



Schlussbericht zum Thema

Nutzbarmachung von Resistenzquellen gegen Flugbrand
zur Verbesserung der Immunität in Sommergerste für
den ökologischen Landbau

FKZ: 2815OE063

**Projektnehmer: Bayerische
Landesanstalt für Landwirtschaft**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung
und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des
Deutschen Bundestages im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere
Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖLN-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter
www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boeln@ble.de

Abschlussbericht

Nutzbarmachung von Resistenzquellen gegen Flugbrand zur Verbesserung der Immunität in Sommergerste für den ökologischen Landbau (GeFluTo)

Förderkennzeichen 2815OE063

Laufzeit: 01.04.2017 bis 31.05.2021

Ausführende Stelle

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung – IPZ2b
Dr. Markus Herz
Projektbearbeitung: Annika Ebbighausen, Magdalena Hanusch

Am Gereuth 6
85354 Freising
Tel.: +49(0)8161 71-3629; Fax: 08161 71-4085
E-Mail: markus.herz@lfl.bayern.de

Projektpartner

Cultivari Getreidezüchtungsforschung Darzau GmbH
Dr. Karl-Josef Müller
Hof Darzau 1
29490 Neu Darchau
Tel.: +49 (0)5853 98098-11
E-Mail: k-j.mueller@darzau.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau
und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Kurzfassung

Nutzbarmachung von Resistenzquellen gegen Flugbrand zur Verbesserung der Immunität in Sommergerste für den ökologischen Landbau

Dr. Markus Herz¹; Annika Ebbighausen¹; Magdalena Hanusch¹; Dr. Karl-Josef Müller²

- 1) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Am Gereuth 6
85354 Freising
Tel.: 08161 71 3629
E-Mail: Markus.Herz@lfl.bayern.de
- 2) Cultivari Getreidezüchtungsforschung Darzau GmbH
Hof Darzau 1
29490 Neu Darchau
Tel.: 05853-98098-11
E-Mail: k-j.mueller@darzau.de

Der Flugbrand (*ustilago nuda*) bei Gerste ist eine Krankheit, die vorrangig im ökologischen Landbau von Bedeutung ist. Zum einen ist die Erzeugung von qualitativ hochwertigem Saatgut beeinträchtigt, da für eine Anerkennung eines Vermehrungsbestandes höchstens fünf befallene Ähren je 150 m² vorhanden sein dürfen. Des Weiteren ist der Markt für ökologisch erzeugte Braugerste in den vergangenen Jahren stark gewachsen und der Nachfrage steht ein knappes Angebot gegenüber. Voraussetzung für eine stärkere Verbreitung des ökologischen Sommergerstenanbaus ist die Bereitstellung geeigneter Sorten und somit auch die Optimierung in der Züchtung. Im Rahmen des Projekts wurden verschiedene Sommergersten in Feld- und Gewächshausversuchen auf das Merkmal Flugbrandtoleranz untersucht, um zu ermitteln, ob eine qualitative Resistenz besteht, eine Kombination aus mehreren Resistenzgenen vorliegt, oder ob die Resistenz nur aus einem hochwirksamen Resistenzgen besteht. Außerdem sollten neue molekulare Marker entwickelt werden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Merkmal stark von der Umwelt x Genotyp Interaktion abhängig ist. Aus den Testungen konnte sich eine Heritabilität von 59% ermitteln lassen. Mittels einer GWAS wurden SNP-Marker ermittelt und anschließend an einem Testset von 120 Genotypen validiert, damit in Zukunft effizienter selektiert werden kann. Drei der Marker detektieren das Resistenzgen Un6 auf Chromosom 3H. Zu einer effizienten Selektion trägt auch eine frühzeitige Nachweismethode mittels qPCR bei, die im Rahmen des Projektes etabliert und an Proben aus der Praxis angewendet wurde. Die

Untersuchung zeigte, dass sich der Pilz vorrangig im Halm und in den Halmknoten ausbreitet und nur zu einem geringen Anteil in den Blättern nachzuweisen ist.

Abstract

Utilization of sources for tolerance against loose smut in spring barley to improve resistance in organic farming

Loose smut is one of the most important seed born diseases in barley. There are strict limitations in the percentage of infected plants in a seed multiplication field. In spite of increasing production of beverages made from barley or malt and in particular a still growing market for organic beer is still growing, it is of elementary interest to provide varieties which are well adapted to the conditions of organic farming. Various cultivars were tested in field and greenhouse trials to obtain more information about the characteristics of different resistance genes. Phenotypic analyses of loose smut resistance have shown that the trait is highly dependent on the environment x genotype interaction. It was also determined that the heritability of the trait is 59%. Molecular markers could be developed in a genome-wide association study. These markers have been validated on a set of 120 genotypes and can be used for efficient selection. Three markers detect the resistance gene *Un6* on chromosome 3H. Furthermore, in the project also a qPCR-method for the early detection of *Ustilago nuda* in plant tissue was developed. The method was applied to samples from the field and is helpful for efficient selection. The test demonstrated that the fungus spreads primarily in nodes and internodes and can only be detected to a small extent in leaves.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	I
Abstract	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einführung.....	1
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	1
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	1
1.3 Planung und Ablauf des Projektes.....	3
1.3.1 Arbeitspaket 1 (AP1): Screening auf Resistenz (GZFD, LfL)	3
1.3.2 Arbeitspaket 2 (AP2): Durchführung alleler Kreuzungen mit ausgewählten Resistenzdonoren (GZFD, LfL).....	4
1.3.3 Arbeitspaket 3 (AP3): Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie (LfL)	4
1.3.4 Arbeitspaket 4 (AP4): Untersuchung des Infektionsverlaufs (LfL).....	4
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	5
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Material und Geräte.....	9
3.2 Resistenztests	9
3.3 Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie	11
3.4 Untersuchung des Infektionsverlaufs.....	11
4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	15
4.1 Resistenztests	15
4.2 Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie	18
4.3 Untersuchung des Infektionsverlaufs.....	22
5 Diskussion der Ergebnisse	26
6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	30

7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen.....	30
8	Zusammenfassung	32
9	Literaturverzeichnis	33
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt	35
11	Anhang	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus <i>ustilago nuda</i> (Agrarinfos.de 2020)	8
Abbildung 2: Infektionsmethode nach Poehlmann (1945)	10
Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der resistenten und anfälligen Genotypen	15
Abbildung 4: Bonitur von 35 Genotypen,	16
Abbildung 5: Befallsergebnisse der getesteten Kreuzungsgruppen am Standort Darzau 2019 (n=43).....	17
Abbildung 6: Manhattan Plot für das Merkmal Flugbrandresistenz.....	19
Abbildung 7: KASP-Lauf von JHI_Hv50K_2016_215315 (Zyklus 30) auf dem Testset	20
Abbildung 8: Auswertung der phänotypischen Boniturdaten und genotypischen Markerdaten	22
Abbildung 9: Amplifikationskurven der DNA-Proben 137 bis 150	23
Abbildung 10: Schmelzkurven der DNA-Proben 137 bis 150	23
Abbildung 11: A: Boxplots der in der qPCR ermittelten Cq-Werte	24
Abbildung 12: Boxplots der Cq-Werte der unterschiedlichen Resistenzquellen	25
Abbildung 13: Durch Hitze geschädigte Pflanzen aus dem Donorensortiment.....	46
Abbildung 14: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten	47
Abbildung 15: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten	47
Abbildung 16: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten	48
Abbildung 17: Markeruntersuchung des Donorensortiments	48
Abbildung 18: Boxplots der Cq-Werte der untersuchten Sorten und Stämme	49
Abbildung 19: Boxplots der Cq-Werte der verschiedenen Pflanzenteile.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der im Projekt getesteten Sortimente	3
Tabelle 2: Material und Geräte, die für die Resistenztests und die qPCR verwendet wurden	9
Tabelle 3: Sorten und Stämme, die für die Untersuchung des Infektionsverlaufs verwendet wurden	12
Tabelle 4: Reaktion mit SYBR Green Kit	13
Tabelle 5: Überblick der Mittelwerte der DH-Populationen	18

Tabelle 6: Signifikante Marker GWAS	20
Tabelle 7: Kürzel der verschiedenen Resistenzquellen	39
Tabelle 8: Sortiment DH-Testung	46
Tabelle 9: Sortiment für die Untersuchung des Infektionsverlaufs (qPCR)	46

Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
bp	Basenpaar
Cq	Quantification Cycle
DH	Doppelhaploide Pflanzen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
GZFD	Getreidezüchtungsforschung Darzau
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)
KASP	Kompetitive allele-specific PCR
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
mz	mehrzeilig
ng	Nanogramm
NTC	Nullkontrolle
p-Wert	Signifikanzwert
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R	resistent
R ² (%)	erklärte phänotypische Varianz
S	anfällig (susceptible)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>U. nuda</i>	<i>Ustilago nuda</i> (Gerstenflugbrand)
Wdh	Wiederholung
zz	zweizeilig

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

In diesem Projekt wurden verschiedene Sommergerstenherkünfte, die eine Toleranz oder Resistenz gegenüber Flugbrand (*Ustilago nuda*) besitzen, darauf geprüft, ob die Resistenz qualitativer Art ist, auf der Kombination von mehreren Resistenzgenen beruht oder nur aus einem einzigen hochwirksamen Resistenzgen besteht. Die einzelnen Resistenzen wurden genetisch separiert und so für eine gezielte Resistenzzüchtung nutzbar gemacht. Parallel wurden molekulargenetische Marker entwickelt, welche eine frühzeitige und effiziente Selektion ermöglichen. Damit wird die Resistenz gegen Flugbrand auf eine breite Basis gestellt. Auf diese Weise kann vermieden werden, dass eine Resistenz im Feldanbau schnell durchbrochen wird, womit auf lange Sicht das Befallsniveau im Praxisanbau mit *U. nuda* auf einem niedrigen Level gehalten werden kann. Darüber hinaus wurde mittels qPCR die Detektion von *U. nuda* etabliert, sowie der Infektionsverlauf des Pilzes in der Pflanze untersucht.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Das vorgestellte Projekt trägt zur Überwindung produktionstechnischer Hemmnisse bei. Zu den folgenden Zielen des Bundesprogrammes leistet dieses Projekt einen wesentlichen Beitrag:

- Züchterische Weiterentwicklung von Getreide für die Bedingungen des ökologischen Landbaus
- Entwicklung von Züchtungszielen und –konzepten für den ökologischen Landbau
- Optimierung von Züchtungsstrategien mit molekulargenetischen Markern
- Verbesserung der Eigenschaften ökologisch erzeugter Braugerste insbesondere im Hinblick auf Resistenz gegen schwer bekämpfbare samenbürtige Krankheiten
- Verbesserung der Qualität ökologisch erzeugter Produkte

Außerdem wurden folgende wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Vorhabens angestrebt:

- Erhaltung und Nutzung von Biodiversität in Form eines Genotypenspektrums mit weiter genetischer Spannweite
- Züchterische Weiterentwicklung von Getreide für die Bedingungen des ökologischen Landbaus
- Nachhaltige Erzeugung und Bereitstellung ökologisch erzeugter Sommergerste
- Umweltschonende Ressourcennutzung durch die Vermeidung von chemischem Pflanzenschutz
- Entwicklung von Züchtungszielen und –konzepten für den ökologischen Landbau
- Optimierung von Züchtungsstrategien mit molekulargenetischen Markern
- Verbesserung der Eigenschaften ökologisch erzeugter Braugerste, insbesondere im Hinblick auf Krankheitsresistenz, Unkrautunterdrückung, Stresstoleranz und Malzqualität
- Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit der heimischen Pflanzenzüchtung durch die Bereitstellung effizienter Züchtungsverfahren
- Verbesserung der Qualität ökologisch erzeugter Produkte

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt ist in insgesamt 4 Arbeitspakete (AP) gegliedert.

1.3.1 Arbeitspaket 1 (AP1): Screening auf Resistenz (GZFD, LfL)

In diesem Projekt wurden drei verschiedene Sortimente auf Flugbrandanfälligkeit getestet (Tabelle 1);

Tabelle 1: Übersicht der im Projekt getesteten Sortimente

Name und Jahr	Genotypenanzahl	Prüfort	Anmerkung
Kreuzungssortiment (2019)	54	Feld (GZFD)	Kreuzungen wurden für dieses Projekt erstellt (F1, F2, F3)
Donorensortiment Wiederholung 1 (2018)	82	Gewächshaus (LfL)	Besteht unter anderem aus Donoren der Kreuzungen
Donorensortiment Wiederholung 2 (2019)	82	Gewächshaus (LfL)	Besteht unter anderem aus Donoren der Kreuzungen
Auswahl des Kreuzungs- und Donorensortimentes (2018)	40	Feld (GZFD)	35 Genotypen aus dem Donorensortiment wurden im Feld getestet
DH-Testung Wiederholung 1 (2020)	126	Gewächshaus (LfL)	5 DH-Populationen mit jeweils 25 Linien (aus Kreuzungssortiment erstellt)
DH-Testung Wiederholung 2 (2020/ 2021)	126	Gewächshaus (LfL)	5 DH-Populationen mit jeweils 25 Linien (aus Kreuzungssortiment erstellt)

Das Kreuzungssortiment (F3) wurde 2019 unter zertifizierten Ökobedingungen in 1 m² netto Microplots in Darzau angebaut. Die Generation F2 wurde dabei 2018 im Feld infiziert.

Das Donorensortiment wurde in 2 Wiederholungen auf Flugbrandähren im Gewächshaus der LfL untersucht. Die 1. Generation wurde jeweils mittels Infektionsmethode nach Poehlmann (1945) infiziert und die 2. Generation auf Flugbrand bonitiert. Bei der DH-Testung wurden 5 verschiedene Populationen mit jeweils 25 Linien beziehungsweise bei einer DH

Linie nur eine Linie im Gewächshaus infiziert und auf *Ustilago nuda* untersucht. Die Listen der verschiedenen Sortimente befinden sich im Anhang.

1.3.2 Arbeitspaket 2 (AP2): Durchführung aller Kreuzungen mit ausgewählten Resistenzdonoren (GZFD, LfL)

Die allelen Kreuzungen wurden in der Getreidezüchtungsforschung Darzau durchgeführt. Es wurden ausgehend von 17 Kreuzungsdonoren 54 Kreuzungen erstellt (siehe Anhang).

1.3.3 Arbeitspaket 3 (AP3): Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie (LfL)

An der LfL wurden in früheren Forschungsprojekten Genombereiche identifiziert, die eine Korrelation mit Flugbrand zeigen. Das Donorensortiment wurde mit den daraus verfügbaren Markern untersucht. Es handelt sich um zwei Un8-Marker (T800F4, ABC07753) und einen Un6-Marker (EBmac0541). Der Un6-Marker wurde mit einer anderen Population entwickelt und ist daher noch nicht validiert. Darüber hinaus wurde das genannte Sortiment mit einem Hochdurchsatz System (50K Illumina Infinium Chip) getestet und eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) bezüglich Flugbrandtoleranz durchgeführt.

1.3.4 Arbeitspaket 4 (AP4): Untersuchung des Infektionsverlaufs (LfL)

An der LfL wurde die in der Dissertation und der Publikation von Wunderle (2013) beschriebene Methode zur Quantifizierung des Flugbrandpilzes mittels qPCR etabliert. Für die Etablierung wurde reine Pilz DNA auf Malz Pepton Agar gewonnen und in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Die Validierung der Primer erfolgte mit 100 % infiziertem Material, bei dem es sich im Gersten Embryonen handelte, die zuvor mittels Embryonentest identifiziert wurden.

Für die eigentlichen Untersuchungen des Infektionsverlaufes wurden zehn verschiedene Sorten ausgewählt und jeweils in drei Wiederholungen untersucht. Daraus ergibt sich ein Probenumfang von 150, da jeweils die letzten drei Sprossknoten und die letzten beiden voll entwickelten Blätter beprobt wurden, um den Infektionsverlauf in der Pflanze zu charakterisieren und einen Zusammenhang zwischen der Wirkung der einzelnen Resistenzgene auf die Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze zu ermitteln.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Flugbrand bei Gerste ist eine Krankheit, die vorwiegend im ökologischen Landbau die Erzeugung von qualitativ hochwertigem Saatgut beeinträchtigt. Für die Anerkennung eines Vermehrungsbestandes dürfen höchstens fünf befallene Ähren je 150 m² vorhanden sein. Darüber hinaus werden Feldbestände nicht anerkannt, aus denen flugbrandkranke Pflanzen entfernt worden sind. Feldbestände werden gleichfalls nicht anerkannt, wenn zum Zeitpunkt der Infektionsmöglichkeit im Umkreis von 50 m Bestände der gleichen Fruchtart mit mehr als 15 gleichzeitig stäubenden Flugbrandpflanzen je 150 m² vorkommen.

