

En rutinemetode til bestemmelse af angreb af nøgen bygbrand (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.) i sædekorn.

Af P. Norup Pedersen.

Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles afdeling for plantekultur.

Anvendelse af markkontrol som bedømmelsesgrundlag for omfanget af angrebet af nøgen bygbrand i den følgende generation er behæftet med en betydelig usikkerhed.

Grunden til denne usikkerhed er, at angrebets omfang foruden af den i marken tilstedeværende sporemængde også afhænger af andre variable faktorer. Sporerne skal for det første løsnes fra brandakset og dernæst af luftstrømninger føres ind til frugtanlægget, og dette skal ske på et for infektionen gunstigt tidspunkt. Såvel frigørelse som lufttransport af sporerne er afhængig af klimafaktorer, der varierer fra år til år og fra egn til egn. Men selv om klimaforholdene er gunstige for såvel frigørelse som transport af sporerne, kan disse dog ikke opnå kontakt med frugtknuden, med mindre byggen avner åbner sig under blomstringen. Byggen tilbøjelighed til mere eller mindre åben blomstring er vel en sortsegenskab, men den er stærkt påvirkelig af klimatologiske faktorer. Derfor vil, foruden sporemængden, også sortsegenskaber og klimaforhold øve indflydelse på brandangrebets omfang i den følgende generation. Dertil kommer yderligere, at selv om en bestemt mark er fri for angrebne planter, vil der alligevel være mulighed for smitte under blomstringen, idet sporer fra angrebne nabomarker kan føres dertil med vinden.

Af disse grunde byder anvendelse af avlen fra sunde stam-sædsmarker ingen absolut sikkerhed for et tilsvarende ringe an-

greb i den næste generation, d. v. s. for sundheden af brugsfrøet, hvorfor det vil være vanskeligt og i hvert fald forbundet med betydelig risiko at stille garantier på grundlag af markkontrollens resultater for stamsæden. En rutinemetode til bedømmelse af brandangrebet direkte på den færdigrensede sædevare vil, forudsat den kan udføres tilstrækkelig sikkert og billigt, have iøjnefaldende fordele. Sædekornshandlerne vil ved hjælp af en sådan metode være i stand til at bedømme fremavlspartierne med hensyn til nøgen brand og kunne udskyde eller varmtvandsbehandle de stærkest angrebne partier. De vil desuden på grundlag af udførte analyser være i stand til at stille garantier for, at såsædspartierne kun indeholder et vist maksimum af brandsmitte. At en sådan garanti er en fordel for landmændene er umiddelbart indlysende, og det er sandsynligt, at den også med tiden vil blive til fordel for sædekornshandlerne, idet mange landmænd, der nu benytter sædekorn af egen avl, vil foretrække at købe sædekorn med garanti for ringe brandsmitte, fremfor at benytte deres egen avl, i hvilken de risikerer kraftige angreb af sygdommen.

En metode til bestemmelse af angrebsgraden direkte på den færdigrensede sædevare vil derfor være af stor interesse. Såning i drivhus om vinteren har været anvendt enkelte steder. Herved er man i stand til hurtigt at få planterne så store, at det kan konstateres, hvorvidt de er angrebne eller ikke (T a p k e 1949). Da det imidlertid ofte drejer sig om små brandprocenter, må man, for at få en tilstrækkelig sikker bestemmelse af angrebets størrelse, arbejde med et stort antal planter. Rutinebestemmelser af brandangrebet på denne måde vil derfor kræve, at der rådes over en meget betydelig drivhusplads. Da en rutineafprøvning i drivhus er både tidsrøvende og dyr, har det været forsøgt at finde en metode, hvorved man i laboratoriet kan konstatere, hvorvidt der er brandhyfer tilstede i kimen eller ikke.

Idet sygdomsbilledet har betydning for denne analysemetode, skal de første faser af sygdomsforløbet kort omtales her. For at sporerne kan få adgang til frugtknuden, må avnerne åbnes. Efter blomstringen presses avnerne sammen igen, hvorved de sporer, der er ført ind mellem avnerne og frugtknuden, befinder sig i et lukket rum med meget høj luftfugtighed, hvor der er

gode muligheder for sporespiring. Efter kort tids forløb danner de første sporer et promycel, og fra dette fremkommer infektionshyfer, der, hvis de befinder sig på frugtknudens overflade, kan gennembryde epidermis. Hyferne fortsætter derefter gennem frugtknudevæggen, indtil de når frøanlæggets kapper, som de derefter følger ned til skutellum. På overfladen af skutellum forgrener hyferne sig kraftigt og trænger ind mellem epitelcellerne og ind i kimen. Ofte er store partier af skutellums ydre lag fuldstændig gennemvævet af hyfer.

Simmonds (1946) har som den første benyttet sig af dette forhold ved udarbejdelsen af en laboratoriemetode til bestemmelse af brandangrebets størrelse. Ved en behandling med kaliumhydroxyd adskilles kim og endosperm, og efter klaring af kimen undersøges denne under mikroskop for forekomst af brandmycel. Russell (1950) har sammenlignet resultaterne opnået efter Simmonds metode med udsåning i marken og fundet god korrelation mellem de to bestemmelser, $r = 0,97$. Popp (1950) anvendte Simmonds metode i noget ændret form og fandt ligeledes god overensstemmelse mellem angreb af *Ustilago nuda* bestemt på bygkim og svampens tilstedeværelse på såvel buskning- som skridningsstadiet. Popp viste endvidere, at metoden ikke kunne benyttes overfor hvedens støvbrand, idet myceliets fremtrængen i planten er afhængig af hvedesorten og af svampens smitterace.

