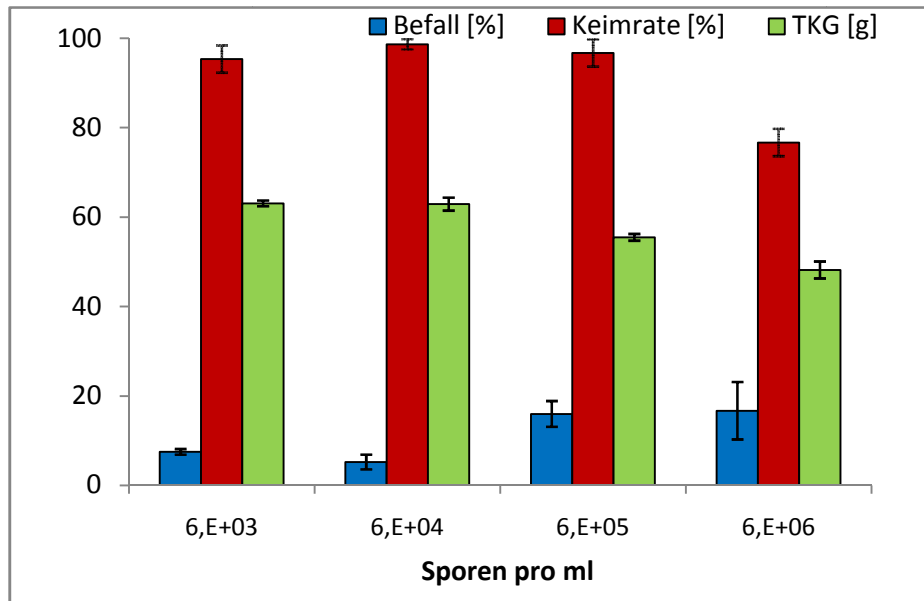


Abb. 3.5: Einfluss der Inokulumdichte mit *U. nuda*-Sporen auf den Saatgutbefall und die Keimfähigkeit. Sommergerste Ingmar (oben) und Sommergerste 'Danuta' (unten). (Vegetationsperiode 2011).

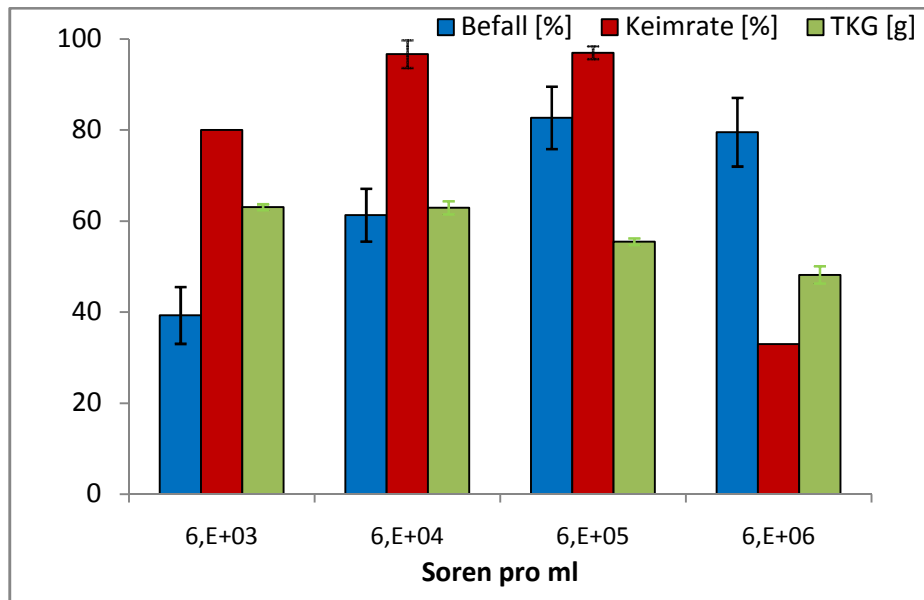
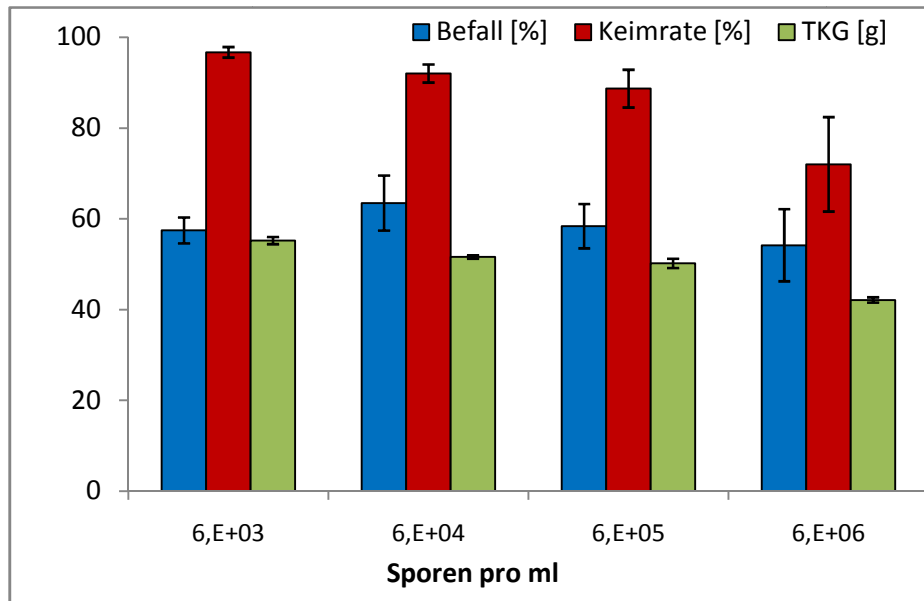


Abb. 3.6: Einfluss der Inokulumsdichte mit *U. nuda*-Sporen auf den Saatgutbefall und die Keimfähigkeit. Sommergerste 'Maltasia' (oben) und Wintergerste 'Igri' (unten). (Vegetationsperiode 2011).

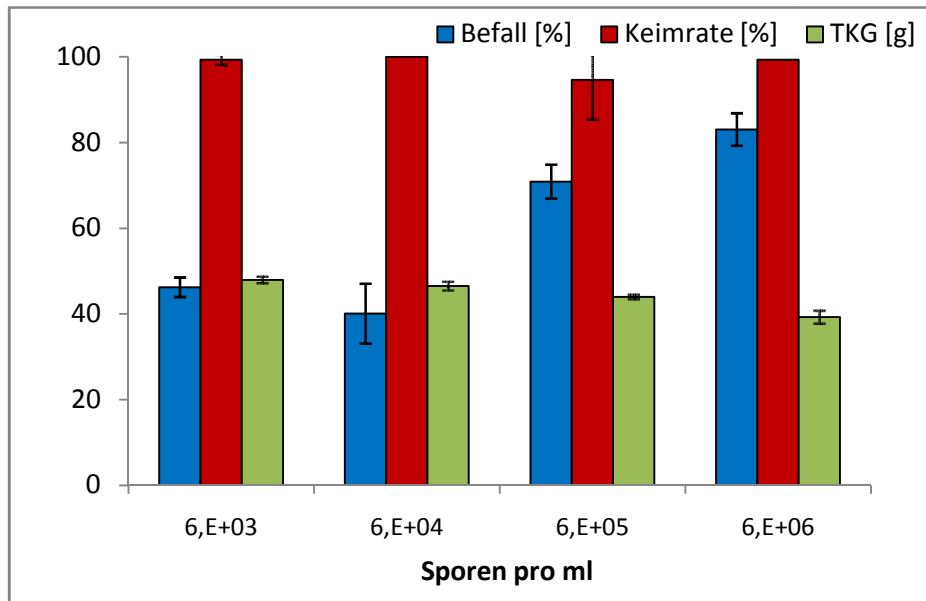


Abb. 3.7: Einfluss der Inokulumdichte mit *U. tritici*-Sporen auf den Saatgutbefall und die Keimfähigkeit. Sommerweizen Eminent, Vegetationsperiode 2011.

3.1.2 Ergebnisse “Arbeitsfeld: Bekämpfungsverfahren“

3.1.2.1 *In vitro*-Hemmaktivität von Pflanzenextrakten und Mikroorganismen

Vor den Gewächshaus- und Feldversuchen wurde mit Mikroorganismen und Pflanzenextrakten ein Screening auf *in-vitro* Wirksamkeit gegen den Flugbranderreger *U. nuda* durchgeführt. Insgesamt wurden 597 Bakterien, 69 Actinomyceten, 19 Trichoderma-Isolate, 7 weitere filamentöse Pilze sowie 40 Pflanzenextrakte (davon drei als ethanolische Auszüge) untersucht. Aussichtsreiche Kandidaten wurden im Anschluss auf eine potentiell vorhandene Phytotoxizität (Keimminderung) untersucht. Interessant für alle folgenden Versuche waren lediglich die Kandidaten, die in den Hemmtesten eine starke Wirksamkeit aufzeigten ohne einen negativen Einfluss auf die Saatgutgesundheit zu haben. Von den ca. 30 Pflanzenextrakten hatten die meisten zumindest eine partielle Wirkung auf die Sporenkeimung von *U. nuda*. Die wässrigen Auszüge (5%) von neun Pflanzenarten führten zu einer vollständigen Hemmung der Sporenkeimung (Abb. 3.8).

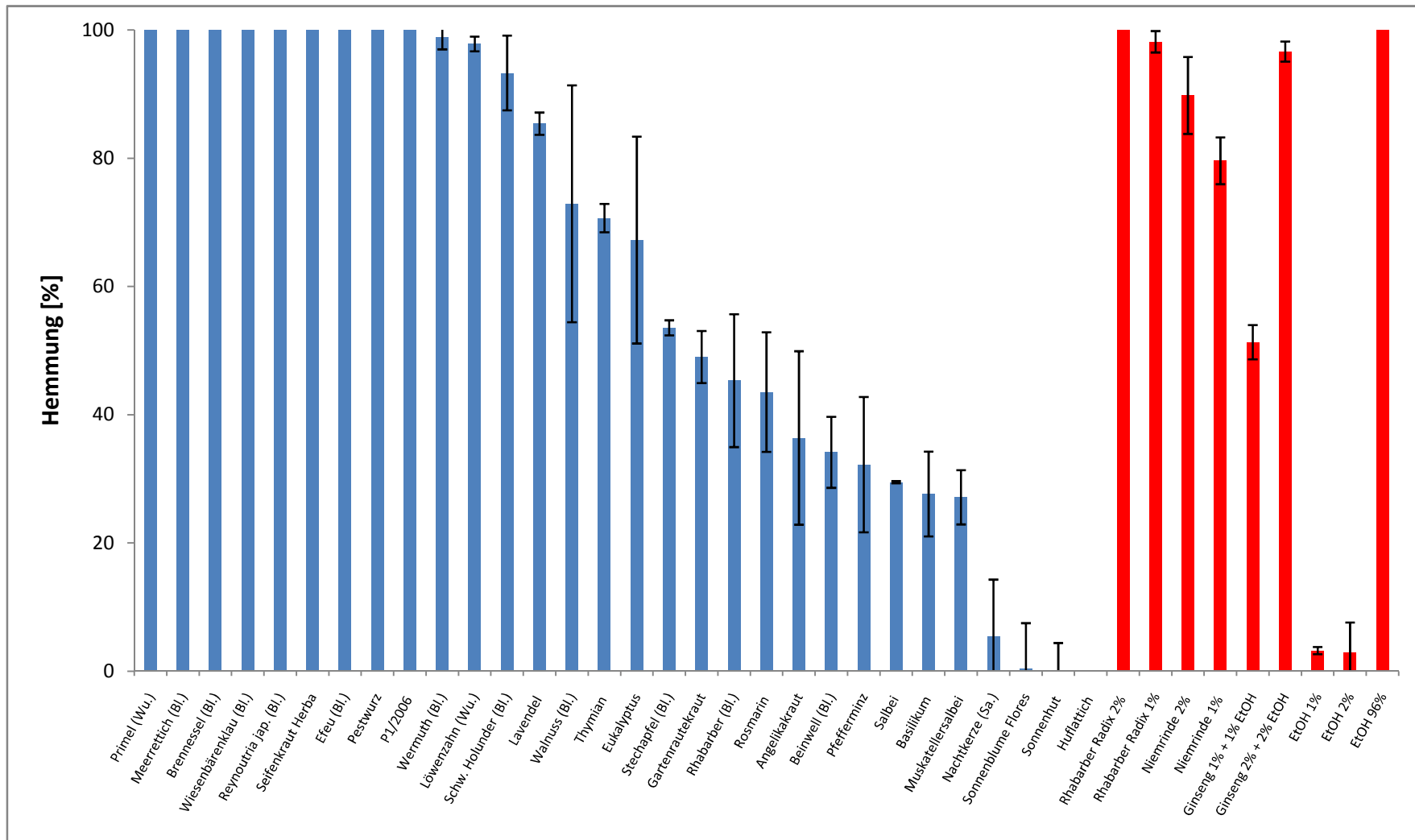


Abb. 3.8: Einfluss von Pflanzenextrakten (Wu: Wurzel, Bl.: Blätter; Sa.: Samen) auf die Keimung der Brandsporen von *U. nuda*. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 x 100 Sporen. Blau: wässrige Auszüge (5%), rot: ethanolische Extrakte.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss von Mikroorganismen auf die Sporenkeimung von *U. nuda in vitro*.

	Anzahl getesteter Isolate	Isolate mit Hemmwirkung [%]
Bakterien (außer Aktinomycceten)	597	10.6
Aktinomycceten	69	30.0
<i>Trichoderma</i> spp.	19	43.0
Andere filamentöse Pilze	7	0

3.1.2.2 Keimversuche zur Ermittlung der Phytotoxizität

Insgesamt wurden ca. 180 Behandlungsvarianten in einem Pflanzenanzuchtraum bei 15 °C auf ihren Einfluss auf die Keimung untersucht. Beispielhaft sind in Tabelle 3.2 die Ergebnisse mit Pflanzenextrakten dargestellt. Die große Mehrheit der Behandlungen hatte keinen negativen Einfluss. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bildeten die Extrakte aus Meerrettich, *R. japonica* und Rhabarberwurzel. Eindeutig phytotoxisches Potential hatte auch das Präparat Nimbicidine. Bemerkenswert ist auch, dass EtOH in der Konzentration von 50% stärker die Keimung beeinflusst als bei 70%.

Tab. 3.2: Einflusses der Saatgutbehandlung mit verschiedenen Pflanzenextrakten und dem Niem-Präparat Nimbicidine auf die Keimung von Sommergerste 'Danuta' im Gewächshaus. Mittelwert von je 3 Saatschalen à 50 Samen. (Ausnahme: Wintergerste 'Igri' siehe Tabelle).

Agens	Präparation	Keimung [relativ; unbehandelt = 100)	Standard- abweichung
Löwenzahnwurzel (5%)	Wasserauszug	90,6	5,0
Meerrettich (5%)	Wasserauszug	63,0	7,2
Schwarzer Holunder (5%)	Wasserauszug	94,2	5,0
Wermut (5%)	Wasserauszug	79,7	18,6
Brennnessel (5%)	Wasserauszug	98,6	2,3
Seifenkraut (5%)	Wasserauszug	89,9	14,7
Efeu (5%)	Wasserauszug	89,1	5,3
Primelwurzel (5%)	Wasserauszug	94,9	5,8
<i>Reynoutria japonica</i> (5%)	Wasserauszug	79,0	4,2
Primelwurzel (5%)	Wasserauszug	97,6	5,3
Beifuß (5%)	Wasserauszug	104,2	2,0
Rhabarberwurzel (2,5%)	Soxhlet-Extrakt	92,5	8,1
Rhabarberwurzel (5%)	Soxhlet-Extrakt	95,9	5,3
Rhabarberwurzel (Pulver)	Coating	83,5	4,6
Rhabarberblätter (Pulver)	Coating	97,8	1,2
Rhabarber (Blätter+Wurzel) (30%)	2 ml pro 150 Körner	100,0	2,3
Rhabarber (Blätter+Wurzel), 30%	3 ml pro 150 Körner	86,3	8,7
Rhabarber (Blätter+Wurzel), 30%	4 ml pro 150 Körner	82,0	2,0
Wiesenbärenklau Herba (Pulver)	Coating	102,7	13,3
Ginseng (2,5%)	Soxhlet-Extrakt	91,2	4,2
Ginseng (5 %)	Soxhlet-Extrakt	93,9	5,7
Nimbicidine (5%)	Feuchtbeize	84,0	2,0

Tab. 3.2: (Fortsetzung)

Nimbecidine (7,5%)	Feuchtbeize	101,0	7,6
Nimbecidine, 25%	Feuchtbeize	91,2	4,2
Nimbecidine, 50%	Feuchtbeize	32,7	7,6
Nimbecidine, 75%	Feuchtbeize	48,7	4,6
Nimbecidine, 100%	Feuchtbeize	27,4	3,1
Nimbecidine (1%)	Feuchtbeize ('Igrı')	95,5	2,3
Nimbecidine (10%)	Feuchtbeize ('Igrı')	95,5	5,0
Nimbecidine (50%)	Feuchtbeize ('Igrı')	83,5	10,6
Nimbecidine (100%)	Feuchtbeize ('Igrı')	3,0	1,2
EtOH (10%), 2h	Feuchtbeize (Igrı)	82,9	8,7
EtOH (70%) 10 min	Feuchtbeize ('Igrı')	85,3	3,5
EtOH (70%) 30 min	Feuchtbeize ('Igrı')	81,6	4,6
EtOH (50%) 10 min	Feuchtbeize ('Igrı')	76,3	8,0
EtOH (50%) 30 min	Feuchtbeize ('Igrı')	50,9	3,1

3.1.2.3 Versuche in Kleinparzellen

Da Verfahren zur Gewächshaustestung erst im Laufe des Projektes erarbeitet werden sollten, wurden die Wirksamkeitstestungen mit potentiell geeigneten Agenzien in Kleinparzellen im Freiland durchgeführt. Nur vereinzelt wurden ausgesuchte Agenzien auch im Gewächshaus untersucht.

Da die Wirksamkeit der geprüften Behandlungen in den Parzellenversuchen unbefriedigend war, wurden die für das dritte Projektjahr vorgesehenen Feldversuche in größeren Parzellen nicht durchgeführt. Stattdessen wurden weitere Versuche in Kleinparzellen durchgeführt, und im Frühjahr 2011 wurde ein Versuch mit Haferflugbrand angelegt, der so zunächst nicht vorgesehen war.

Einen Überblick über die im Rahmen des Projektes durchgeführten Prüfungen in Kleinparzellen gibt Tab.3.3. Wie daraus ersichtlich ist, wurde in beiden Versuchen mit Sommergerste nur ein Befall in den Kontrollen von < 1% erzielt. Daher wurde für die Frühjahrsaussaat im dritten Versuchsjahr statt Sommergerste Hafer verwendet, der sich künstlich inokulieren lässt. Auch im Versuch mit Winterweizen (Aussaat 2009) war der Befall sehr gering. Entsprechend war die Variabilität des Befalls innerhalb der Behandlungen sehr hoch. Die in diesen Versuchen gewonnenen Daten eignen sich damit nur für die Bewertung der Pflanzenverträglichkeit, nicht aber der Flugbrandwirkung.

Tab. 3.3: Übersicht über die im Projektzeitraum durchgeführten Kleinparzellenversuche

Aussaart	Getreideart	Anzahl Behandlungen	Befall in der Kontrolle [%]	Beste Behandlung *	Zweitbeste Behandlung *	Drittbeste Behandlung *
2008	W-Weizen	10	2,7	Rhabarber (61.8)	Rhabarber+U407 (50.4)	50% EtOH (18.4)
	W-Gerste	10	9.3	V298a (48.3)	50% EtOH (43.5)	Trichodex (35.8)
2009	S-Gerste	50	< 0.5			
	W-Gerste	20	5.9 / 3.9 *	70% EtOH (49.3)	50 % EtOH (41.9)	Rhabarberwurzel (40.8)
	W-Weizen	20	0.7 / 1.1 *			
2010	S-Gerste	50	0.9 / 0.8 *			
	W-Gerste	38	11.1 / 10.8 *	Rhabarber (39.6)	50% EtOH (38.7)	70% EtOH+Vit. (36.0)
2011	S-Hafer	38	45.2 / 45.7	70% EtOH+Bärenklau (83.6)	70% EtOH+Rhabarber (82.7)	70% EtOH (82.3)

* () = Wirksamkeit [%]

Die aussagekräftigsten Ergebnisse waren die mit Wintergerste (Aussaart 2010) und Hafer (Aussaart 2011). Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser beiden Versuche detailliert dargestellt.