Im konventionellen Anbau kann der Flugbrand durch Saatgutbeizung bislang gut bekämpft werden. Kostendruck und strengere Pflanzenschutzrichtlinien werden jedoch in Zukunft die Vorteile resistenter Sorten noch stärker zum Tragen bringen. Ein weiterer Aspekt ist, dass ökologisch erzeugte Produkte, insbesondere Öko-Braugerste, nicht in ausreichenden Mengen in Deutschland produziert wird und daher Mälzereien gezwungen sind, den Rohstoff aus anderen Ländern zu beziehen. Daher ist eine Verbreitung des Sommergerstenanbaus im ökologischen Landbau innerhalb Deutschlands notwendig, um die gestiegene Nachfrage zu decken. Die zu erfüllende Voraussetzung besteht in der Bereitstellung von geeigneten Sorten.

Bisher sind einige monogene Resistenzen gegen Flugbrand bei Gerste charakterisiert. In Deutschland zeigt das Gen Un6 in der Sorte Steffi regional noch gute Wirksamkeit, scheint jedoch in einigen Anbaugebieten bereits von virulenten Flugbrandrassen überwunden zu sein. Die Resistenz Un8 zeigt noch eine gute Wirksamkeit, scheint jedoch nach Beobachtungen aus Versuchen und aus der Praxis mit einer Anfälligkeit gegen den Gerstenhartbrand gekoppelt zu sein. Somit ist die Resistenzzüchtung deutlich erschwert, obwohl für das Gen gekoppelte Marker publiziert sind. Von anderen Resistenzquellen ist bislang nicht bekannt, ob sie die bereits gut charakterisierten Gene besitzen oder neue bzw. eine Kombination aus beiden. Weitere Resistenzquellen sind beschrieben z.B. Gabor und Thomas (1987), wurden jedoch bislang in Deutschland nicht erfolgreich züchterisch eingesetzt. Müller et al. (2005), haben ein Sortiment von Gerstengenotypen auf Toleranz gegenüber Flugbrand geprüft. Parallel dazu wurden diese Genotypen an der LfL mit einem Set von SNP Markern gesichtet. Jedoch konnte durch diese Versuche kein neues Gen identifiziert

werden. Es sind noch eine Reihe weiterer Resistenzdonoren aus Genbanken oder dem europäischen Gerstenpool verfügbar, welche gute Toleranzen gegen Flugbrand zeigen. Dieses Material wurde allerdings bisher weder mit Markern noch in verlässlichen Versuchen auf Flugbrandtoleranz geprüft. Der Nachweis, ob es sich um verschiedene Allele desselben Locus oder um unterschiedliche Resistenzloci handelt, kann nur durch das Aufbrechen der Kopplung in einer spaltenden Kreuzungsnachkommenschaft erreicht werden.

Infektionsnachweis und Gewächshaustest

Der komplizierte Nachweis der Infektion und die Untersuchung auf Resistenz gegen den Erreger erschwert die gezielte Selektion auf tolerante Genotypen in der Züchtung. Für den Nachweis sind bisher zwei Generationen notwendig Ein einfacher und frühzeitiger Test, etwa durch ein PCR-basiertes Verfahren könnte die Selektion und damit die Entwicklung von Sorten deutlich beschleunigen. Dazu soll im Projekt ein PCR Test an infizierten Jungpflanzen durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich der Pilz aus befallenen Körnern bis in die Pflanze weiterentwickelt. Da einer der Resistenzfaktoren das Wachstum des Pilzes aus dem befallenen Korn in die Pflanze verhindert, wäre dies eine sehr effiziente Möglichkeit, den Befall bzw. die Resistenz zu diagnostizieren. Der Resistenztest im Gewächshaus nach Wunderle et al. (2012) wurde 2014 an der LfL etabliert, so dass Zuchtlinien und spaltende Nachkommenschaften reproduzierbar untersucht werden können. Diese Methode erlaubt den Nachweis des Befalls bereits in frühen Entwicklungsstadien und könnte so die Zeit für den Resistenznachweis um mehrere Wochen verkürzen. Außerdem sind bisher zwei Typen der Resistenz nachgewiesen. Der eine Typ verhindert die Ausbreitung des Myzels vom befallenen Samenkorn in der Pflanze. Der zweite Resistenztyp verhindert bereits das Wachstum des Erregers im Embryo befallener Körner. Eine Quantifizierung mittels qPCR könnte Aufschluss darüber geben, welches Resistenzgen, welchen Typen von Resistenz ermöglicht und es können vertiefte Kenntnisse über die Mechanismen der Resistenz gewonnen werden.

Epidemiologie und Lebenszyklus von *Ustilago nuda*

Flugbrand (*Ustilago nuda*) ist ein samenbürtiger Pilz, dessen Dauerhyphen im Embryo des Kornes überdauern und mit dem Auskeimen des Kornes zu wachsen beginnen. Während der Keimung sind Temperaturen von 20-30 °C für das Pilzwachstum optimal. Liegen die Temperaturen während der Keimung um die 0 °C, so ist der Pilz nicht in der Lage mitzuwachsen, die Pflanze bleibt latent und bildet keine Symptome aus. Eine hohe

Luftfeuchtigkeit fördert die Infektion. Nach Oertel (1955) konnte bei einer Luftfeuchtigkeit zwischen 56-58 % ein Brandährenbefall von 94 % festgestellt werden, verglichen mit einer Luftfeuchtigkeit von 11-30 %, bei der nur etwa 22 % der Ähren Symptome zeigten. Die Optimaltemperatur während der Infektion mit Brandsporen wird mit 18-20 °C angegeben, bei gleichzeitig hoher Luftfeuchte von 80-100 %. Kühles Wetter hingegen verlängert die Blütezeit und führt somit ebenfalls zu einer erhöhten Infektionsmöglichkeit.

Infektion während der **Blüte**:

Die Brandsporen, Teleutosporen, 5-8 µm, diploider Nuclues, (Neergard 1988) werden mit dem Verbreitungsvektor Wind bis zu 150 m weit an gesunde Ähren getragen. Gelangen die Sporen auf eine Blüte, so keimen diese auf dem Fruchtknoten aus und bilden ein haploides Promycel (schlauchförmige, septierte, oft rudimentäre Basidie, deren vier Zellen seitlich Basidiosporen abschnüren). Daraus entstehen hefeartige Sproßzellen, welche kopulieren. Ausgehend von diesen dikaryotischen Zellen bildet sich ein Paarkernmycel, welche in Richtung des sich entwickelnden Scutellums (Schildchen: Saugschicht zwischen Keim und Innenkorn des Samens) und Embryos wachsen (Dauerhyphen im Embryo sind verdickt und knorrig). Dort sind diese nach Konzak (1953) und Malik und Batts (1960) ausschließlich in den Zellzwischenräumen zu beobachten. Es entsteht ein ausdauerndes Ruhezmyzel, deren Wachstum erst wieder mit der Auskeimung des Kornes beginnt (Batts 1955)

Infektionsverlauf in der Pflanze:

Keimt das infizierte Korn, wachsen die Pilzhypen ab dem 5.-7. Tag nach der Aussaat in den Vegetationspunkt ein. Diese Hypen konnten in den Untersuchungen von Wunderle (2013) nicht im Endosperm nachgewiesen werden. Nach etwa 10-14 Tagen nach Keimbeginn ist der Pilz nicht mehr in der Lage, den Bestockungsknoten zu durchwachsen (Wunderle 2013), d.h. der Pilz muss so schnell wie möglich den Vegetationspunkt erreichen. Der Pilz wächst anfangs unter starker Verzweigung in das Zellgefüge ein. Wachsen die Hypen verspätet in die sich entwickelnde Ährenanlage ein, so kann ein distales, zielgerichtetes in die Ährenanlage, parallel sowie senkrecht zur Längsachse fortschreitendes Wachstum beobachtet werden (Wunderle 2013). Der Pilz wird passiv durch die Streckung der Internodien während des Schossens nach oben transportiert (Batts und Jeater 1958; Malik und Batts 1960; Wunderle 2013). Ausgehend von den Knoten wächst der Pilz hauptsächlich im Leitgewebe (inter- und intrazellulär) in die Blattscheide ein (Wunderle 2013).

Die Menge und Dichte an Hyphen nimmt nach Wunderle (2013) im Verlauf der Vegetationsperiode in der sich entwickelnden Ährenanlage und dem darunter liegenden meristematischen Gewebe zu. Es entsteht ein dichtes Hyphennetzwerk, von welchem ausgehend Hyphen in die Blattprimordien einwachsen. Die Abbildung 1 stellt die beschriebene Ausbreitung des Pilzes da.

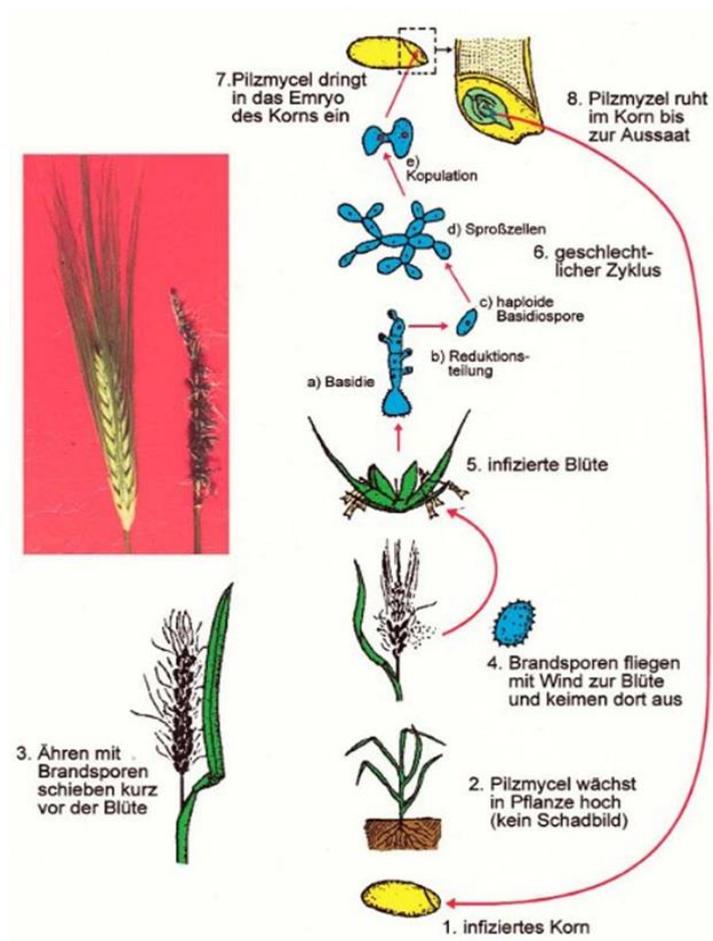


Abbildung 1: Entwicklungszyklus *Ustilago nuda* (Agrarinfos.de 2020)

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

Das verwendete Pflanzenmaterial variierte in den unterschiedlichen Testungen. Im Feldversuch wurde das Kreuzungssortiment mit 54 Genotypen getestet. Die Testungen des Donorensortiments erfolgten mit 82 Genotypen. In einem weiteren Versuch wurden 5 DH-Populationen getestet, mit jeweils 25 Linien. Für die qPCR wurden 10 Sorten mit verschiedenen Resistenzgenen untersucht. Detaillierte Informationen zu den verschiedenen Sorten und Linien der einzelnen Testungen befinden sich im Anhang

Die Tabelle 2 stellt die Geräte und Materialien dar, die in den einzelnen Versuchen verwendet wurden.

Tabelle 2: Material und Geräte, die für die Resistenztests und die qPCR verwendet wurden

Material/ Geräte	Hersteller oder Lieferant
Resistenztests:	
Tween20	Merck Chemicals GmbH
Spritzen und Kanülen	B. Braun Deutschland GmbH & Co KG
Luftbefeuchter HR 15 Profi (1-1,5 l/h)	My Smokey – Onlineshop
Infektionsverlauf (qPCR):	
NucleoSpin Plant II (Extraktionskit)	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
Primer (ITsuf, ITsur, IThf, IThr)	Eurofins Genomics
Kugelmühle (Grinder GT200)	Zefa-Laborservice GmbH
AriaMx Real-time PCR System	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG
qPCR Brilliant III SYBR MM with ROX	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG
AriaMx 96 well plates, skirted and low profil + optical strip caps	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG

3.2 Resistenztests

Für die Durchführung eines Resistenztests sind zwei aufeinander folgende Wachstumszyklen der Gerste notwendig. Die erste Generation wird nach dem Ährenschieben (BBCH 59) infiziert und die daraus resultierende 2. Generation wird auf Brandähren bonitiert.

Die Infektionsmethode wurde nach Poehlmann (1945) durchgeführt. Für die Infektionen wurde jeden Tag eine frische Sporensuspension angesetzt, die eine Konzentration von 30.000 Sporen/ml enthält. Diese Konzentration wurde gewählt, um einerseits einer Überinfektion und demnach einer Ausbildung von Kümmerkörnern vorzubeugen und andererseits um einer verminderten Keimrate zu entgehen (Wunderle und Koch 2009). Der Sporensuspension wurde 0,01 % „Tween 20“ hinzugefügt, um die Oberflächenspannung zu verringern. Anschließend wurde die Suspension langsam durch die Deckspelze direkt auf den Fruchtknoten appliziert, mittels Injektionsspritze (20 G x 1 ½), bis aus der Blüte etwas von der Lösung wieder austritt (Abbildung 2). Die Narbe darf dabei nicht beschädigt werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 59 ist die Infektion am erfolgreichsten. Die Staubbeutel sollen eine grün-gelbliche Farbe aufweisen. Erfolgt die Infektion zu früh oder zu spät, kann die Spore nicht in den Embryo einwachsen. Die Luftfeuchtigkeit während der Infektion spielt eine entscheidende Rolle. Diese sollte bei 80 – 90 % liegen und zusätzlich eine Temperatur von 23 – 25 °C gegeben sein. Die Rahmenbedingungen für die zweite Generation bedürfen keiner besonderen Steuerung. Allerdings sollte nach der Keimung für einen Zeitraum von ca. drei Wochen eine Vernalisation durchgeführt werden. Außerdem wurde die zweite Generation in allen Versuchen in drei technischen Wiederholungen untersucht.



Abbildung 2: Infektionsmethode nach Poehlmann (1945)

Die Sammlung und Aufbereitung aller erhobenen Boniturdaten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit „R-Studio“ unter Anwendung des Paketes „ggplot2“ (Wickham

2016). Die statistische Auswertung der phänotypischen Daten wurde ebenfalls mit dem Statistikprogramm „R-Studio“ durchgeführt. Es wurde eine Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Test durchgeführt unter der Berücksichtigung der jeweiligen Mittelwerte.

3.3 Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie

Das Donorensortiment wurde mit drei vorhandenen Markern untersucht. Zwei Un8-Marker wurden aus den von Zang et al. (2015) publizierten Sequenzen abgeleitet. Ein Un6-Marker wurde in früheren Projekten an der LfL entwickelt. Der Un6-Marker „EBmac541“ wurde mit einer anderen Population entwickelt und ist noch nicht validiert.

Darüber hinaus wurde das „Donorensortiment Wiederholung 2“ auch mittels 50K Illumina Infinium Chip von der TraitGenetics GmbH getestet und eine GWAS durchgeführt. Die GWAS erfolgte mit dem Programm R (Version 3.2.2) und den dazugehörigen Paketen Synbreed (Wimmer et al. 2012) und GenABEL (Aulchenko et al. 2007). Zur Verringerung einer Alphafehler-Inflation bei multiplen Vergleichen wurden Korrekturen des p-Wertes durchgeführt. Diese erfolgten einerseits nach Benjamini-Hochberg (Benjamini und Hochberg 1995) und zusätzlich nach Bonferroni-Holm (Holm 1979). Der genotypische Datensatz für die GWAS bestand aus den 44.040 Markern des 50k Illumina Infinium Chip (Bayer et al. 2017). Bei der GWAS wurden Marker mit >10 % fehlenden Datenpunkten, redundante Marker und Marker mit fixiertem Allel entfernt, sodass sich die Gesamtzahl der Marker, die in der GWAS Anwendung finden, auf 16.933 beläuft.