En sammenligning af Pops og Simmonds metoder er foretaget af Popp og Russell (1951). De fandt god overensstemmelse mellem resultaterne opnået med de to fremgangsmåder ($r = 0,93$), såvel som mellem resultaterne fra de to metoder sammenlignet med resultaterne ved dyrkning i marken ($r = 0,92$ for Simmonds metode og $r = 0,94$ for Pops metode).

Da de to metoder til bestemmelse af brandangrebet direkte på sædevareren således må siges at være tilstrækkelig sikre til brug for såvel frøkontrolanstalter som sædekornshandlere, vil det være af stor interesse at få dem indarbejdet her i landet. Begge metoder er derfor blevet nøje afprøvet. Det viste sig herved, at der knyttede sig visse ulemper til dem, foruden at de var for arbejdskrævende til at kunne benyttes til rutinemæssig analysebrug under danske forhold, idet vi i almindelighed har med

mindre brandangreb at gøre end tilfældet er i Canada, hvor de omtalte undersøgelser er udført, og derfor må undersøge et større antal kim for at kunne opnå en tilstrækkelig stor sikkerhed. Der har derfor været arbejdet på at forbedre disse metoder, og resultatet af dette arbejde er beskrevet i det følgende.

Metodik.

Den her beskrevne hurtigmetode, der egner sig til rutineanalyser, har de ovenfor omtalte undersøgelser af Simmonds som udgangspunkt. Metoden praktiseres på følgende måde:

Ca. 80 gram kerner anbringes i en 1000 ml kogekolbe med kogende vand og koges i 5 minutter. Kogningen og den deraf følgende udblødning bevirker, at skutellum bedre end ved Simmonds metode tåler den påfølgende behandling med natriumhydroxyd. Vandet hældes fra, og der skylles en gang med varmt vand og tilsættes 170 ml 5 pct. natriumhydroxyd. Kolben med dens indhold af kerner og natriumhydroxyd anbringes over et gasblus og opvarmes til kogning (opvarmningstid 4 min.) og holdes på kogepunktet i 5 minutter. Kogning med natriumhydroxyd bevirker, at avnerne løsner sig fra kim og endosperm. Efter kogningen hældes vædsken og de deri svømmende avner bort, og der skylles kraftigt med flere hold varmt vand for at fjerne den sidste rest af avner. Skylningen må ophøre, når vandet begynder at blive brunfarvet. Efter skylningen hældes de nøgne kerner over på et $\frac{1}{3}$ l glas, der fyldes op med en 2,5 pct. natriumhydroxydopløsning tilsat 2,5 pct. formalin (6,25 pct. af handelsvaren, der er en ca. 40 pct. opløsning) og henstilles i vandbad ved 55° i 7—9 timer. Tilsætningen af formalin bevirker, at kim og skutellum bliver stivere og fastere, uden at det påvirker endospermen nævneværdigt. Der omrøres af og til, særlig i de første timer, idet det øverste kernelag ellers påvirkes for svagt. Når de øverste kernelag begynder at blive geleagtige, og kimene fra de øverste kernelag har løsnet sig fra endospermen og flyder frit omkring, afbrydes varmebehandlingen. Glassenes indhold hældes over på et sigtesystem og skylles kraftigt med varmt vand. Sigtesystemet består af 3 sigter, hvoraf den øverste



Fig. 1. System af sigter.
(Succession of screens).

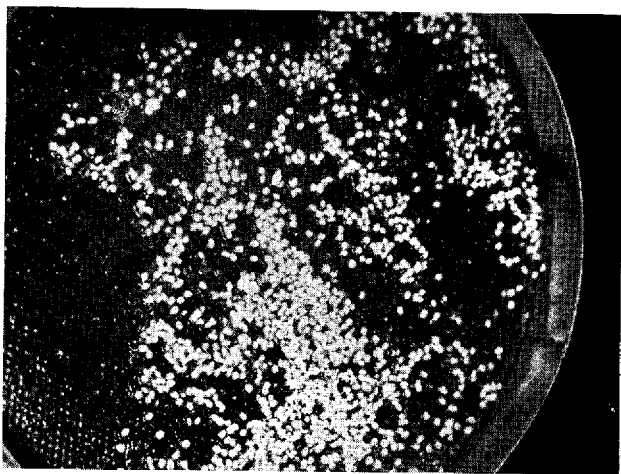


Fig. 2. Nederste sigte med kim.
(Bottom screen with embryos).

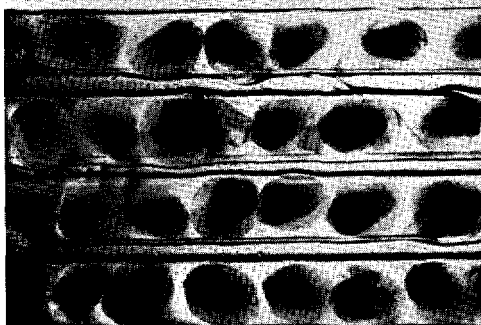


Fig. 3. Kimene arrangeret på glasbakke.
(*Embryos arranged on a special slide*).

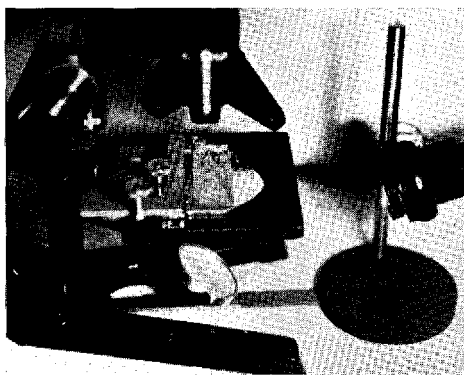


Fig. 4. Mikroskopopstilling.
(*Convenient working arrangement of microscope*).



