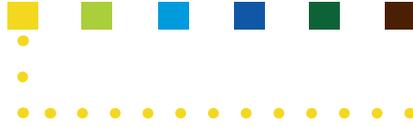




JKI



Mitteilungen

Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut

1. Nachwuchswissenschaftler-Forum

- 24. bis 26. November 2008 in Quedlinburg -



419
2009

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)

Das Julius Kühn-Institut ist eine Bundesoberbehörde und ein Bundesforschungsinstitut. Es umfasst 15 Institute zuzüglich gemeinschaftlicher Einrichtungen an zukünftig sechs Standorten (Quedlinburg, Braunschweig, Kleinmachnow, Dossenheim, Siebeldingen, Dresden-Pillnitz) und eine Versuchsstation zur Kartoffelforschung in Groß Lüsewitz. Quedlinburg ist der Hauptsitz des Bundesforschungsinstituts.

Hauptaufgabe des JKI ist die Beratung der Bundesregierung bzw. des BMELV in allen Fragen mit Bezug zur Kulturpflanze. Die vielfältigen Aufgaben sind in wichtigen rechtlichen Regelwerken, wie dem Pflanzenschutzgesetz, dem Gentechnikgesetz, dem Chemikaliengesetz und hierzu erlassenen Rechtsverordnungen, niedergelegt und leiten sich im Übrigen aus dem Forschungsplan des BMELV ab. Die Zuständigkeit umfasst behördliche Aufgaben und die Forschung in den Bereichen Pflanzengenetik, Pflanzenbau, Pflanzenernährung und Bodenkunde sowie Pflanzenschutz und Pflanzengesundheit. Damit vernetzt das JKI alle wichtigen Ressortthemen um die Kulturpflanze – ob auf dem Feld, im Gewächshaus oder im urbanen Bereich – und entwickelt ganzheitliche Konzepte für den gesamten Pflanzenbau, für die Pflanzenproduktion bis hin zur Pflanzenpflege und -verwendung. Forschung und hoheitliche Aufgaben sind dabei eng miteinander verbunden. Weiterführende Informationen über uns finden Sie auf der Homepage des Julius Kühn-Instituts unter <http://www.jki.bund.de>. Spezielle Anfragen wird Ihnen unsere Pressestelle (pressestelle@jki.bund.de) gern beantworten.

Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for cultivated plants (JKI)

The Julius Kühn-Institute is both a research institution and a higher federal authority. It is structured into 15 institutes and several research service units on the sites of Quedlinburg, Braunschweig, Kleinmachnow, Siebeldingen, Dossenheim und Dresden-Pillnitz, complemented by an experimental station for potato research at Groß Lüsewitz. The head quarters are located in Quedlinburg.

The Institute's core activity is to advise the federal government and the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection in particular on all issues relating to cultivated plants. Its diverse tasks in this field are stipulated in important legal acts such as the Plant Protection Act, the Genetic Engineering Act and the Chemicals Act and in corresponding legal regulations, furthermore they arise from the new BMELV research plan.

The Institute's competence comprises both the functions of a federal authority and the research in the fields of plant genetics, agronomy, plant nutrition and soil science as well as plant protection and plant health. On this basis, the JKI networks all important departmental tasks relating to cultivated plants – whether grown in fields and forests, in the glasshouse or in an urban environment – and develops integrated concepts for plant cultivation as a whole, ranging from plant production to plant care and plant usage. Research and sovereign functions are closely intertwined.

More information is available on the website of the Julius Kühn-Institut under

<http://www.jki.bund.de>. For more specific enquiries, please contact our public relations office (pressestelle@jki.bund.de).

Finanziert mit freundlicher Unterstützung der
**Gemeinschaft der Förderer und Freunde
des Julius Kühn-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen e.V. (GFF)**

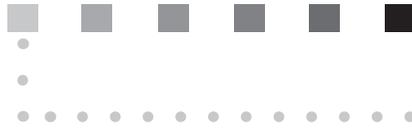
Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,

Tel.: 03946 47-200, E-Mail: GFF@jki.bund.de

Internet: <http://www.jki.bund.de/> Bereich "Über uns"



JKI



Mitteilungen

Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut

1. Nachwuchswissenschaftler-Forum

- 24. bis 26. November 2008 in Quedlinburg -

419
2009

Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)
Erwin-Baur-Str. 27
06484 Quedlinburg

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISSN 1867-1268
ISBN 978-3-930037-46-9

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, 2008. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben bei auch nur auszugsweiser Verwertung vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965. In der Fassung vom 24. Juni 1985 zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, Berlin.