In Zusammenarbeit mit dem Genomanalyselabor IPZ 1b wurden in der GWAS assoziierte 50K-Marker auf KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) umgesetzt und die funktionierenden Marker an einem größeren Set validiert. Für zehn assoziierte Marker wurden KASP-Primer gelegt. Die Primer wurden jeweils an einem Testset von 24 Proben getestet, das individuell für den jeweiligen Primer zusammengestellt wurde. Jedes Set bestand aus Genotypen, die mittels des 50K-Chips analysiert worden waren, ergänzt um negativ Kontrollen und künstliche Mischproben (Heterozygote). Die KASP-Läufe wurden mit dem PACE™ Genotyping Master Mix (3CR Bioscience) nach Herstellerangaben auf einem CFX Touch RealTime PCR Detection System (Bio-Rad) durchgeführt.

3.4 Untersuchung des Infektionsverlaufs

Für die Untersuchung des Infektionsverlaufs des Pilzes in der Gerstenpflanze wurden zehn verschiedene zweizeilige (zz) Genotypen ausgewählt; Barke, Grace, DZB1019c01, Jet,

Pirona, DZB1122m, Isense, DZB1040e, MMR12 (Odilia), DZB0809m. Die Sorten Barke und Grace sind anfällig und die weiteren zeigen eine Resistenz auf (Tabelle 3). Die Resistenzen der Sorten sind verschiedenen Ursprungs und werden durch das jeweilige Kürzel genauer beschrieben. Eine Übersicht der Kürzel befindet sich im Anhang (Tabelle 7). Diese Genotypen wurden ausgewählt, damit ein weit gefächertes Screening der Resistenzen erfolgt.

Tabelle 3: Sorten und Stämme, die für die Untersuchung des Infektionsverlaufs verwendet wurden

Genotyp	Zeiligkeit	Resistenzquelle
Barke	zz	(anfällig)
Grace	zz	(anfällig)
DZB1019c01	zz	UnL/8
Jet	zz	UnJ
Pirona	zz	Un8
DZB1122m	zz	Un8
Isense	zz	Un6s
DZB1040e	zz	Un6z
MMR12 (Odilia)	zz	Un6r
DZB0809m	zz	Un6m

Für die Untersuchung des Infektionsverlaufes wurden pro Genotyp drei Knoten und zwei Blätter in jeweils 3 Wiederholungen getestet.

Zum Homogenisieren wurden die Proben drei Tage gefriergetrocknet und mit einer Kugelmühle vermahlen. Anschließend wurden jeweils 20 µg der Probe für die DNA-Extraktion eingewogen. Die DNA-Aufreinigung wurde mit dem NucleoSpin Plant II Kit (5.1 Genomic DNA from plant) der Macherey-Nagel GmbH & Co Kg durchgeführt und umfasst folgende Schritte: Als erstes erfolgt die Zelllysis unter der Verwendung des Buffers PL1 und der RNase, gefolgt von der Filtration. Daran schließt sich die DNA-Bindung unter der Zuhilfenahme des PC-Buffers an. Im nächsten Schritt erfolgt das Waschen und Trocknen der Kieselgel-Membran durch die Verwendung der Buffer PW1 und PW2 sowie dem Zentrifugieren nach jedem waschen. Abschließend wird die DNA mit dem PE Buffer aus der Membran gelöst.

Die qPCR Untersuchungen wurden auf dem AriaMx Real-time PCR Gerät der Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit einem

SYBRGreen Kit (qPCR Brilliant III SYBR MM with ROX) angesetzt (Tabelle 4). 20 µl Reaktionsvolumen beinhalten hierbei 10 µl SYBR, 0,8 µl Primer (forward + reverse), 0,3 µl Reference dye, 7,9 µl Aqua dest. und 1 µl DNA-Lösung. Für jeden Lauf wurden eine Nullkontrolle (NTC), mit 1 µl Aqua dest. anstatt DNA-Lösung, sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Außerdem wurden pro DNA-Probe drei Wiederholungen untersucht.

Tabelle 4: Reaktion mit SYBR Green Kit

Reagenz	Volumen je Reaktionsansatz
qPCR Brilliant III SYBR MM with ROX	10 µl
Primer (forward + reverse)	0,8 µl
Reference dye	0,3 µl
Aqua dest.	7,9 µl
DNA	1 µl

Es wurde folgendes Thermal Profil genutzt:

Die primäre Denaturierung erfolgte 3 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit 5 s bei 95 °C (Denaturierung) und 10 s bei 60 °C (Primerhybridisierung). Abschließend erfolgte ein Zyklus mit 30 s bei 95 °C, 30 s bei 65 °C und 30 s bei 95 °C. Die gesamte qPCR durchläuft 42 Zyklen. Für die Schmelzkurve wurde die Voreinstellung des Cyclers berücksichtigt.

Spezifische *Ustilago nuda* und Gersten Primer wurden nach Wunderle et al. (2012) gewählt ITSuf (*U. nuda* forward): 5' -TGT GGC TCG CAC CTG TCC AAC-3' , ITSur (*U.nuda* reverse): 5' -TTC TCC TTG CGT CGC GCT GT-3' und ITShf (Gerste forward): 5' -ACA CGC TCC CAA CCA CCC TCT-3' , ITShr (Gerste reverse): 5' -ACC ATG CGC TGT GTC CGA CG-3'. Alle genannten Primer basieren auf einer 5.8S ribosomalen RNA Gensequenz.

Die Auswertung der qPCR Ergebnisse erfolgte mit der AriaMx Software 1.7. Verwendet wurde ein einheitlicher SYBR-Threshold von 0,03, um einen einheitlichen Quantification Cycle (Cq-Wert) der Proben zu ermitteln und somit die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Zusätzlich wurde eine Anpassung der Kurven nach dem Algorithmus von Savitzky und Golay (1964) durchgeführt. Im Kapitel „4.3 Untersuchung des Infektionsverlaufs“ sind die Cq-Werte der einzelnen Proben über alle Wiederholungen berücksichtigt. Der Cq (Quantification Cycle) wird in der qPCR anhand der Fluoreszenzkurve bestimmt und fungiert als

Maß für die Genexpression. Der Wert markiert die Position der Amplifikationskurve auf der Zyklusachse und ist proportional zum Logarithmus der anfänglichen Zielkonzentration bei konstanter Amplifikationseffizienz (Tuomi et al. 2010).

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Resistenztests

Es wurden verschiedene Sortimente auf die Anfälligkeit gegenüber Flugbrand geprüft. Abbildung 3 zeigt eine Häufigkeitsverteilung der resistenten und anfälligen Genotypen im „Donorensortimentversuch Wiederholung 1“, „Wiederholung 2“ und dem Feldversuch in Darzau 2018. Aus der Abbildung lässt sich entnehmen, dass unterschiedlich viele Pflanzen in jeder Umwelt berücksichtigt wurden. In Darzau wurden insgesamt 40 Genotypen auf Flugbrandanfälligkeit untersucht und drei erwiesen sich davon als anfällig. In der ersten und zweiten Wiederholung des Donorensortiments wurden jeweils 82 Genotypen untersucht. In der „Wiederholung 1“ zeigten sich 56 Genotypen als resistent und 19 als anfällig. Die restlichen sieben Genotypen haben nicht gekeimt oder es konnte aufgrund der starken Hitzeschädigung keine Bonitur vorgenommen werden (Abbildung 13). In der zweiten Wiederholung konnten vier Genotypen nicht berücksichtigt werden, weil diese nicht gekeimt haben. Ferner wiesen 45 Genotypen keinen Befall auf und 33 zeigten einen Flugbrandbefall. Der Befall jedes Genotyps der drei verschiedenen Orte ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16).

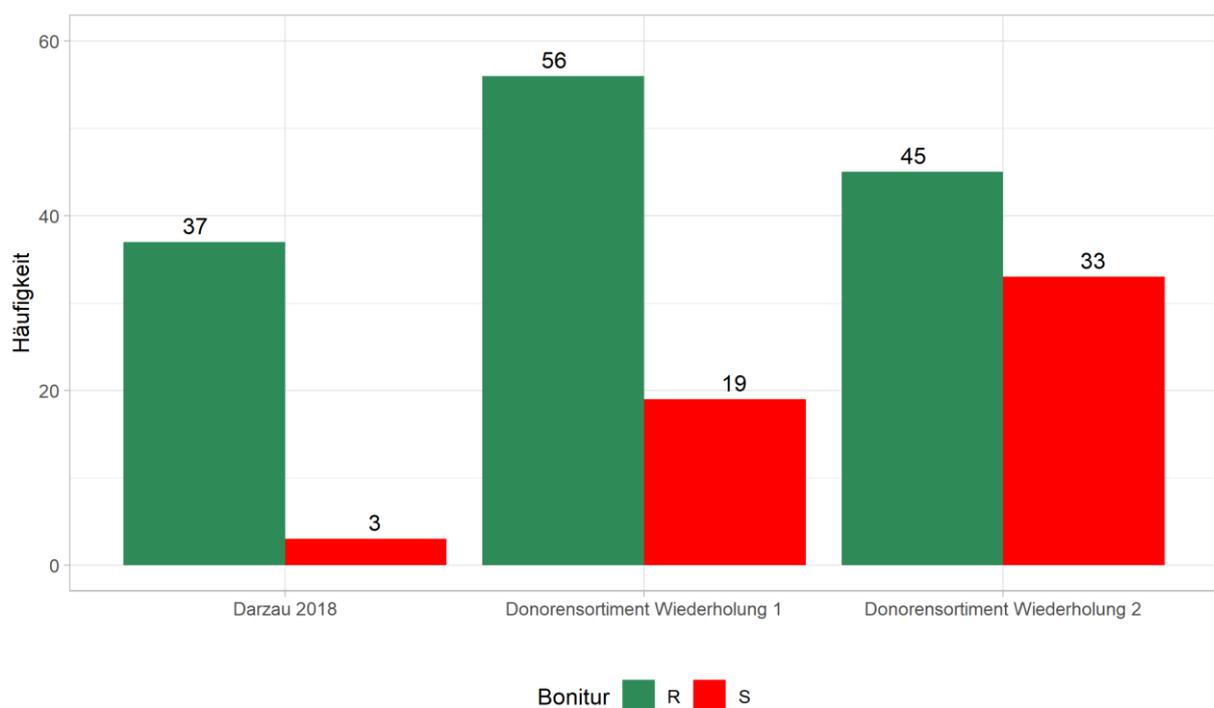


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der resistenten und anfälligen Genotypen im Donorensortimentversuch Wiederholung 1 und 2 und im Feldversuch in Darzau 2018; R = resistent, S = anfällig

Die statistische Auswertung der genannten Daten hat ergeben, dass sich signifikante Unterschiede zwischen der Wiederholung 1 und 2 des Donorensortimentes, sowie zwischen dem Feldversuch in Darzau (2018) und der Wiederholung 2 ergeben. Bei Betrachtung aller untersuchten Genotypen ergibt sich für das Merkmal „Resistenz“ eine Heritabilität von 59%. In einer weiteren Auswertung wurden die 35 Genotypen analysiert, die in allen Umwelten getestet wurden. Es ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen Wiederholung 1 und 2. Außerdem zeigen die Genotypen DZB0101bic, DZB1030t und DZB1148e, die das Resistenzgen Un6 tragen, in der zweiten Wiederholung des Donorensortiments einen Befall (5 – 13%).

In Abbildung 4 ist die Bonitur der 35 Genotypen, die in den Umwelten „Darzau 2018“, „Donorensortimentversuch Wiederholung 1“ und „Wiederholung 2“ getestet wurden dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass in „Darzau 2018“ drei Genotypen einen Befall aufwiesen. In der Wiederholung 1 des Donorensortiments zeigten keine der untersuchten Genotypen einen Befall auf und in der „Wiederholung 2“ zeigten sich sechs der Genotypen als anfällig.

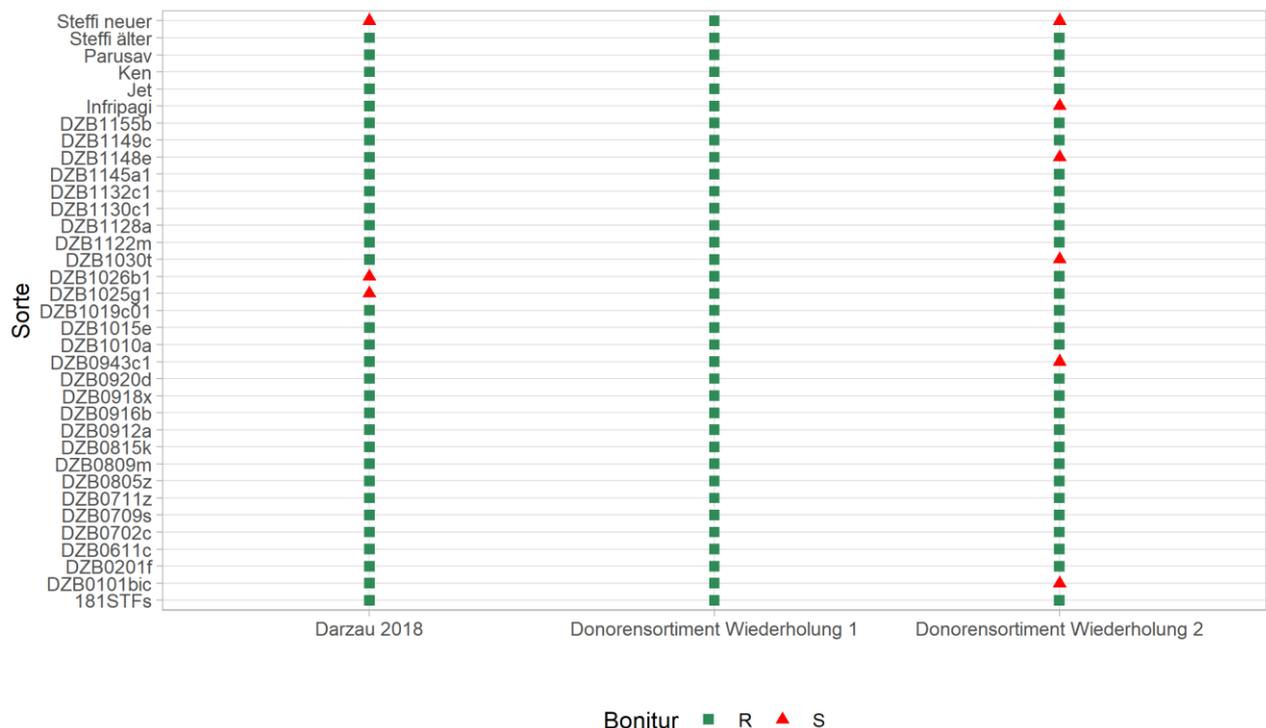


Abbildung 4: Bonitur von 35 Genotypen, die in den drei Umwelten "Darzau 2018", „Donorensortimentversuch Wiederholung 1“ und "Wiederholung 2" getestet wurden; R = resistent, S = anfällig

Im Jahr 2019 wurden unter zertifizierten Ökobedingungen von der GZFD 43 verschiedene F3-Kreuzungsnachkommenschaften im Feldversuch in Darzau getestet. Die Abbildung 5

zeigt den Befall in Prozent im Einzelnen. Im Mittel aller Kreuzungen lag der Befall bei 23%. Außerdem zeigen 15 Nachkommenschaften keinen Befall und die Genotypen DZB1776, DZB1782, DZB1784, DZB1787, DZB1788 und DZB1796 konnten aufgrund verkümmelter Pflanzen nicht bonitiert werden. Den höchsten Befall mit jeweils 67% zeigten „DZB1777“ und „DZB1795“ und den niedrigsten zeigte „DZB1758“ mit 4%. Hinzuzufügen ist, dass aufgrund der trockenen Bedingungen das Befallsniveau niedrig lag, die hochanfällige Infektionslinie erreichte nur ein Drittel des sonst üblichen Niveaus.