Versuch mit Wintergerste, Aussaat Herbst 2010

Die Behandlungsliste (Tab. 3.4) bestand aus verschiedenen Behandlungsgruppen:

1 – 2: Kontrollen

3 – 5: Ethanolvarianten

6 – 16: Coating mit Pflanzenpulver (6-8), Mikroorganismen (9-13) oder Fertigpräp. (14-16)

17 – 26: Kombination aus Ethanol (70%) + Coatingvarianten

27 – 38: Feuchtbeizung in ethanolischen oder wässrigen Pflanzenextrakten (26-29), Kulturbrühen von Mikroorganismen (30-36) oder in einem Fertigpräparat (27), Tauchbehandlung in einem Fertigpräparat (38)

Tab 3.4: Behandlungen in den Kleinparzellenversuchen am Dottenfelderhof 2010/2011 mit Wintergerste (C: Coating; FB: Feuchtbeize; TB: Tauchbehandlung auf Schüttler).

1	Kontrolle trocken	-
2	Kontrolle Wasser, 3 h (TB)	je 210 g auf 500 ml VE-Wasser
3	EtOH (10%), 2 h (TB)	je 210 g auf 500 ml EtOH 10%-ig
4	EtOH (50%), 10 min (FB)	21 ml EtOH auf 210 g Korn (1 l Kolben), 2x
5	EtOH (70%), 10 min (FB)	21 ml EtOH auf 210 g Korn (1 l Kolben), 2x
6	Bärenklau (5%) (C)	40 ml M.C. 3%-ig, 70 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
7	Pestwurz (5%) (C)	40 ml M.C. 3%-ig, 72,5 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
8	Rhabarber (5%) (C)	42 ml M.C. 3%-ig + 50 - 100 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
9	Rhabarber (Wurzel) (5%) (C)	42 ml M.C. 3%-ig + 50 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
10	IV 298 a (C)	42 ml M.C. 1%-ig, + 80 g gefr.-getr. Pulver auf 430 g Korn
11	I 128 a (C)	42 ml M.C. 1 %-ig , 85 g gefr.-getr. Pulver auf 430 g Korn
12	Proradix (C)	21 ml M.C. 1%-ig + 3 Beutel (f. 100 ml Mittel)
13	W. Nr. 1010 (C)	M.C. 30 ml 1%-ig, 100 g gefr.-getr. Pulver auf 430 g Korn
14	Isolat 7 (C)	40 ml M.C. 3%-ig, 35 g Pulver auf 420 g Korn
15	Vitalin (C)	22 ml M.C. 1%-ig + 10 g Vitalin-Pulver auf 420 g Korn
16	Nimbecidine (25%), 10 min (FB)	42 ml 25%-iges Mittel auf 420 g Korn, 210 g Korn 21 ml M./Kolben
17	EtOH (70%), 10 min + Bärenklau (5%) (C)	40 ml M.C. 3 %-ig,70 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
18	EtOH (70%), 10 min. + Pestwurz (5%) (C)	40 ml M.C. 3 %-ig, 72,5 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
19	EtOH (70%), 10 min + Rhabarber (5%) (C)	42 ml M.C. 3%-ig + 50 - 100 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
20	EtOH (70%), 10 min. + Rhabarber (Wurzel) (5%) (C)	42 ml M.C. 3%-ig + 50 g Pflanzenpulver auf 420 g Korn
21	EtOH (70%), 10 min + IV 298 a (C)	42 ml M.C. 2%-ig, + 88 g gef.-getr. Pulver auf 430 g Korn
22	EtOH (70%), 10 min + I 128 a (C)	42 ml M.C. 1%-ig, + 96 g gef.-getr. Pulver auf 430 g Korn
23	EtOH (70%), 10 min + Proradix (C)	21 ml M.C. 1%-ig + 3 Beutel (f. 100 ml Mittel)
24	EtOH (70%), 10 min + W. Nr. 1010 (C)	M.C. 30 ml 1%-ig, 100 g gefr.-getr. Pulver auf 430 g Korn
25	EtOH (70%), 10 min + Isolat 7 (C)	40 ml M.C. 3 %-ig, 35 g Pulver auf 420 g Korn
26	EtOH (70%), 10 min + Vitalin (C)	22 ml M.C. 1%-ig + 10 g Vitalin-Pulver auf 420 g Korn
27	EtOH (70%), 10 min + Nimbecidine (C)	42 ml 25%-iges Mittel auf 420 g Korn

Tab 3.4: Forstsetzung

28	Bärenklau (5%), 3 h (TB)	5%-ig, 25 g Pflanzenpulver/500 ml, 50°C-VE-Wasser, 1 h gerührt, zentrifugiert
29	Pestwurz (5%), 3 h (TB)	5%-ig, 25 g Pflanzenpulver/500 ml, 50°C-VE-Wasser, 1 h gerührt, zentrifugiert
30	Rhabarber (5%), 3 h (TB)	5%-ig, 25 g Pflanzenpulver/500 ml, 50°C-VE-Wasser, 1 h gerührt, zentrifugiert
31	Rhabarber (Wurzel) (5%), 3 h (TB)	5%-ig, 25 g Pflanzenpulver/500 ml, 50°C-VE-Wasser, 1 h gerührt, zentrifugiert
32	IV 298 a (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
33	I 128 a (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
34	Proradix (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
35	W. Nr. 1010 (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
36	Isolat 7 (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
37	Vitalin (50%), 3 h (TB)	50%-ig, je 210 g Korn mit ca. 500 ml Kulturbrühe, Verdünnung 1 : 1
38	Nimbecidine (7,5%), 3 h (TB)	7,5%-ig, 60 ml/800 ml VE-Wasser, 210 g Korn/400 ml in Schott-Flaschen

Einige der Behandlungen hatten einen negativen Effekt auf den Feldaufgang (Abb. 3.9). Am ausgeprägtesten war dies bei den Ethanol-Varianten (50 u. 70%), Rhabarberblätter (Coating), den Nimbecidine-Varianten sowie den meisten Kombinationen mit 70% Ethanol. Nach dem Ährenschieben hatte sich diese Reduktion weitestgehend ausgewachsen (Abb. 10). Der Befall mit Flugbrand betrug in den Kontrollvarianten ca. 11% (Abb. 3.11). Die wirksamsten Varianten waren 50% EtOH, Rhabarberblätter und Rhabarberwurzel (Coating) und einige der Kombinationen mit 70% Ethanol. Einige der wirksamen Behandlungen hatten auch eine Reduzierung der Keimung bewirkt (s.o.). Es erscheint damit möglich, dass der Rückgang der Anzahl befallener Ähren zumindest teilweise darauf zurückzuführen war, dass die Keimrate der flugbrandbefallenen Körner durch die Behandlungen reduziert wurde. Für die praktische Anwendung als Saatgutbehandlungsmittel zur Sanierung flugbrandbefallener Saatgutchargen wären Wirksamkeiten von mindestens 80% zu fordern. Damit reicht im Falle von Gersten- und Weizenflugbrand die Effektivität selbst der wirksamsten im Projekt selektierten Behandlungen für die Praxis nicht aus.

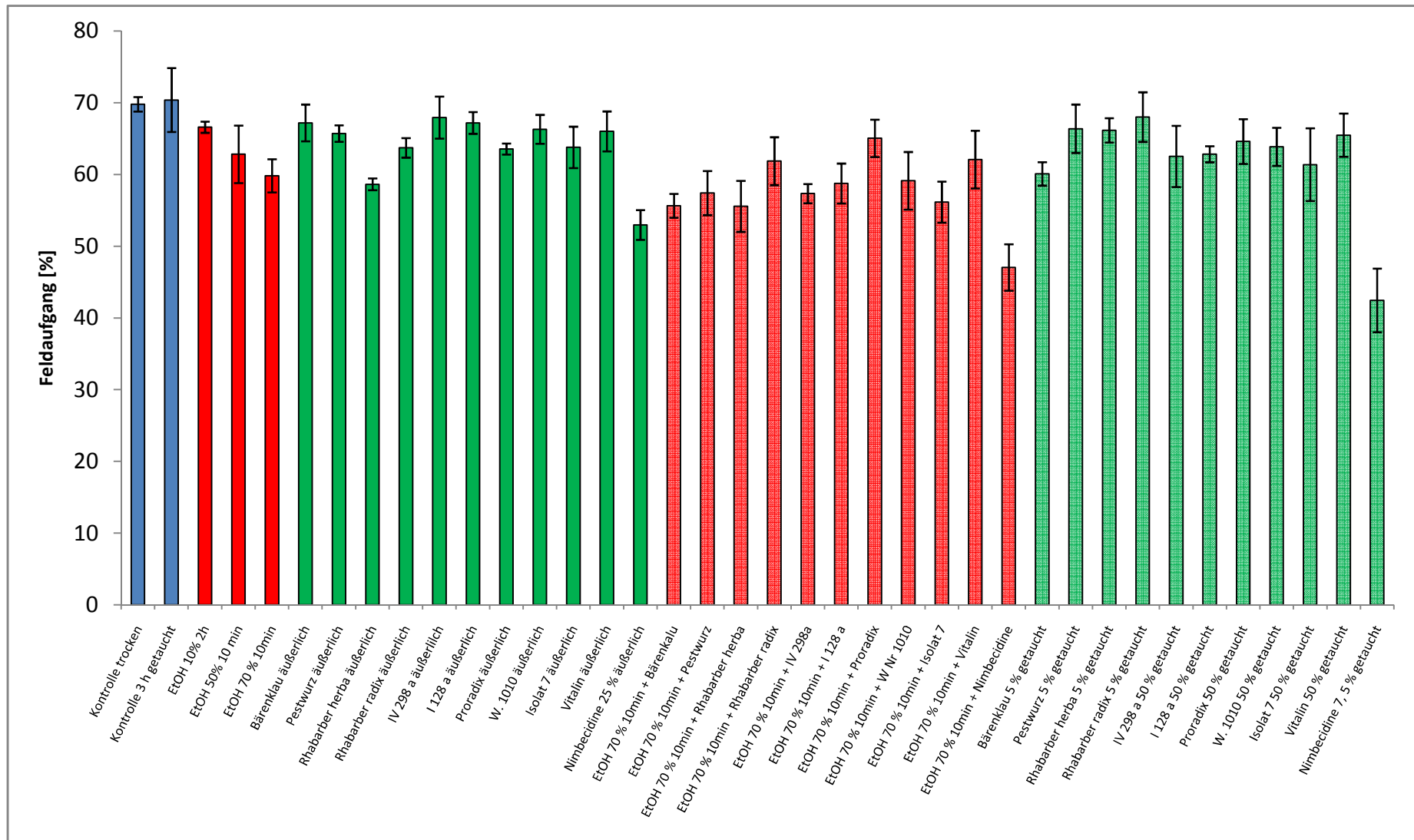


Abb. 3.9: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Auflauf von Wintergerste 'Igri' (Aussaat Herbst 2010)

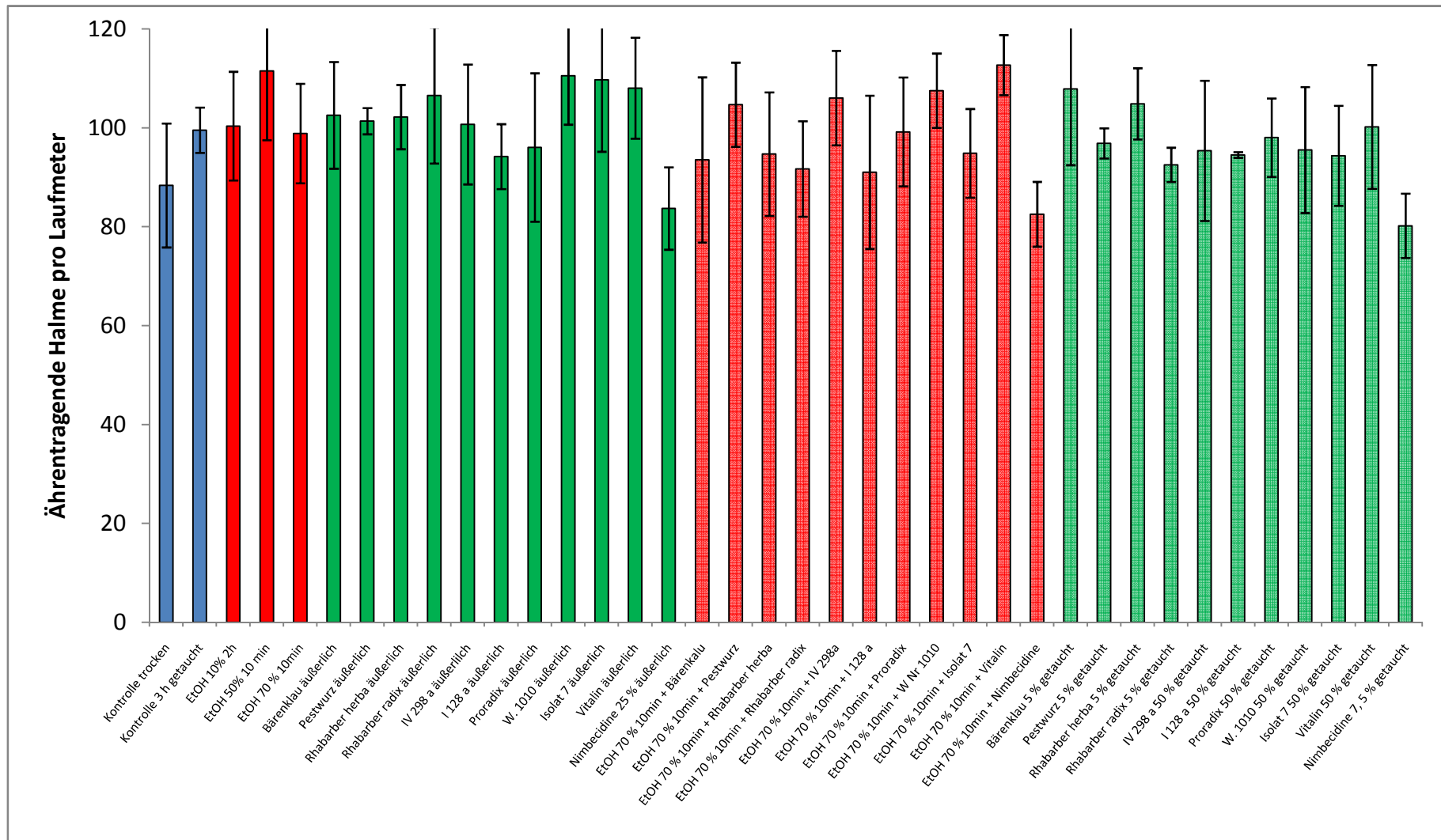


Abb. 3.10: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf die Bestandesdichte nach dem Ährenschieben bei Wintergerste 'Igrí' (Ausaat Herbst 2010)

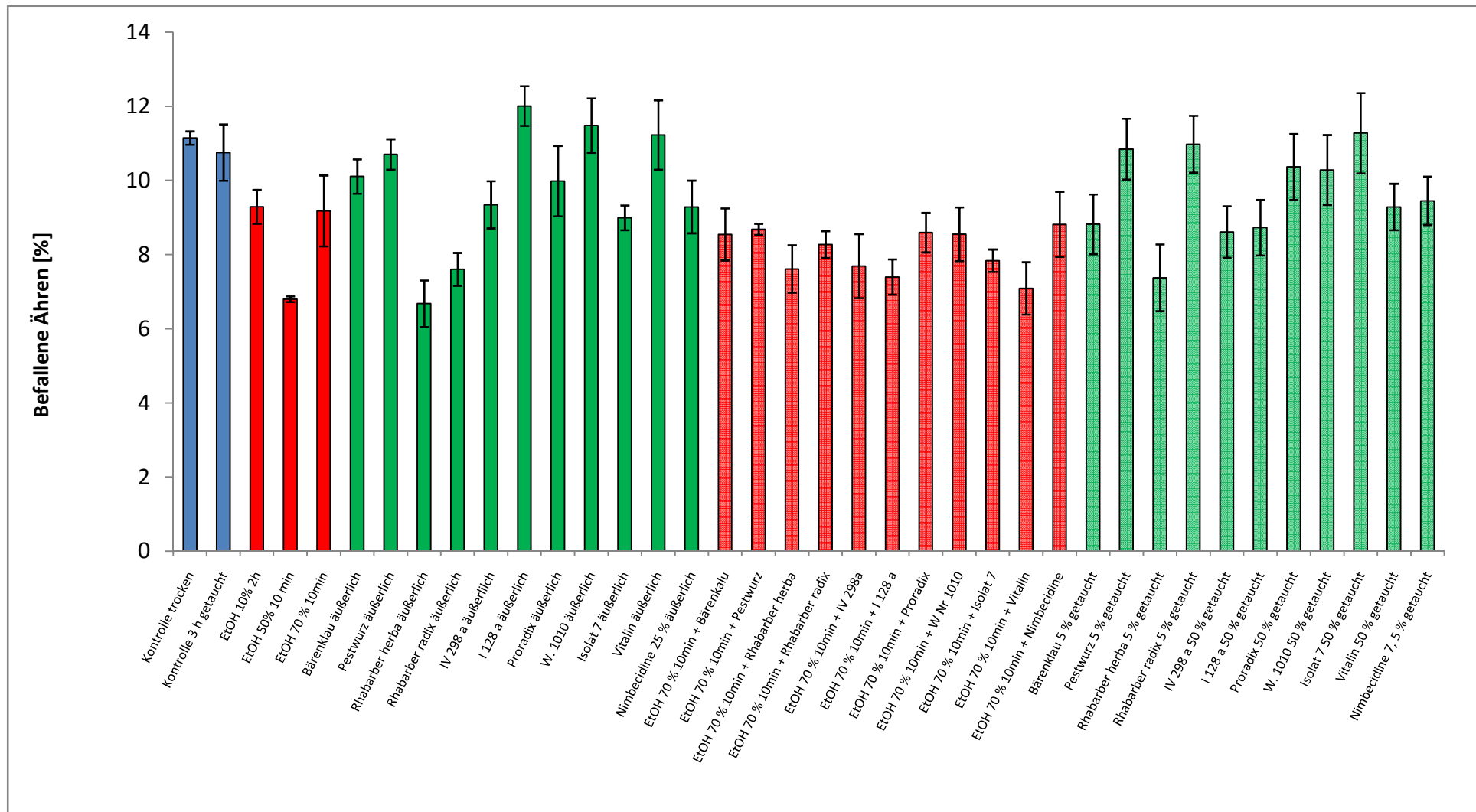


Abb. 3.11: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Flugbrandbefall von Wintergerste 'Igri' (Ausaat Herbst 2010)

Versuch mit Hafer, Aussaat Frühjahr 2011

Die Behandlungsliste (Tab. 3.5) bestand aus verschiedenen Behandlungsgruppen:

1 – 2: Kontrollen

3 – 5: Ethanolvarianten

6 – 15: Coating mit Pflanzenpulver (6-8), Mikroorganismen (9-13) oder Fertigpräparaten (14-15)

16 – 25: Kombination aus Ethanol (70%) + Coatingvarianten

26 – 38: Feuchtbeizung in ethanolischen oder wässrigen Pflanzenextrakten (26-29), Kulturbrühen von Mikroorganismen (30-36) oder in einem Fertigpräparat (27), Tauchbehandlung in einem Fertigpräparat (38)

Tab 3.5: Behandlungen in den Kleinparzellenversuchen am Dottenfelderhof 2011 mit Hafer (C: Coating; FB: Feuchtbeize; TB: Tauchbehandlung auf Schüttler).