Inhalt - Contents

Themen zur Züchtungsforschung/Züchtung

Moderation Dir. und Prof. Dr. Günter Schumann

Rode, Jeannette; Ahlemeyer, Jutta; Friedt, Wolfgang; Ordon, Frank

**Nutzung der genetischen Diversität für Assoziationsstudien in Gerste
(*Hordeum vulgare* L.)**

6

Utilization of Genetic Diversity for Association Studies in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Bergmann, Britta; Kopahnke, Doris; Ordon, Frank

**Kartierung und züchterische Nutzung neuer Resistenzquellen gegen die
Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres* f. *teres*) der Gerste -
erste Ergebnisse zur Phänotypisierung**

9

Mapping and exploitation of new sources of resistance to net form of net blotch
(*Pyrenophora teres* f. *teres*) in barley – first results of phenotyping

Beckmann, Katrin; Lellbach, Hans; Wehling, Peter

**Genetische Analyse und molekulare Charakterisierung von Schwarzrostresistenz
in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.)**

12

Genetic analysis and molecular characterisation of stem-rust resistance in perennial ryegrass
(*Lolium perenne* L.)

Engelmann, Uta; Kopahnke, Doris; Ordon, Frank

**Kartierung und züchterische Nutzung neuer Resistenzquellen gegen die
Weizenblattdürre (*Pyrenophora tritici-repentis*)**

16

Mapping and exploitation of new sources of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*)

Nehrlich, Stephanie

**Resistenzevaluierung von *Colletotrichum gloeosporioides* an *Gaultheria* unter
In-vitro-Bedingungen**

20

Evaluation of resistance of *Gaultheria* to *Colletotrichum gloeosporioides* under in vitro conditions

Bartelmann, Anne; Badani-Dehmer, Ana, Gloria; Balko, Christiane; Seddig, Silvia

Trockentoleranz bei Kartoffeln

22

Drought tolerance of potato

Struckmeyer, Tobias; Marthe, Frank

**Züchterische Nutzung von Resistenz gegen den Erreger der *Septoria*-Blattflecken
(*Septoria petroselinii*) an Petersilie (*Petroselinum crispum*)**

23

Utilization of resistance to *septoria* leaf spot caused by *Septoria petroselinii* for parsley breeding
(*Petroselinum crispum*)

Herzog, Katja; Flachowsky, Henryk; Hanke, Magda-Viola

**Erste Ergebnisse zur Etablierung eines Sicherheitsvektorsystems an Apfel
(*Malus domestica* BORKH.) zur Erzeugung markergenfreier gm-Pflanzen**

24

Preliminary results to establish a recombinase vector system on apple (*Malus domestica* BORKH.)
to generate marker-free gm-plants

Hättasch, Conny; Flachowsky, Henryk; Hanke, Magda-Viola

Erste Ergebnisse zur Mobilität von *gusA*-spezifischen Silencing-Signalen in Apfelpflanzen

29

Preliminary Results about the mobility of *gusA*-specific silencing signals in apple plants

Engel, Josefine; Weinzierl, Karina; Klocke, Evelyn

***Pelargonium* Suspensionskultur - Charakterisierung und Möglichkeiten der Verwendung**

32

Pelargonium suspension culture - Characterization and prospects for utilization

Weber, Maria; Ulrich, Detlef

- Charakterisierung des Aromamusters der Wilderdbeere *Fragaria nilgerrensis* (Schldl.) als Voraussetzung für die Nutzung in der Erdbeerzüchtung** 36
 Characterisation of the aroma pattern of the wild strawberry *Fragaria nilgerrensis* (Schldl.) as a precondition for the use in strawberry breeding

Themen zum Pflanzenschutz/Phytopathologie

Moderation Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann

Njontie, Charles; Schiemann, Joachim; Hüskén, Alexandra

- Forschungsprojekte zur Sicherung der Koexistenz bei Mais (*Zea Mays L.*)** 41
 Research Projects to Ensure the Coexistence by Maize (*Zea Mays L.*)

Priegnitz, U.; Kühne, S.; Ellmer, F.; Moll, E.; Kowalska, J.

- Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Spinosad-, Neem- und *B.t.t.*-Präparaten auf die Regulierung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) im Ökologischen Landbau** 42
 Effect of Spinosad, Neem and *B.t.t.* on the control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in organic farming

Schuster, C.; Konstantinidou-Doltsinis, S.; Schmitt, A.

- Untersuchung der Wirksamkeit eines Pflanzenextraktes gegen die Braunfäule an Tomatenpflanzen (*Phytophthora infestans*)** 43
 Investigations on the effectiveness of a plant extract against infection of tomato plants with late blight (*Phytophthora infestans*)

Krengel, Sandra

- Effekte einer Temperaturerhöhung auf die natürliche Regulation durch die Marienkäfer *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* bei Blattläusen in Weizen** 47
 The Impact of Increased Temperature on the Predatory Effect of *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* (Coccinellidae) on Aphids in Wheat

Arntjen, Anja; Jelkmann, Wilhelm

- Herstellung eines infektiösen Voll-Längen cDNA Klons und Untersuchungen zur Variabilität des *Apple stem pitting virus*** 52
 Construction of an infectious full-length cDNA clone and investigations on variability of *Apple stem pitting virus*

Gehring, Isabel; Rausch, Thomas; Geider, Klaus

- Identifizierung und Differenzierung von *Erwinia amylovora* und epiphytischer Erwinien mit PCR Methoden** 56
 Identification and differentiation of *Erwinia amylovora* and epiphytic bacteria by PCR methods

Müller, Ina; Geider, Klaus; Jelkmann, Wilhelm

- Biologische Kontrolle des Feuerbrands mittels Bakteriophagen und Bacteriocinen** 60
 Biological control of fire blight by bacteriophages and bacteriocins

Nowak, A.; Konstantinidou-Doltsinis, S.; Seddon, B.; Schmitt, A.