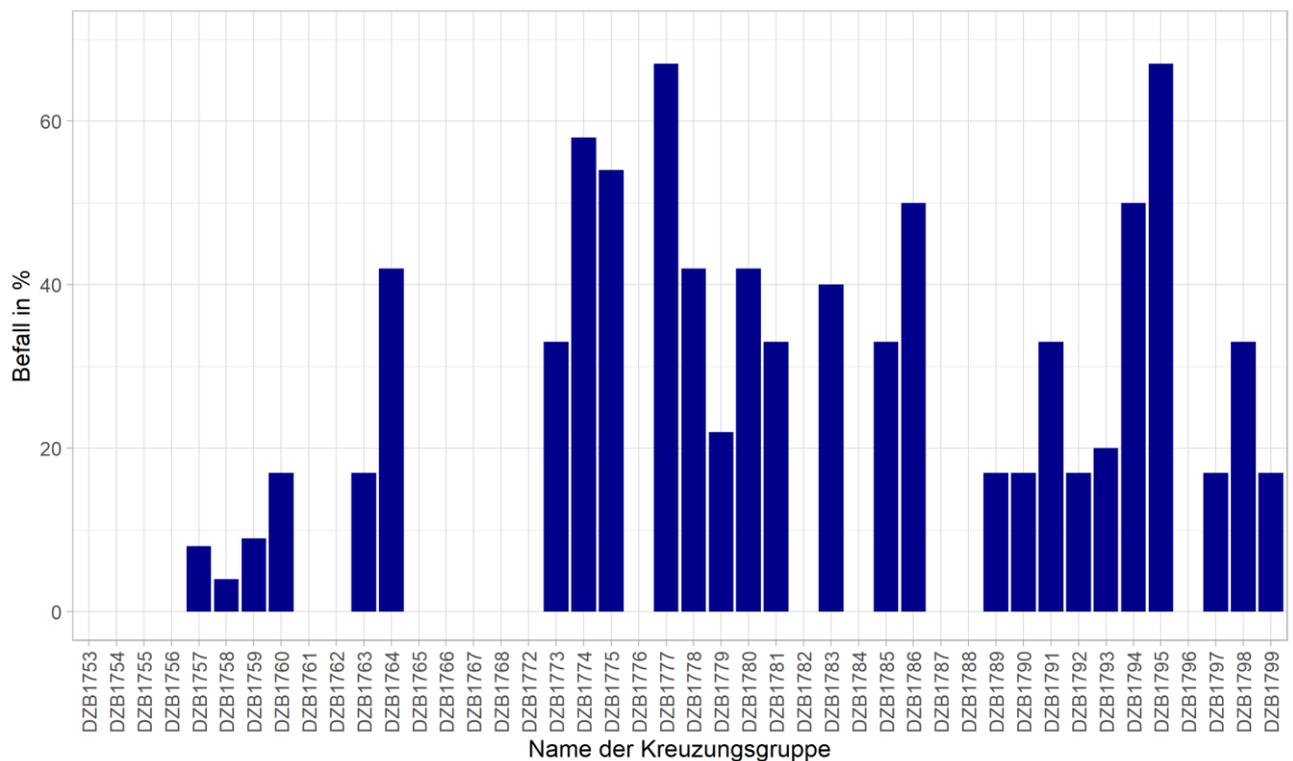


Abbildung 5: Befallsergebnisse der getesteten Kreuzungsgruppen am Standort Darzau 2019 (n=43)

Abschließend wurden in diesem Projekt verschiedene DH-Populationen in zwei Wiederholungen getestet. Die erste Wiederholung lieferte unzureichende Ergebnisse. Aufgrund nicht optimaler Rahmenbedingungen während der Infektion und einer zu geringen Luftfeuchte, konnten keine Flugbrandähren bonitiert werden. Daraufhin wurde eine Poolprobe aus vermeintlich infizierten Körnern der DH-Linien gebildet und mittels Embryontest untersucht, um schlussfolgern zu können, ob diese Körner infiziert waren. Dieser Test zeigte, dass nur ein Anteil von ca. 2,5% der untersuchten Körner Flugbrandmycel aufwies.

Die zweite Wiederholung der DH-Testung lieferte aussagekräftige Ergebnisse. In Tabelle 5 sind die Mittelwerte des prozentualen Befalls für jede DH-Population dargestellt. Es wurde jeweils der Mittelwert der drei technischen Wiederholungen gebildet, da sich zwischen diesen keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die Ergebnisse zeigen, dass Die DH-Population „DZB1758a“ im Mittel den höchsten Befall mit 40% aufweist. Dem Gegenüber steht die Population „DZB1776“ mit einem mittleren Befall von 10% und einem maximalen Befall von 100%. Erwähnenswert ist, dass die Population „DZB1764“ einen maximalen Mittelwert von 72% aufweist und gleichzeitig im Verhältnis die geringste Standardabweichung verzeichnet.

Tabelle 5: Überblick der Mittelwerte der DH-Populationen (2. Wiederholung) im Merkmal „Befall in %“, Min= minimaler Mittelwert, Max= maximaler Mittelwert, STABW= Standardabweichung

DH-Population	Min	Max	Mittelwert	STABW
DZB1753	0	100	14	27
DZB1758a	0	100	40	39
DZB1764	0	72	12	24
DZB1766	0	100	34	42
DZB1776	0	100	10	25

Eine Varianzanalyse der beiden Wiederholungen der DH-Testung ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den phänotypischen Ausprägungen im Merkmal Flugbrandbefall. Allerdings liegt dies vorrangig daran, dass die Infektion der ersten Wiederholung nur unzureichend ausgeprägt war.

4.2 Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie

Die Auswertung für die Markeruntersuchung des Donorensortiments mit den beiden Un8-Markern (T800F4, ABC07753 Scind) und dem Un6-Marker EBmac541 hat verschiedene Übereinstimmungen der phänotypischen Boniturdaten und der genetischen Sequenzen gezeigt. Für den Marker T800F4 zeigt sich eine Übereinstimmung von 60%, Ausfälle betragen 3 % und die Nichtübereinstimmung beträgt 37%. Die Auswertung von ABC07753 Scind zeigt eine Übereinstimmung von 46%, eine Nichtübereinstimmung von 52% und die Ausfälle liegen bei 2%. Die Auswertung des Un6-Markers „EBmac541“ ergab eine

Übereinstimmung von 50%, Ausfälle von 23% und Nichtübereinstimmung von 27% (Abbildung 17). Der Un6-Marker „EBmac541“ wurde in einem früheren Projekt der LfL entwickelt und ist noch nicht validiert. Bei einigen Zuchtstämmen konnte der Phänotyp nicht mit den Markern erklärt werden.

In der GWAS konnten für die Boniturdaten des „Donorensortiments Wiederholung 2“ zehn signifikante Marker, die mit dem Merkmal „Flugbrandresistenz“ assoziiert sind, ermittelt werden. Die Abbildung 6 zeigt den entsprechenden Manhattan Plot.

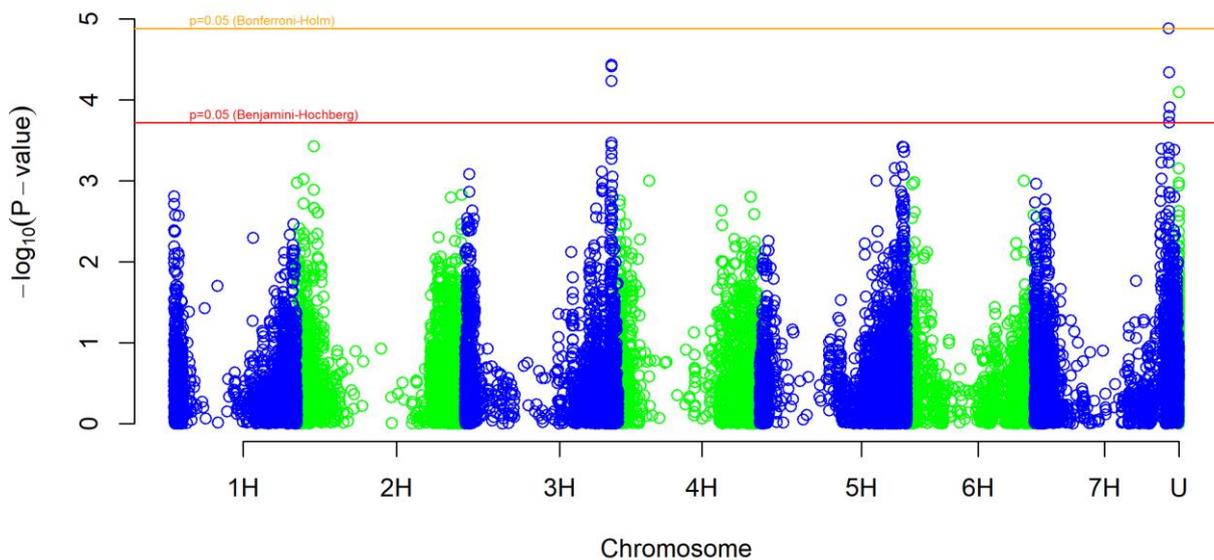


Abbildung 6: Manhattan Plot für das Merkmal Flugbrandresistenz. Die Y-Achse beschreibt das Signifikanzniveau; die X-Achse stellt die sieben Chromosomen da; U= Unbekannte Lokalisierung der Marker; gelbe Linie= p-Wert Korrektur nach Bonferroni-Holm; rote Linie= p-Wert Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Für die genomweite Assoziationsstudie wurden die Boniturdaten des „Donorensortiment Wiederholung 2“ verwendet.

Die Tabelle 6 stellt die signifikanten Marker dar, die in der GWAS ermittelt wurden. Auf dem Chromosom 3H konnten vier Marker detektiert werden. Diese zeigen erklärte phänotypische Varianzen von 22,4% bis 30,1%. Sie liegen im Basenpaarbereich von 667628646 bis 667717687 (decken somit Bereich von 89041bp ab). Zusätzlich konnten auf Chromosom 7H fünf signifikante Marker ermittelt werden, die erklärte phänotypische Varianzen im Bereich von 19,3% bis 26% liefern. Diese Marker umfassen den Abschnitt von 611405335bp bis 616337334. Der Marker SCRI_RS_187742 weist eine unbekannt Lokalisierung auf.

Tabelle 6: Signifikante Marker GWAS

Marker	Chromosom	Position (bp)	R ² (%)
JHI-Hv50k-2016-215304	3H	667628646	30,1
JHI-Hv50k-2016-215315	3H	667708907	23,9
JHI-Hv50k-2016-215317	3H	667717394	22,4
JHI-Hv50k-2016-215320	3H	667717687	23,3
BOPA2_12_30362	7H	611405335	26,0
JHI-Hv50k-2016-499116	7H	614230860	19,5
JHI-Hv50k-2016-499118	7H	614230984	19,3
JHI-Hv50k-2016-499156	7H	614237138	22,8
JHI-Hv50k-2016-499735	7H	616337334	20,5
SCRI_RS_187742	U	0	21,3

Die Etablierung und Validierung der molekularen Marker aus der GWAS hat ergeben, dass von den zehn getesteten Markern vier anwendbar sind. Bei JHI-Hv50k-2016-215317 gab es Probleme mit der Wasserkontrolle, daher ist der Marker nicht auswertbar. JHI-Hv50k-2016-499735 war monomorph. Die Marker JHI-Hv50k-2016-499116, JHI-Hv50k-2016-499118, JHI-Hv50k-2016-499156 und BOPA2_12_30362 stimmten bei den Kontrollen nicht mit den Erwartungen überein. Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch den KASP-Lauf des Markers „JHI_Hv50K_2016_215315“ in 30 Zyklen auf dem genannten Testset.

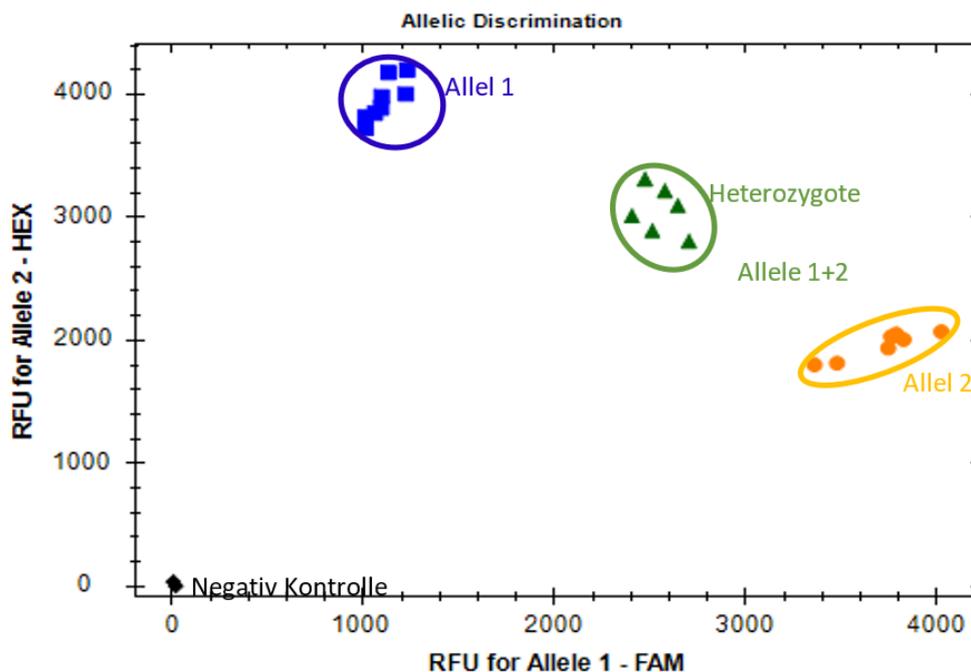
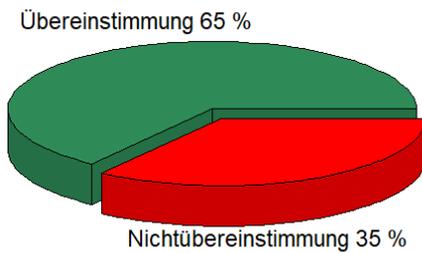


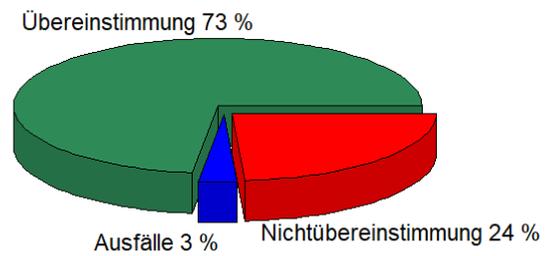
Abbildung 7: KASP-Lauf von JHI_Hv50K_2016_215315 (Zyklus 30) auf dem Testset

Im nächsten Schritt wurden die vier Marker JHI-Hv50k-2016-215304, JHI-Hv50k-2016-215315, JHI-Hv50k-2016-215320 und SCRI_RS_187742 auf ein größeres Set mit 120 Genotypen getestet. Alle vier Marker liefen ohne technische Probleme. Die Auswertung der phänotypischen Boniturdaten und genotypischen Markerdaten der vier Marker ist in Abbildung 8 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der Marker SCRI_RS_187742 Übereinstimmungen von Genotyp und Phänotyp von 65% aufweist und eine Nichtübereinstimmung von 35%. Für den Marker JHI-Hv50k-2016-215304 ergeben sich Übereinstimmungen von 73%, die Ausfälle betragen 3% und die Nichtübereinstimmung liegt bei 24%. Ein ähnliches Verhältnis zeigt sich für den Marker JHI-Hv50k-2016-215315. Für den vierten Marker JHI-Hv50k-2016-215320 liegt die Übereinstimmung von phänotypischen und genotypischen Daten bei 70%, die Ausfälle betragen 7% und die Nichtübereinstimmung liegt bei 23%.

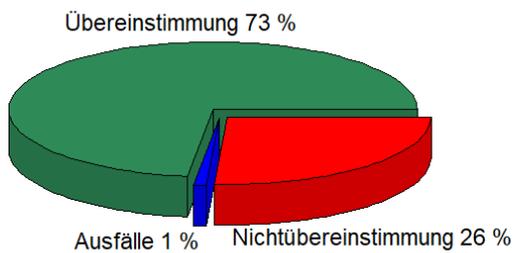
SCRI_RS_187742



JHI-Hv50k-2016-215304



JHI-Hv50k-2016-215315



JHI-Hv50k-2016-215320

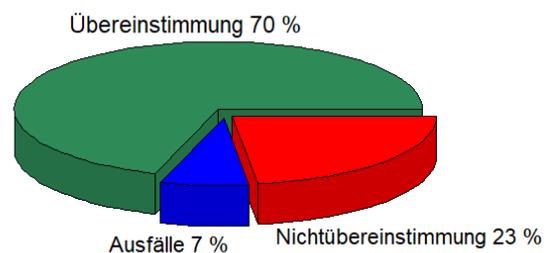


Abbildung 8: Auswertung der phänotypischen Boniturdaten und genotypischen Markerdaten von SCRI_RS_187742, JHI-Hv50k-2016-215304, JHI-Hv50k-2016-215315 und JHI-Hv50k-2016-215320. Grün kennzeichnet den prozentualen Anteil der Übereinstimmungen der Daten zwischen Phänotyp und Genotyp, rot kennzeichnet den prozentualen Anteil an Nichtübereinstimmungen der Daten, blau kennzeichnet den prozentualen Anteil der Ausfälle in der Untersuchung

4.3 Untersuchung des Infektionsverlaufs

In diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden, in welchen Pflanzenteilen sich im Stadium nach dem Ährenschieben Flugbrandmycel befindet. Dazu wurden die letzten drei Halmknoten und die letzten beiden voll entwickelten Blätter mittels qPCR untersucht. Zur Etablierung der Methode wurde eine *U. nuda*-Standardreihe mit 4000 ng, 400 ng, 40 ng und 0 ng *U. nuda*-DNA/ml verwendet. Das gemessene R^2 lag bei 0,8. Die höchste DNA-Konzentration hatte einen Quantifikation Cycle (Cq-Wert) von 11, der Cq-Wert der

Negativkontrolle war > 33. Die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse ergab eine spezifische Schmelztemperatur des Amplifikationsproduktes von 83°C.