1	Kontrolle trocken	-
2	Wasserkontrolle, 10 min	10 min mit Wasser feucht behandelt
3	EtOH (96%), 10 min (FB)	Feuchtbeizung
4	EtOH (50%) 10 min (FB)	Feuchtbeizung
5	EtOH (70%), 10 min (FB)	Feuchtbeizung
6	Bärenklau (5%) (C)	35 g Pflanzenpulver + 30 ml M.C. 3%, 201 g Korn
7	Pestwurz (5%) (C)	60 g Pflanzenpulver + 60 ml M.C. 3%, 201 g Korn
8	Rhabarber (Wurzel) (5%) (C)	25 g Pflanzenpulver + 45 ml Metylan 3%, 201 g Korn
9	IV 298 a (C)	211 g Korn, 30 ml M.C., 35 g gefr.-getr. MO-Pulver (ergibt 5,66*106/g Korn)
10	I 128 a (C)	211 g Korn, 31 ml M.C. + 41,5 g gefr.-getr. MO-Pulver (ergibt 8,16*107/g Korn)
11	Proradix (C)	211 g Korn, 31 ml M.C. + 16,5 g Prorad. fertiges Mittel (ergibt 1,63*108/g Korn)
12	W. Nr. 1010 (C)	211 g Korn+15 g gefr.-getr. MO-Pulver (ergibt 2,96*107/g Korn)
13	Isolat 7 (C)	211 g Korn, 36,74 g Sporengranulat, M.C. 2% 40 ml (ergibt 9,33*106/g Korn)
14	Vitalin (C)	9,37 g Sporen-Trockengranulat auf 211 g Korn (ergibt 1,20*108/g Korn)
15	Nimbecidine (25%) (C)	20 ml fertiges Mittel (25%ig) auf 201 g Korn, gebeizt

Tab 3.5: Fortsetzung

16	EtOH (70%), 10 min (FB)+ Bärenklau (5%) (C)	35 g Pflanzenpulver + 30 ml M.C. 3%, 201 g Korn
17	EtOH (70%), 10 min (FB) + Pestwurz (5%) (C)	60 g Pflanzenpulver + 60 ml M.C. 3%, 201 g Korn
18	EtOH (70%) 10 min (FB) + Rhabarber (Wurzel) (5%) (C)	25 g Pflanzenpulver + 45 ml Methylan 3%, 201 g Korn
19	EtOH (70%), 10 min (FB)+ IV 298 a (C)	211 g Korn, 30 ml M.C., 35 g gefr.-getr. MO-Pulver
20	EtOH (70%), 10 min (FB) + I 128 a (C)	211 g Korn, 31 ml M.C. + 41,5 g gefr.-getr. MO-Pulver
21	EtOH (70%), 10 min (FB) + Proradix (C)	211 g Korn, 30 ml M.C. + 15,7 g Prorad. fertiges Mittel
22	EtOH (70%), 10 min (FB) + W. 1010 (C)	201 g Korn+14,25 g gefr.-getr. MO-Pulver, 30 ml M.C. 1%
23	EtOH (70%), 10 min (FB) + Isolat 7 (C)	201 g Korn, 35 g Pulver, M.C. 2% 25 ml
24	EtOH (70%), 10 min (FB) + Vitalin (C)	9,37 g Sporen-Trockengranulat auf 211 g Korn
25	EtOH (70%), 10 min (FB) + Nimbecidine (25%) (FB)	20 ml fertiges Mittel 25%-ig auf 201 g Korn, gebeizt
26	Bärenklau (10%) (FB)	wässriger Auszug (10%), 20 ml, 201 g Korn
27	Pestwurz (10%) (FB)	wässriger Auszug (10%), 20 ml , 201g Korn
28	Rhabarber (Wurzel) (Soxhlet) (FB)	ethanolischer Extrakt (10%), alc. (5%), 20 ml, 201 g Korn
29	Rhabarber (Wurzel) (10%) (FB)	wässriger Auszug (10%), 20 ml, 201 g Korn
30	IV 298 a (100%) (FB)	Kulturbrühe 100%-ig
31	I 128 a (100%) (FB)	Kulturbrühe 100%-ig
32	U 407 a/1 (100%) (FB)	Kulturbrühe 100%-ig
33	Proradix (100%) (FB)	fertiges Mittel
34	W. Nr. 1010 (100%) (FB)	Kulturbrühe 100%-ig
35	Isolat 7 (100%) (FB)	Kulturbrühe 100%-ig
36	Vitalin (100%) (FB)	fertiges Mittel
37	Nimbecidine (7,5%) (FB)	fertiges Mittel, 20 ml, 201 g Korn
38	Lavendel (10%) (Soxhlet) (FB)	ethanolischer Extrakt (10%), alc. (5%), 20 ml, 201 g Korn

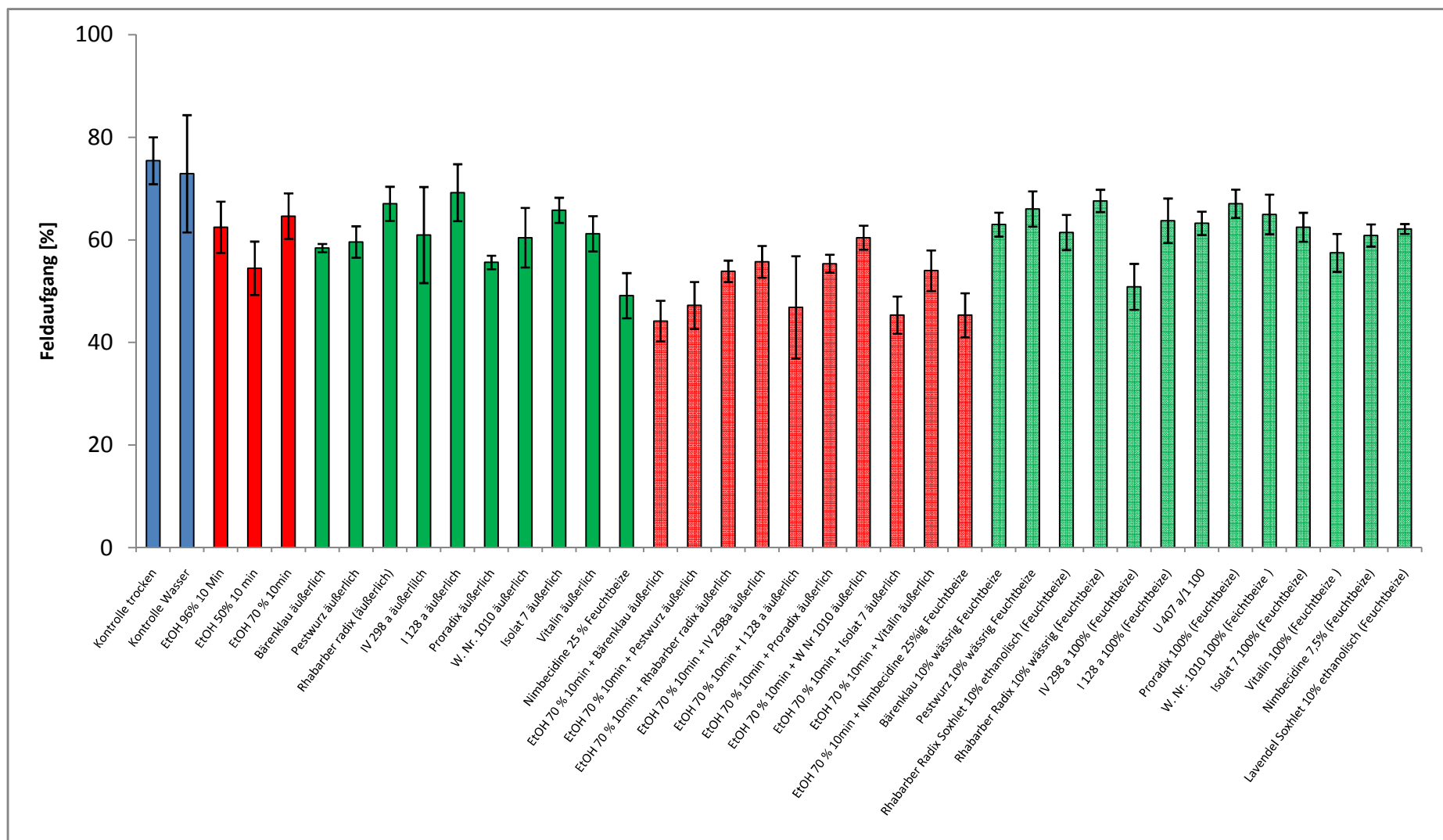


Abb. 3.12: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Aufruf von Hafer (Aussaat Frühjahr 2011)

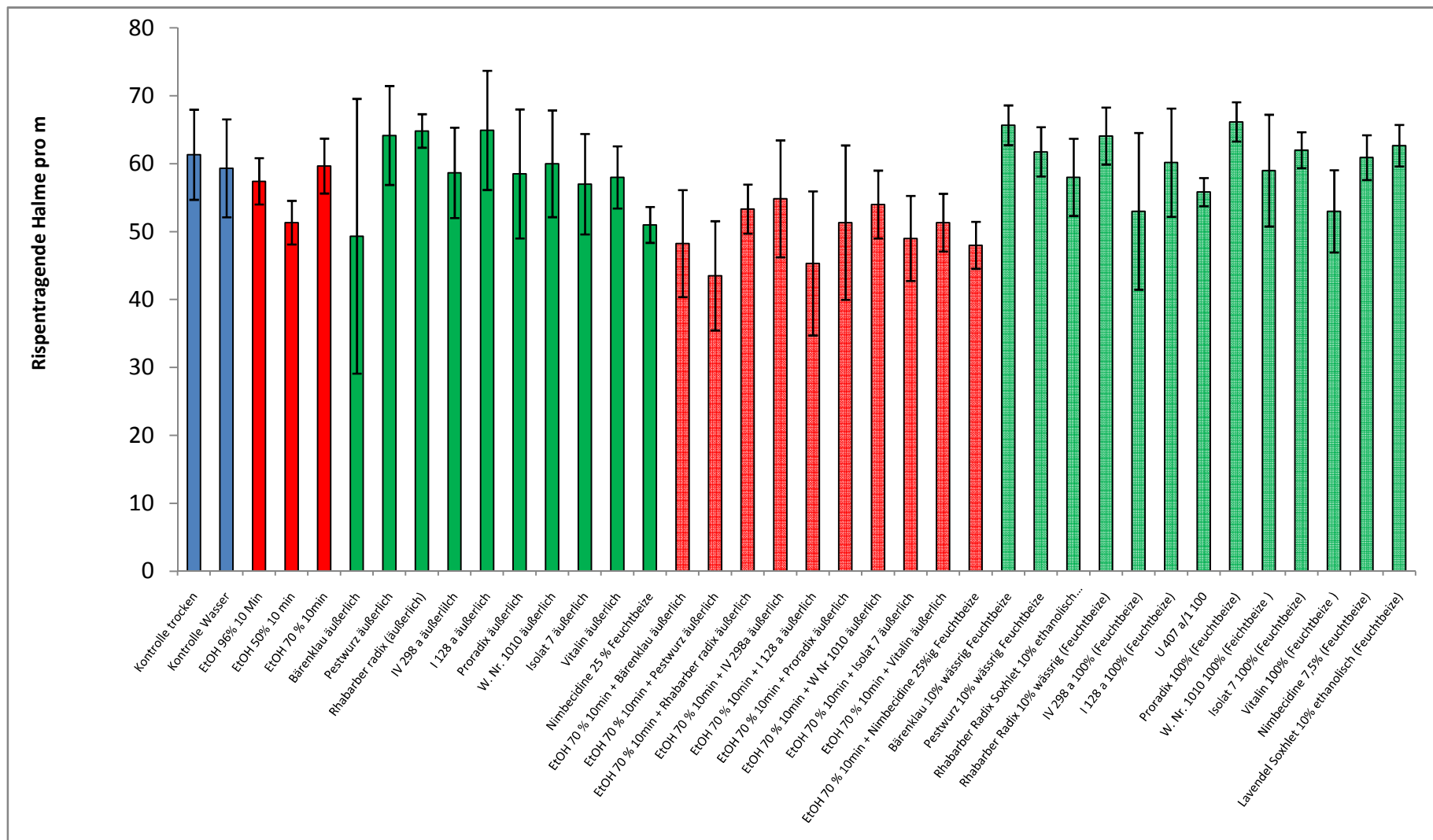


Abb. 3.13: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf die Anzahl rispen tragender Halme von Hafer (Ausaat Frühjahr 2011)

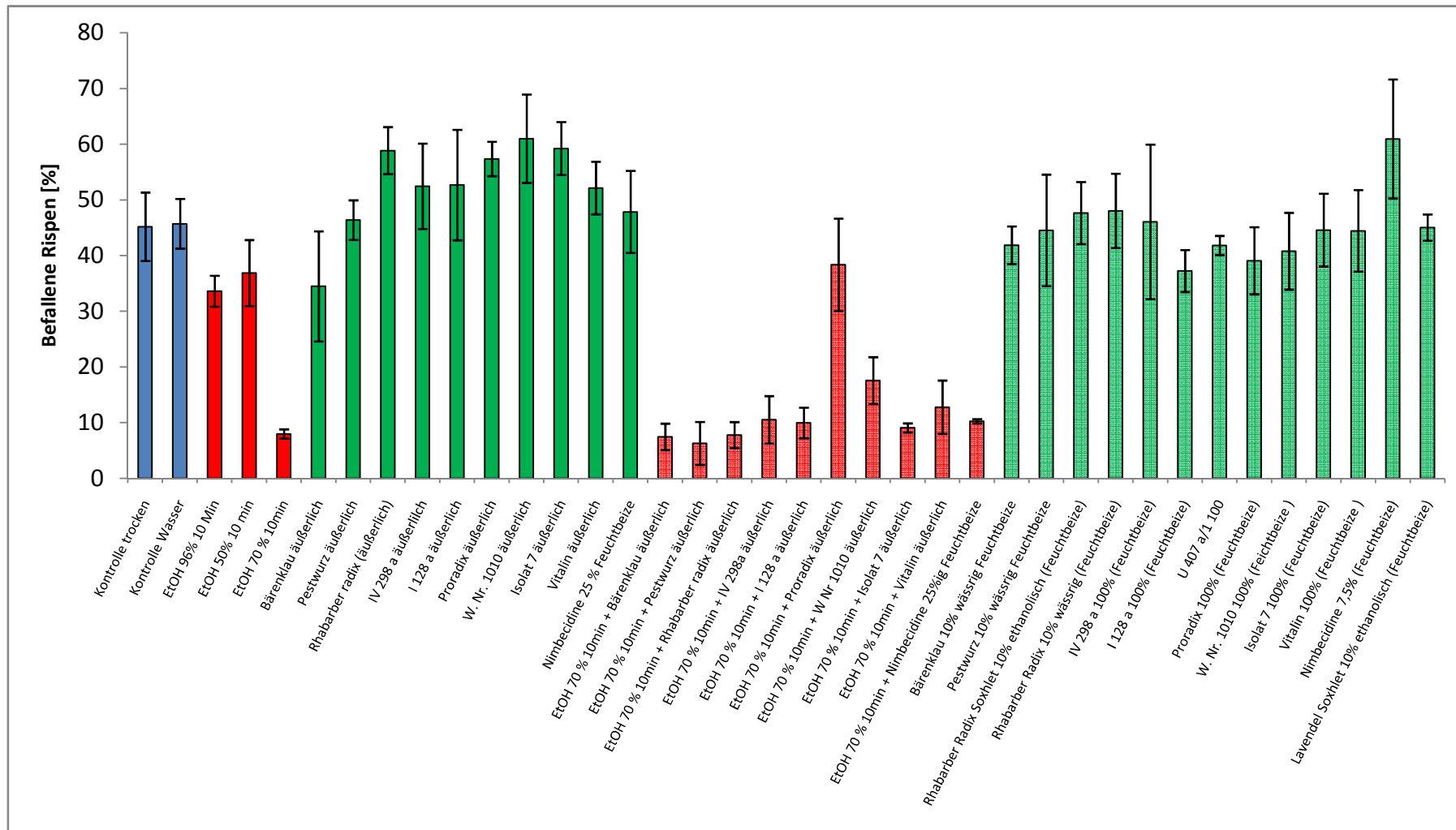


Abb. 3.14: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Flugbrandbefall von Hafer (Aussaat Frühjahr 2011)

Auch beim Hafer bewirkten die Kombinationsbehandlungen mit EtOH (70%) einen leichten Rückgang der Keimung (Abb. 3.12). Nach dem Rispenziehen hatten sich die meisten Varianten in Bezug auf die Anzahl rispentragender Halme zwar angeglichen, insbesondere bei den Kombinationsvarianten mit 70% EtOH war der negative Effekt aber noch sichtbar (Abb. 3.13). Nur die Varianten mit 70% EtOH bewirkten eine deutliche Reduzierung des Flugbrandbefalls (Wirksamkeit ca. 80%) (Abb. 3.14). Weder der 50%ige noch der 96%ige Ethanol hatte diesen Effekt. Im Fall der Kombination EtOH (70%)+Proradix war der Flugbrandbefall nicht reduziert. Dieses Ergebnis ist zunächst nicht erklärbar und bedarf der weiteren Überprüfung.

3.1.2.4 Wirksamkeitsversuche im Gewächshaus

Im Folgenden werden die Ergebnisse von zwei der insgesamt drei durchgeführten Versuche vorgestellt. Das im Versuch mit Sommergerste verwendete Saatgut hatte einen Befall laut Embryotest von ca. 40%. Aus den 15 pro Topf ausgesäten Körnern gingen in der Kontrolle im Durchschnitt 10.5 Pflanzen hervor (= 70%). Die Variabilität in der Anzahl aufgelaufener Pflanzen war bei allen Behandlungen groß (Abb. 3.15). Auch der prozentuale Befall schwankte stark. Er betrug in der Kontrolle ca. 27% und war nur nach Tebuconazol-Behandlung (Raxil) signifikant reduziert (Abb. 3.16).

Der Flugbrandbefall des im Versuch mit Winterweizen verwendeten Saatgutes betrug ...% im Embryotest. Trotz dieses hohen Befalls war die Keimfähigkeit dieser Saatgutcharge kaum beeinflusst (Abb. 3.17). Die Behandlung mit EtOH (75% u. 95%) und *Pseudomonas* sp. IV 298a führte zu einer Verringerung des Auflaufs. Wie im Versuch mit Sommergerste hatte nur die Tebuconazol-Behandlung (Raxil) eine signifikante Flugbrandwirkung (Abb. 3.18).

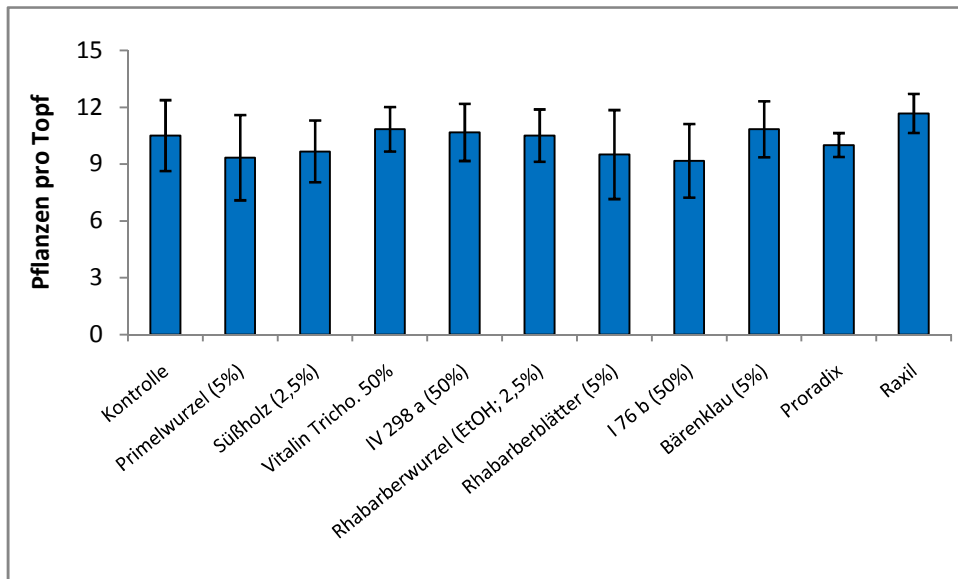


Abb. 3.15: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Auflauf von Sommergerste im Gewächshaus. Es waren 15 Körner pro Topf ausgesät worden.