- Alternative Präparate in der Bekämpfung des Falschen Mehltaus an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*)** 64
 Alternative agents for control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumbers

Fischer, D.; Pelz, H.-J.; Prokop, A.

Die Vergrämung von Schermäusen, *Arvicola amphibius* (früher *Arvicola terrestris*), mit Hilfe von Geruchs- und Geschmacksrepellentien auf Basis von pflanzlichen Sekundärmetaboliten

67

The effect of secondary plant compounds for repelling water voles, *Arvicola amphibius* (previously *Arvicola terrestris*)

Jandewerth, Pia; Pelz, Hans-Joachim

Tierschutz und Fallenfang – Ertränkungsfallen auf dem Prüfstand

69

Animal Welfare and Trapping – Testing Drowning Traps

Kluge, Alexander; Nordmeyer, Henning

Verfahren der Bildverarbeitung zur Unkrautererkennung

70

Weed recognition by image processing

Themen zum Pflanzenbau/Bodenkunde und weitere Themen

Moderation Dr. Ute Menge-Hartmann

Schick, Judith; Kratz, Sylvia; Adam, Christian; Schnug, Ewald

Zum Düngepotential thermochemisch behandelter Klärschlammaschen – das EU-Projekt SUSAN

76

Fertilizing potential of thermochemically treated sewage sludge ashes – the EU-Project SUSAN

Al Hassoun, R.; Rogasik, J.; Stöven, K.; Schnug, E.

Soil infiltration as affected by the age and ecological groups of earthworm population

82

Die Einflüsse des Alters und der ökologischen Gruppen von Regenwürmern auf die Infiltrationsrate des Bodens

Hartmann, K.; Lilienthal, H.; Schnug, E.

Optimierung des Erntezeitpunktes von Erbsen durch ein kostengünstiges Verfahren der Fernerkundung

87

Optimizing the harvest date of fresh peas using low cost remote sensing.

Abu-Hashim, M.; Lilienthal, H.; Stöven, K.; Schnug, E.

Characteristics of soil infiltration capacity under different agricultural management

91

Eigenschaften der Infiltrationskapazität von Böden bei unterschiedlicher Bewirtschaftungsweise

Autoren

96

Themen zur Züchtungsforschung/Züchtung

Moderation Dir. und Prof. Dr. Günter Schumann

Rode, Jeannette¹; Ahlemeyer, Jutta²; Friedt, Wolfgang²; Ordon, Frank¹

¹Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg; ²Institut für Pflanzenzüchtung, IFZ, Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen

Nutzung der genetischen Diversität für Assoziationsstudien in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Utilization of Genetic Diversity for Association Studies in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Zusammenfassung

Verschiedene Wintergerstesorten (64 mehr- und 49 zweizeilige), welche im Zeitraum 1959 bis 2003 in Deutschland zugelassen waren, wurden über 3 Jahre an jeweils 12 verschiedenen Standorten in Feldversuchen untersucht. Dabei wurden agronomische Merkmale wie der Kornertrag, die Ertragsstrukturkomponenten, der Proteingehalt und das Resistenzniveau gegen verschiedene Pathogene erfasst. Basierend auf der SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Detektion mittels des Illumina Golden Gate Assays, deren Ergebnisse gemeinsam mit den phänotypischen Merkmalsdaten in Assoziationsstudien genutzt wurden, konnten zahlreiche Einzelnukleotidunterschiede detektiert werden, die mit einer entsprechenden phänotypischen Merkmalsausprägung korreliert sind. Basierend auf diesen Ergebnissen werden CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)-Marker und Primer für die Pyrosequenzierung entwickelt, die anschließend in der praktischen Züchtung eine Nutzung dieser Ergebnisse erlauben sowie eine Verifikation der entsprechenden Assoziationen in spaltenden doppelhaploiden (DH)-Populationen.

Stichwörter: Gerste, Assoziationsstudien, SNP, Illumina Golden Gate Assay, CAPS, Pyrosequenzierung, DH-Populationen

Abstract

Several winter barley cultivars (64 six-rowed and 49 two-rowed) released in Germany in the period 1959-2003 have been phenotyped in three years at 12 locations each, for yield, yield components, protein content, lodging, and resistance to several pathogens. Furthermore, all these cultivars were analysed using the Illumina Golden Gate assay for Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). This provides detailed information on the genome-wide genetic diversity present in cultivated barley. Based on statistical tools robust marker trait associations based on broad phenotypic and genotypic data were identified. As Illumina markers are not directly applicable in barley breeding programmes, they will be converted to easy to handle SNP-markers (CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), pyrosequencing) which facilitate a use of these results in applied barley breeding and a verification of respective marker trait associations in doubled haploid lines (DHs).