Die Untersuchung von Blattproben mittels qPCR hat gezeigt, dass mit der Methode eine gezielte Detektion von *Ustilago nuda* möglich ist. In Abbildung 9 sind exemplarisch die Amplifikationskurven der DNA-Proben 137 bis 150 dargestellt. Die mitgeführte Positivkontrolle weist einen Cq-Wert von 17 auf und die Negativkontrolle einen Wert von 33. Die dazugehörigen Schmelzkurvenanalyse ist in Abbildung 10 abgebildet und auch hier beträgt die spezifische Schmelztemperatur der Amplifikationsprodukte 83°C.

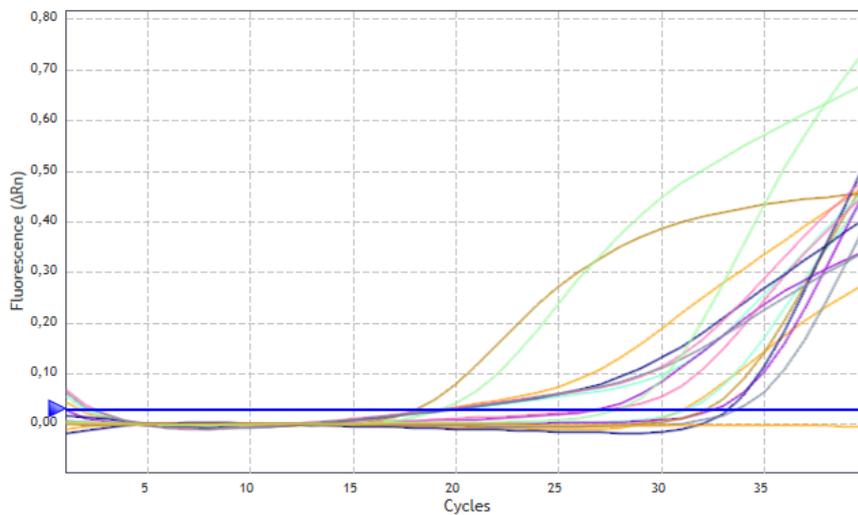


Abbildung 9: Amplifikationskurven der DNA-Proben 137 bis 150

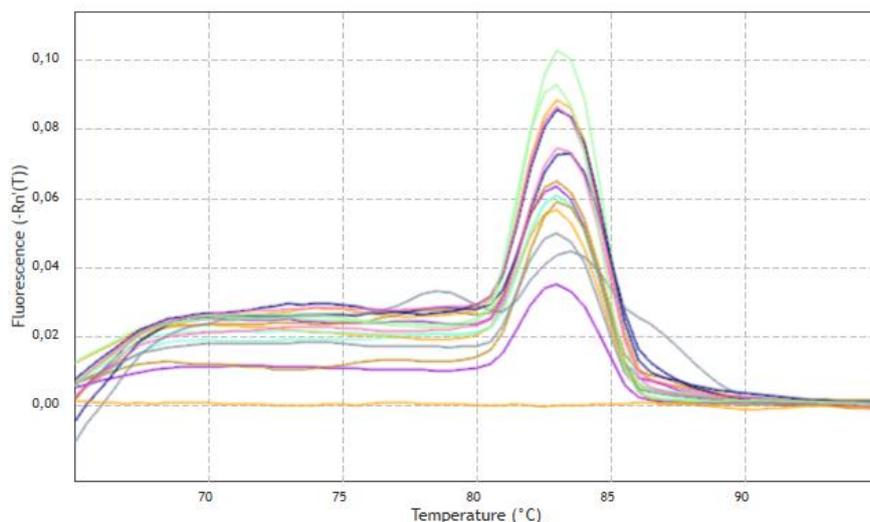


Abbildung 10: Schmelzkurven der DNA-Proben 137 bis 150

In Abbildung 11 sind die Cq-Werte der untersuchten Pflanzenteile in einer Boxplotverteilung dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Werte in „Blatt 1“ und „Blatt 2“ höher sind als die Cq-Werte der verschiedenen Halmknoten. Pflanzenteil „Knoten 3“ besitzt mit 20 den niedrigsten Mittelwert und weist daher die höchsten Gehalte von *U. nuda* auf. Dem gegenüber steht „Blatt 1“ mit einem Mittelwert von 33 und dieser sagt aus, dass sich nur sehr geringe bis keine pilzliche Ziel-DNA nachweisen lässt. Aus der genannten Darstellung lässt sich ableiten, dass die Gehalte an pilzlicher DNA mit zunehmender Entfernung von der Basis abnehmen. Außerdem gibt es zwischen den Wiederholungen keine signifikanten Unterschiede. Ferner unterscheiden sich die Pflanzenteile signifikant in den Cq-Werten. Alle untersuchten Halmknoten zeigen signifikante Unterschiede zu „Blatt 1“ und es bestehen zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen Halmknoten 2 und 3 verglichen mit „Blatt 2“.

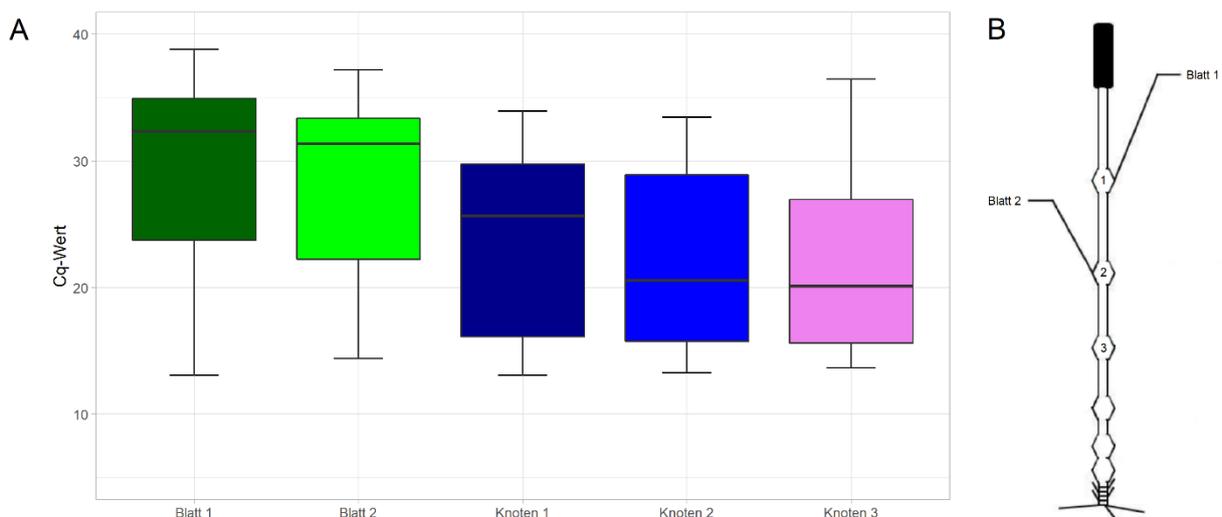


Abbildung 11: A: Boxplots der in der qPCR ermittelten Cq-Werte aufgeteilt nach den untersuchten Pflanzenteilen; B Schematische Darstellung einer ausgewachsenen Gerstenpflanze (verändert nach Kirby und Appleyard 1985) mit den untersuchten Pflanzenteilen

In der Abbildung 12 sind die Cq-Werte der verschiedenen Resistenzquellen in einer Boxplotverteilung abgebildet. In der Betrachtung der Cq-Werte im Hinblick auf die verschiedenen Resistenzquellen lassen sich signifikante Effekte zwischen Un6s und Un6r ermitteln sowie zwischen der Resistenzquelle UnJ und Un6s. Die Abbildung zeigt, dass Sorten mit dem Attribut „anfällig“ die größte Streuung an Cq-Werten aufweisen. Die geringste Streuung der Werte bildet die Resistenzquelle Un6s und diese zeigt gleichzeitig den

niedrigsten mittleren Cq-Wert von 19. Der höchste mittlere Cq-Wert von 33 resultiert aus der Resistenzquelle Un6r.

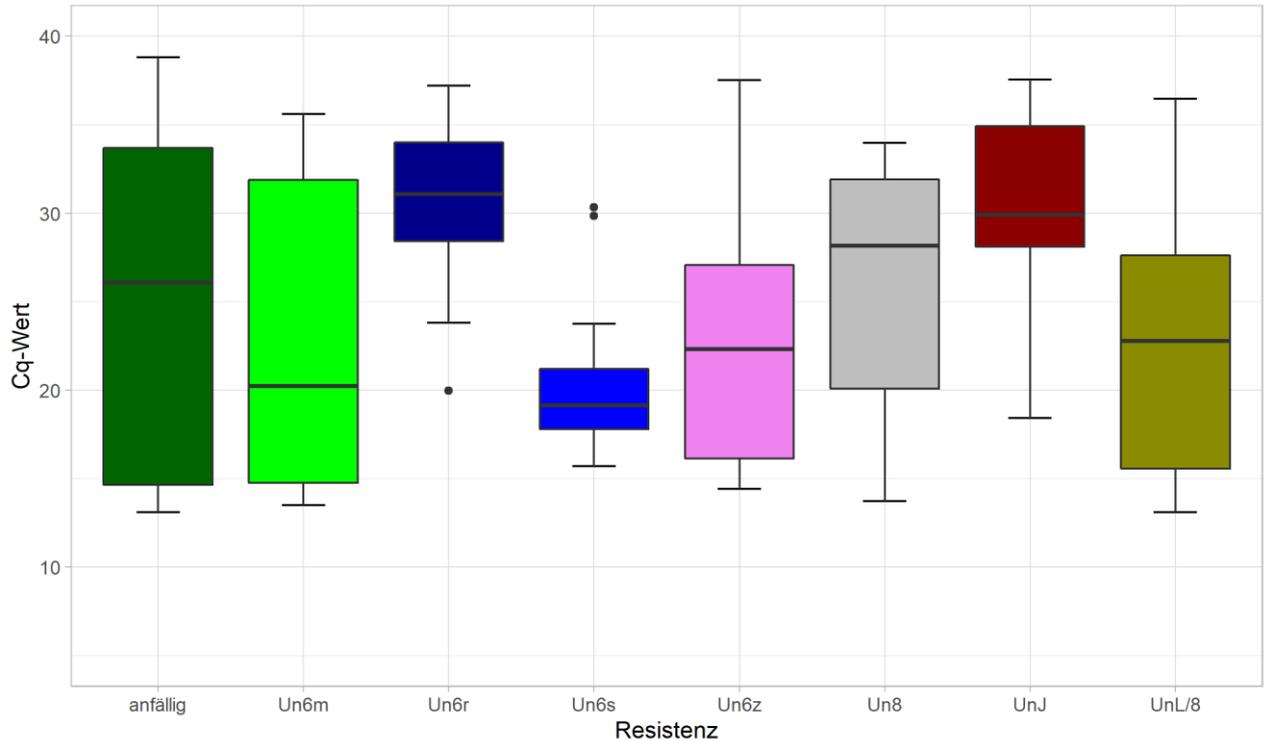


Abbildung 12: Boxplots der Cq-Werte der unterschiedlichen Resistenzquellen

Eine Boxplotverteilung der Cq-Werte über die untersuchten Sorten und Stämme ist in Abbildung 18 im Anhang dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Ausprägung der Cq-Werte ergeben sich nur für „Jet“ und „MMR12“ zur Sorte „Isense“.

5 Diskussion der Ergebnisse

Mit der Einführung systemisch wirkender Fungizide in den 1960er Jahren hat der Flugbrand der Gerste im konventionellen Anbau stark an Bedeutung verloren (Jones und Dhitaphichit 1991). Allerdings führen steigende Anforderungen an Saatgutproduktionssysteme mit minimiertem chemischem Input, das Auftreten von Resistenzen gegenüber chemischen Saatgutbehandlungsmitteln und die zunehmende Nachfrage nach ökologisch erzeugter Gerste zu einem wiederaufkommenden Interesse an dem Pathogen *U. nuda* (Jones und Dhitaphichit 1991; Menzies 2008). Resistenzzüchtung gegen Flugbrand (*Ustilago nuda*) ist sehr aufwendig und erfordert die Inokulation jeder Pflanze (Zang et al. 2015).

Resistenztests

Die Durchführung von Resistenztests benötigt mindestens einen Zeitraum von sechs Monaten und optimale Rahmenbedingungen während der Infektion, um eine erfolgreiche Entwicklung des Pilzes zu erreichen. Die Ergebnisse des Donorensortimentversuches haben gezeigt, dass signifikante Unterschiede zwischen der Wiederholung 1 und 2, sowie zwischen dem Feldversuch in Darzau (2018) und der Wiederholung 2 bestehen. Allerdings konnte in diesem Versuch keine einheitliche Bonitur durchgeführt werden, da aufgrund von starker Hitze die Pflanzen im Gewächshaus sehr geschwächt waren, so dass für die erste Wiederholung lediglich ermittelt werden konnte, ob ein Befall vorliegt oder nicht. Die zweite Wiederholung hingegen konnte differenzierter bonitiert werden und es wurde der prozentuale Befall jedes Genotyps ermittelt. Es fällt auf, dass die Genotypen DZB0101bic, DZB1030t und DZB1148e nur in der Wiederholung 2 des Donorensortiments einen geringen Befall (5 – 13%) zeigen, außerdem tragen sie das Resistenzgen Un6 und es wurde daher erwartet, dass diese Genotypen resistent seien. Daraus lässt sich ableiten, dass das Gen keine verlässliche Resistenzquelle darstellt. Allerdings kann dennoch angenommen werden, dass der Befall durch das Gen gemindert wird. Die Varianzanalyse der phänotypischen Daten der 35 Genotypen aus den drei Umwelten „Donorensortiment Wiederholung 1“, „Donorensortiment Wiederholung 2“ und „Darzau 2018“ hat gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen „Donorensortiment Wiederholung 1“ und „Wiederholung 2“ besteht. Die Ursache liegt sehr wahrscheinlich an den unterschiedlichen Temperaturbedingungen während der Infektion.

Schlussfolgern lässt sich auf Grundlage der Ergebnisse somit, dass die Genotyp x Umwelt Interaktion bei der Ausbildung der Resistenz eine entscheidende Rolle einnimmt. Damit wird die Aussage von Müller (2006) bestätigt. Sehr trockene Witterungsbedingungen während der Blüte reduzieren die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber Flugbrand, weil die Keimung der Sporen eine hohe Feuchtigkeit benötigt (Oertel 1955). Dies zeigen auch die Ergebnisse des Feldversuchs aus dem Anbaujahr 2019, denn die hochanfällige Infektionslinie erreichte nur ein Drittel des sonst üblichen Befallsniveaus, aufgrund der trockenen Bedingungen. Zusätzlich kann vermutet werden, dass die Resistenz nur bei optimalen Wachstumsbedingungen für die Pflanze besteht, da anderenfalls der Pilz die Möglichkeit hat, in den Vegetationspunkt einzuwachsen. Außerdem zeigen einige Genotypen eine Resistenz gegen eine normalvirulente Flugbrandrasse und einen Befall bei der Testung mit einer hochvirulenten Rasse.

Die Ergebnisse aus den Feldversuchen in Darzau 2018 und 2019 lassen vermuten, dass die Resistenzquelle UnCZA die Resistenzgene Un8, Un6u und Un6z enthält. Außerdem lässt sich schlussfolgern, dass Un6z ungleich der Resistenzquelle Un6r ist. UnCZL unterscheidet sich von allen Resistenzquellen (Un8, Un6z, Un6r, Un6s und Un6u). Außerdem haben die Feldversuche gezeigt, dass Un8 rezessiv ist. Ebenfalls hat sich in den Feldversuchen die Resistenz aus Jet in UnCZJ als nicht resistent gegenüber dem Un6z virulenten Zuchtstamm gezeigt. Dies zeigt, dass diese Resistenz mindestens bei hoch virulenten Rassen nicht mehr wirksam ist. In den Gewächshausversuchen zeigt sich Jet allerdings weiterhin als resistent. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um verschiedene Flugbrandstämme mit unterschiedlicher Virulenz handelt. Diese Ergebnisse verdeutlichen die komplizierte Selektion auf das Merkmal Flugbrandtoleranz.