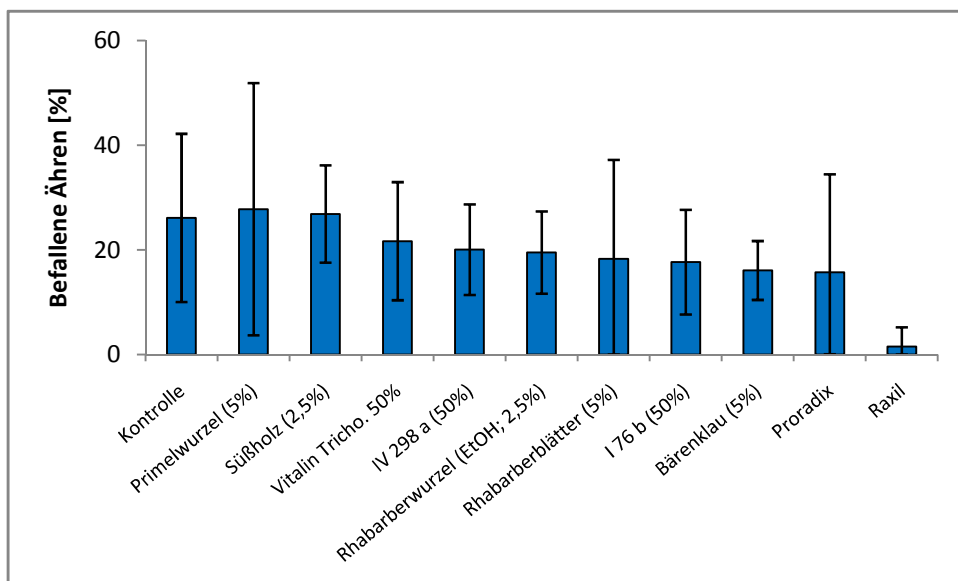


Abb. 3.16: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Flugbrandbefall von Sommergerste im Gewächshaus.

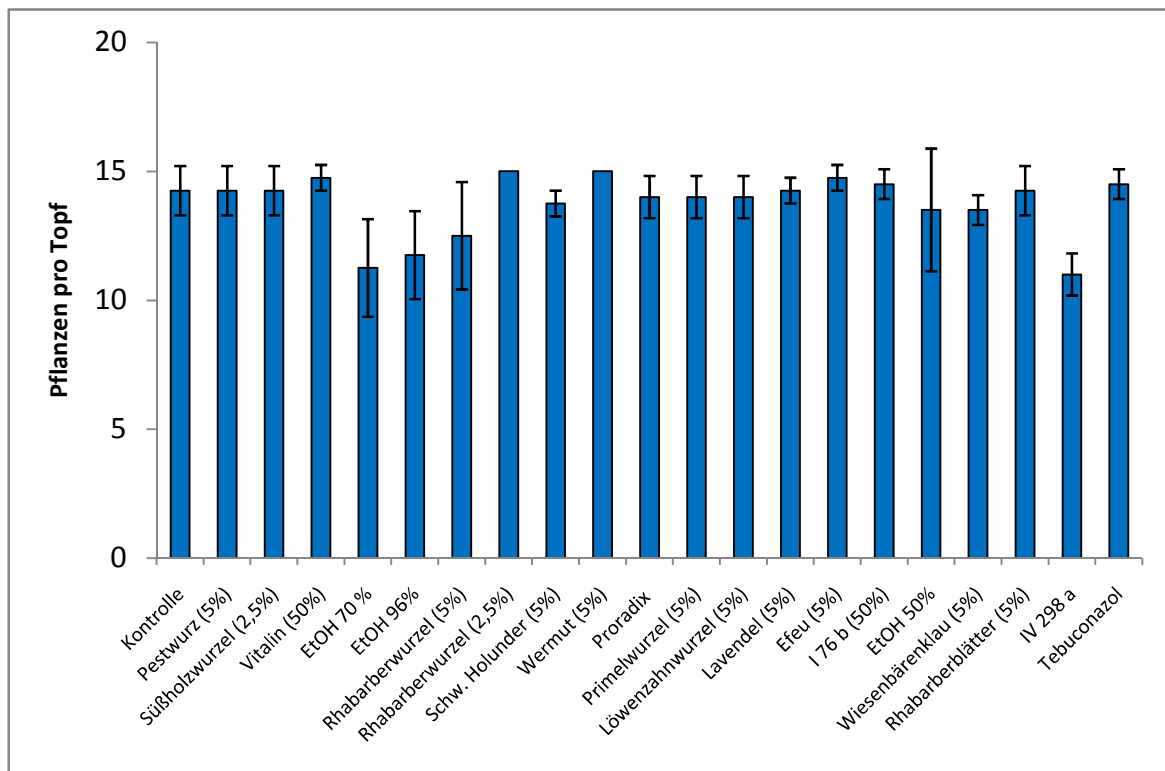


Abb. 3.17: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Auflauf von Winterweizen im Gewächshaus. Es waren 15 Körner pro Topf ausgesät worden.

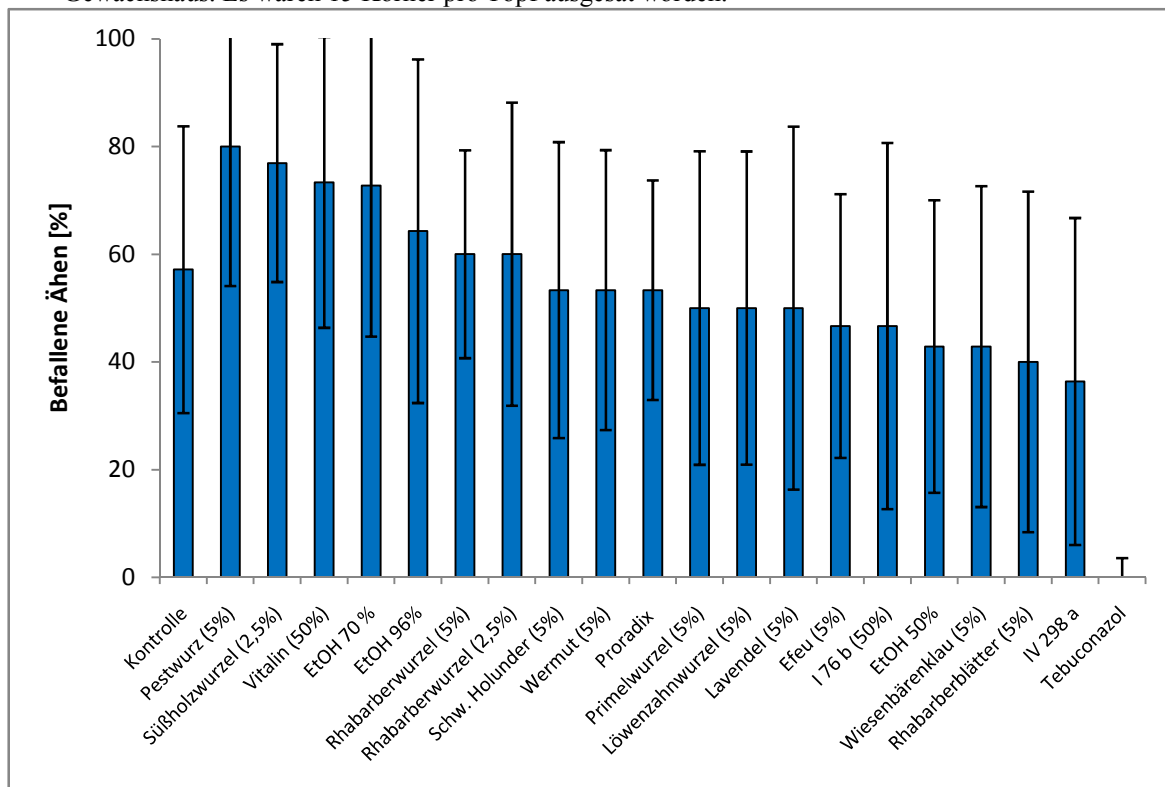


Abb. 3.18: Einfluss verschiedener Behandlungsmittel auf den Flugbrandbefall von Winterweizen im Gewächshaus.

3.1.3 Ergebnisse "Arbeitsfeld Nachweisverfahren"

3.1.3.1 Mikroskopie

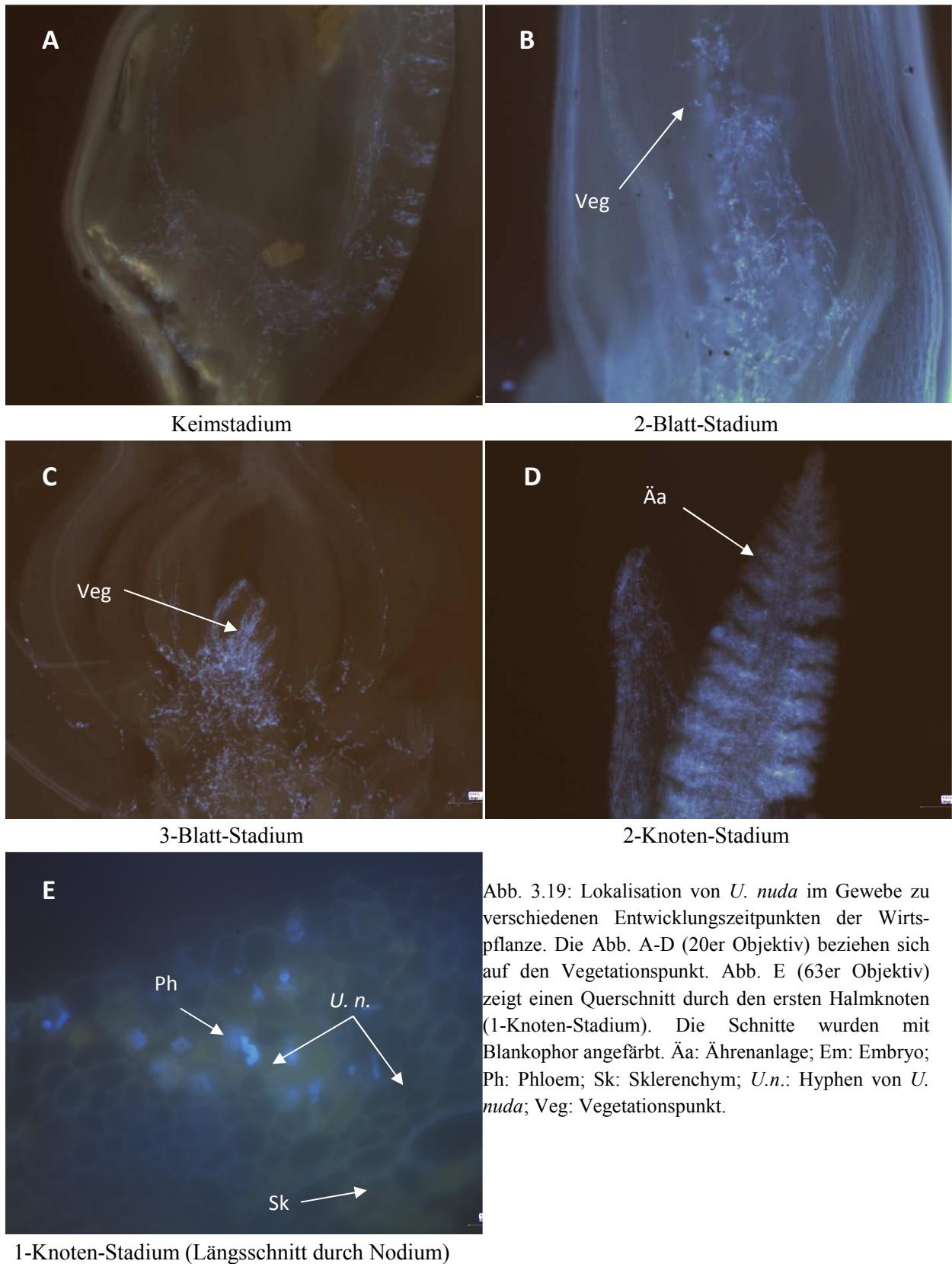


Abb. 3.19: Lokalisation von *U. nuda* im Gewebe zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten der Wirtspflanze. Die Abb. A-D (20er Objektiv) beziehen sich auf den Vegetationspunkt. Abb. E (63er Objektiv) zeigt einen Querschnitt durch den ersten Halmknoten (1-Knoten-Stadium). Die Schnitte wurden mit Blankophor angefärbt. Äa: Ährenanlage; Em: Embryo; Ph: Phloem; Sk: Sklerenchym; *U.n.*: Hyphen von *U. nuda*; Veg: Vegetationspunkt.

Die Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor ermöglichte einen sicheren Nachweis des Pilzes im Vegetationspunkt (Abb. 3.19 A-D) und den Knoten (Abb. 3.19 E). Im Wachstumsverlauf nahm die Masse an Pilzhypen in der Wirtspflanze stark zu. Am deutlichsten war diese Zunahme beim Übergang vom 3-Blatt-Stadium zum 2-Knoten-Stadium. Es konnte ebenfalls ein Einwachsen des Pilzes in die Blattanlagen beobachtet werden (Abb. 3.19 C-D). In den Nodien (Abb. 3.19 E) wuchs der Pilz praktisch ausschließlich innerhalb der Leitbündel und hier zielgerichtet apikal, parallel zu den Tracheen (nicht gezeigt).

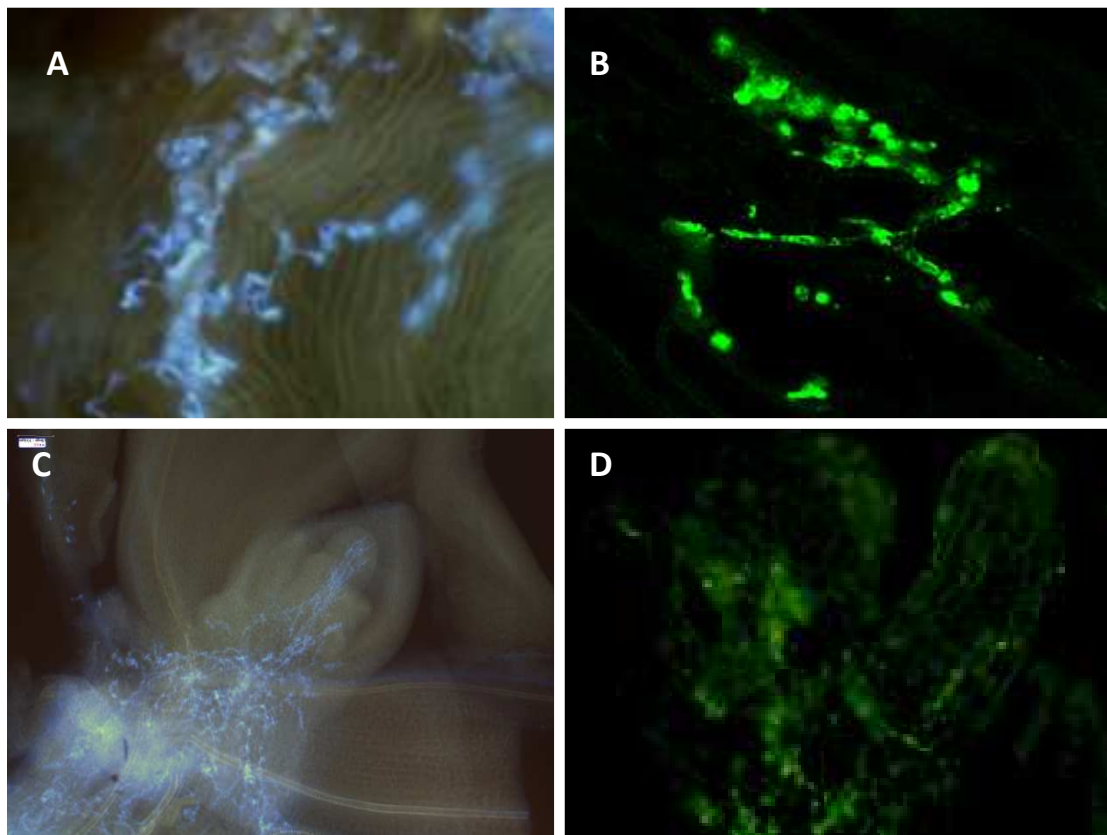


Abb. 3.20 A-D: Unspezifischer Nachweis der Pilzhypen von *U. nuda* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor (A, C) und spezifischer Nachweis durch Immunostaining mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern (B, D). A + B: Knotengewebe, C + D: Vegetationspunkt von Gerstenpflanzen zum 3-Blatt-Stadium.

Mit Hilfe der Immunlokalisation (Abb. 3.20 B und 3.20 D) war es möglich, *U. nuda*-Hyphen spezifisch im Vegetationspunkt und im Nodiengewebe anzufärben. Die Hyphen konnten in beiden Fällen nur interzellulär und nicht intrazellulär beobachtet werden. Das Wachstum des Pilzes erfolgte, wie bereits oben beschrieben, stets zielgerichtet in Richtung Apex.

3.1.3.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

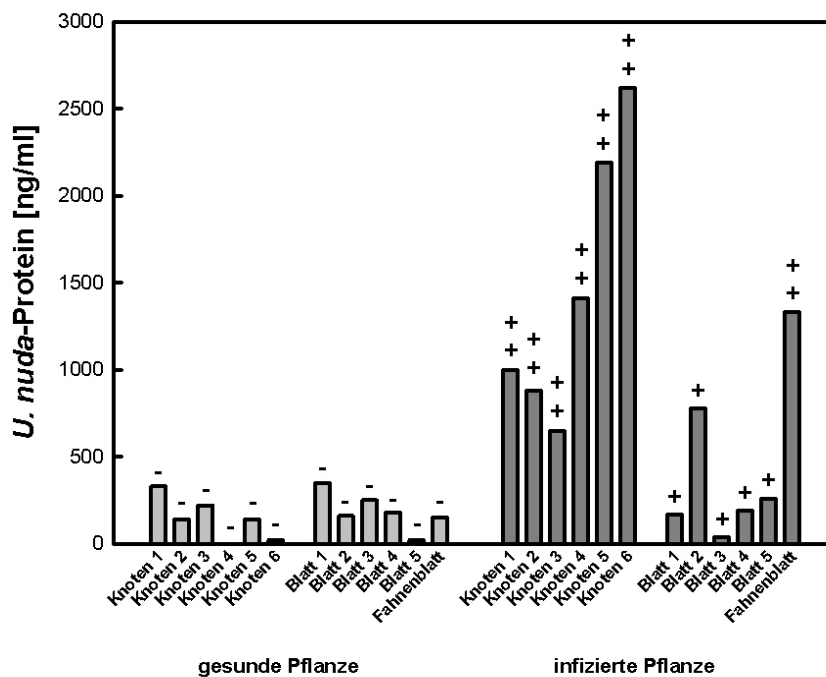


Abb. 3.21: Quantifizierung von *U. nuda*-Protein in Halmknoten und Blattspreiten (basaler Bereich) einer gesunden und einer befallenen Pflanze (= mit Brandähre) mittels ELISA (Sommergerste cv. 'Danuta'). Material aus den gleichen Pflanzenteilen wurde auch mikroskopisch untersucht (Knoten: Fluoreszenzmikroskopie nach Blankophor-Anfärbung, Blatt: Lichtmikroskopie von Blattspreiten nach Trypanblau-Anfärbung) und die vorhandene Mycelmenge visuell bonitiert (- = kein Mycel, + = wenig Mycel und ++ = viel Mycel).