Keywords: Barley, association studies, SNPs, Illumina Golden Gate assay, CAPS, pyrosequencing, DHs

Einleitung

In den letzten Jahren haben Assoziationsstudien erhebliche Bedeutung in der Pflanzenzüchtung gewonnen. Der Vorteil von Assoziationsstudien liegt darin, dass keine biparentalen Kreuzungspopulationen mit einer eingeschränkten genetischen Auflösung erstellt werden müssen. Die innerhalb biparentaler Populationen identifizierten Marker sind zudem häufig kreuzungsspezifisch und daher nicht universell in der praktischen Züchtung einsetzbar.

Im Rahmen von Assoziationsstudien werden zunehmend Hochdurchsatz-Markensysteme wie DArT (Diversity Array Technology; Wenzl et al., 2004) und die BeadArray-Technologie (Oliphant et al., 2002) eingesetzt. Diese Verfahren erlauben eine effiziente Erfassung von Einzelnukleotidunterschieden (SNPs) und somit eine genomabdeckende Erfassung der genetischen Diversität, die anschließend in assoziationsgenetischen Studien in Beziehung zum Phänotyp gesetzt werden kann. Die SNPs sind zum größten Teil bereits kartiert, so dass ihre Lage im Genom bekannt ist. Somit können mit diesen Markersystemen im Rahmen von Assoziationsstudien Bereiche im Genom identifiziert werden, die mit der Merkmalsausprägung in Beziehung stehen. In Gerste wurden bereits erste erfolgreiche Assoziationsstudien mit der DArT-Technologie durchgeführt (Comadran et al., 2008; Pswarai et al., 2008).

Material und Methoden

Es wurden 64 mehr- sowie 49 zweizeilige Wintergerstesorten in den Jahren 2004, 2005 und 2006 an jeweils 12 Standorten in Deutschland phänotypisch charakterisiert. Diese Sorten waren in ihrem Zulassungszeitraum (1959-2003) jeweils die bedeutendsten ihrer Dekade (vgl. Ordon et al., 2005). Es wurden agronomische Merkmale wie der Kornertrag, verschiedene Ertragskomponenten, der Proteingehalt und das Resistenzniveau in einer Boniturskala von 1 bis 9 erfasst (1 = resistent und 9 = anfällig). An der Universität Giessen wurden die 113 Gerstesorten mittels 70 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm Structure 2.2 zur Ermittlung der Populationsstruktur verrechnet. Ein für Gerste verfügbarer Illumina Golden Gate Bead Array wurde für die Genotypisierung der Wintergerstesorten eingesetzt. Die aus diesen Analysen gewonnenen Daten wurden mit den Informationen zum Phänotyp unter Verwendung des Softwareprogramms TASSEL Version 2.0.1 assoziiert. Das Signifikanzniveau wurde hierfür auf $p \leq 0,01$ gesetzt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Feldversuche wurden bereits von Ahlemeyer et al. (2008) publiziert. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldversuche der Jahre 2004, 2005 und 2006 für 64 mehr- und 49 zweizeilige Wintergerstesorten

	64 mehrzeilige Wintergerstesorten			49 zweizeilige Wintergerstesorten		
	Min	Max	Mittel	Min	Max	Mittel
Kornertrag (dt/ha)	62,80	89,75	80,60	67,12	81,45	76,58
Proteingehalt (%)	11,44	13,33	12,44	11,61	13,88	12,57
Tausendkornmasse (g)	31,74	50,28	43,38	44,13	61,22	52,11
Kornzahl/Ähre	28,68	44,62	36,56	17,15	23,30	19,61
Ähren/m ²	480,22	703,47	548,53	662,57	918,88	786,92
Lager (Bonitur 1-9)	1,04	7,16	3,31	1,02	5,74	2,99
Mehltau (Bonitur 1-9)	1,84	4,79	3,40	1,52	4,27	2,98
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	1,28	3,21	1,87	1,33	3,72	1,96
Netzflecken (Bonitur 1-9)	1,95	4,24	3,25	2,35	3,85	3,05
Halmknicken (Bonitur 1-9)	1,83	5,10	3,39	1,39	4,50	2,78
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	1,89	4,82	3,19	1,59	4,74	2,81

Bezüglich der Merkmalsausprägung war eine hohe Variation innerhalb des Wintergerstesortimentes zu beobachten. Der Kornertrag der mehr- und zweizeiligen Sorten lag im Mittel über die 3 Versuchsjahre bei 80,60 bzw. 76,58 dt/ha. Es zeigte sich bei Betrachtung der Minimal- und Maximalwerte eine Spanne von 26,95 bzw. 14,33 dt/ha.