Die DH-Testung lieferte in der ersten Wiederholung keine aussagekräftigen Ergebnisse, da sich in der zweiten Generation auch bei der anfälligen Sorte keine Flugbrandähren gebildet haben. Dies könnte einerseits an nicht optimalen Rahmenbedingungen während der Infektion liegen, andererseits könnten die Sporen aufgrund von langer Lagerung keine ausreichende Keimfähigkeit gehabt haben. Bei Raumtemperatur sinkt die Keimfähigkeit nach wenigen Monaten stark ab und erlischt laut Tapke (1929) nach einem Jahr. Bei Temperaturen im Bereich von 0 – 2 °C können die Sporen eine Keimfähigkeit von 50% erhalten über einen Zeitraum von bis zu 9 Monaten. Die zweite Wiederholung des Experiments hingegen lieferte aussagekräftige Ergebnisse. Im Mittel zeigte die DH-Population „DZB1776“ den geringsten Befall von 10%. Gefolgt von der „DZB1764“ mit einem Befall

von 12%. Einen Befall von durchschnittlich 14% lieferte die DH-Population „DZB1753“. In einer Publikation von Müller (2006) wurde beobachtet, dass der Genotyp „CDC Freedom“ mit dem Resistenzgen Un8 eine geringere Keimfähigkeit zeigt. Ähnliche Beobachtungen wurden in der ersten Wiederholung des DH-Versuchs für die Population „DZB1753“ mit der Resistenzquelle „UnAxUn8“ gemacht. Allerdings konnte in der zweiten Wiederholung keine verminderte Keimfähigkeit beobachtet werden. Festgestellt werden konnte in der zweiten Wiederholung der DH-Testung und auch in den Testungen des Donorensortiments, dass nicht immer alle Triebe befallen waren. Auffällig war zusätzlich, dass bei einem anfälligen Genotyp, gleichzeitig oft eine geringere Keimung zu beobachten war. Allerdings konnten in der Varianzanalyse für diese Beobachtung keine signifikanten Effekte ermittelt werden. Ergänzend lässt sich aus einer Publikation von Zang et al. (2015) wiedergeben, dass Genotypen, die eine Un8 Resistenz aufweisen, bei einem Befall mit Flugbrand teilweise ein beeinträchtigtes Pflanzenwachstum zeigen. Das kommt daher, weil es bei einem Befall zu einer Überexpression von CKX1 und CKX2.1 Genen kommt. Diese Gene zerstören die Cytokinine des Pathogens und auch die der Pflanze.

Markeruntersuchung und Genomweite Assoziationsstudie

Die Markeruntersuchung mit den beiden Un8-Markern und dem Un6 Marker haben gezeigt, dass bei einigen Zuchtstämmen der Phänotyp nicht mit den Markern erklärt werden konnte. Aus diesem Grund sind sie potenzielle Träger eines anderen Resistenzgens. Des Weiteren lagen die Übereinstimmungen von phänotypischen- und genotypischen Markerdaten für alle Marker im Bereich zwischen 46 bis 60%.

Die Untersuchung des Donorensortiments mit dem 50K-Chip (Bayer et al. 2017) wurde für die genomweite Assoziationsstudie verwendet. Die Verrechnung hat ergeben, dass zehn signifikante Marker mit dem Merkmal Flugbrandresistenz assoziiert sind. Die Etablierung und Validierung der molekularen Marker aus der GWAS hat ergeben, dass von diesen zehn getesteten Markern vier technisch funktionieren. Es handelt sich um drei Marker auf Chromosom 3H und um einen Marker mit einer unbekanntem Lokalisierung. Es lässt sich schlussfolgern, dass die genannten Marker auf Chromosom 3H das Resistenzgen Un6 detektieren, weil Menzies et al. (2010) das Gen dort lokalisiert haben. Der Marker mit unbekannter Lokalisierung könnte das Resistenzgen Un8 detektieren. Zang et al. (2015) veröffentlichten, dass es auf dem Chromosomenarm 1HL liegt und Künzel et al. (2000) stellten dies ebenfalls fest. Beide Studien positionieren das Gen Nähe des distalen Endes des Chromosomenarms.

Untersuchung des Infektionsverlaufs und qPCR

Im Projekt ist es gelungen die qPCR als valide Nachweismethode zu etablieren und an Proben aus der Praxis zu testen. Es wurde eine Quantifizierung der Proben untereinander vorgenommen und der Cq-Wert berücksichtigt. Ab einem solchen Wert von > 33 kann angenommen werden, dass keine pilzliche DNA in der Probe vorhanden ist, da die jeweils mitgeführte Negativkontrolle diesen Wert aufweist. Die Positivkontrolle ergab einen Wert von 17. Es hat sich in den Ergebnissen gezeigt, dass sich die Pflanzenteile signifikant in den Cq-Werten unterscheiden. Alle untersuchten Halmknoten zeigen signifikante Unterschiede zu „Blatt 1“ und es bestehen zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen Halmknoten 2 und 3 verglichen mit „Blatt 2“. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gehalte an pilzlicher DNA mit zunehmender Entfernung von der Basis abnehmen und in den Blättern fast keine DNA nachzuweisen ist. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme von Agrios (2005), wonach der Pilz dem Vegetationspunkt hinterher wächst bis zum Ährenschieben. Dem gegenüber steht die Aussage von Batts und Jeater (1958) und Malik und Batts (1960), die publiziert haben, dass der Pilz durch die Streckung der Internodien beim Schossen passiv nach oben transportiert wird. Allerdings stellt sich die Frage, warum trotz eines Nachweises von pilzlicher Ziel-DNA in den Proben keine Brandähren ausgebildet wurden. Es besteht daher die Vermutung, dass bei trockener Witterung oder hohen Temperaturen im Gewächshaus der Befall latent verläuft, was die Selektion auf tolerante bzw. resistente Genotypen deutlich erschwert. Aussagekräftige Korrelationen zwischen der Verteilung des Pilzes in der Pflanze und den einzelnen Resistenzgenen ließen sich nicht ermitteln.

Fazit und Ausblick

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die entwickelten Marker für eine gezielte Selektion genutzt werden können und die Resistenztests in den verschiedenen Sortimenten wichtige Antworten liefern, welche Sorten oder Stämme sich als Kreuzungspartner für die Resistenzzüchtung eignen. Zu diesen zählen beispielsweise die Sorten Parusav, I-sense und Ken. Zusätzlich stellt der Nachweis von *Ustilago nuda* mit der qPCR eine verlässliche Methode dar. Allerdings bestehen noch Fragen im Hinblick auf die Virulenz der Flugbrandrassen. Es ist nicht geklärt, inwiefern sich die Rassen voneinander unterscheiden und ob die bekannten Resistenzgene Un6 und Un8 wirksam gegen die verschiedenen Rassen sind.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die gewonnenen Erkenntnisse können direkt auf das Gerstenzuchtprogramm der LfL und anderer Züchter angewendet werden. Die Wirksamkeit verschiedener Resistenzquellen wurde genauer betrachtet und dieses Wissen vereinfacht zukünftige Selektionsentscheidungen. Damit kommen diese Ergebnisse nicht nur den mit der LfL kooperierenden Züchtern zugute. Außerdem konnten durch die Versuche potenzielle Kreuzungspartner ermittelt werden, die ebenfalls direkt im Zuchtprogramm berücksichtigt werden. Die Entwicklung von molekularen Markern trägt zu einer effizienten und frühzeitigen Selektion bei. Auch die Etablierung der qPCR als Nachweismethode bietet einen großen Mehrwert für die Diagnose des Pilzbefalls, da eine frühzeitige Untersuchung des Pflanzenmaterials erfolgen kann.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Bereits zu Beginn des Projektes kam es zu leichten Verzögerungen, da auf Grund des schlechten Infektionserfolges in vorangegangenen Projekten, die Inokulation optimiert werden musste. Wie im Vorangegangenen beschrieben, wird für eine Untersuchung der phänotypischen Ausprägung ein Zeitraum von ca. sechs Monaten benötigt. Dies ist etwa der Zeitrahmen für die zusätzlichen Versuche der Infektionsoptimierung. Die Erstellung der Kreuzungen, die Zusammenstellung des Sortimentes, die Infektionsversuche der Sortimente, die Etablierung der qPCR, die Marker- und SNP-Chip Untersuchungen und die Erstellung der DH-Populationen liefen größtenteils nach dem Zeitplan ab. Die F1 wurde anders als im Plan vorhergesehen, unter Feldbedingungen in Darzau inokuliert. Auf Grund der heißen und trockenen Witterungsbedingungen im Jahr 2018 kam es zu einem Ausfall der Ergebnisse. Die F2 (davor an der LfL im Gewächshaus vermehrt) wurde ebenfalls unter Feldbedingungen infiziert und in der F3 auf phänotypische Ausprägung untersucht. Die Eltern hingegen wurden in einem erweiterten Sortiment im Gewächshaus in zwei Wiederholungen (Sommer 2018 und Herbst/Winter 2018-19; Donorensortiment) infiziert. Bei der ersten Wiederholung im Jahr 2018 kam es auf Grund der fehlenden Möglichkeit der Gewächshauskühlung, zu einem eingeschränkten Ergebnis, da es über Wochen hinweg zu heiß im Gewächshaus war. Es konnte daher nur eine „Befall“, „kein Befall“ Bonitur

durchgeführt werden. Des Weiteren wurde das Gewächshaus der LfL ab Mai 2019 energetisch saniert und es mussten neue Räumlichkeiten für die Versuche gefunden werden, was erneut für Verzögerungen sorgte. Deshalb konnte mit der Untersuchung des Infektionsverlaufes, sowie der Inokulation der ausgewählten DH-Populationen erst Ende Dezember 2019 begonnen werden. Zudem ging die erste Projektbearbeiterin im Mai 2019 in den Mutterschutz und anschließend bis Ende Oktober in Elternzeit. Die Einstellung einer zweiten Projektbearbeiterin erfolgte erst im November 2019. Aufgrund dieser Faktoren kam es zu Verzögerungen bei der Erstellung der Genomweiten Assoziationsstudie, der Untersuchung der verschiedenen DH-Populationen auf Flugbrandanfälligkeit und auch zu Verzögerungen bei der Untersuchung des Infektionsverlaufs mittels qPCR. Da allerdings eine kostenneutrale Verlängerung des Forschungsvorhaben bis 31.03.2021 bewilligt wurde, konnten alle geplanten Untersuchungen vollständig durchgeführt werden. Darüber hinaus wurde im Rahmen des Projektes eine Validierung der technisch funktionierenden Marker in Kooperation mit dem Genomanalyselabor (IPZ 1b) durchgeführt. Insgesamt konnten die Ziele des Projektes im Rahmen der Projektverlängerung erreicht werden.

8 Zusammenfassung

Der Flugbrand (*Ustilago nuda*) bei Gerste ist eine Krankheit, die vorrangig im ökologischen Landbau von Bedeutung ist. Zum einen ist die Erzeugung von qualitativ hochwertigem Saatgut beeinträchtigt, da für eine Anerkennung eines Vermehrungsbestandes höchstens fünf befallene Ähren je 150 m² vorhanden sein dürfen. Außerdem hat ökologisch erzeugte Sommergerste für die verarbeitende Industrie nach Weizen, Hafer und Dinkel die höchste Bedeutung. Durch die gestiegene Nachfrage in der Vergangenheit, steht ein geringes Angebot aus deutscher Erzeugung zur Verfügung, sodass Mälzer zu Importen gezwungen sind. Grund dafür sind die verschiedenen Restriktionen im ökologischen Landbau und die nicht ausreichende Resistenz gegenüber Krankheiten. Vor allem samenbürtige Krankheiten, wie der Gerstenflugbrand (*Ustilago nuda*) sind schwer kontrollierbar. Dies liegt einerseits an der fehlenden Möglichkeit von Behandlungen wie der chemisch-synthetischen Beizung.

In diesem Projekt wurden verschiedene Sommergerstenherkünfte auf eine Resistenz gegenüber *U. nuda* geprüft. Es wurde in den verschiedenen Testungen ermittelt, dass die Genotyp x Umwelt Interaktion eine wichtige Rolle einnimmt. Außerdem wurde für das Merkmal Flugbrandresistenz eine Heritabilität von 59% errechnet und es hat sich gezeigt, dass der Krankheitsverlauf bei trockener Witterung latent verlaufen kann. In einer genomweiten Assoziationsstudie und anschließenden Markervalidierung konnten drei molekulare Marker entwickelt werden, die wahrscheinlich das Resistenzgen *Un6* detektieren. Zusätzlich wurde im Projekt eine qPCR-Methode etabliert, die einen schnellen Nachweis von *U. nuda*-DNA in Blättern und Halmknoten ermöglicht. Bei diesen Untersuchungen hat sich außerdem gezeigt, dass sich der Pilz über die Halmknoten ausbreitet und selten in den Blättern nachzuweisen ist.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die erzielten Ergebnisse wichtige und interessante Erkenntnisse im Hinblick auf die Resistenzzüchtung von Sommergerste im Merkmal Flugbrandtoleranz liefern, die in Kreuzbngsprogrammen sowohl bei der Wahl der Kreuzungspartner, als auch bei der Selektion effizient eingesetzt werden können. Dennoch besteht weiterhin Forschungsbedarf beispielsweise im Hinblick auf die Unterscheidung verschiedener Flugbrandrassen oder in der Entwicklung und Bereitstellung von molekularen Markern.

9 Literaturverzeichnis

Agrarinfos.de (2020) Entwicklungszyklus *Ustilago nuda*. <http://www.agrarinfos.de/hf/pflanzenbau/Aktuelle%20Pflanzenfotos/album/05%20PB%2017.05.16/index.html#05%2520Kreislauf%2520Gerstenflugbrand.jpg>. Abgerufen am: 01.12.2020

Agrios, GN (2005) *Plant Pathology*. (London (UK): Academic Press)

Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM (2007): GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* 23: 1294-1296

Bayer MM, Rapazote-Flores P, Ganai M, Hedley PE, Macaulay M, Plieske J, Ramsay L, Russell J, Shaw PD, Thomas W and Waugh R (2017) Development and Evaluation of a Barley 50k iSelect SNP Array. *Front. Plant Sci.* 8:1792. doi: 10.3389/fpls.2017.01792

Batts CCV (1955). Observations on the infection of wheat by loose smut (*Ustilago tritici* (Pres.) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society*, 38(4), 465IN4-475IN7.

Batts CCV and Jeater A (1958). The development of loose smut (*Ustilago tritici*) in susceptible varieties of wheat, and some observations on field infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 41(1), 115IN8-125.

Benjamini Y and Hochberg Y (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57: 289-300

Gabor BK and Thomas PL (1987). Un8 allele for loose smut resistance associated with necrosis in embryos of infected barley. *Phytopathology*, 77(4), 533-538.

Holm S (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: 65-70

Jones P, Dhitaphichit P (1991) Virulent and fungicide-tolerant races of loose smut (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in Ireland. *Plant Pathol.* 40, 508-514

Kirby EJM and Appleyard M (1985) Development of the wheat plant. (In F.G.H. Lupton (Eds.), *Wheat breeding*. London: Chapman & Hall)

Konzak CF (1953). Inheritance of resistance in barley to physiologic races of *Ustilago nuda* (No. REP-616. CIMMYT.).

Kumar S, Knox RE, Singh AK, DePauw RM, Campbell HL, Isidro-Sanchez L, Clarke FR, Pozniak CJ, N'Daye A, Meyer B, Sharpe A, Ruan Y, Cuthbert RD, Somers D, Fedak G (2018) High-density genetic mapping of a major QTL for resistance to multiple races of loose smut in a tetraploid wheat cross. *PLOS ONE* 13(2):e0192261

Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154:397–412

Malik MMS and Batts CCV (1960). The development of loose smut (*Ustilago nuda*) in the barley plant, with observations on spore formation in nature and in culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 43(1), 126IN8-131IN9.

Malik MMS and Batts CCV (1960). The infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society*, 43(1), 117IN6-125IN7.