In einem Versuch zur Lokalisation von *U. nuda* in der Pflanze (Abb. 3.21) konnten in Gewebeprobe der gesunden Pflanze keine deutlich erhöhten Proteingehalte (> 500 ng *U. nuda*-Protein/ml) gemessen werden. Dagegen wurden bei der kranken Pflanze in allen Knoten und in etwa der Hälfte der Blattspreiten deutlich erhöhte Gehalte festgestellt (ca. 500 - 2700 ng *U. nuda*-Protein/ml). Mit Ausnahme des zweiten und des dritten Knotens/Blattes war der Gehalt in den Halmknoten deutlich höher als in den entsprechenden Blattspreiten. Auffallend war, dass der *U. nuda*-Gehalt in den Knoten anscheinend mit zunehmender Nähe zur Brandähre zunahm. Ein solcher Zusammenhang konnte nicht für das Material von Blattspreiten beobachtet werden, obwohl auch hier der höchste Proteingehalt im Fahnenblatt gemessen wurde. Mit der Mikroskopie wurde im Falle der infizierten Pflanze in allen untersuchten Pflanzenteilen Pilzmycel gefunden [+ , ++], während bei der gesunden Pflanze alle Teile befallsfrei waren [-].

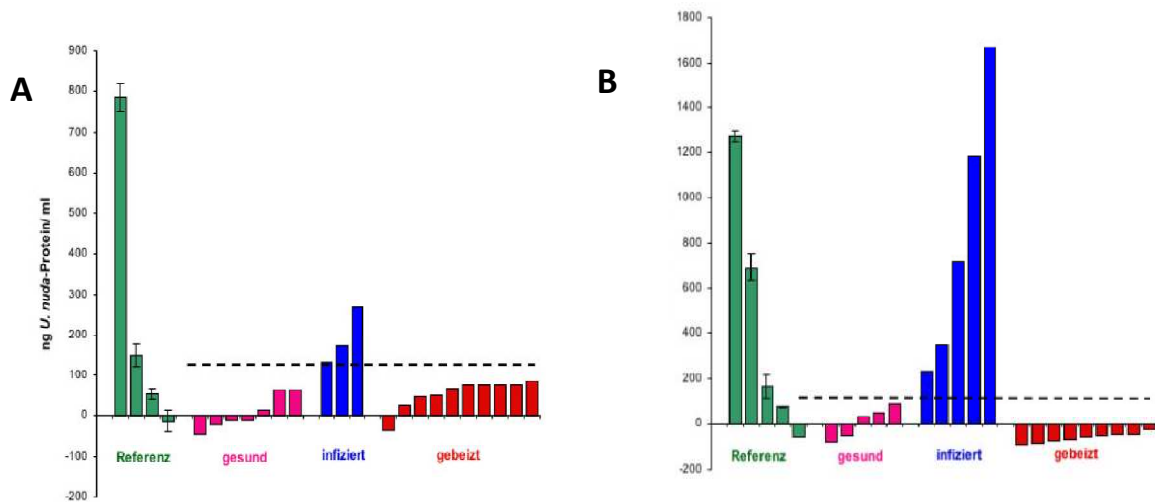


Abb. 3.22 A-B: Ergebnis eines ELISA zum 1-Blatt-Stadium (A) bzw. zum 3-Blatt-Stadium (B) mit jeweils 10 aus mit der Spritze inokuliertem Saatgut bzw. gebeizten Körnern aufgelaufenen Jungpflanzen. Basierend auf einem für diesen Versuch angenommenen Schwellenwert von 125 ng Pilzprotein/ml wurden die aus inokuliertem Saatgut hervorgegangenen Pflanzen in „gesund“ und „infiziert“ eingeteilt.

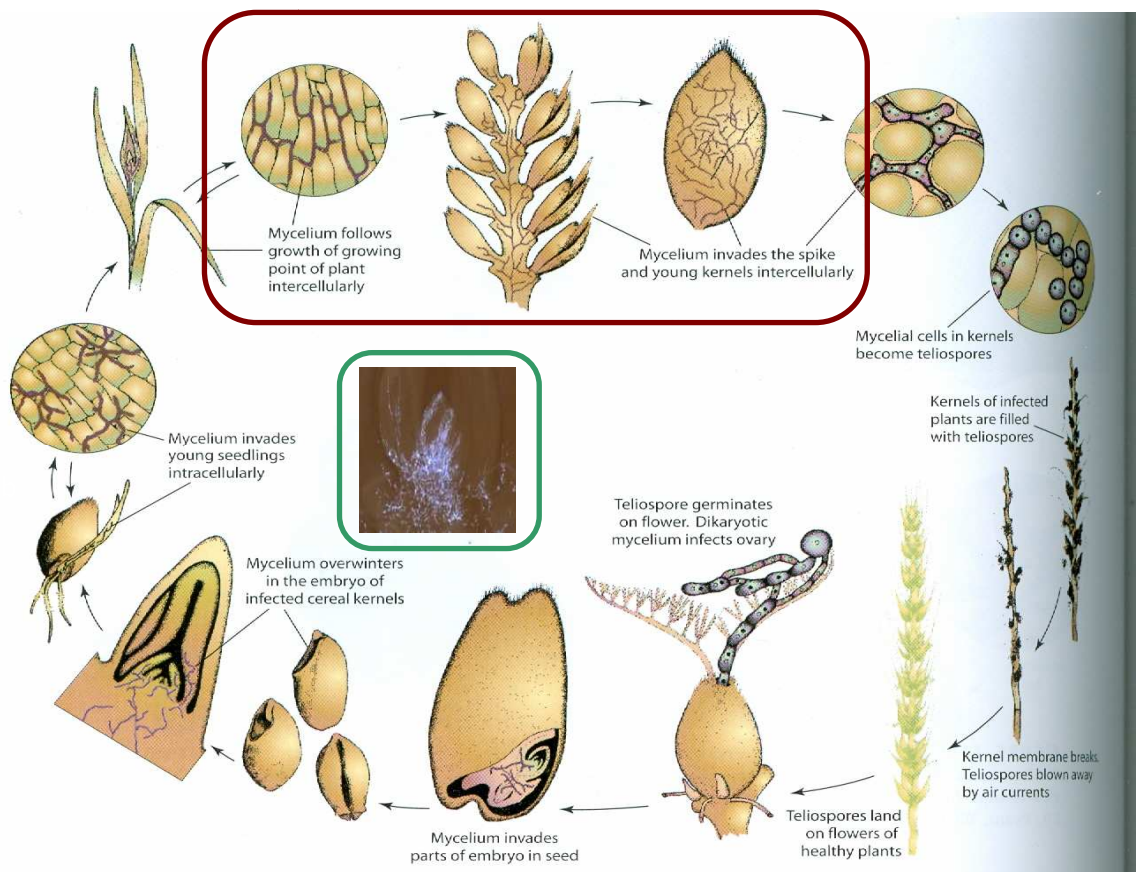


Abb. 3.23: Infektionszyklus von *Ustilago nuda* im Lehrbuch „Plant Pathology“ (Agrios 2005). Die Darstellung, wonach das Pilzmycel dem Wachstumspunkt folgt und erst in der Ähre in die jungen Körner einwächst (rote Umrahmung) trifft so nicht zu. Vielmehr wird der Vegetationspunkt schon wenige Tage nach Beginn der Keimung besiedelt (grüne Umrahmung).

Bei der Bestimmung des frühest möglichen Auswerttermins (Abb. 3.22 A 3.22 B) konnten zum 1-Blatt-Stadium (< 7 Tage nach Aussaat) in Pflanzen, angezogen aus inokuliertem Saatgut, *U. nuda*-Proteingehalte gemessen werden, die in einer Größenordnung < 300 ng/ml lagen. Diese Proteingehalte stiegen bis zur Auswertung im 3-Blatt-Stadium (> 10 Tage nach Aussaat) deutlich an. Für Pflanzen, die aus gebeiztem Saatgut aufgelaufen waren, wurden zu beiden Auswertterminen stabile *U. nuda*-Proteinkonzentrationen in einer Größenordnung bis 100 ng/ml gemessen. Somit konnten bereits zum 3-Blatt-Stadium (EC 13) erhöhte Proteingehalte im den Vegetationspunkt enthaltenden Gewebe detektiert werden (Abb 3.23, grüne Umrahmung). Nach dem Lehrbuch „Plant Pathology“ sollte ein Einwachsen des Pilzes jedoch erst zu einem viel späteren Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung stattfinden (Abb. 3.23). Zu diesem Termin kann nach unseren Beobachtungen (ELISA und Mikroskopie) jedoch nicht mehr von einem „Einwachsen“ gesprochen werden. Vielmehr ist das Pflanzenmaterial zu diesem Zeitpunkt bereits komplett mit *U. nuda*-Myzel durchwachsen.

Als abschließende Untersuchung mit größerer Stichprobenmenge (Abb. 3.24) wurden zwei identische Experimente mit je 71 Einzelproben durchgeführt. Da in beiden Experimenten sehr ähnliche Ergebnisse erzielt wurden, ist hier nur das Ergebnis der ersten Wiederholung dargestellt. In den Halmknoten von Pflanzen, die aus infiziertem (aufgrund von Blüteninokulation), aber mit Tebuconazol behandeltem Saatgut angezogen wurden, waren nur geringe Mengen an *U. nuda*-Protein (< 500 ng *U. nuda*-Protein/ml) vorhanden. Gleiches galt für 44 der 59 untersuchten Pflanzen der infizierten, nicht gebeizten Saatgutcharge. In den restlichen 15 Pflanzen aus diesem Saatgutposten wurden dagegen erhöhte *U. nuda*-Proteingehalte gemessen, die sich in einem Bereich von 500-3000 ng *U. nuda*-Protein/ml bewegten. In etwa 25% der Fälle konnten für Pflanzen, angezogen aus blüteninokuliertem Saatgut, Proteingehalte gemessen werden, die deutlich oberhalb derjenigen für aus gebeizten Jungpflanzen genommenen Proben lagen. Der über einen Embryotest prognostizierte Befall dieses Saatgutposten lag mit 40% höher. Für die Interpretation der Ergebnisse ist allerdings zu beachten, dass die verwendete Saatgutcharge aufgrund des Flugbrandbefalls einen reduzierten Auflauf zeigte.

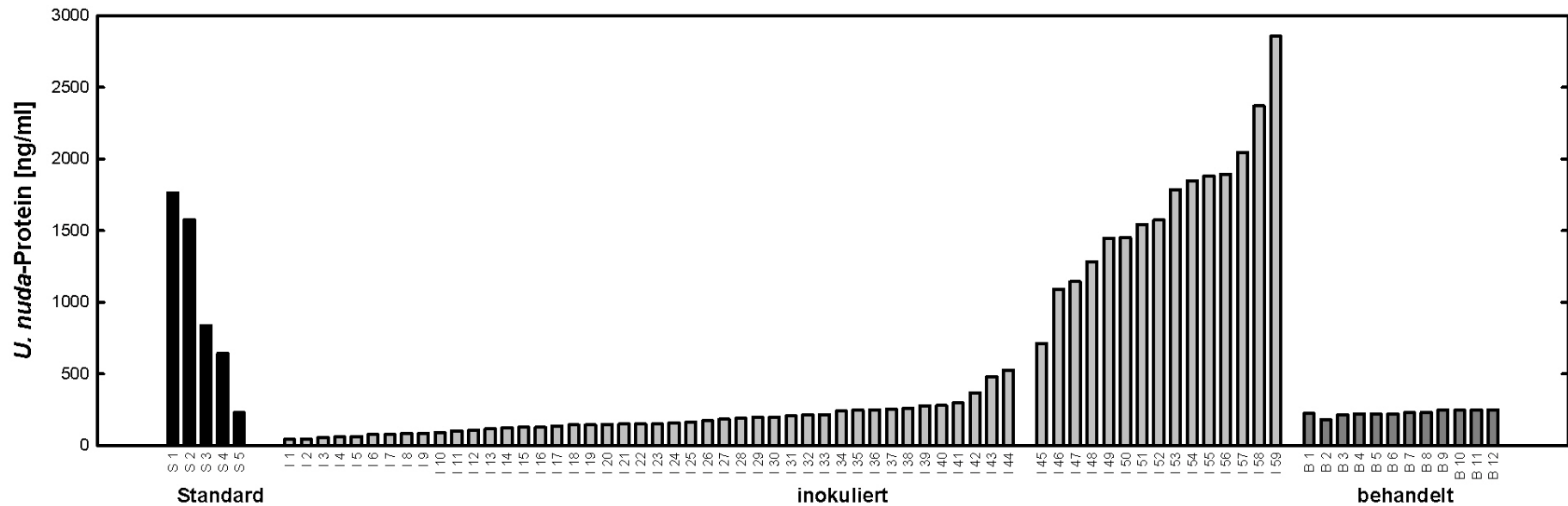


Abb. 3.24: Quantifizierung von *U. nuda*-Protein im ersten Knoten der Sommergerstensorte 'Danuta' mittels ELISA. Die Pflanzen (I 1 - I 59) wurden aus Saatgut angezogen, welches durch künstliche Blüteninokulation der Mutterpflanze mit *U. nuda*-Sporen gewonnen wurde. Als Kontrolle wurden 12 Pflanzen (B 1 - B 12) mit Raxil (Aktivsubstanz: Tebuconazol) behandelt. Der durch den Embryotest vorhergesagte Befall für die Saatgutchargen war 41% bzw. 0%. Der verwendete Standard (S 1 - S 5) entspricht 1300 ng, 650 ng, 130 ng, 65 ng und 13 ng *U. nuda*-Protein/ml.

3.1.3.3 Real-time PCR

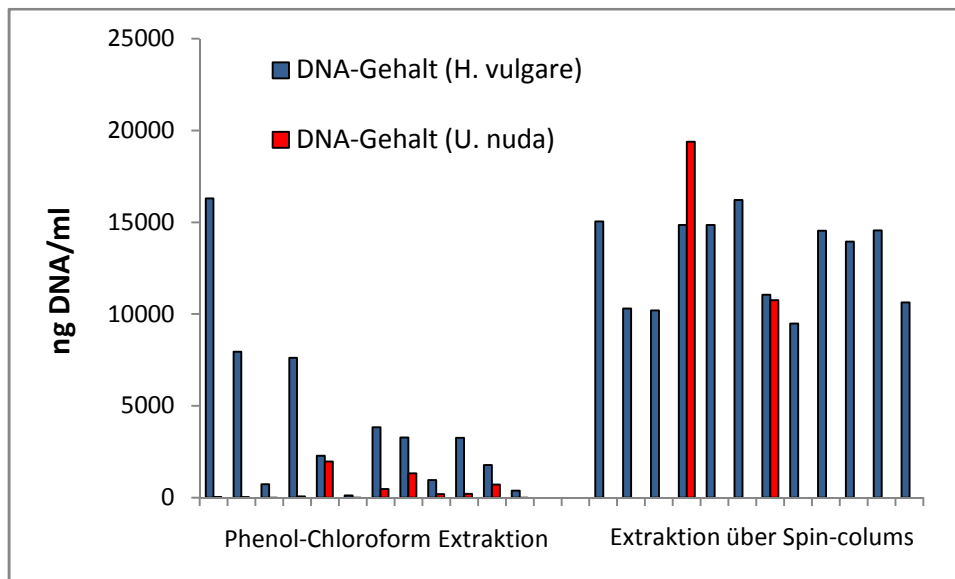


Abb. 3.25: Vergleich zweier DNA-Extraktionsverfahren (übliche Phenol-Chloroform Extraktion und Verwendung des NucleoSpin Plant II, Nucleic Acid Purification Kit von Machery-Nagel). Aus jeweils 12 zufällig ausgewählten Pflanzenproben (3-Blatt-Stadium) wurde die DNA extrahiert und der Gehalt gemessen.

Aus Abb. 3.25 geht hervor, dass eine standardisierte DNA-Extraktion mit Spin-columns zu deutlich höheren Ausbeuten führte. Während die gemessenen DNA-Gehalte (für *H. vulgare*) für die Extraktion per Hand größtenteils in einer Größenordnung < 5000 ng/ml rangierten lagen sie für eine Extraktion per Kit mit Konzentrationen von > 10000 ng/ml deutlich höher. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass es nach einer Extraktion mittels Kit zu deutlich geringeren Schwankungen für *H. vulgare*-DNA kam (10000-15000 ng/ml). Die gemessenen DNA-Konzentrationen für *U. nuda*-Protein in infizierten Pflanzen waren ähnlich hoch wie die gleichzeitig bestimmte Wirts-DNA-Konzentration und in einem Fall sogar höher.

Für die Entwicklung einer Real-time PCR-basierenden Methode wurde zunächst DNA von einer *in-vitro*-Kultur von *U. nuda* extrahiert und anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen für die PCR verwendet. Abb. 3.26 zeigt eine typische Amplifikationskurve für die *U. nuda*-Standardreihe (4000 ng, 400 ng, 40 ng, 4 ng DNA/ml). Der Korrelationskoeffizient war 0,9970, die Steigung -3,4053. Die höchste Konzentration zeigte einen Ct-Wert von 24, während die niedrigste mit einem Ct-Wert von 35 im Bereich der Negativkontrolle lag. In der dazugehörigen Schmelzkurvenanalyse konnte der spezifische Schmelzpunkt des erhaltenen PCR-Produktes auf 83°C bestimmt werden (Abb. 3.27). Nach Herstellung einer Amplifikationskurve mit 8000 ng, 800 ng, 80 ng und 8 ng *H. vulgare* bzw. *T. aestivum*-DNA/ml ergaben sich nahezu identische Ergebnisse mit Ct-Werten von 15 für die höchste und 34 bzw. 38 für die non-template Kontrolle (beide nicht gezeigt).

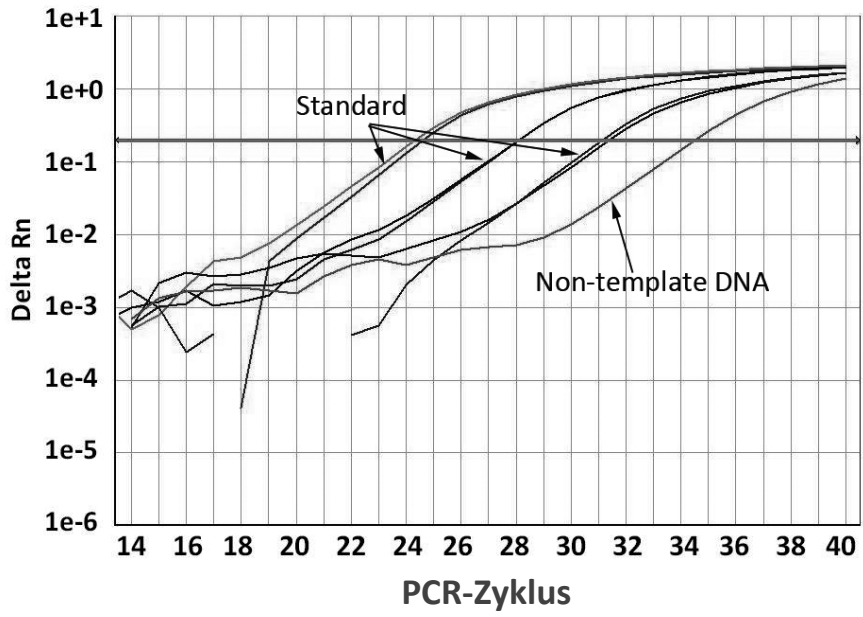


Abb. 3.26: Standardgerade für eine Real-time PCR mit *U. nuda*-DNA (4000 ng, 400 ng, 40 ng, 0 ng DNA/ml).