Tabelle 2 zeigt die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Merkmalen der Jahre 2004, 2005 und 2006. Bis auf die Boniturstufen von Mehltau und Netzflecken korrelieren die Merkmale hoch signifikant zwischen den 3 Jahren.

Tab. 2 Korrelation der Merkmale der 113 Wintergerstesorten zwischen den 3 Versuchsjahren

	2004-2005	2004-2006	2005-2006
Kornertrag (dt/ha)	0,87***	0,78***	0,84***
Proteingehalt (%)	0,47***	0,32***	0,50***
Tausendkornmasse (g)	0,97***	0,94***	0,95***
Kornzahl/Ähre	0,97***	0,96***	0,96***
Ähren/m ²	0,94***	0,95***	0,95***
Lager (Bonitur 1-9)	0,80***	0,65***	0,71***
Mehltau (Bonitur 1-9)	0,01	-0,39***	0,51***
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	0,53***	0,31***	0,65***
Netzflecken (Bonitur 1-9)	0,12	0,29**	0,39***
Halmknicken (Bonitur 1-9)	0,38***	0,40***	0,72***
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	0,63***	0,51***	0,56***

*, **, *** signifikant bei $p = 0,05$; $p = 0,01$ und $p = 0,001$.

Basierend auf den Daten der 70 Mikrosatelliten wurde die Populationsstruktur des Gerstenmaterials bestimmt. Es erfolgte eine getrennte Analyse von mehr- und zweizeiligen Gerstesorten, wobei einer Gruppierung in jeweils 4 verschiedene Gruppen beobachtet wurde. Die Ergebnisse wurden bei der Berechnung von Assoziationen berücksichtigt.

Die agronomischen Merkmale wurden über die verschiedenen Standorte und die 3 Jahre gemittelt. Es erfolgte eine Verrechnung mit den SNP-Daten. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Assoziationsstudie dargestellt. Es konnten zahlreiche SNPs identifiziert werden, die mit den verschiedenen Merkmalen in Beziehung stehen.

Tab. 3 Ergebnisse der Assoziationsstudie für die 113 Wintergerstesorten

Merkmal	Anzahl SNPs ($p \leq 0,01$)
Kornertrag (dt/ha)	34
Proteingehalt (%)	17
Tausendkornmasse (g)	22
Kornzahl/Ähre	2
Ähren/m ²	32
Lager (Bonitur 1-9)	9
Mehltau (Bonitur 1-9)	13
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	10
Netzflecken (Bonitur 1-9)	0
Halmknicken (Bonitur 1-9)	5
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	31

Diskussion

In den Jahren 2004, 2005 und 2006 wurden 113 Wintergerstesorten an 12 verschiedenen Standorten in Deutschland angebaut. Die Ergebnisse zeigten, dass eine große Variation im Material vorhanden war und damit gute Voraussetzungen für eine Assoziationsstudie geboten wurden.

Die einzelnen Merkmale korrelierten sehr gut über die 3 Anbaujahre. Aus diesem Grunde wurden zunächst nur die Mittelwerte mit den Ergebnissen des Illumina Golden Gate Assays verrechnet. Dabei wurden zahlreiche SNPs detektiert, die mit der Merkmalsausprägung in Beziehung stehen. Die Assoziationen müssen nun zusätzlich mit den Einzelwerten der verschiedenen Standorte und Jahre geprüft werden. Verschiedene Merkmale unterliegen stärkeren Umwelt- und Jahreseinflüssen, so dass hier eine detaillierte Auswertung notwendig ist. Von großem Interesse sind Assoziationen, die über mehrere Standorte und Jahre mit einem Merkmal in Beziehung stehen. Diese könnten für eine Selektion im Züchtungsprozess eingesetzt werden.

Illumina-Marker sind allerdings sehr kostenintensiv und es werden zahlreiche weitere SNPs mit den Arrays untersucht, die keine Beziehung zur Merkmalsausprägung zeigen. Deshalb werden lediglich als assoziiert detektierte SNPs anschließend in CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)-Marker oder Marker für die Pyrosequenzierung umgewandelt.

Auf Grund einer natürlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung kann es bei Assoziationsstudien zu zufälligen Ergebnissen kommen. Man spricht dann von sogenannten falsch positiven Assoziationen. Aus diesem Grunde sollen die konvertierten Marker in spaltenden doppelhaldigen Populationen geprüft werden. Sie können daraufhin im Zuchtprozess als Selektionsmarker eingesetzt werden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), (Gabi-Genobar; FKZ 03115066 A-E) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), (SFB 299), für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- Ahlemeyer, J., W. Friedt, W. Köhler, A. Graner, F. Ordon, 2008: Genetic Gain in German Winter Barley and its Utilization in a Whole-Genome Association Mapping Approach. The 10th International Barley Genetics Symposium (IBGS), 05.-10.04.2008, Alexandria, Ägypten.
- Comadran, J., J. R. Russell, F. A. Van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, M. Baum, A. M. Stanca, N. Pecchioni, A. M. Mastrangelo, T. Akar, A. Al-Yassin, A. Benbelkacem, W. Choumane, H. Ouabbou, R. Dahan, J. Bort, J.-L. Araus, A. Psarayi, I. Romagosa, C. A. Hackett, W. T. B. Thomas, 2008: Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* **161**, 35-45.