- Menzies JG, Steffenson BJ, Kleinhofs A (2010) A resistance gene to *Ustilago nuda* in barley is located on chromosome 3H. *Can J Plant Pathol* 32:247–251
- Mueller KJ. *Eur J Plant Pathol* (2006) Susceptibility of German spring barley cultivars to loose smut populations from different European origins 116: 145. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9049-9>
- Neergard P (1988). *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup. In I. M. Smith, J. Dunez, R. A. Lelliot, D. H. Phillips, & S. A. Archer (Eds.), *European Handbook of Plant Diseases* (pp. 470–471). Oxford: Blackwell Scientific Publications
- Oertel C (1955) Untersuchungen zur Biologie des Gerstenflugbrandes (*Ustilago nuda* (Jens.) Kellerm. et Sw.). *Kuehn-Archiv* 69: 552–602.
- Poehlmann JM (1945) A simple method of inoculating barley with loose smut. *Phytopathology* 35 (8). 640-644
- Savitzky A and Golay MJE. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least-Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36, 1627-1639. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60214a04>
- Tapke VF (1929): The role of humidity in the life cycle, distribution and control of the loose-smut fungus of wheat. *Phytopath.* 19, p103.
- Thomas PL and Menzies JG (1997) Cereal smuts in Manitoba and Saskatchewan, 1989 - 1995. *Can J Plant Pathol* 19:161–165
- Tuomi, JM, Voorbraak F, Jones DL, Ruijter JM (2010). Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods* 50, 313–322
- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wimmer V, Albrecht T, Auinger HJ, Schön CC (2012): Synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R. *Bioinformatics* 28: 2086-2087
- Wunderle JU and Koch E (2009). Künstliche Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Flugbrand-erreger (*Ustilago nuda*) und Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten. *Julius-Kühn-Archiv*, (424), 56.
- Wunderle JU, Leclerque A, Schaffrath U, Slusarenko A and Koch E (2012). Assessment of the loose smut fungi (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in tissues of barley and wheat by fluorescence microscopy and real-time PCR. *European journal of plant pathology*, 133(4), 865-875.
- Wunderle JU (2013). Entwicklung und Anwendung von Methoden für einen frühen Nachweis der Flugbranderreger *Ustilago nuda* und *U. tritici* in Gerste und Weizen (Doctoral dissertation, Hochschulbibliothek der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen).
- Zang W, Eckstein PE, Colin M, Voth D, Himmelbach A, Beier, S., Stein, N., Scoles, G.J. & Beattie, A. D. (2015). Fine mapping and identification of a candidate gene for the barley Un8 true loose smut resistance gene. *Theoretical and applied genetics*, 128(7), 1343-1357.

10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Vortrag; im Rahmen des BPZ-Arbeitskreises (26.02.2019)

Vortrag; im Rahmen des BPZ-Arbeitskreises (11.02.2020)

Vortrag; im Rahmen des BPZ-Arbeitskreises (25.02.2021)

Praxismerkblatt

Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen, z.B. des Förderprogramms (ggf. unter Angabe des Schwerpunkts), soweit dies möglich ist

Zu den folgenden Zielen des Bundesprogrammes leistet dieses Projekt einen wesentlichen Beitrag:

- Züchterische Weiterentwicklung von Getreide für die Bedingungen des ökologischen Landbaus
- Entwicklung von Züchtungszielen und –konzepten für den ökologischen Landbau
- Optimierung von Züchtungsstrategien mit molekulargenetischen Markern, vorwiegend durch die Entwicklung von neuen molekularen Markern
- Verbesserung der Eigenschaften ökologisch erzeugter Braugerste insbesondere im Hinblick auf Resistenz gegen Flugbrand
- Verbesserung der Qualität ökologisch erzeugter Produkte

2. Wissenschaftliche und technische Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Es konnten wichtige wissenschaftliche und technische Ergebnisse gewonnen werden. Zum einen konnten verschiedene Sortimente in Feld- und Gewächshausversuchen auf die Anfälligkeit gegenüber Flugbrand geprüft werden. Die daraus gewonnen Informationen werden bereits jetzt für das Gerstenzuchtprogramm der LfL genutzt und stehen anderen Züchtern zur Verfügung. Zusätzlich wurden SNP-Marker entwickelt, die ebenfalls für eine effizientere Selektion eingesetzt werden. Außerdem wurde die Nachweismethode mittels qPCR etabliert und in der Untersuchung von Praxisproben eingesetzt. Zusätzlich konnte mit der genannten Methode die Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze teilweise rekonstruiert werden. Als Nebenergebnis hat sich gezeigt, dass während der künstlichen Infektion optimale Bedingungen (Temperatur 23 – 25°C, Luftfeuchte > 80%) nötig sind, um eine erfolgreiche und reproduzierbare Infektion zu erreichen. Des Weiteren wurde in den Untersuchungen ermittelt, dass sich nach erfolgreicher Infektion und Nachweis von pilzlicher Ziel-DNA in der Pflanze nicht immer Brandähren gebildet haben.

3. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten.

Es liegen keine Erfindungen oder Schutzrechtsanmeldungen aus dem abgeschlossenen Projekt vor.

4. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) — z.B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt).

Die im Projekt entwickelten SNP-Marker können von privaten Pflanzenzüchtungsunternehmen genutzt werden. Aufgrund der beschleunigten Selektion stellt die Anwendung dieser Marker einen Wettbewerbsvorteil dar. Alle notwendigen Informationen werden auf Anfrage von der LfL zur Verfügung gestellt. Die Etablierung solcher Marker in einem Labor benötigt ca. ein halbes Jahr. Eine Sorte, die durch die Unterstützung dieser Marker selektiert wurde, könnte nach sechs Jahren reif zur Anmeldung für die Wertprüfung sein.

5. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) — u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u.a. einzubeziehen

Die wissenschaftlichen Ergebnisse stehen kurzfristig für weitere Forschungsarbeiten zur Verfügung. Die Erkenntnisse können in weitere Forschungsprojekte zur genaueren Aufklärung der Krankheit *Ustilago nuda* genutzt werden. Interessant wäre hierfür eine Kooperation mit weiteren- gewerblichen Züchtern und phytopathologischen Forschungseinrichtungen. Aus der Zusammenarbeit innerhalb des Projektes und neu geknüpften Kontakten zu Züchtern und Wissenschaftlern werden sich mittel- und langfristig weitere Ansatzpunkte für die Entwicklung Flugbrand-toleranter Sorten ergeben.

6. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten

innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse sowie Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.

Durch die Bereitstellung von Genotypen mit großer genetischer Distanz zum vorhandenen Zuchtmaterial kann das Material direkt in die Zuchtprogramme von Züchtern integriert werden. Die Sortenentwicklung wird in gemeinnützigen Organisationen oder Züchtungsunternehmen durchgeführt. Weiterführend wäre die etablierte qPCR-Methode weiter zu entwickeln und beispielsweise auch eine schnelle Untersuchung des Korns zu etablieren. In einem Folgeprojekt könnte eine spezifische Untersuchung von verschiedenen Flugbrandrassen erfolgen. Beispielsweise könnte durch Sequenzierung untersucht werden, ob sich die entwickelten Marker nur auf bestimmte Rassen anwenden lassen.

7. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer, z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt).

Die Ergebnisse des Projektes liegen teilweise online verfügbar vor. Daten und Pflanzenmaterial können von der LfL zur Verfügung gestellt werden. Es ist geplant, die Ergebnisse auf weiteren wissenschaftlichen Tagungen vorzustellen.

8. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Aufgrund einiger Verzögerungen zu Beginn des Projektes und dem Abriss der Gewächshäuser der LfL wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes bis 31.03.2021 bewilligt. Der Kostenrahmen wurde von allen Beteiligten wie geplant eingehalten. Einzelheiten lassen sich den entsprechenden Zwischennachweisen entnehmen.

Freising, den 06. September 2021

Dr. Markus Herz

11 Anhang

Tabelle 7: Kürzel der verschiedenen Resistenzquellen

Kürzel	Resistenzquelle
15	Mik
z	Zeiners Immune
s	Steffi
s	Fink
etROM =s	PI306431
t	Stander
b	BigCulm
m	Mirema
v	Pervonez
i	Ivana
c	Sencis
r	Rubiola
x	Xizang
u	Ciho13664
etLEN (evtl. =s)	HOR 01504
k	HB332
L	Lino
J	Jet
A	HOR 05359
8	HB334
8	Freedom
8	Metcalfe

Tabelle 1: Kreuzungssortiment Zusammenstellung

Name	Pedigree	Flugbrandkreuzungstyp
DZB1753	DZB0702c/DZB1122m	UnAxUn8
DZB1754	DZB0702c/DZB1128a	UnAxUn8
DZB1755	DZB1030t/DZB0702c	UnAxUn6z
DZB1756	DZBLLZK6/DZB0702c	UnAxUn6z
DZB1757a	DZB1119g/DZB0702c	UnAxUn6s
DZB1757z	DZB0702c/DZB1119g	UnAxUn6s
DZB1758a	DZB0312a/DZB0702c	UnAxUn6s
DZB1758z	DZB0702c/DZB0912a	UnAxUn6s
DZB1759a	DZB1263e/DZB0702c	UnAxUn6r
DZB1759z	DZB0702c/DZB1263e	UnAxUn6r
DZB1760a	DZB0702c/Odilia	UnAxUn6r
DZB1760z	Odilia/DZB0702c	UnAxUn6r
DZB1761	DZB1025b2/DZB0702c	UnAxUn6u
DZB1762	Parusav/DZB0702c	UnAxUn6u
DZB1763	DZB0611c/DZB1122m	UnJxUn8
DZB1764	DZB0611c/DZB1128a	UnJxUn8
DZB1765	DZB1030t/DZB0611c	UnJxUn6z
DZB1766	DZBKLZK6/DZB0611c	UnJxUn6z
DZB1767	DZB1119g/DZB0611c	UnJxUn6s
DZB1768	DZB0912a/DZB0611c	UnJxUn6s
DZB1769	DZB1263e/DZB0611c	UnJxUn6r
DZB1770	Odilia/DZB0611c	UnJxUn6r
DZB1771	DZB1025b2/DZB0611c	UnJxUn6u
DZB1772	Parusav/DZB0611c	UnJxUn6u
DZB1773	DZB0943c1/DZB1122m	UnLxUn8
DZB1774	DZB0943c1/DZB1128a	UnLxUn8
DZB1775a	DZB0943c1/DZB1030t	UnLxUn6
DZB1775z	DZB1030t/DZB0943c1	UnLxUn6z
DZB1776	DZBKLZK6/DZB0943c1	UnLxUn6z
DZB1777	DZB0934c1/DZB1119g	UnLxUn6s
DZB1778	DZB0943c1/DZB0912a	UnLxUn6s
DZB1779	DZB0943c1/DZB1263e	UnLxUn6r

DZB1780	DZB0943c1/Odilia	UnLxUn6r
DZB1781	DZB0943c1/DZB1025b	UnLxUn6u
DZB1782a	Parusav/DZB0943c1	UnLxUn6u
DZB1782z	DZB0943c1/Parusav	UnLxUn6u
DZB1783	DZB1030t/RGT-Planet	Un6z
DZB1784	RGT-Planet/DZB0912a	Un6s
DZB1785	RGT-Planet/DZB1263e	Un6r
DZB1786	Odilia/RGT-Planet	Un6r
DZB1787	DZB1025b/RGT-Planet	Un6u
DZB1788	Laureate/DZB1128a	Un8
DZB1789	DZB1030t/Laureate	Un6z
DZB1790a	Laureate/DZB0912a	Un6s
DZB1790z	DZB0912a/Laureate	Un6s
DZB1791	DZB1263e7/Laureate	Un6r
DZB1792	Odilia/Laureate	Un6r
DZB1793	DZB1025b2/Laureate	Un6u
DZB1794	Accordine/DZB1128a	Un8
DZB1795	DZB1030t/Accordine	Un6z
DZB1796	Accordine/DZB0912a	Un6s
DZB1797	DZB1263e/Accordine	Un6r
DZB1798	Odilia/Accordine	Un6r
DZB1799	DZB1025b2/Accordinde	Un6u

Tabelle 2: Donorensortiment Zusammenstellung (mz= mehrzeilig, zz=zweizeilig)

Name	Zeiligkeit	Resistenzquelle	Spelzigkeit	Abstammung
181STFs	zz	Un6s		
Accordine	zz			Sangria*(Quench*Propino)
Aischa	zz			
Avalon	zz			Beatrix*(Pasadena*Marnie)
Barke	zz			Libelle*Alexis
Bido	zz			Ceresia*Donoria
Borema	zz			
Br.M6315-1048	mz			
Charlotte	zz			CSBA56-2-1276*Chariot
Conquest	mz			(Vantage/Jet)/Vantamoor/Svan/Parkland
Danuta	zz			90014DH*(Salome*Maresi)
DZB0101bic	zz	Un6b	Nacktgerste	
DZB0201f	zz	Un15	Nacktgerste	
DZB0611c	zz	UnJ(+6z)	Nacktgerste	
DZB0702c	zz	UnA(+6z)	Nacktgerste	
DZB0709s	zz	Un6t	Nacktgerste	
DZB0711z	zz	Un6z/k	Nacktgerste	
DZB0805z	zz	Un6z/s	Nacktgerste	
DZB0809m	zz	Un6m	Nacktgerste	
DZB0815k	zz	Un6	Nacktgerste	

Name	Zeiligkeit	Resistenzquelle	Spelzigkeit	Abstammung
DZB0912a	zz	Un6s		
DZB0916b	zz	Un15		
DZB0918x	zz	Un6x	Nacktgerste	
DZB0920d	zz	Un6i	Nacktgerste	
DZB0937mls	zz	Un6s	Nacktgerste	
DZB0943c1	zz	UnL	Nacktgerste	
DZB1010a	zz	Un6v	Nacktgerste	
DZB1015e	zz	Un6u/s	Nacktgerste	
DZB1019c01	zz	UnL/8	Nacktgerste	
DZB1026b1	zz	Un6u	Nacktgerste	
DZB1025g1	zz	Un6u	Nacktgerste	
DZB1030t	zz	Un6z	Nacktgerste	
DZB1040e	zz	Un6c		
DZB1119g	zz			
DZB1122m	zz	Un8		
DZB1128a	zz	Un8		
DZB1130c1	zz	UnL(+6z)	Nacktgerste	
DZB1132c1	zz	UnL/J	Nacktgerste	
DZB1145a1	zz	Un6k	Nacktgerste	
DZB1148e	zz	Un6z/s	Nacktgerste	
DZB1149c	zz	Un15/6	Nacktgerste	
DZB1154a1	zz	Un6z/k	Nacktgerste	

Name	Zeiligkeit	Resistenzquelle	Spelzigkeit	Abstammung
DZB1155b	zz	Un6z/u	Nacktgerste	
DZB1223	zz	Un6s	Nacktgerste	
DZB1251	zz	UnL(+6z)	Nacktgerste	
DZB1263e	zz			
DZBKLZK6	zz	Un6z	Nacktgerste	
Grace	zz			(Xanada*Simba)*Marnie
Infripagi	zz	Un6	Nacktgerste	
Roxana	zz			Br.3556a/Korinna/Alexis
IPZ34025/1178	zz			KWS Irina * Calcule
IPZ34044/1199	zz			Zeppelin * (Marthe*Beatrix)
IPZ34109/1462	zz			(Steward*Yukata) * Overture
IPZRK1 34216/1197	zz			(Frilox*LMGN 2588) * LMGN 2640
IPZ34272/1227	zz			Henrike*Ria*(Krona*Efron-IN 78/229) * KWS Asta
IPZ34325/1305	zz			DIPP 1503*Polygena*Marnie*Conchita * NORD 11/1116
IPZ34379/1529	zz			NORD 11/1111 * SEJT 2630
IPZ34385/1544	zz			Melius * KWS Dante
Isense	zz	Un6s	Nacktgerste	
Jet	zz	UnJ	Nacktgerste	Jade*Pastoral
Ken	zz	Un6s	Nacktgerste	
Laureate	zz			Sanette*Concerto
Lawina	zz		Nacktgerste	IPZ11420/1676/(N)/CI/(N)
Marthe	zz			Neruda*Recept

Name	Zeiligkeit	Resistenzquelle	Spelzigkeit	Abstammung
MBR6	zz	Un6r		
Metcalfe	zz			
MMR12 (Odilia)	zz	Un6r		
Parusav	zz	Un6u	Nacktgerste	
Pirona	zz	Un8	Nacktgerste	HB334*(PI268183*Nackta)
Quench	zz			Sebastian*Drum
RGT-Planet	zz			TamTam*Concerto
Scarlett	zz			(Amazone*BR2730e)*Kym
Steffi älter	zz			Stamm*210
Steffi neuer	zz			Stamm*210
Streif	zz			Pasadena*Aspen
Sydney	zz			Simba*S00F060(Bellevue*Vortex)
Trebi	mz			Landgerste der Türkei
Warrior	mz			Aramir/ (Zephyr/6/Tellus/1 D/Zephyr) oder Freya/Plumage/43
ZFS	zz	Un6z	Nacktgerste	
Sigrid	zz			(Forester*Nairn)*Carnival
Havanna	zz			Br.St.3556a x Br.St.3192f
Roxana	zz			
DZB0808vb81	zz	Un6b		