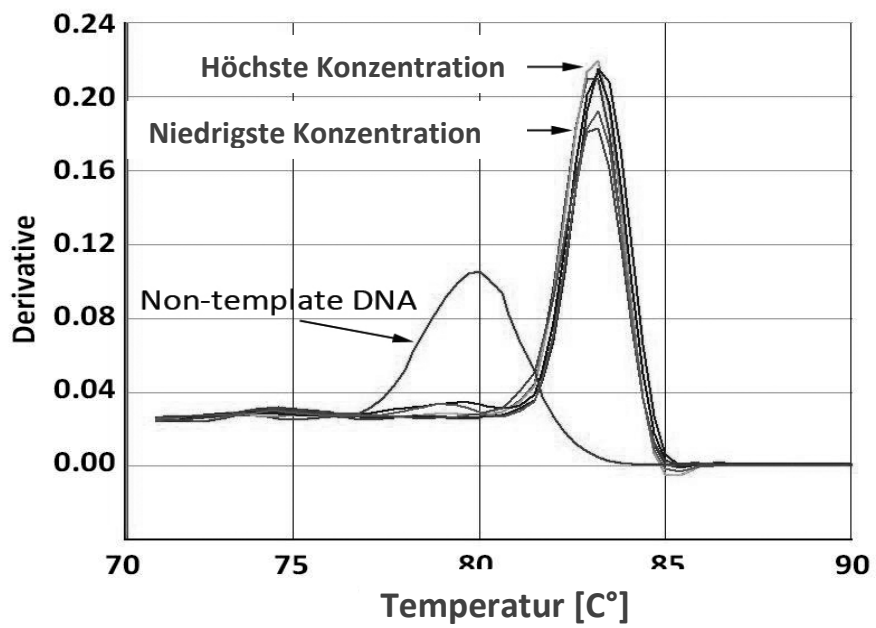


Abb. 3.27: Zu Abb. 3.7 gehörende Schmelzkurvenanalyse.

Amplifikationskurven wurden ebenfalls von gesunden und infizierten Gersten- und Weizenpflanzen hergestellt. In Abb. 3.28 sind die mit Gerste erzielten Resultate exemplarisch dargestellt. Für infizierte Gersten- aber auch Weizenpflanzen konnten Ct-Werte in der Größenordnung von 24 bis 28 beobachtet werden. Diese Werte entsprachen *U. nuda*- bzw. *U. tritici*-DNA-Konzentrationen von 400 - 4000 ng/ml. Mit einem Ct-Wert von 34 lag der DNA-Gehalt gesunder Pflanzen in der Größenordnung der non-template Kontrolle. Über die anschließend durchgeführte Schmelzkurvenanalyse konnte für DNA aus infizierten Weizen- und Gerstenpflanzen (für Weizenpflanzen nicht gezeigt) ein Schmelzpunkt des erhaltenen Produktes von 83°C bestimmt werden. Dieser war identisch mit dem Schmelzpunkt der aus reiner *U. nuda*-DNA bestimmt wurde (vergleiche Abb. 3.29 mit Abb. 3.27).

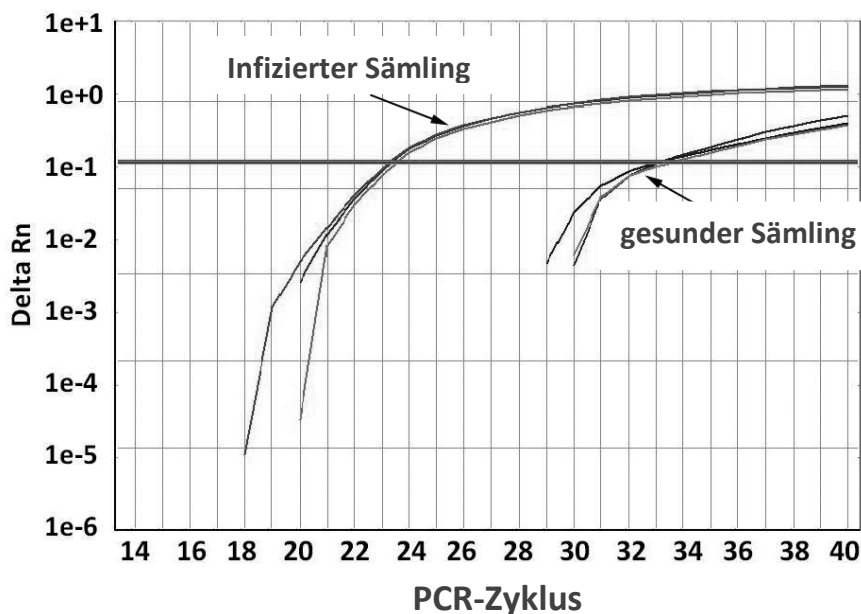


Abb. 3.28: Detektion von *U. nuda* im Pflanzengewebe. Amplifikationskurven für DNA aus einer gesunden und einer infizierten Gerstenpflanze (Sommergerste 'Danuta'; 3 Replikate).

Um die Variabilität des DNA-Gehaltes in Pflanzen zu bestimmen, wurden zwei identische Experimente mit insgesamt 96 Pflanzenproben durchgeführt (Abb. 3.3). Keine *U. nuda*-DNA oder nur sehr geringen Mengen (< 10 ng *U. nuda*-DNA/ μ g *H. vulgare*-DNA) konnten in Pflanzen, angezogen aus gesundem Saatgut, detektiert werden. Nur minimale DNA-Gehalte fanden sich auch in etwa 65% der Pflanzen, die aus einer inokulierten Saatgutcharge (Sommergerste 'Danuta'; Befall nach Embryotest: 30%) angezogen worden waren. Der DNA-Gehalt der restlichen 35% war sehr variabel und bewegte sich in einem Bereich von 60 – 2000 ng *U. nuda*-DNA/*H. vulgare*-DNA. Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen der anderen Hälfte der jeweiligen Proben (die Proben waren vorher geteilt worden) stimmten sehr gut mit den Real-time PCR-Ergebnissen überein. Weiterhin bildeten Pflanzen, die aus

gesundem Saatgut angezogen wurden, nie eine brandige Ähre aus, und alle Pflanzen, die ein Ährensymptom zeigten, hatten DNA-Gehalte > 60 ng *U. nuda*-DNA/*H. vulgare*-DNA. Die Übereinstimmung mit dem Ährensymptom konnte aber nicht für alle Pflanzen bewertet werden, weil 5 keine Ähre ausgebildet hatten. Lediglich in Pflanzenprobe I 9 trat eine Abweichung zwischen dem Real-time PCR-Ergebnis und dem ELISA-Ergebnis auf. Da diese Pflanze nach weiterer Kultivierung eine Brandähre ausbildete ist davon auszugehen, dass bei dieser Probe ein Fehler im PCR-Teil des Experiments aufgetreten war.

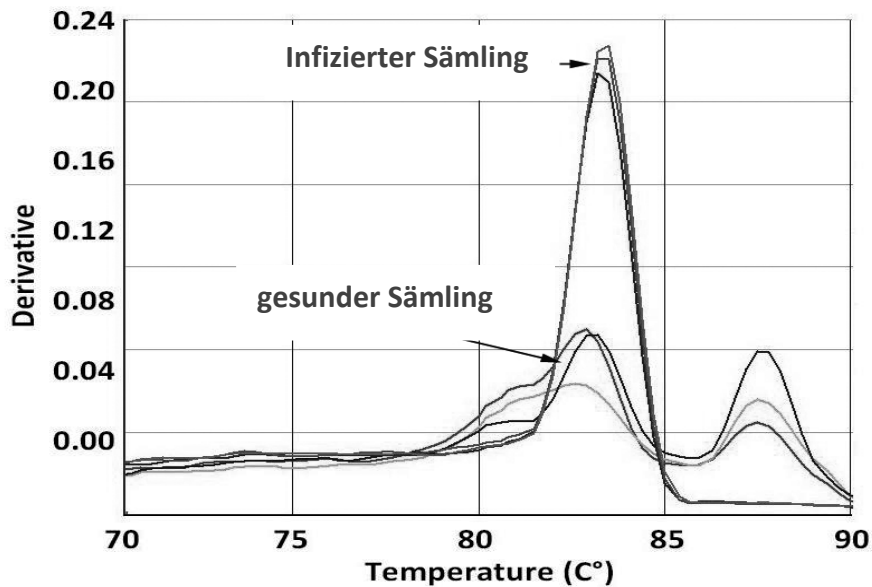


Abb. 3.29: Detektion von *U. nuda* im Pflanzengewebe. Zu Abb. 3.28 gehörende Schmelzkurvenanalyse.

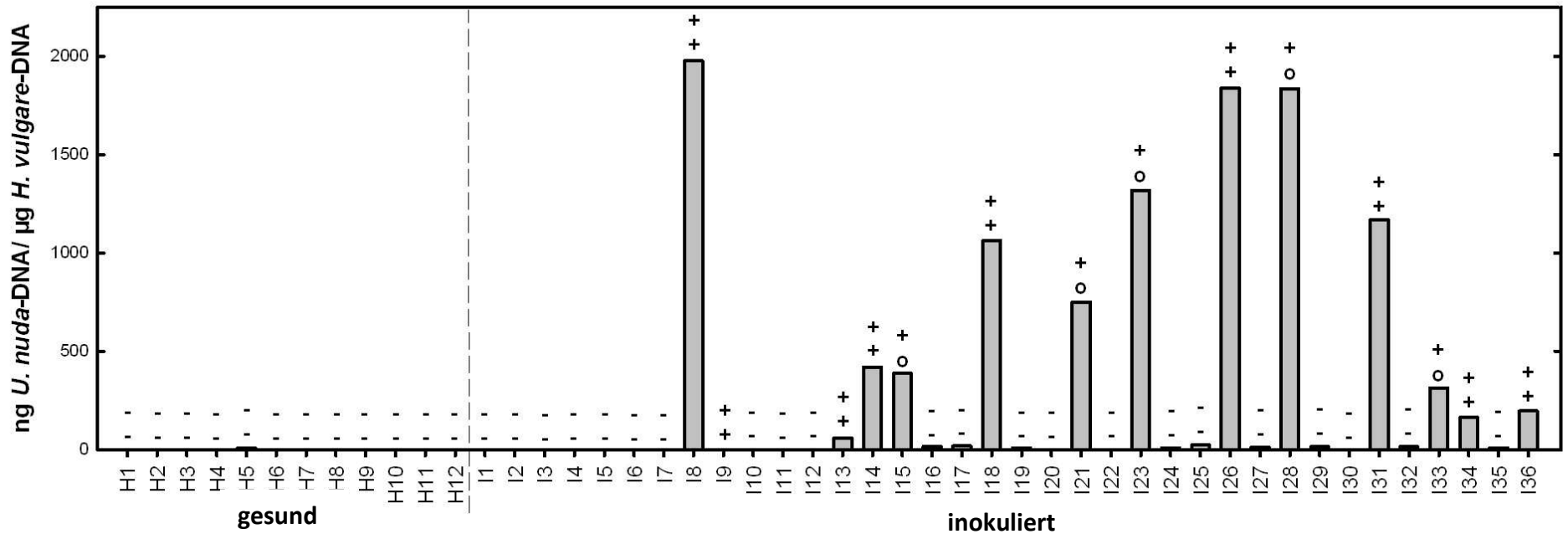


Abb. 3.30: Quantifizierung von *U. nuda* im ersten Knoten des Haupttriebes von 36 Einzelpflanzen (Sommergerste 'Danuta') über Real-time PCR. Die Pflanzen wurden aus gesunden und aus durch Blüteninokulation der Mutterpflanze mit *U. nuda*-Sporen gewonnenem, infiziertem Saatgut herangezogen. Material des gleichen Knotens wurde ebenfalls über einen ELISA auf einen Befall hin untersucht (+/- in der oberen Reihe). Seitentriebe der gleichen Pflanze wurden bis zum Ährenschieben weiterkultiviert und anhand der Ährensymptome als befallen oder gesund eingestuft (+/- in der unteren Reihe; O steht für Pflanzen die keinen Seitentrieb ausgebildet haben). Der durch den Embryotest prognostizierte Befall der aus Blüteninokulation hervorgegangenen Saatgutcharge lag bei 30 %.

Für Weizen- wie auch Gerstenpflanzen war es möglich, infizierte Pflanzen bereits zum 3-Blatt-Stadium zu detektieren (EC 13; Abb. 3.31 und Abb. 3.32). Die Ergebnisse der Sommergerstensorte 'Danuta' können direkt mit denen aus Abb. 3.30 verglichen werden, da die Pflanzen aus der selben Saatgutcharge angezogen worden waren. Der niedrigere Gehalt an potentiell infizierten Pflanzen (2 aus 12) im Vergleich zu Abb. 3.30 kann durch die relativ geringe Stichprobenmenge erklärt werden. Der unterschiedlich hohe Befall der Saatgutchargen 'Danuta' und 'Igri', der durch den Embryotest prognostiziert wurde, konnte in den PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Auch dieses Ergebnis konnte bei der Wiederholung des Versuches, ebenso wie die in Abb. 3.30 gezeigten, bestätigt werden (nicht gezeigt).

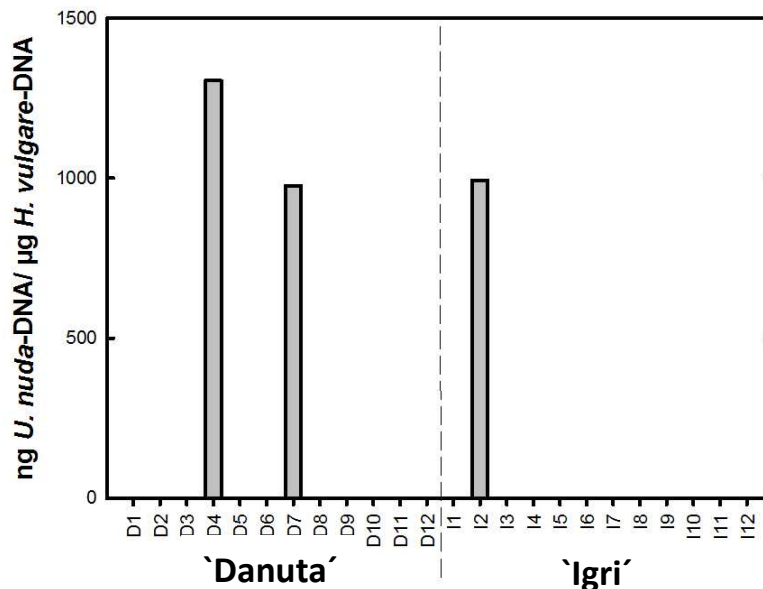


Abb. 3.31: Real-time PCR-Quantifizierung von *U. nuda* in 12 Sämlingen der Sommergerste 'Danuta' und der Wintergerste 'Igri' zum 3-Blatt-Stadium (EC 13). Der durch einen Embryotest prognostizierte Befall der beiden Saatgutchargen lag in den Größenordnungen 30% und 10%.

Der gemessene Gehalt an *U. tritici*-DNA in Weizen lag deutlich unterhalb der Werte, die für *U. nuda* in Gerste ermittelt wurden (vergl. Abb. 3.31 mit Abb. 3.32). Der vorhergesagte hohe Prozentsatz potentiell befallener Pflanzen für die beiden Weizensorten 'Apogee' und 'Akteur' korrelierte ebenfalls sehr gut mit den im Embryotest erhaltenen Werten (Befall: 61% und 70%).

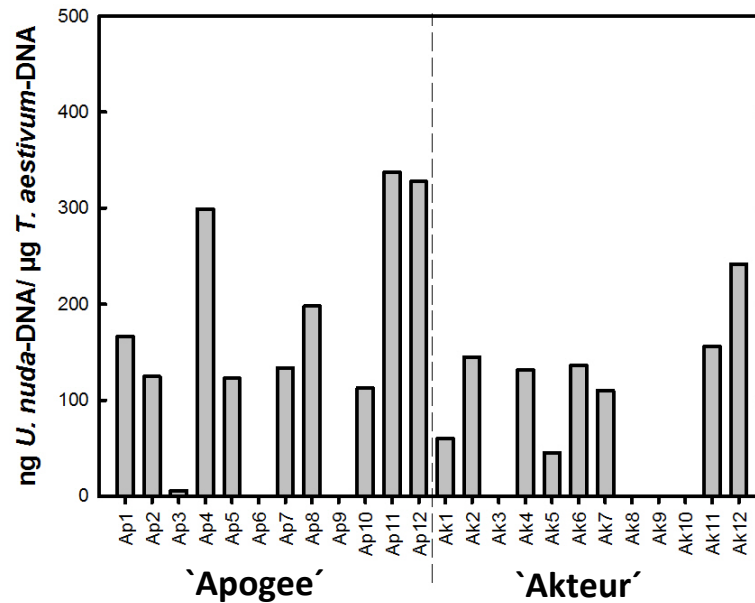


Abb. 3.32: Real-time PCR-Quantifizierung von *U. nuda* in 12 Sämlingen des Modellweizens 'Apogee' und der Wintergerste 'Igri' zum 3-Blatt-Stadium (EC 13).

3.1.3.4 Anwendung der Nachweisverfahren

Die entwickelten Nachweisverfahren lassen sich in verschiedenen Bereichen anwenden. An erster Stelle ist die Züchtung flugbrandresistenter Sorten sowie die Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln- und -verfahren zu nennen. Im Rahmen des Projektes war insbesondere der letztere Aspekt von Interesse. Daher wurden exemplarisch zwei Untersuchungen in diesem Bereich durchgeführt. Die erste betraf die Heiß- und Warmwasserbeize, über deren Wirkungsweise kaum etwas bekannt ist. In der zweiten Untersuchung wurden zwei nicht-chemische, aus dem Screening hervorgegangene Saatgutbehandlungsmittel, Pestwurz- und Rhabarberwurzelpulver, auf ihre Flugbrandwirkung im Gewächshaus überprüft.

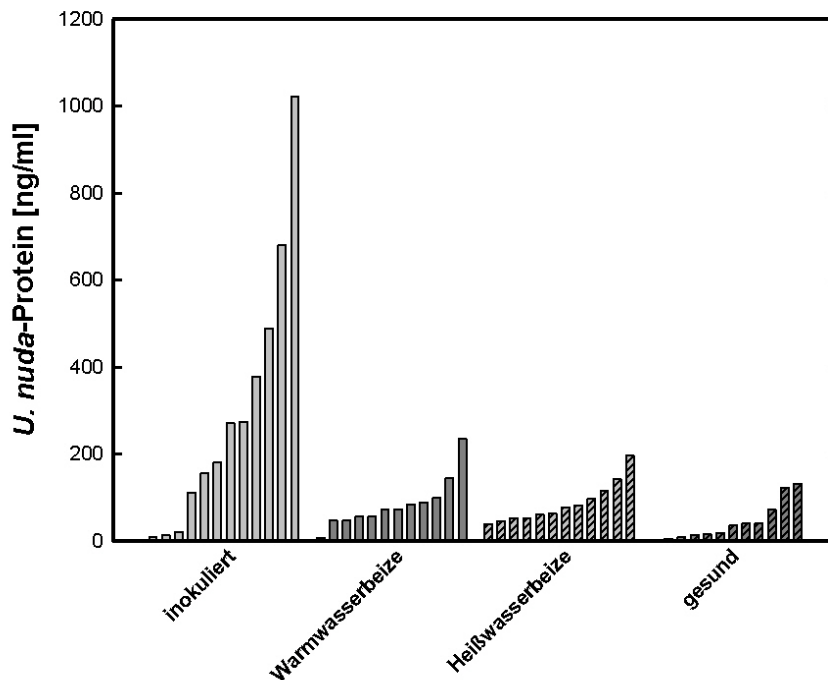


Abb. 3.33: Quantifizierung von *U. nuda*-Protein im Vegetationspunkt zum 3-Blatt-Stadium (10-14 Tage nach Aussaat) von je 12 Einzelpflanzen (Sommergerste 'Danuta') mittels ELISA nach thermischer Saatgutbehandlung in Wasser sowie von Pflanzen aus gesundem Saatgut. Befall der infizierten Saatgutcharge laut Embryotest: ca. 40%.