Fig 5. Sund kim.
(*Healthy embryo*).

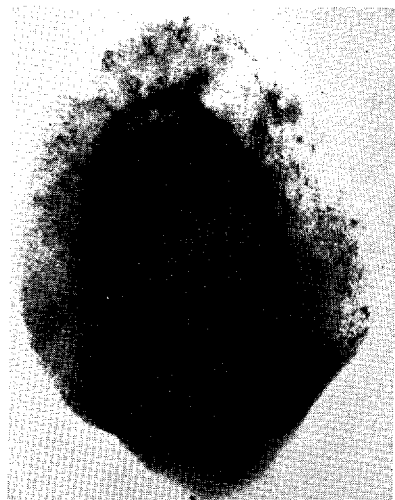


Fig. 6. Angrebet kim.
(*Diseased embryo*).

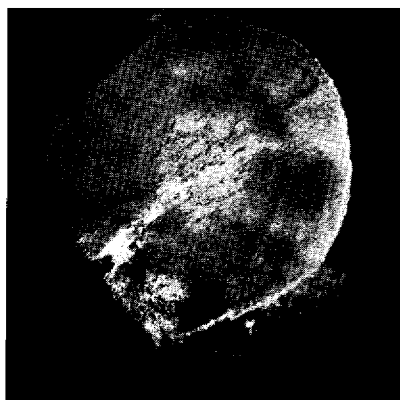


Fig. 7. Kim med angrebet fordelt over hele skutellum.
(*Uniformly infected scutellum*).

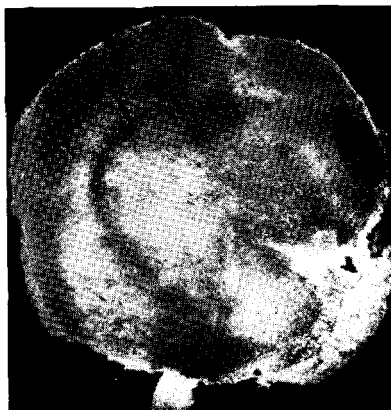


Fig. 8. Kim med pletvis angreb i kanten af skutellum.
(*Embryo with diseased spots at edge of scutellum.*)

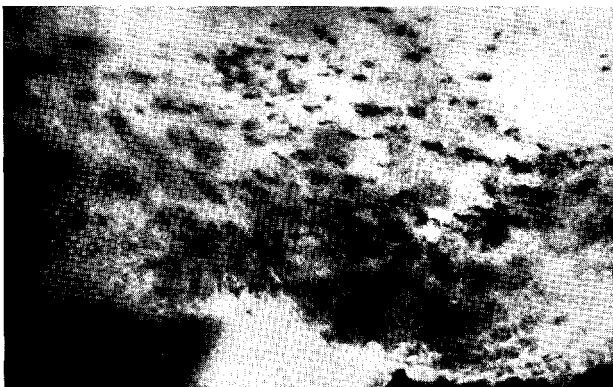


Fig. 9. Forstørrelse af angrebet plet af fig. nr. 8.
(*Diseased spot, enlarged from Fig. No. 8.*)

har elliptiske huller på $9 \times 3,3$ mm, den efterfølgende runde huller på 3,0 mm i diameter, og den nederste ligeledes runde huller på 1,5 mm i diameter (fig. 1 og 2).

Ved skylningen går kimene let gennem de to første sigter, men opfanges på den sidste. Småpartikler under 1,5 mm skylles bort. Enkelte kerner, der af en eller anden grund ikke er svulmet op, går gennem første sigte og opsamles på sigte nr. 2. Endospermen, der er stærkt opsvulmet, tilbageholdes på første sigte.

Såvel første som anden sigte efterses for eventuelt fasthængende kim, idet det muligvis har en vis betydning, at alle kim medtages. For at kunne vurdere dette spørgsmål, blev i 32 prøver, undersøgt i 1950, alle de kim, der efter skylningen stadig hang fast ved endospermen, samlet og undersøgt separat. Resultatet af denne undersøgelse ses i tabel 1.

Tabel 1. Undersøgelse over betydningen af, at alle kim frigøres. 32 analyser 1950.

	Frie Kim		Vedhængende kim		Kim	
	ialt	%	ialt	%	ialt	%
Sunde.....	45926	96,5	1657	3,5	47583	
Angrebne.....	514	1,12	26	1,57	540	1,13

Disse 32 analyser omfattede ialt 47583 kim, af disse var 96,5 pct. frigjort ved skylningen, medens 3,5 pct. af kimene ikke var frigjort fra endospermen, eller af anden grund befandt sig på de to øverste sigter. Undersøgelsen af kimene på den nederste sigte viste, at 1,12 pct. af disse var angrebne af brand, medens de kim, der efter skylningen stadig befandt sig på de øverste to sigter, havde 1,57 pct. angrebne. I gennemsnit af samtlige kim var angrebsprocenten 1,13, altså 0,01 pct. højere end ved analyse af kimene på den nederste sigte alene. Forskellen på de to gennemsnitsangrebsprocenter er ikke signifikant, men man må dog stræbe efter at få alle kim med i analysen, idet der kan være forskel på kimenes tilbøjelighed til at løsne sig fra endospermen i de forskellige prøver.