Tabelle 8: Sortiment DH-Testung

Name	Zeiligkeit	Pedigree	Kreuzungstyp	Anzahl Linien
DZB1753	zz	DZB0702c/DZB1122m	UnAxUn8	25
DZB1758a	zz	DZB0312a/DZB0702c	UnAxUn6s	25
DZB1764	zz	DZB0611c/DZB1128a	UnJxUn8	25
DZB1766	zz	DZBKLZK6/DZB0611c	UnJxUn6z	25
DZB1773	zz	DZB0943c1/DZB1122m	UnLxUn8	1
DZB1776	zz	DZBKLZK6/DZB0943c1	UnLxUn6z	25

Tabelle 9: Sortiment für die Untersuchung des Infektionsverlaufs (qPCR)

Name	Zeiligkeit	Resistenzquelle	Spelzigkeit	Abstammung
Barke	zz	(anfällig)		Libelle*Alexis
Grace	zz	(anfällig)		(Xanada*Simba)*Marnie
DZB1019c01	zz	UnL/8	Nacktgerste	
Jet	zz	UnJ	Nacktgerste	Jade*Pastoral
Pirona	zz	Un8	Nacktgerste	HB334*(PI268183*Nackta)
DZB1122m	zz	Un8		
Isense	zz	Un6s	Nacktgerste	
DZB1040e	zz	Un6z		
MMR12 (Odilia)	zz	Un6r		
DZB0809m	zz	Un6m	Nacktgerste	



Abbildung 13: Durch Hitze geschädigte Pflanzen aus dem Donorensortiment Wiederholung 1

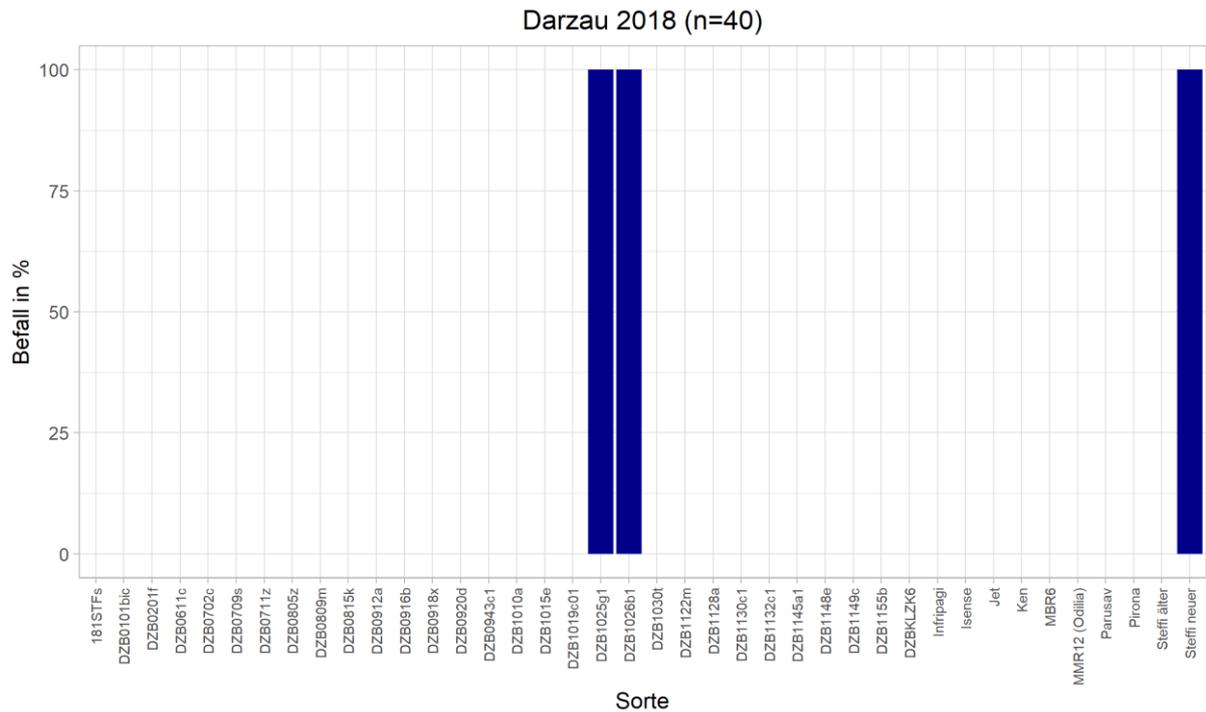


Abbildung 14: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten (Darzau 2018)

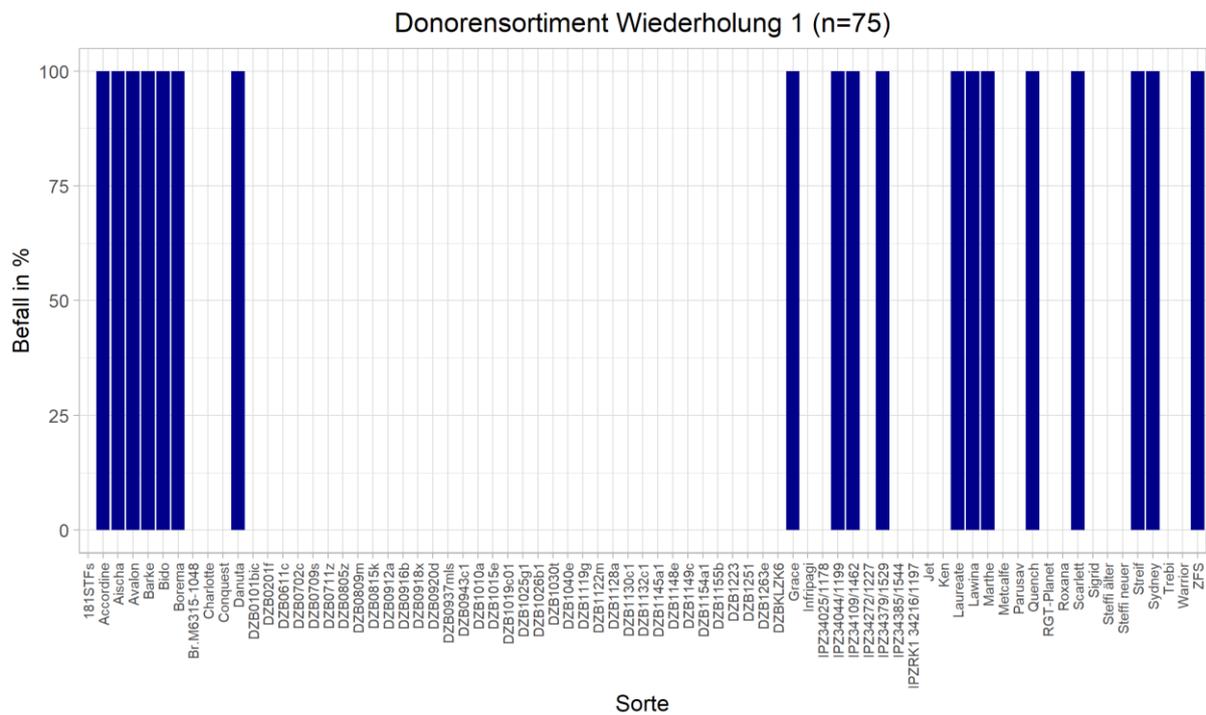


Abbildung 15: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten (Donorensortiment Wiederholung 1)

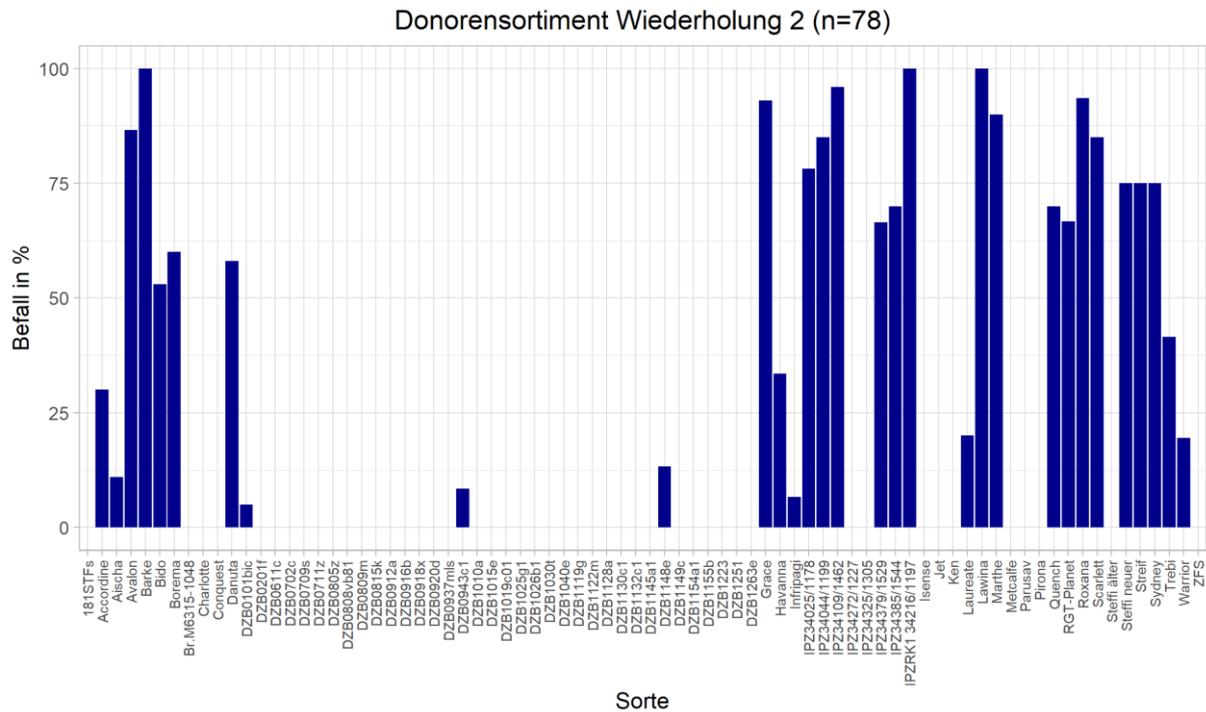


Abbildung 16: Flugbrandbefall in % der verschiedenen Sorten (Donorensortiment Wiederholung 2)

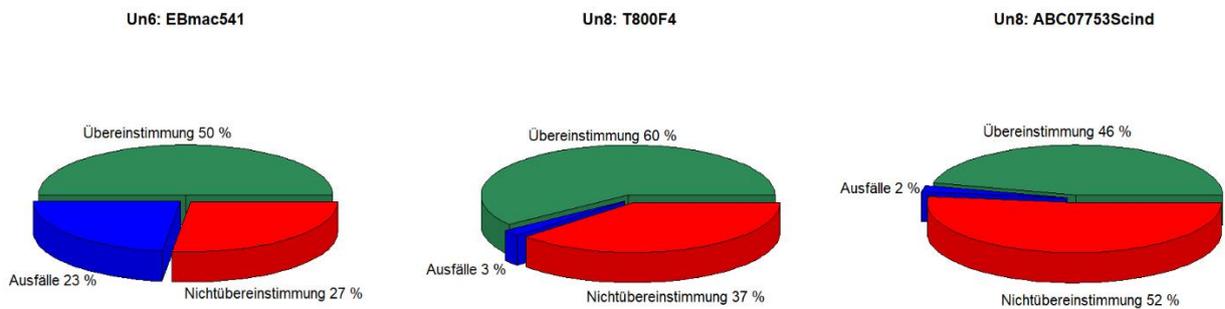


Abbildung 17: Markeruntersuchung des Donorensortiments Wiederholung 2 mit zwei Un8-Markern und einem Un6-Marker

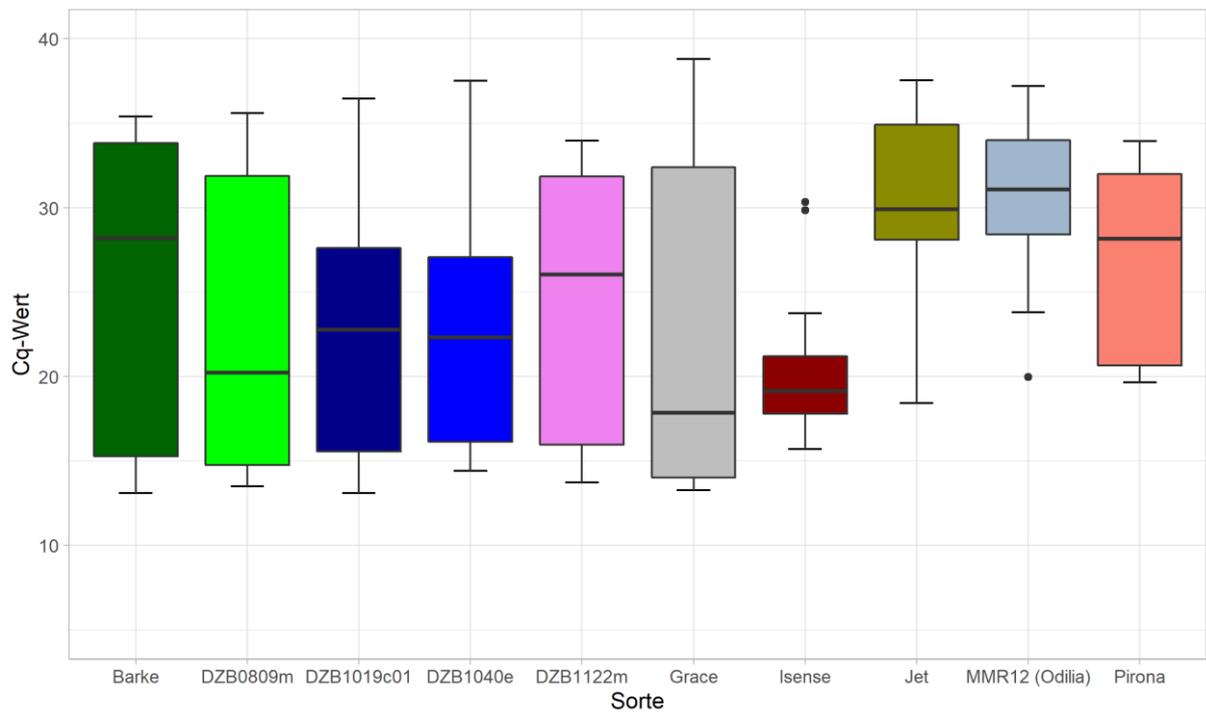


Abbildung 18: Boxplots der Cq-Werte der untersuchten Sorten und Stämme

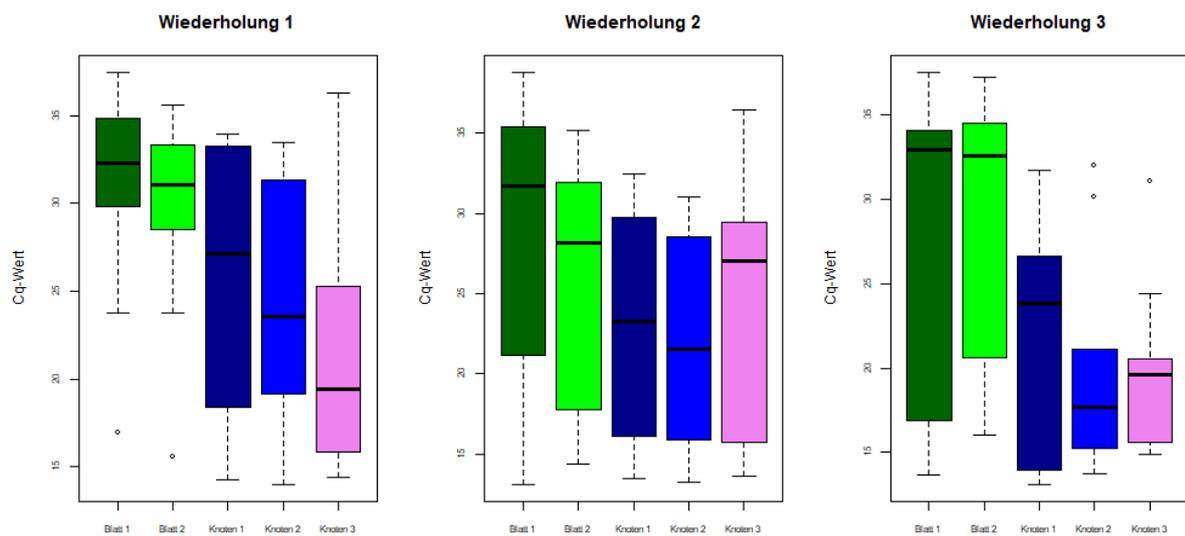


Abbildung 19: Boxplots der Cq-Werte der verschiedenen Pflanzenteile unterteilt in die drei Wiederholungen