In einem Versuch zur Quantifizierung von *U. nuda*-Protein im Vegetationspunkt zum 3-Blatt-Stadium (Abb. 3.33) konnte mit einer aus künstlicher Blüteninokulation hervorgegangenen Saatgutcharge (Befall: ca. 40%) die Wirksamkeit der beiden thermischen Saatgutbehandlungsverfahren Warm- und Heißwasserbeize gezeigt werden. Während für die inokulierte, unbehandelte Saatgutcharge *U. nuda*-Proteingehalte in der Größenordnung 0 - 1100 ng/ml gemessen wurden, lag der höchste Gehalt nach Saatgutbehandlung mit den beiden physikalischen Verfahren bei ca. 200 ng/ml. Hierbei handelte es sich um Konzentrationen, die in dieser Größenordnung auch in einem als Kontrolle mitgeführten, nicht befallenen Saatgutposten detektiert wurden.

In mikroskopischen Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor (Abb. 3.34) wurden nach Anwendung der thermischen Verfahren ähnliche Änderungen in der Morphologie und im Wuchsverhalten des Pilzes beobachtet wie nach Anwendung des chemischen Wirkstoffs Tebuconazol. In beiden Fällen wuchs das Pilzmycel nicht mehr zielgerichtet zum Vegetationspunkt orientiert, sondern vielmehr knäuelig auf der Stelle. Die Farbe des Mycels erschien nicht, wie nach Wasserbehandlung, hellblau, sondern eher orange-gelb. Die Beobachtungen können dahingehend interpretiert werden, dass der Pilz durch die

Heiß- und Warmwasserbehandlung nicht unmittelbar abgetötet, sondern in seinem Wachstum so gehemmt wird, dass er dem Wachstum der Pflanze nicht mehr folgen kann.

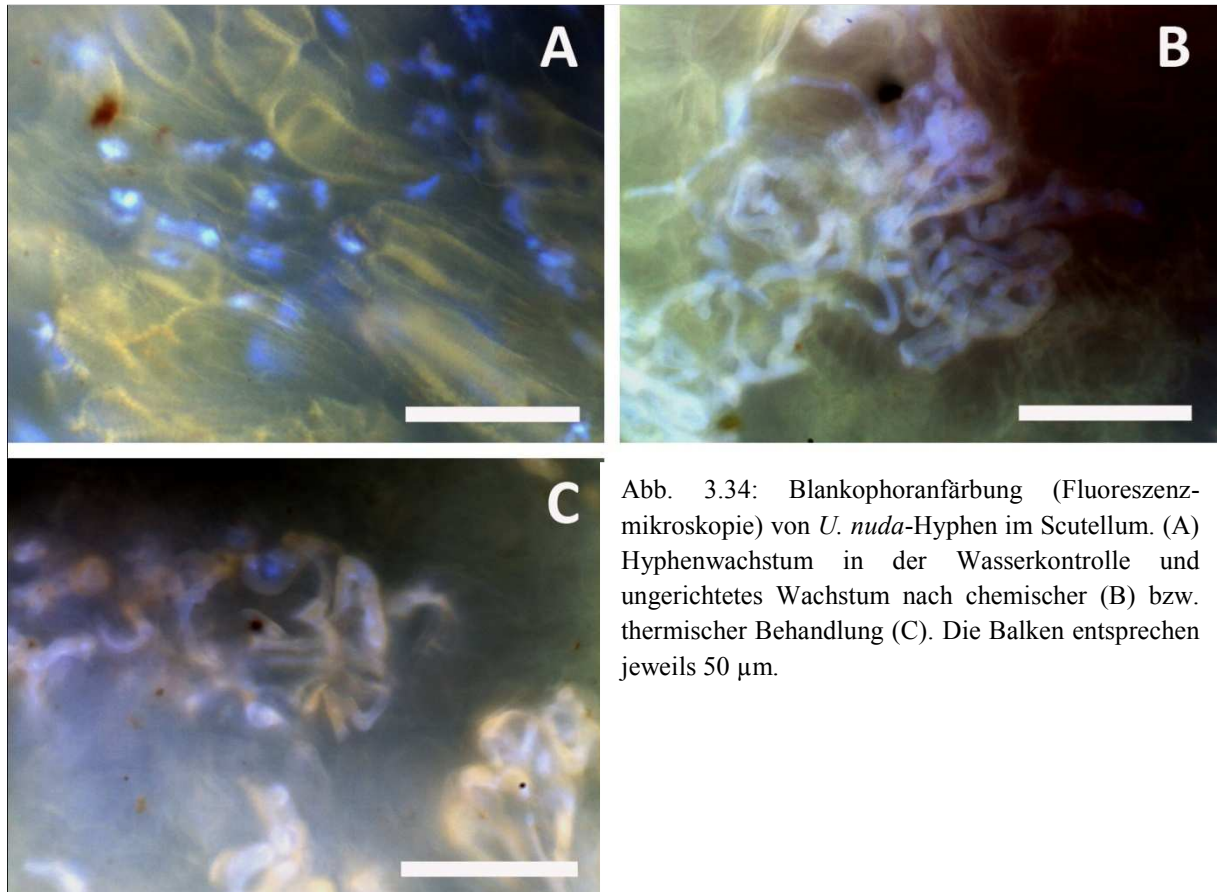


Abb. 3.34: Blankophoranfärbung (Fluoreszenzmikroskopie) von *U. nuda*-Hyphen im Scutellum. (A) Hyphenwachstum in der Wasserkontrolle und ungerichtetes Wachstum nach chemischer (B) bzw. thermischer Behandlung (C). Die Balken entsprechen jeweils 50 µm.

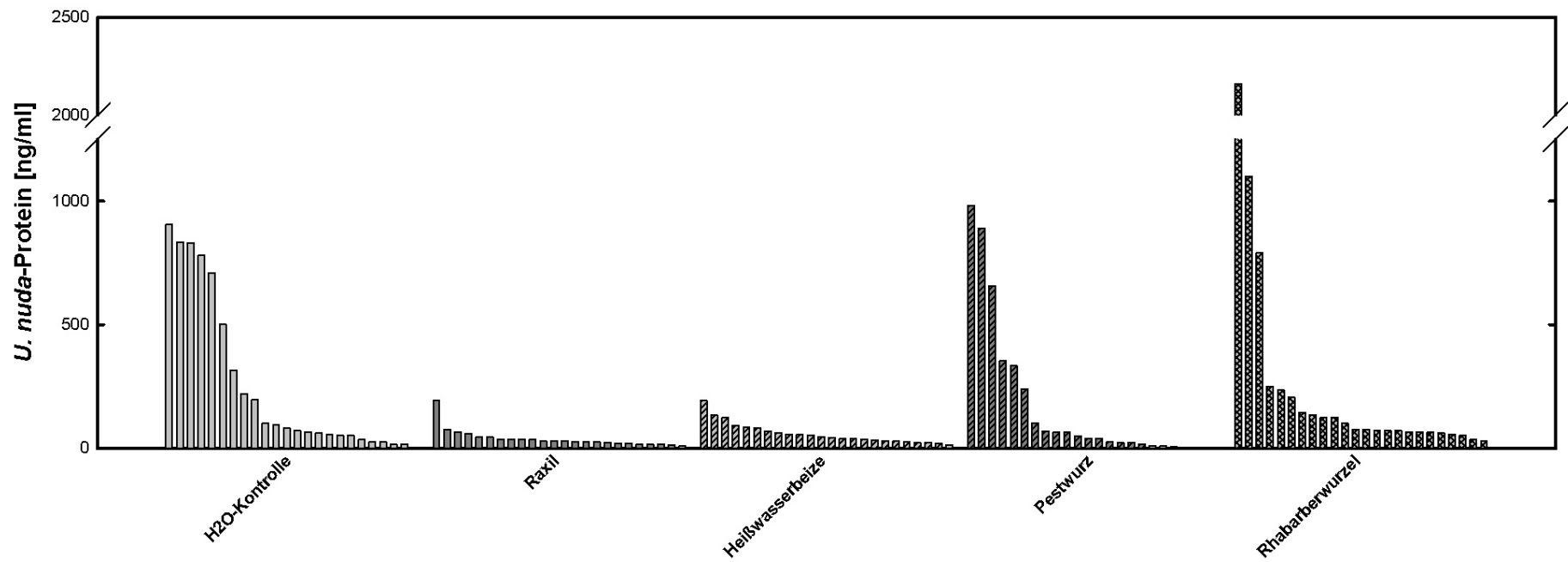


Abb. 3.35: *U. nuda*-Quantifizierung im Vegetationspunkt von Einzelpflanzen der Sommergerste 'Danuta' zum 3-Blatt-Stadium (10-14 Tage nach Aussaat) mittels ELISA. Die Pflanzen wurden aus gesundem Saatgut oder aus durch Blüteninokulation der Mutterpflanze mit *U. nuda*-Sporen gewonnenem Saatgut angezogen und anschließend mit unterschiedlichen Saatgutbehandlungsverfahren behandelt. Befall der infizierten Saatgutcharge laut Embryotest: ca. 40%.

Zur Untersuchung der Flugbrandwirksamkeit der alternativen Mittel Rhabarberwurzel und Pestwurz wurde je ein Experiment mit der Sommergerstensorte 'Danuta' und der Winterweizensorte 'Akteur' mit jeweils insgesamt 120 Einzelproben durchgeführt. Weitere Behandlungen waren eine mit Wasser behandelte Kontrolle, eine chemische Behandlung (Raxil) und eine Heißwasserbehandlung. Die beprobten Pflanzen der Sommergerstensorte 'Danuta' zeigten in keinem Fall erhöhte *U. nuda*-Proteingehalte (> 500 ng/ml) für die Behandlungen „Tebuconazol“ und „Heißwasser“ (Abb. 3.35). Dagegen wurden in Pflanzen, die aus inokuliertem, aber unbehandeltem Saatgut angezogen worden waren, *U. nuda*-Proteingehalte der Größenordnung 500-1400 ng/ml (in 6 von 24 Pflanzenproben) gemessen. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für die Pflanzen, bei denen das Saatgut mit Pestwurz bzw. Rhabarberwurzel behandelt worden war. Damit kann zwar eine gewisse Wirksamkeit dieser Agenzien gegen Flugbrand nicht ausgeschlossen werden; sie ist aber, falls überhaupt vorhanden, deutlich geringer als die des chemischen Mittels und die der Heißwasserbeize. Damit ist dieses mit dem ELISA an Jungpflanzen gewonnene Ergebnis in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Feldversuche (z.B. an Wintergerste, Abb. 3.11) sowie der Gewächshausversuche an Sommergerste (Abb. 3.16) und Winterweizen (Abb. 3.18), bei denen das Ährensymptom bonitiert wurde.

Keine eindeutigen Ergebnisse wurden mit dem Wirt-Parasit System *U. tritici* / Winterweizen (Abb. 3.36) erhalten. Aufgrund des Ergebnisses des Embryotests (Befall: ca. 70%) wäre eine kleine Gruppe von Pflanzen mit geringen Gehalten und eine Große mit höheren Gehalten von *U. tritici*-Protein zu erwarten gewesen. Im Falle der Wasserkontrolle deutete sich eine solche Verteilung an. Die höchsten Pilz-Protein-Gehalte erreichten hier eine Größenordnung von 1000-1300 ng/ml. Bei den anderen Behandlungen stellten sich die Gehalte der Einzelpflanzen eher als ein Kontinuum dar, wobei die Maximalwerte nach Heißwasserbehandlung weniger hoch waren als die nach den anderen Behandlungen. Nach dem Schossen war die Aussage zur Wirksamkeit der Raxil- und Heißwasserbeize zwar besser als im 3-Blatt-Stadium (Daten nicht gezeigt). Allerdings würde bei Wintergetreide dieser späte Auswerttermin keine signifikante Zeitersparnis gegenüber der Bonitur des Ährensymptoms bedeuten. Aus diesem Grund wäre es zielführender, mit Sommerweizen zu arbeiten.

Für die Verwendung von Sommerweizen sprach auch die verminderte Keimfähigkeit der Gerste aus künstlicher Inokulation. Wie oben im Teil „Inokulationsverfahren“ beschrieben, reagierte die Gerste auf die Blüteninokulation mit einem Abfall der Keimfähigkeit und des Tausendkorngewichts. Für Gewächshausversuche, bei denen ein hoher Saatgutbefall (ca.50%) notwendig ist, um mit einer vertretbaren Anzahl Pflanzen pro Variante auszukommen, ist die verminderte Keimung daher ein schwerwiegendes Hindernis. Darüber hinaus sind befallene Körner empfindlicher als gesunde. Bereits ein geringes phytotoxisches Potential der

Saatgutbehandlungsmittel, das bei gesunden Körnern nicht in Erscheinung tritt, kann die Keimung stark befallener Körner vermindern. Damit werden befallene Körner eher ausgemerzt als gesunde, woraus eine verringerte Anzahl befallener Pflanzen resultieren kann. Dies kann zu falschen Schlüssen führen, da hier ganz offensichtlich keine Flugbrandwirkung vorliegt.

Darum ist es gerade für die Gewächshausversuche wichtig, mit Saatgut hoher Keimfähigkeit zu arbeiten. Als Ausweg bietet sich hier der Weizen an, der trotz hohen Flugbrandbefalls nicht mit verminderter Keimfähigkeit reagierte. Daher wurden in der Verlängerungsphase des Projektes versucht, den Wirksamkeitstest im Gewächshaus mit Sommerweizen durchzuführen. Tatsächlich war auch in diesen Versuchen die Keimfähigkeit der verwendeten Sommerweizensorte Eminent trotz hohen Flugbrandbefalls wieder nur geringfügig beeinflusst. Allerdings zeigte sich bei wiederholter Testung, dass die vorhandenen Antikörper zum Nachweis von *U. tritici* in Weizen nicht geeignet waren. Damit lässt sich auch (zumindest teilweise) die schwache Aussagekraft des oben geschilderten Versuchs mit winterweizen erklären. Die Antikörper waren zwar mit *U. nuda* als Antigen hergestellt worden, hatten aber *in vitro* auch mit *U. tritici* gut reagiert. Dass ein Nachweis von *U. tritici* in der Pflanze nicht möglich ist war daher nicht zu erwarten. Eine zweite, ebenfalls mit *U. nuda* als Antigen hergestellte Antikörpercharge war bereits *in vitro* vergleichsweise selektiv für *U. nuda*. Im Pflanzenversuch erwies sie sich erwartungsgemäß ebenfalls als ungeeignet für den Nachweis von *U. tritici* in Weizen. Für die Weiterentwicklung und routinemäßige Anwendung des ELISA-Frühtestes mit Sommerweizen wäre daher eine geeignete Antikörpercharge herzustellen.

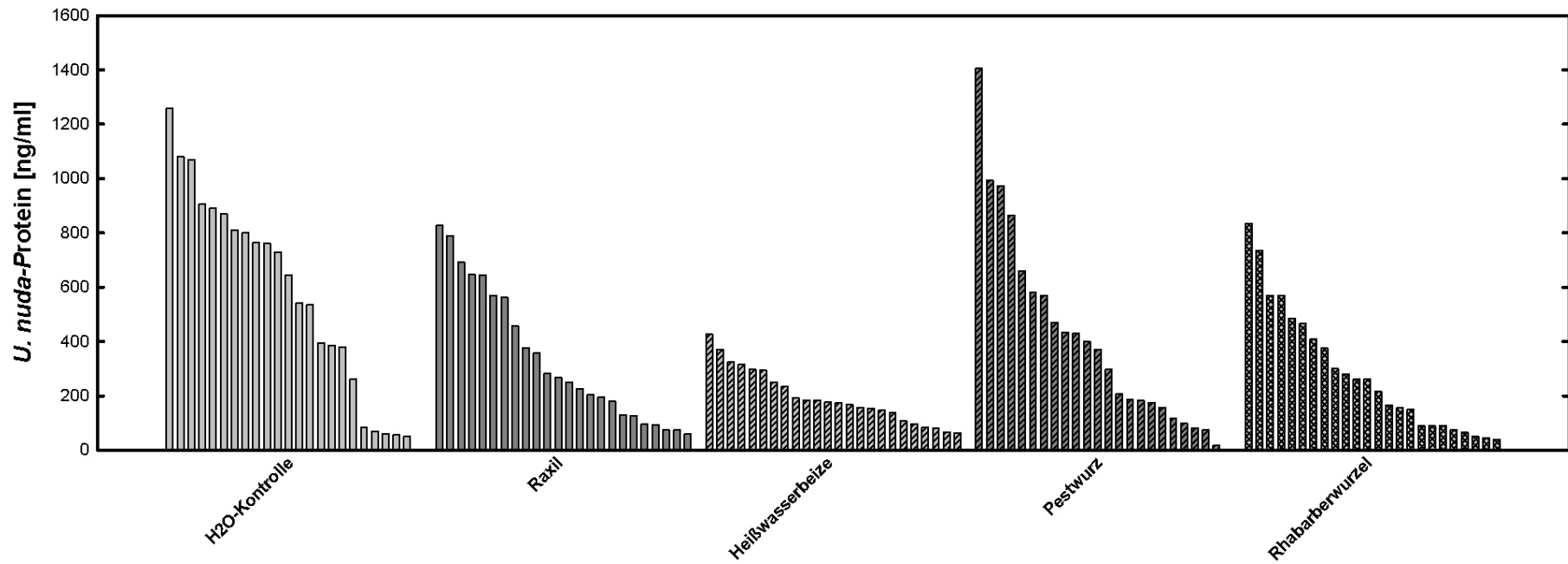


Abb. 3.36: *U. tritici*-Quantifizierung im Vegetationspunkt von Einzelpflanzen der Winterweizensorte 'Akteur' zum 3-Blatt-Stadium (10-14 Tage nach Aussaat) mittels ELISA. Die Pflanzen wurden aus gesundem Saatgut oder aus durch Blüteninokulation der Mutterpflanze mit *U. nuda*-Sporen gewonnenem Saatgut angezogen und anschließend mit unterschiedlichen Saatgutbehandlungsverfahren behandelt. Befall der infizierten Saatgutcharge laut Embryotest: ca. 40%.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Fall des Gersten- und Weizenflugbrandes ist der Befall von natürlich infiziertem Saatgut meist nur gering. Die Verwendung von Saatgutposten mit geringem Befall ist bei Feldversuchen problematisch, da die Aussagekraft der Ergebnisse geringer ist als bei Saatgutposten mit ausreichendem Befall. Für Gewächshausversuche sind solche natürlich infizierten Saatgutposten in aller Regel ungeeignet. Mit den hier verwendeten Sorten konnte durch das Ausstäuben trockener Sporen ein Saatgutbefall von ca. 5 % erzielt werden, der für Feldversuche in der Regel ausreichend ist. Allerdings gab es Schwankungen zwischen den Jahren, deren Ursachen nicht bekannt sind. Mit der Einzelblüteninokulation ließ sich Saatgut mit einem Befall >60% erzeugen. Wichtig für die praktische Anwendung ist die Beobachtung, dass Gerste auf die Blüteninokulation empfindlicher reagiert als Weizen. Versuche, bei denen hoch infizierte Saatgutposten benötigt werden, sollten daher bevorzugt mit Weizen durchgeführt werden. Nicht berücksichtigt wurde bei den Untersuchungen die Resistenz bzw. Anfälligkeit der Sorten. Hier wären Versuche mit verschiedenen Sorten nötig um zu ermitteln, welche von ihnen sich besonders für die Herstellung von infiziertem Saatgut eignen. Vielleicht bestände auch die Chance, Gerstensorten zu finden, die weniger empfindlich auf die Inokulation reagieren.