Samtlige kim overføres til alkohol for at hærdes. Først til 50 pct., hvor de står i ca. 2 timer, derefter til 70 pct., der efter endnu et par timers forløb udskiftes med 95 pct., hvori de henstår natten over. Kimene kan uden skade henstå i 95 pct. alkohol i flere uger, og først 1—2 døgn inden man ønsker at påbegynde analysen, overføres kimene til glycerin for at blive klare og gen-nemsigtige.

Før påbegyndelsen af mikroskopiske undersøgelser hældes kimene ud i specielle glasbakker af størrelse som et objektglas, der er forsynet med en inddeling, så kimene let arrangeres i rækker. En sådan inddeling kan frembringes ved at anbringe tynde glasrør i bakkens længderetning med en indbyrdes afstand på 3,5 mm og smelte dem fast i kanten (fig. 3 og 4). Når kimene sammen med lidt glycerin hældes over på bakken, lægger de sig i rækkerne mellem glasrørene, og man behøver som regel kun at rette lidt på rækkerne med en fin pensel. Kimene mikroskoperes derefter række for række, og man er ved denne fremgangs-måde aldrig i tvivl om, hvilke kim der er efterset.

Til undersøgelse af skutellum for brandhyfer benyttes et binokulært præparermikroskop med stort synsfelt. Den bedst egnede forstørrelse er ca. 40 gange. Er kimene omhyggeligt be-handlede, så skutellum er ubeskadiget, kan den mikroskopiske undcrsøgelse foregå hurtigt, og der vil sjældent være grund til at foretage kontroleftersyn af svage angreb, idet brandsvampens brune hyfer fremtræder tydeligt på baggrund af de klare celler (fig. 5—6—7). Hyferne ses som regel særlig tydeligt i kanten af skutellum. Ofte ses afgrænsede brune partier, der er særlig stærkt inficeret med svampen, idet celler, der har været i be-røring med hyferne, har tilbøjelighed til brunfarvning, (fig. 8—9).

Indtil man får øvelse i at bedømme svage angreb, kan man kontrollere bedømmelsen under et monokulært mikroskop med større forstørrelse. Ønsker man et kontroleftersyn af et bestemt afsnit af kimen, kan man med en skarp spydformet nål udskære det område af kimen, hvor den formodede infektion sidder og anbringe udsnittet sammen med en dråbe glycerin på et objekt-glas. Et dækglas lægges over, og objektglasset lægges med dæk-glasset nedefter på en plan flade og presses hårdt mod under-laget. Efter denne behandling er cellerne spredt så meget, at det

hurtigt kan afgøres, om der er hyfer i præparatet. Farvning er unødvendig.

Resultater.

For at skaffe materialer til en sammenligning mellem resultaterne af laboratorieundersøgelsen og angrebet i marken, blev der i vinteren 1949—50 foretaget en undersøgelse af 44 kunstigt inokulerede prøver, hvorefter den tiloversblevne del af prøverne i foråret 1950 blev udsået i forsøgsmarken på Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles forsøgsgård Albertslund. Resultaterne af undersøgelsen i laboratoriet og optællingen i marken ses i tabel 3. En korrelationsberegning gav koefficienten $r = 0,88$. Ved sammenligning af de to talrækker ses, at laboratorieresultaterne gennemgående ligger lidt lavere end markresultaterne, og i gennemsnit af alle prøver ligger laboratorieresultaterne 5,7 pct. lavere. En af årsagerne hertil er, at der i det til inokulering benyttede sporemateriale foruden *Ustilago nuda* også forekom sporer af *Ustilago nigra* Tapke. Denne svamp, der ikke før er fundet i Danmark, ligner på sygdomsbilledet slående nøgen bygbrand, og de to brandformer kan kun med sikkerhed adskilles på sporenes spiremåde (Tapke 1932). Fysiologisk adskiller de sig i en for denne undersøgelse væsentlig karakter, idet *U. nigra* i modsætning til *U. nuda* ikke overvintrer i kimen, men mellem avnerne og frøskallen (Ruttle 1934). Svampehyferne trænger først ned i kimen ved frøets spiring og kan derfor ikke påvises ved hjælp af den før omtalte laboratoriemetode. Da man ikke ved optælling i marken kan adskille de to brandformer, vil angreb af *U. nigra* blive henregnet til angreb af den almindelige nøgne brandform. Deraf følger, at ved angreb af begge svampearter i en prøve vil en bestemmelse i laboratoriet ligge under en optælling i marken.

Det synes at være vanskeligere at bestemme brandangrebet i laboratoriet på kunstigt inokulerede kerner end på naturligt inokulerede (Russel 1950). Grunden dertil er antagelig, at den kunstige inokulering af og til sker på et for infektionen mindre gunstigt tidspunkt, hvorfor der fremkommer en svag infektion, der kun vanskeligt kan iagttages i kimen. Ved naturlig inokulering sker overførelsen af sporerne under blomstringen, på hvil-

ket tidspunkt infektionsbetingelserne er de bedst mulige, og hyferne vil derfor hurtigt nå skutellum og kunne forgrene sig kraftigt før frømodningen.

Efter at det havde vist sig, at kunstigt smittet materiale ikke egnede sig særlig godt til sammenlignende undersøgelser, stillede Statsfrøkontrollen i årene 1950-51-52 og 53 et antal af de den foregående sommer undersøgte prøver til rådighed til dette formål. Disse prøver var udtaget af større partier og repræsenterede forskellige sorter. Udsåning i marken og optælling af brandangrebet var foretaget af Statsfrøkontrollen efter de der gældende regler. Prøverne blev udsået på to forsøgsgårde med to gentagelser hvert sted. I alt omfattede undersøgelsen i marken ca. 16.000 planter af hver prøve. Resterne af de pågældende prøver blev det følgende efterår benyttet ved laboratorieundersøgelserne, der omfattede ca. 1.700 kim af hver prøve. Ved modtagelsen om efteråret var prøverne kun mærket med et nummer, og først efter at samtlige prøver fra det pågældende år var undersøgt, blev koden frigivet.