- Pswarayi, A., F. A. Van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, J. Comadran, J. R. Russell, N. Pecchioni, A. Tondelli, T. Akar, A. Al-Yassin, A. Benbelkacem, H. Ouabbou, W. T. B. Thomas, I. Romagosa, 2008: Changes in allele frequencies in landraces, old and modern barley cultivars of marker loci close to QTL for grain yield under high and low input conditions. *Euphytica* **163**, 435-447.
- Oliphant, A., D. L. Barker, J. R. Stuelpnagel, M. S. Chee, 2002: BeadArray technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques Suppl.*, 56-61.
- Ordon, F., J. Ahlemeyer, K. Werner, W. Köhler, W. Friedt, 2005: Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding. *Euphytica* **146**, 21-28.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinhofs, A. Kilian, 2004: Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**, 9915-9920.

Kontakt: Jeannette Rode, E-Mail: jeannette.rode@jki.bund.de

Bergmann, Britta; Kopahnke, Doris; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg

Kartierung und züchterische Nutzung neuer Resistenzquellen gegen die Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*) der Gerste - erste Ergebnisse zur Phänotypisierung

Mapping and exploitation of new sources of resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in barley – first results of phenotyping

Zusammenfassung

Die Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*) ist eine der bedeutendsten Krankheiten der Gerste (*Hordeum vulgare*). Die Entwicklung und Nutzung resistenter Sorten stellt eine effektive und ökologisch sinnvolle Methode dar, Ertragsverluste durch diese Krankheit zu vermeiden. Zur Aufklärung der genetischen Basis der Resistenz gegenüber *Pyrenophora teres f. teres* wurden im Sommer 2008, d.h. Aussaat im August und Bonitur bis Oktober, an drei Standorten Freilandresistenzprüfungen mit doppelhaploiden Populationen (DHs) durchgeführt. Im Rahmen der Bonitur wurde quantitativ der prozentuale Befall der Blattfläche sowie qualitativ der Reaktionstyp bestimmt. Die ersten Ergebnisse des Sommerversuchs am Standort Quedlinburg zeigen, dass in den Populationen eine hinreichende genetische Variation vorhanden ist, welche die Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker bildet.

Stichwörter: Gerste (*Hordeum vulgare*), Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*), Resistenz, DH-Linien.

Abstract

Net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres* (Died.) Drechsler) is one of the most important foliar diseases of barley (*Hordeum vulgare*) which causes large economic losses in some barley growing areas. The use of cultivars with resistance to net blotch is the most effective and ecological sound method of controlling this disease. To identify new sources of resistance to net blotch, doubled-haploid barley populations (DHs) were evaluated for resistance in a so called „summer-trial“ at three locations. The populations were evaluated within an extraordinary growing season (August to October). The area under the disease-progress curve (AUDPC) and the infection type were used to assess disease reaction. The first results of the test in Quedlinburg give hint to a sufficient genetic variation which will be the basis for marker development.

Keywords: Barley (*Hordeum vulgare*), net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*), resistance, doubled-haploids.

Einleitung

Die Netzfleckenkrankheit wird hervorgerufen durch den pilzlichen Erreger *Pyrenophora teres f. teres* (Died.) Drechsler (anamorph *Drechslera teres f. teres* (Sacc.) Shoemaker). Ziel dieses Projektes ist die Verbesserung der Widerstandsfähigkeit der Gerste gegen diesen pilzlichen Schaderreger. Zu diesem Zweck gilt es die Genetik der Netzfleckenresistenz in verschiedenen Resistenzdonoren aufzuklären, die entsprechenden Resistenzen im Gerstengenom zu kartieren sowie effiziente molekulare Marker zu entwickeln. Der Erreger

Pyrenophora teres zählt zu den Ascomyceten und besitzt eine hohe physiologische Variabilität, d.h. es existiert eine Vielzahl von Pathotypen mit unterschiedlichen Virulenzen (Hartleb et al., 1990). Das charakteristische Krankheitsbild zeigt sich überwiegend an Blättern, die netzartige bis streifenförmige Flecke aufweisen, welche meist von Chlorosen umgeben sind. Symptome können aber auch an Blattscheiden, Spelzen, Grannen und Körnern auftreten. Für die Resistenzprüfung im Feld werden während des drei-jährigen Projektes „Sommerversuche“ an drei Standorten (Quedlinburg, Leopoldshöhe und Thüle) durchgeführt, deren vorläufige Ergebnisse des Standortes Quedlinburg im Folgenden präsentiert werden.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: Für die Freilandresistenzprüfung gegen *Pyrenophora teres* wurden im Sommersuch 2008 zwei doppelhaploide (DH)- Populationen getestet (Tabelle 1).