In Laborversuchen konnte eine große Anzahl von Mikroorganismen und Pflanzenextrakten mit *in vitro* antagonistischer Wirkung identifiziert werden. Es erscheint lohnenswert, diese Agenzien auch gegen andere Pflanzenpathogene zu testen. Bei den Versuchen zur Applikation an das Saatgut wurden wichtige, grundlegende Techniken erarbeitet, die auch in späteren Versuchen mit Saatgutapplikation Anwendung finden können. Leider korrelierte die *in vitro*-Aktivität der Mikroorganismen und Pflanzenextrakte nicht mit der Aktivität an der Pflanze. Der Hauptgrund hierfür dürfte die Lokalisation des Flugbranderreger im Embryo sein. Damit ist die Pflanze bereits infiziert, so dass die Mittel kurative Aktivität aufweisen müssen, um wirksam zu sein. Zukünftige Arbeiten sollten daher gezielter auf das Auffinden von Naturstoffen gerichtet sein, die von der Pflanze aufgenommen und in ihr systemisch verteilt werden. Alternativ zur Saatgutbehandlung wären auch Ährenbehandlungen denkbar, die die Infektion der Blüte verhindern. Hierzu liegen aber bisher keine Ergebnisse vor. Gleiches gilt für die Verwendung endophytischer Mikroorganismen zur Krankheitsbekämpfung. Bemerkenswert ist die Bestätigung früherer Ergebnisse, wonach Ethanol eine Wirkung gegen Haferflugbrand besitzt. Hier gilt es allerdings noch, das phytotoxische Potential von Ethanol besser zu charakterisieren und in den Griff zu bekommen.

Die hier angewandten, teilweise neu entwickelten Verfahren zum Nachweis des Flugbranderreger in der Pflanze finden potentiell Anwendung bei der Aufklärung der Biologie des Pilzes, bei der Entwicklung und Charakterisierung resistenter Sorten sowie bei der Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln- und verfahren. Während die Mikroskopie in erster Linie dem qualitativen Nachweis dient, sind ELISA und Real-time PCR Verfahren, mit denen sich die in der Pflanze vorhandene Pilzmenge quantifizieren lässt. In vielen Fällen wird es sinnvoll sein, die Mikroskopie mit einem quantitativen Verfahren zu kombinieren. Im

vorliegenden Projekt wurde die Quantifizierung mit dem ELISA der Quantifizierung mit der PCR vorgezogen, wobei die Gründe hierfür in erster Linie die Kosten und die Verfügbarkeit der Technologie sowie der Gesamtaufwand waren. Den Vorteilen der ELISA-Methode stehen aber auch Nachteile gegenüber. Der schwerwiegendste ist, dass geeignete Antikörper vorhanden sein müssen, deren Herstellung zeitaufwendig ist und deren Qualität nur bedingt zu steuern ist. Dagegen sind Primer für die PCR schnell herzustellen und bezüglich der Sequenz klar definiert.

Es konnte gezeigt werden, dass an Sommergerste mit Hilfe des ELISA-Frühtestes bereits im 3-Blatt-Stadium eine Vorhersage über die Wirksamkeit von Saatgutbehandlungsmitteln möglich ist. Die grundlegenden Techniken für einen solchen Nachweis sind damit vorhanden, müssen allerdings für die routinemäßige Anwendung noch umgesetzt werden. Problematisch ist die verringerte Keimfähigkeit bei hoch infizierter Sommergerste. Die Verwendung von Sommerweizen könnte hier Abhilfe schaffen, erfordert aber geeignete Antikörper oder ein anderes Nachweisverfahren. Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen sollte eine einfache, qualitative PCR für diesen Zweck ausreichen. Eine weitere Schwierigkeit des ELISA-Verfahrens ist es, dass auch in gesunden Pflanzen ein, wenn auch geringer, *U. nuda*-Gehalt gemessen wird, und dass die Höhe dieses „Rauschens“ von Versuch zu Versuch Schwankungen unterliegt. Damit ist die Festlegung eines einheitlichen Grenzwertes, oberhalb dessen eine Pflanze mit Sicherheit befallen ist, nur schwer möglich. Andererseits konnte die Wirksamkeit wirklich effektiver Verfahren, wie der chemischen Behandlung und der Heißwasserbehandlung, mit dem ELISA in der Regel zweifelsfrei nachgewiesen werden.

4. Zusammenfassung

Im Arbeitsfeld **“Inokulationsverfahren“** wurden Weizen und Gerste durch Ausbringung von Flugbrandsporen zum Zeitpunkt der Blüte inokuliert, und der Inokulationserfolg mikroskopisch mit dem sog. Embryotest ermittelt. Die durchschnittliche Befallshöhe unterlag jahresbedingten Schwankungen, die bei Weizen stärker ausgeprägt waren als bei Gerste. Die Ergebnisse deuteten die höchste Effektivität für das Ausstäuben trockener Sporen an, gefolgt von der Ausbringung einer Sporensuspension mit einer Farbspritzpistole und der Ausbringung trockener Sporen mit einer Airbrush. Dabei war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle stets eindeutig. Zwischen den Behandlungen waren die Unterschiede aber nicht signifikant. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich mit den genannten Verfahren der künstlichen Inokulation und den hier geprüften Sorten Saatgut mit ca. 2- 5 % Flugbrandbefall erzeugen lässt. In Einzeljahren kann der erzielte Befall auch wenige Prozentpunkte höher liegen.

In Versuchen mit Einzelblüteninokulation wurde der Zusammenhang zwischen Inokulumdichte, Flugbrandbefall, Keimfähigkeit und Tausendkorngewicht des resultierenden Saatgutes untersucht. Von wenigen Ausnahmen abgesehen führte die Erhöhung der Sporenkonzentration zu einer mehr oder weniger linearen, deutlichen Befallserhöhung. Meist wurden Befallsgrade von >60% erreicht. Eine Ausnahme bildete die Sommergerstensorte `Ingmar`, die offensichtlich eine Resistenz gegen den Flugbrand aufweist. Allerdings ging der höhere Befall mit einer Reduktion der Keimfähigkeit und des Tausendkorngewichtes einher, was bei Gewächshausversuchen, in denen solches Saatgut verwendet wird, sehr nachteilig ist. Interessanterweise war dieser Zusammenhang bei der Sommerweizensorte `Eminent` weitaus weniger ausgeprägt. Ähnliche Beobachtungen, d.h. durchweg gute bis sehr gute Keimfähigkeit trotz sehr hohen Saatgutbefalls mit *U. tritici*, wurden auch in anderen Versuchen mit flugbrandinfizierten Saatgutposten von Weizen gemacht.

Im Arbeitsfeld **“Entwicklung von Bekämpfungsverfahren“** wurde zunächst mit Mikroorganismen und Pflanzenextrakten ein Screening auf *in-vitro* Wirksamkeit (Hemmung der Sporenkeimung) gegen den Flugbranderreger *U. nuda* durchgeführt. Insgesamt wurden 597 Bakterien, 69 Actinomyceten, 19 Trichoderma-Isolate und sieben weitere filamentöse Pilze untersucht. In der Gruppe der Bakterien hatten 11%, bei den Actinomyceten 30% und bei den Trichoderma-Isolaten 43% eine hemmende Wirkung. Weiterhin wurde die *in vitro*-Aktivität von ca. 30 wässrigen und einigen ethanolischen Pflanzenauszügen untersucht. Die meisten der Pflanzenextrakte hatten zumindest eine partielle Wirkung auf die Sporenkeimung von *U. nuda*. Die Auszüge (5%) von neun Pflanzenarten führten zu einer vollständigen Hemmung der Sporenkeimung. Im nächsten Schritt wurden die wirksamen Extrakte und Mikroorganismen mit verschiedenen Methoden und in verschiedenen Kombinationen an das Saatgut appliziert, und das so behandelte Saatgut wurde zur Ermittlung potentiell phytotoxischer Wirkungen in Töpfe im Gewächshaus ausgesät. Insgesamt wurden ca. 180 solcher Tests durchgeführt. Die große Mehrheit der Behandlungen hatte keinen negativen Einfluss auf die Keimung. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bildeten die Extrakte aus

Meerettich, *R. japonica* und Rhabarberwurzel. Bemerkenswert war auch, dass Ethanol in der Konzentration von 50% die Keimung stärker beeinflusste als bei 70%.

In mehrjährigen Feldversuchen mit natürlich infiziertem Saatgut wurde die Wirksamkeit der aussichtsreichsten Kandidaten auf Gersten- und Weizenflugbrand in Kleinparzellen untersucht. In diesen Versuchen zählten Ethanol und Rhabarber (als Extrakt oder Pulver) zu den wirksamsten Varianten. Sowohl an Gerste als auch an Weizen war die Flugbrandwirkung aber gering und nur unzureichend reproduzierbar. Die Wirksamkeit selbst der effektivsten im Projekt selektierten Behandlungen ist für die Sanierung flugbrandbefallener Saatgutposten von Gerste und Weizen in der Praxis eindeutig zu gering. Der Hauptgrund für die schlechte Wirksamkeit der selektierten Agenzien an der Pflanze dürfte die Lokalisation der Flugbranderreger *U. nuda* und *U. tritici* im Embryo sein. Zukünftige Arbeiten sollten daher gezielter auf das Auffinden von Stoffen mit systemischer Aktivität gerichtet sein. Der Erreger des Haferflugbrandes (*Ustilago avenae*) ist, anders als *U. nuda* und *U. tritici*, auf der Kornoberfläche bzw. unter den Spelzen lokalisiert. Dennoch war im Feldversuch die Flugbrandaktivität auch an Hafer nur gering. Allerdings wurde beim Hafer mit Ethanol (70%) eine deutliche Reduzierung des Flugbrandbefalls erzielt (Wirksamkeit ca. 80%).

Wesentlich erfolgreicher als die Bekämpfung war die **“Entwicklung von Nachweisverfahren“**. Durch Anfärbung mit dem Farbstoff Blankophor war ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Flugbranderregers im Vegetationspunkt von Keimpflanzen und in Halmknoten von älteren Pflanzen sicher möglich. Mit Hilfe eines enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) konnten die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen zur Lokalisation des Flugbranderregers bestätigt werden. Insgesamt bestätigten die Untersuchungen die Annahme, dass der Flugbranderreger schon früh in das meristematische Gewebe des Keimlings einwächst und mit dem Schossen passiv nach oben transportiert wird. Untersuchungen zur Bestimmung des frühest möglichen Auswerttermins ergaben, dass die Probenahme schon 10-14 Tage nach Aussaat (EC 13) möglich ist. Zum Termin 7 Tage nach Aussaat konnten nur in Ausnahmefällen erhöhte *U. nuda*-Proteingehalte gemessen werden, was darauf hindeutete, dass das Mycel zu diesem Zeitpunkt noch nicht in jedem Fall in den Vegetationspunkt eingewachsen war. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem ELISA-Nachweis um ein hinreichend sicheres Verfahren handelt. Mit der Real-time PCR konnte ein weiteres Verfahren zum quantitativen Nachweis des Flugbrandpilzes in der Pflanze entwickelt werden. Einleitende Versuche mit DNA aus einer axenischen Kultur von *U. nuda* zeigten, dass die entworfenen Primer grundsätzlich zur Quantifizierung geeignet waren. Bei einer Schmelzkurvenanalyse für *U. nuda*-DNA aus Reinkultur und aus Pflanzen wurde ein einheitlicher Schmelzpunkt für das spezifische *U. nuda*-PCR-Produkt (83°C) ermittelt, ein starkes Indiz für die Zuverlässigkeit der Methode. In einem Versuch mit 36 Pflanzenproben, der zweimal durchgeführt wurde, bestand eine gute Übereinstimmung zwischen dem Ergebnis der Real-time PCR, des ELISA und dem an den Bestockungstrieben gebildeten Ährensymptom.

In weiteren Versuchen wurde die Anwendbarkeit des mikroskopischen Nachweises bzw. des ELISA im Rahmen von Arbeiten zur Entwicklung von Saatgutbehandlungsmitteln

exemplarisch gezeigt. So lag der *U. nuda*-Proteingehalt im 3-Blatt-Stadium nach vorausgegangener Heiß- und Warmwasser – Saatgutbehandlung bei ca. 200 ng/ml, während ohne Saatgutbehandlung Gehalte von >1100 ng/ml gemessen wurden. In mikroskopischen Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor wurden nach Anwendung der thermischen Verfahren Änderungen in der Morphologie und im Wuchsverhalten des Pilzes beobachtet: das Pilzmycel wuchs nicht mehr zielgerichtet zum Vegetationspunkt orientiert, sondern vielmehr knäuelig auf der Stelle. In ELISA-Untersuchungen an Pflanzen im 3-Blatt-Stadium wurde die Flugbrandwirksamkeit der alternativen Mittel Rhabarberwurzel und Pestwurz mit der chemischen Beizung (Tebuconazol) und der Heißwasserbehandlung verglichen. Während die *U. nuda*-Proteingehalte nach chemischer Beizung und Heißwasserbehandlung deutlich verringert waren, lagen sie nach der Behandlung mit Rhabarberwurzel und Pestwurz in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den Kontrollen. Diese Ergebnisse entsprechen damit denen der Gewächshaus- und Feldversuche, bei denen die Flugbrandwirkung anhand des Ährensymbols bonitiert worden war.

5. Gegenüberstellung der geplanten und tatsächlich erreichten Ziele

Arbeitsfeld I: Inokulationsverfahren

Geplant war zum einen die Entwicklung von Verfahren, mit denen sich mit Flugbrand befallenes Saatgut in Parzellenversuchen, also in größeren Mengen, erzeugen lässt. Dieses Ziel wurde grundsätzlich erreicht. Es ist zu erwarten, dass sich der Inokulationserfolg durch die Wahl besonders geeigneter Sorten weiter verbessern lässt. Auch das Ziel, den Einfluss der Sporendichte bei der Einzelblüteninokulation auf den Infektionserfolg und die Keimfähigkeit des resultierenden Saatgutes genauer zu charakterisieren wurde erreicht.

Arbeitsfeld II: Bekämpfungsverfahren

Die Labor-, Gewächshaus und Feldversuche zum Auffinden effektiver Behandlungsmittel wurden wie geplant durchgeführt. Zwar wurden Mittel mit Wirksamkeit *in vitro* gefunden, aber das Ziel, Mittel mit Wirksamkeit an der Pflanze zu entwickeln, wurde nicht erreicht.

Arbeitsfeld III: Nachweisverfahren

Weiterhin war die Entwicklung von Gewächshaustests vorgesehen, mit dem sich bereits im Jugendstadium der Pflanze Saatgutbehandlungsmittel mit Wirksamkeit gegen Flugbrand erkennen lassen. Dazu sollten zunächst verschiedene Nachweismethoden überprüft werden. Dieser Teil des Projektes war sehr erfolgreich. Der Nachweis in der Pflanze, auch zu einem frühen Stadium, gelang mit Hilfe der Mikroskopie, mit einem ELISA und der Real-time PCR. Die Verfahren wurden exemplarisch für Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Heißwasserbeize und in Gewächshaustesten zur frühen Bewertung der Wirksamkeit potentieller Saatgutbehandlungsmittel mit Flugbrandwirkung angewendet.

6. Literaturverzeichnis

- Banowitz, G.M., Trione E.J., Krygier, B.B. (1984). Immunological comparisons of teliospores of two wheat bunt fungi, *Tilletia* species, using monoclonal antibodies and antisera. *Mycologia* **76**, 51-62
- Amos, W. (1952). Über die Entwicklung des Flugbrandmycels in infizierten Weizenpflanzen. Dissertation, TH Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Cherewick, W.J.; Popp, W., 1950. A modification of Moore's method of inoculating wheat and barley with loose smut. *Phytopathology* **40**, 1054-1056.
- Deepshikha; Pramod Murari; Tiwari A. N. (2006). Evaluation of different botanicals against loose smut of wheat. *Journal of Plant Disease Sciences* **1**, 225-226.
- Eibel, P., Wolf, G.A., Koch, E. (2005a). Detection of *Tilletia caries*, causal agent of common bunt of wheat, by ELISA and PCR. *J. Phytopathol.* **153**, 297-306.
- Eibel, P., Wolf, G.A., Koch, E. (2005b). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of loose smut of barley (*Ustilago nuda*). *European Journal of Plant Pathology* **111**, 113–124.
- Josefsen, L., Christiansen, S. K. (2002). PCR as a tool for early detection and diagnosis of common bunt of wheat, caused by *Tilletia tritici*. *Mycological Research* **106**, 1287–1292.
- Kellerer, T., Sedlmeier, M., Rabenstein, F., Killermann, B. (2007). Entwicklung von immunochemischen und PCR-Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia*-Arten. Bericht ü. d. 58. Tagung 2007 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 33-36.
- Klinkowski, M. (1953). Die Antibiotika und ihre Bedeutung als Beizmittel. *Mitteilungen aus der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft Heft 75*, 152-155.
- Kochanová, M., Zouhar, M., Prokinová, E., Rysánek, P. (2004). Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. *Plant Soil and Environment* **50**, 75–77.
- Kumar, A., Singh, A., Garg, G.K. (1998). Development of seed immunoblot binding assay for detection of karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **7**, 119-121
- Malik, M.M.S., Batts, C.C.V. (1960a). The infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society* **43**, 117-125.
- Malik, M. M. S., & Batts, C. C. V. (1960b). The development of loose smut of barley (*Ustilago nuda*) in the barley plant, with observations on spore formation in nature and in culture. *Transaction of the British Mycological Society*, **43**, 126–131.
- Morton, D. J. (1961). A quick method of preparing barley embryos for loose smut examination. *Phytopathology* **50**, 270–272.

- Poehlmann, J.M. (1945). A simple method of inoculating barley with loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Popp, W. (1951). Infection in seeds and seedlings of wheat and barley in relation to development of loose smut. *Phytopathology* **41**, 261-275.
- Roberts, A. M. I., Theobald, C. M., & McNeil, M. (2007). Calibration of quantitative PCR assays. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* **12**, 364–378.
- Verma, H. S. ; Singh, A. ; Agarwal, V. K. (1984). Application of seedling crown test for screening of systemic fungicides against loose smut of wheat. *Seed Research* **12**, 56-60.
- Yuan, Q., Nian, S., Yin, Y., Li, M., Cai, J., & Wang, Z. (2009). Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 585–594.
- Zouhar, M., Mazáková, J., Prokinová, E., Vánová, M., & Rysánek, P. (2010). Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. *Plant Protection Science* **46**, 107–115.

7. Übersicht über bisher realisierte Veröffentlichungen

Koch, E., Wunderle, J., Orlik, O., Spieß, H.

Loose smut of barley and wheat: biology and approaches for non chemical control.

IOBC/WPRS Working Group “Biological Control of Plant Pathogens“, Biocontrol of Plant Pathogens in Sustainable Agriculture. Reims, France 24-27 June 2012.

Wunderle, J.U., Koch, E. (2010)

Detection of the loose smut pathogen *Ustilago nuda* in barley and wheat seedlings by microscopy and ELISA. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 75, 612.

Wunderle, J.U., Koch, E.

Development of methods to assess the efficacy of non-chemical seed treatments for control of loose smut in barley and wheat.

IOBC/WPRS Working Group “Biological Control of Plant Pathogens“, Climate Change: Challenge or Threat to Biocontrol? Graz, Austria, 7–10 June 2010.

Koch, E.; Wunderle, J.; Orlik, M.

Development of seed treatments for control of loose smut in barley and wheat (*U.nuda*, *U. tritici*) in organic agriculture. Page 42, Proceedings of the Third International Symposium “Seed Health in Agricultural Development”, Beijing, China.

Koch, E.; Spieß, H. (2010)

Inokulationsverfahren zur Erzeugung von Saatgut mit Flugbrandbefall (*U. nuda*, *U. tritici*). Julius-Kühn-Archiv, Heft: 428, 395-396.

Wunderle, J.U.; Leclerque, A.; Koch, E. (2010)

Verfahren zum Nachweis des Flugbranderregers (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) in Jungpflanzen. Julius-Kühn-Archiv, Heft: 428, 395.

Wunderle, J.U., Leclerque, A., Schaffrath, U., Slusarenko, A., Koch, E. (2012)

Quantification of the loose smut fungi (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in plant tissue of barley and wheat by real-time PCR and visualization by fluorescence microscopy. European Journal of Plant Pathology 133, 865–875.