Resultaterne af de enkelte års undersøgelser er sammenstillet i tabel 4, og gennemsnittene af de enkelte års bestemmelser ses i tabel 2.

Tabel 2. Sammenligning af angrebet af nøgen bygbrand bestemt i laboratoriet og i marken 1950--53.

År	Antal prøver	Gennemsnitlig brandprocent bestemt i		Korrelationskoefficient
		laboratoriet	marken	
1950.....	38	1.11	0.85	0.92
1951.....	15	1.20	1.27	0.99
1952.....	25	0.55	0.51	0.92
1953.....	54	3.56	3.67	0.86
1950-53.....	132	2.01	1.99	0.93

Det ses, at gennemsnittet af bestemmelsen i laboratoriet ligger meget nær op ad bestemmelsen i marken. I 1950 lå laboratorie-gennemsnittet dog lidt over markgennemsnittet, medens det modsatte var tilfældet i 1951 og 1953. Beregnet på samtlige prøver er gennemsnittene meget nær ens for de to bestemmelsesmåder.

Af hovedtabellen fremgår, at i 1950 lå laboratorieresultaterne i 29 af 38 tilfælde over markbestemmelserne, medens det modsatte var tilfældet i 1951, hvor laboratorieresultaterne kun lå højest i 3 af 10 tilfælde og differencen mellem de to bestemmelser var 0 i 2 tilfælde. I de to sidste år havde ingen af bestemmelsesmetoderne overvægt i denne henseende.

Diskussion.

Den i det foregående omtalte metode til bestemmelse af angrebet af nøgen bygbrand på færdigrenset sædekorn er en modificering af den af Simmonds (1946) beskrevne »the whole embryo method«.

Ved afprøvning af Simmonds metode fandtes denne at have visse ulemper, der gjorde den mindre velegnet som rutinemetode, bl. a. var det vanskeligt at få kimene frigjort uden beskadigelser. For at kunne benyttes som rutinemetode ved garantianalyser må, så vidt muligt, alle kim i prøven medtages, og desuden ønskes, hele, klare kim, der kun er iblandet få urenheder, idet disse besværliggør arbejdet med undersøgelsen. Den her beskrevne metode nærmer sig mere til disse ønsker, idet kogningen og den dermed følgende vandoptagelse før tilsætningen af natriumhydroxyd giver mindre beskadigede kim, den forudgående fjernelse af avnerne letter frigørelse og rensning af kimene, og endelig giver den lavere natriumhydroxydkoncentration, tilsætningen af formalin og den kortere påvirkningstid mindre beskadigede og klarere kim, der er lettere at mikroskopere.

De udførte analyser omfattede et stort antal sorter. Stærkest repræsenteret var sorterne Maja, Carlsberg, Herta, Freja og Rigel. De forskellige sorter opførte sig ens under analysen. Sorter med store kim som f. eks. Abed Archer synes dog at være noget lettere at arbejde med end småkimede sorter. Eventuelle forskelle mellem sorterne kan være tilsløret af, at der var nogen variation mellem forskellige prøver af samme sort, hvilket antagelig skyldes forskelle i bjergningsforholdene. Da bjergningsforholdene veksler fra år til år, kunne man forvente en lignende variation imellem årene, men en sådan er ikke fundet. I alle sorter fandtes, at de kraftigst angrebne kim ikke var så veludviklede som

de sunde, hvilket også er beskrevet af Wells og Platt (Wells & Platt 1949). De angrebne kim synes at være vanskeligere at skille fra endospermen end de sunde.

Omkostningerne ved udførelsen af analysen kan vanskeligt fastsættes på grundlag af de her foretagne analyser, idet de afhænger af hurtigheden og rutinen hos vedkommende, der skal udføre dem. Arbejdsforbruget ved de her udførte analyser kan derfor kun give en orientering. I almindelighed var en rutineret mand i stand til at udføre 10 analyser på 3 arbejdsdage eller ca. 800 kim i timen. Heri var indbefattet såvel udpræparering som eftersyn af kimene.

Som det fremgår af det foregående, er der ved undersøgelse af ca. 1.700 kim pr. prøve tilstrækkelig god overensstemmelse mellem brandangrebet fundet ved laboratoriemetoden og brandangrebet optalt i marken til, at metodens pålidelighed må siges at være fuldt tilstrækkelig.

Da omkostningerne ved analysen er omtrent proportional med antallet af kim, når man ser bort fra engangsomkostningerne ved anskaffelse af apparatur, må man afpasse kimantallet pr. analyse efter den sikkerhed, man ønsker på resultaterne og dermed det formål, man ønsker at benytte resultaterne til.

Da metoden vel i de fleste tilfælde vil blive benyttet til orienterende undersøgelser, vil det være en fordel efter udpræpareringen at dele analysen op i portioner på f. eks. 500 kim. Hvis man forudsætter, at man kun vil benytte de partier til sædekorn, hvis brandprocent ligger på 0,2 og derunder, kan man efter at have konstateret antallet af angrebne kim i den første af disse portioner ved hjælp af en Poissontabel aflæse sandsynligheden for, at vedkommende parti ligger på 0,2 pct. brand eller derunder. Hvis sandsynligheden for, at partiet ligger på eller under 0,2 pct. brand er meget stor, kan man eventuelt spare yderligere undersøgelser og benytte partiet på grundlag af analysen på de 500 kim. Hvis omvendt sandsynligheden for, at partiet ligger over 0,2 pct. brand er meget stor, kan man afstå fra at benytte partiet til såsæd eller lade det varmtvandsafsvampe. Hvis man ikke med ret stor sikkerhed kan gruppere partiet efter resultatet af undersøgelsen af de første 500 kim, tages næste hold i arbejde.