Tab. 1 DH- Populationen zur Aufklärung der Genetik der Netzfleckenresistenz

DH-Population	n	Form
Uschi x HHOR 3073	131	Wintergerste
(Post x Viresa) x HHOR 9484	84	Wintergerste

Anbau der zu prüfenden Genotypen: Die 215 Prüfglieder wurden in einfaktorieller randomisierter Blockanlage mit zwei Wiederholungen im „Sommerversuch“ (nach Kopahnke, 1994) angebaut. Die Prüfglieder wurden in Hills (Horste) mit 50 cm Abstand ausgesät (jeweils 25 Körner/Hill). Als resistenter Standard wurde die Wintergerste „HHOR 10860“ eingesetzt. Zudem wurden die anfälligen Standards „Candesse“ und der „Stamm 4046“ jeweils zu beiden Seiten der Hills als Infektionsstreifen angebaut. Vor der Aussaat (6.8.2008) der zu prüfenden Genotypen wurde infiziertes Stroh in die Versuchsfläche eingemulcht, um das Ausgangsinokulum mit *Pyrenophora teres* zu erhöhen. Die erste Bonitur wurde zu Beginn des Erscheinens deutlicher Symptome an den anfälligen Standards durchgeführt. Die Resistenzbewertung erfolgte an vier Boniturterminen während des Zeitraumes 17.9.-28.10.2008, indem der prozentuale Befall der Blattfläche und der Reaktionstyp nach Tekauz (1985) bestimmt wurden. Aus dem prozentualen Befall der Blattfläche wurde die Fläche unter der Befallsverlaufskurve (AUDPC, d.h. area under disease-progress curve) ermittelt, die dem mittleren Befall je Teilstück entspricht (Walther et al., 2000). Die Klasseneinteilung für die Darstellung des mittleren Befalls richtete sich nach der Faustregel von STURGES (Köhler et al., 2002).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Auswertung des mittleren Befalls sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

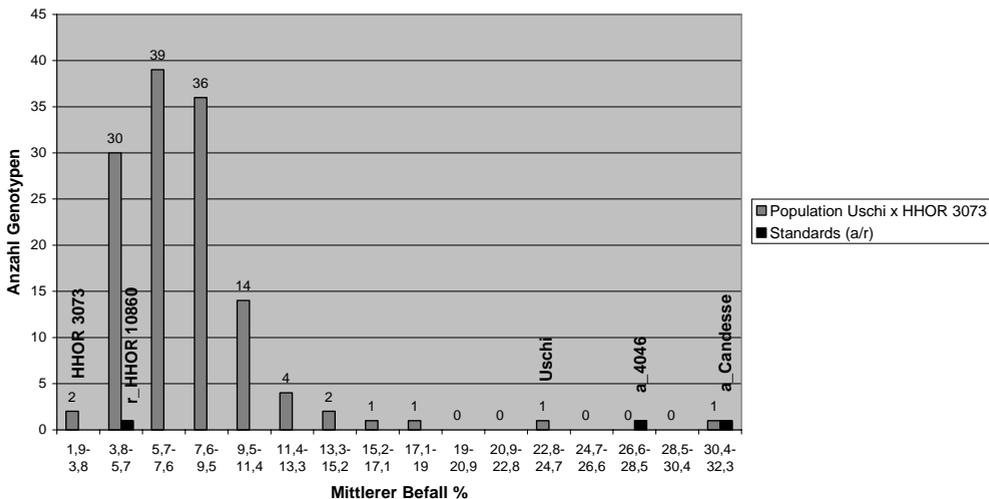


Abb. 1 Häufigkeitsverteilung des mittleren Befalls mit *P. teres* der Population Uschi x HHOR 3073 (Sommerversuch 2008)