Følgende opstilling, der er uddrag af en Poissontabel (P e a r s o n 1930) kan benyttes til denne bedømmelse.

Sandsynligheden udtrykt i procent for at man i en prøve på 500 kim vil finde:

Antal angr. kim	når partiets sande gennemsnit ligger på					
	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.4 %	0.5 %	1.0 %
0	60.6	36.8	22.3	13.4	8.2	0.7
1	30.3	36.8	33.5	27.1	20.5	3.4
2	7.6	18.4	25.1	27.1	25.6	8.4
3	1.3	6.1	12.6	18.0	21.4	14.0
4	0.2	1.5	4.7	9.0	13.4	17.5
5	0.02	0.3	1.4	3.6	6.7	17.5
6	0.001	0.05	0.4	1.2	2.8	14.6
7	—	0.007	0.08	0.3	9.9	10.4
8	—	—	0.01	0.09	3.1	6.5
9	—	—	0.002	0.02	0.09	3.6
10	—	—	—	0.004	0.02	1.8

Ved hjælp af den ovenfor anført tabel kan man hurtigt finde den procentiske sandsynlighed for, at et givet resultat kan henføres til en af de i tabellens øverste række anførte angrebsprocenter. Hvis man i en portion på 500 kim f. eks. har fundet, at 2 kim var angrebet af brand, og man derfor ønsker at vide, hvor stor chancen er for at finde to angrebne kim eller derover i en prøve, hvis sande gennemsnit er 0,1 pct. angrebne, summerer man værdierne i kolonnen under 0,1 fra 2 og nedefter og får i dette tilfælde $7,6 + 1,3 + 0,2 + 0,02 + 0,001 = 9,121$ pct. Havde man i ovennævnte portion f. eks. fundet, at 4 kim var angrebne af brand, finder man ved hjælp af tabellen, at den procentiske sandsynlighed for, at dette resultat kan fremkomme i et parti med en angrebsprocent på 0,1 kun er 0,2. Følger man linien mod højre, ses det, at af de her opstillede muligheder er der størst sandsynlighed for, at partiets angrebsprocent ligger på 1,0, og at denne sandsynlighed udtrykt i procent er 17,5.

Ved hjælp af denne opdeling vil man til visse formål kunne spare en del analysearbejde og dermed billiggøre metoden.

Metoden kan kun benyttes til bestemmelse af angrebet af nøgen bygbrand, *Ustilago nuda*, idet de øvrige brandformer, der angriber byg, *Ustilago nigra* og *Ustilago hordei*, ikke har overvintrende hyfer i kimen. Metoden kan heller ikke benyttes til

bestemmelse af angrebet af *Ustilago tritici* på hvede, idet Popp har vist, at metoder der bygger på konstatering af overvintrende hyfer i kimen, ikke kan benyttes for denne, idet såvel hvedesort som svampens smitteracer øver indflydelse på den måde angrebets udvikling forløber på, og om det når frem til sporedannelse i akset. (P o p p 1950).

Da angreb af *Ustilago nuda* og *Ustilago nigra* ikke kan adskilles i marken, kan angreb af sidstnævnte undtagelsesvis være årsag til uoverensstemmelser mellem laboratorieresultater og optælling i marken. Da *Ustilago nigra* kan bekæmpes ved hjælp af de almindeligt anvendte kemiske afsvampningsmidler, og da det meste såsæd afsvampes af andre grunde, vil dens optræden blive forholdsvis sjælden. Udover U.S.A. og Canada, hvor *Ustilago nigra* er almindeligt udbredt, er svampen kun rapporteret få gange. Her i landet er svampen trods undersøgelse af flere hundrede sporeprøver fra forskellige egne kun fundet en enkelt gang. Dens optræden i velbehandlet såsæd må derfor formodes at være så sjælden, at den ikke vil være til nogen hindring for metodens benyttelse.

OVERSIGT

1. Simmonds metode til bestemmelse af angreb af nøgen bygbrand i sædekorn er modificeret, så den egner sig som rutinemetode.
2. Den modificerede metode går ud på at løsne avnerne ved kogning i natriumhydroxyd og fjerne dem ved skylning med vand, hvorefter kim og endosperm adskilles ved opvarmning i en blanding af natriumhydroxyd og formalin, kimene klarer i glycerin og mikroskoperes uden forudgående farvning.
3. I årene 1950—53 blev 132 naturligt smittede prøver, der omfattede mange forskellige sorter, undersøgt efter denne metode og kontroldyrket i marken. Laboratorieundersøgelsen omfattede ca. 1.700 kim af hver prøve og kontroldyrkningen i marken ca. 16.000 planter pr. prøve. Resultaterne af laboratorie- og markundersøgelserne viste god overensstemmelse, og en korrelationsberegning på materialet gav koefficienten $r = 0,93$.

4. I 1950, hvor der blev arbejdet med kunstigt smittede prøver, blev arbejdet kompliceret ved optræden af *Ustilago nigra*, der i marken let forveksles med den almindelige nøgne brand, men ikke som denne kan påvises ved hjælp af laboratoriemetoden. *Ustilago nigra* er ikke senere påvist her i landet.

Det omtalte arbejde blev påbegyndt på den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles arvelighedsafdeling og senere fortsat på afdelingen for plantekultur. Forfatteren ønsker herved at takke de to afdelingers eforer, professor, dr. phil. C. A. Jørgensen og professor Axel Pedersen samt direktør Chr. Stahl, Statsfrøkontrollen, for værdifulde råd og bistand; endvidere Landbrugets Kornforædlingsfond for økonomisk bistand til udførelse af en del af analysearbejdet.

Tabel 3. Albertslund 1950. Sammenligning af angrebsprocenten fundet ved laboratoricanalyse af 44 kunstigt smittede bygprøver med angrebsprocenten i marken. Ca. 2000 kim af hver prøve undersøgt i laboratoriet og ca. 2000 planter i marken.

Lb. nr.	Procent angreb i			Lb. nr.	Procent angreb i		
	laborat.	marken	difference		laborat.	marken	difference
1	45.2	50.8	— 5.6	23	44.2	43.0	+ 1.2
2	80.4	88.3	— 7.9	24	13.8	28.0	—14.2
3	31.4	34.3	— 2.9	25	31.3	45.5	—14.2
4	23.9	34.0	—10.1	26	28.3	32.0	— 3.7
5	55.3	61.6	— 6.3	27	27.3	29.3	— 2.0
6	29.1	43.0	—13.9	28	67.7	67.0	+ 0.7
7	33.0	44.0	—11.0	29	76.1	61.0	+16.1
8	39.0	55.4	—16.4	30	20.5	20.5	0
9	43.5	50.7	— 7.2	31	33.4	47.0	—13.6
10	50.5	77.5	—27.0	32	37.4	49.3	—11.9
11	33.6	33.8	— 0.2	33	43.3	45.8	— 2.5
12	53.0	58.5	— 5.5	34	15.6	17.3	— 1.7
13	38.2	41.0	— 2.8	35	22.9	25.3	— 2.4
14	29.8	39.3	— 9.4	36	63.5	70.3	— 6.8
15	40.0	53.0	—13.0	37	28.9	27.3	+ 1.6
16	34.1	65.0	—30.9	38	18.7	19.8	— 1.1
17	30.5	27.3	+ 3.2	39	31.4	28.5	+ 2.9
18	26.6	46.5	—19.9	40	23.4	22.3	+ 0.6
19	41.0	44.5	— 3.5	41	14.5	15.3	— 0.8
20	33.9	35.0	— 1.1	42	28.8	32.0	— 3.2
21	42.0	50.0	— 8.0	43	29.6	23.8	+ 5.8
22	19.1	20.3	— 1.2	44	23.6	23.0	+ 0.6

Tabel 4. Sammenligning mellem angreb af nøgen bygbrand bestemt i laboratoriet og i Statsfrøkontrollens kontrolmarker. Ca. 1700 kim af hver prøve undersøgt i laboratoriet og ca. 16000 planter i marken.

Lb. nr.	Procent angreb i			Lb. nr.	Procent angreb i		
	laborat.	marken	difference		laborat.	marken	difference
38 prøver 1950.							
1	0.00	0.06	-0.06	20	2.26	1.96	+0.30
2	3.37	2.33	+1.04	21	2.18	1.77	+0.41
3	0.50	0.53	-0.03	22	0.66	0.44	+0.22
4	1.41	1.06	+0.35	23	0.99	0.56	+0.43
5	1.14	1.04	+0.10	24	0.94	0.69	+0.25
6	0.87	1.10	-0.23	25	0.62	0.83	+0.27
7	0.80	0.48	+0.32	26	1.33	0.88	+0.45
8	0.70	0.34	+0.36	27	1.26	0.72	+0.54
9	0.89	0.46	+0.43	28	1.13	0.48	+0.65
10	0.44	0.40	+0.04	29	1.34	0.60	+0.74
11	0.78	0.42	+0.36	30	1.04	0.84	+0.20
12	0.66	0.67	-0.01	31	1.28	1.01	+0.27
13	0.70	1.37	-0.67	32	1.33	0.50	+0.83
14	0.22	0.49	-0.27	33	1.86	1.35	+0.51
15	0.82	0.85	-0.03	34	1.55	1.03	+0.52
16	0.63	0.46	+0.17	35	0.65	0.62	+0.03
17	0.63	0.36	+0.27	36	1.01	0.77	+0.24
18	4.25	3.60	+0.65	37	0.33	0.40	-0.07
19	1.01	0.71	+0.30	38	0.42	0.47	-0.05
15 prøver 1951.							
1	1.00	1.49	-0.49	8	0.39	0.70	-0.31
2	0.41	0.75	-0.34	9	0.47	0.76	-0.29
3	9.70	8.08	+1.62	10	0.33	0.59	-0.26
4	0.40	0.21	+0.19	11	1.68	1.29	+0.39
5	0.77	1.21	-0.44	12	0.49	0.52	-0.03
6	0.11	0.11	0	13	0.22	0.41	-0.19
7	0.60	0.93	-0.33	14	0.32	0.97	-0.65
				15	1.09	1.09	0
25 prøver 1952.							
1	0.66	0.06	0	13	0.27	0.31	-0.04
2	0.27	0.10	+0.17	14	0.23	0.40	-0.17
3	1.73	1.79	-0.06	15	0.27	0.18	+0.09
4	1.98	1.74	+0.24	16	0.04	0.04	0
5	0.78	1.09	-0.31	17	0.61	1.03	-0.42
6	0.00	0.02	-0.02	18	0.06	0.01	+0.05
7	0.28	0.28	0	19	0.05	0.06	-0.01
8	0.84	1.16	-0.32	20	0.53	0.20	+0.33
9	1.47	1.32	+0.15	21	0.13	0.17	-0.04
10	0.35	0.43	-0.08	22	0.77	1.17	-0.40
11	1.05	0.46	+0.59	23	0.00	0.01	-0.01
12	0.12	0.11	+0.01	24	1.16	0.92	+0.24
				25	0.69	0.44	+0.25

Tabel 4 (fortsat). Sammenligning mellem angreb af nøgen bygbrand bestemt i laboratoriet og i Statsfrøkontrollens kontrolmarker. Ca. 1700 kim af hver prøve undersøgt i laboratoriet og ca. 16000 planter i marken.

Lb. nr.	Procent angreb i			Lb. nr.	Procent angreb i		
	laborat.	marken	difference		laborat.	marken	difference
54 prøver 1953.							
1	8.24	10.40	-2.16	28	3.83	4.51	-0.68
2	3.96	4.14	-0.18	29	3.13	2.80	+0.33
3	1.70	4.15	-2.45	30	3.41	2.73	+0.68
4	9.01	13.00	-3.99	31	2.89	2.74	+0.15
5	1.83	3.09	-1.26	32	2.62	2.56	+0.06
6	3.32	4.23	-0.91	33	4.56	2.77	+1.79
7	3.24	2.94	+0.30	34	2.27	2.57	-0.30
8	2.93	3.08	-0.15	35	2.61	2.70	-0.09
9	6.26	7.79	-1.53	36	2.88	2.47	+0.41
10	3.24	3.28	+0.56	37	2.30	2.60	-0.30
11	3.61	2.57	+1.04	38	3.20	2.02	+1.18
12	3.39	2.61	+1.28	39	2.59	2.17	+0.42
13	2.60	3.15	-0.55	40	2.33	2.67	-0.34
14	3.19	2.94	+0.25	41	6.53	7.18	-0.65
15	4.02	2.91	+1.11	42	3.58	3.67	-0.09
16	4.24	3.11	+1.13	43	3.99	2.92	+1.07
17	2.65	2.22	+0.43	44	3.01	2.19	+0.82
18	4.51	3.74	+0.77	45	2.81	2.23	+0.58
19	1.95	2.79	-0.81	46	2.97	2.91	+0.06
20	3.78	3.70	+0.08	47	3.29	4.15	-0.86
21	2.80	3.50	-0.70	48	3.72	2.75	+0.97
22	2.33	2.51	-0.28	49	3.32	3.02	+0.30
23	2.84	3.92	-1.08	50	3.39	3.23	+0.16
24	2.73	3.95	-1.22	51	4.97	3.46	+1.51
25	3.25	3.80	-0.55	52	4.95	4.59	+0.36
26	4.24	5.73	-1.49	53	3.85	3.80	-0.15
27	4.05	4.61	-0.56	54	1.95	2.76	-0.81

SUMMARY

A routine embryo method of testing seed barley for loose smut (Ustilago nuda (Jens.) Rostr.).

A routine method to test the severity of loose smut infection in barley has been developed. The routine method is based on Simmonds's »The Whole Embryo Method«.

The method is practised as follows: The seeds are boiled in water and next in sodium hydroxide whereby the glumes detach from the endosperm. The glumes are removed by means of a water rinse. The seeds are placed in a solution of formalin and sodium

hydroxide at 55° C. After 7—9 hours, embryo and endosperm have separated. Using a succession of screens, the embryos are removed. They are then hardened in alcohol, cleared in glycerin, and microscopied without staining.

In the years 1950—53, 132 naturally inoculated samples, comprising several varieties, were examined by the routine method, the results being checked by field plot tests. The embryo tests comprised approximately 1,700 embryos per sample, and the field check tests approximately 16,000 plants per sample. There was a close agreement between the data obtained from embryo tests and field tests (Table 4), and the coefficients of correlation for each year were 0.92, - 0.99, - 0.92, - 0.86, respectively, and for all the years, 0.93.

In 1950, when artificially inoculated samples were used, the work was complicated by the appearance of *Ustilago nigra*, which was on this occasion observed for the first time in Denmark. This fungus is easily confused in the field with *Ustilago nuda* but cannot, unlike the latter, be demonstrated by the embryo method. The presence of *Ustilago nigra* has not at any later date been reported in this country.

L I T T E R A T U R

1. *Pearson, K.* 1930: Tables for statisticians and biometricians. London.
2. *Popp, W.* 1950: Infection in seeds and seedlings of wheat and barley in relation to development of loose smut. *Phytopath.* 41:3: 261—275.
3. *Russell, R. C.* 1950: The whole embryo method of testing barley for loose smut as a routine test. *Scient. Agric.* 30: 361—366.
4. *Russell, R. C. & Popp, W.* 1951: The embryo test as a method of forecasting loose-smut infection in barley. *Scient. Agric.* 31: 559—565.
5. *Ruttle, M. L.* 1934: Studies on barley smuts and on loose smut of wheat. N.Y. agr. Exp. Sta. Tech. Bul. 221.
6. *Simmonds, P. M.* 1946: Detection of the loose smut fungi in embryos of barley and wheat. *Scient. Agric.* 26: 51—58.
7. *Tapke, V. F.* 1932: An undescribed loose smut of barley. *Phytopath.* 22: 869—70.
8. *Tapke, V. F.* 1949: A mass-production method for studies of barley smuts in the greenhouse. *Phytopath.* 39: 1065—1066.
9. *Wells, S. A. & Platt, A. W.* 1949: The effect of loose smut on the viability of artificially inoculated barley seeds. *Scient. Agric.* 29: 45—52.