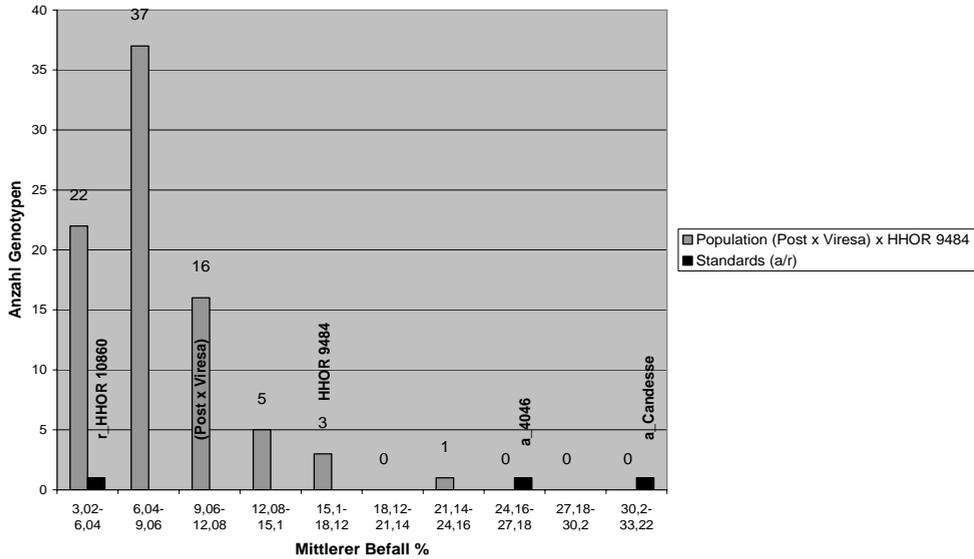


Abb. 2 Häufigkeitsverteilung des mittleren Befalls mit *P. teres* der Population (Post x Viresa) x HHOR 9484 (Sommerversuch 2008)

Die errechneten mittleren Befallswerte der Eltern der DH-Populationen am Standort Quedlinburg sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Mittlerer Befall der Eltern der DH-Populationen des Sommerversuchs 2008

Population	Elter	Mittlerer Befall [%]
Uschi x HHOR 3073	Uschi	23,2
	HHOR 3073	3,11
(Post x Viresa) x HHOR 9484	(Post x Viresa)	9,93
	HHOR 9484	17,37

Bei beiden Populationen zeigt sich eine kontinuierliche Verteilung, die jedoch nicht einer Normalverteilung entspricht (KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test, $p < 0,01$). Wie anhand der geprüften Standards deutlich wird, konnte mit der beschriebenen Versuchsanordnung eine erfolgreiche Infektion mit *P. teres* erzielt werden. Eine ähnliche Versuchsanordnung für die Resistenzprüfung gegen die Netzfleckenkrankheit wird auch von Sachs (2000) beschrieben. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass bei den Populationen eine Differenzierung der Eltern hinsichtlich des mittleren Befalls gegeben ist. Während diese in der Population Uschi x HHOR 3073 deutlich ist, handelt es sich bei der anderen Kombination um die Kreuzung zweier Genotypen mit mittlerem Resistenzniveau. Entsprechend der Reaktion der Eltern sind in der Population (Post x Viresa) x HHOR 9484 deutliche Transgressionen in Richtung resistenterer Genotypen zu erkennen, welche auf das Vorhandensein positiver Allele in beiden Eltern schließen lässt. Diese ist zwar in der Population Uschi x HHOR 3073 nicht zu erkennen, jedoch zeigt sich auch hier keine Klasseneinteilung, so dass davon auszugehen ist, dass auch die Resistenz von HHOR 3073 durch mehrere QTL (quantitative trait loci) bedingt ist. Eine Transgression in Richtung resistenterer Genotypen zeigte sich auch bei Steffenson et al. (1996) bei Freilandresistenzprüfungen der DH-Population „Streptoe x Morex“, anhand dieser sieben QTL für die Netzfleckenresistenz identifiziert werden konnten.

Gemeinsam mit den diesjährigen Ergebnissen von zwei weiteren Standorten sowie durch eine Wiederholung dieser Versuche in 2008 werden sichere phänotypische Daten als Basis für eine QTL-Analyse gewonnen.

Literatur

- Hartleb, H.; Meyer, U.; Lehmann, C.O. (1990): Das Resistenzverhalten von Saatgersten gegenüber verschiedenen Isolaten von *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin **26**, 3, 257-264.
- Köhler, K.; Schachtel, G.; Voleske, P.(2002): Biostatistik. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, 301 S.
- Kopahnke, D. (1994): Untersuchungen zur Epidemiologie von *Drechslera teres* an Gerste und Selektion von resistentem Ausgangsmaterial. Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Jahresbericht 1994, 63-65.
- Sachs, E. (2000): Netzfleckenkrankheit der Gerste. In: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt, Teil 2. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft, **373**, 14-17.
- Steffenson, B.J.; Hayes, P.M.; Kleinjohs, A. (1996): Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. Theor Appl Genet **92**, 552-558.
- Tekauz, A. (1985): A numerical scale to classify reaction of barley to *Pyrenophora teres*. Can. J. Plant Pathol., **7**, 181-183.
- Walther, U.; Flath, K.; Moll, E.; Prochnow, J.; Sachs, E. (2000): Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte. In: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt, Teil 3. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft, **374**, 8-25.

Kontakt: Britta Bergmann, E-Mail: britta.bergmann@jki.bund.de.

Beckmann, Katrin; Lellbach, Hans; Wehling, Peter

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Groß Lüsewitz

Genetische Analyse und molekulare Charakterisierung von Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.)

Genetic analysis and molecular characterisation of stem-rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)

Zusammenfassung

Ein Blattsegment-Test auf Resistenz von Deutschem Weidelgras gegen den Erreger des Schwarzrostes (*Puccinia graminis* ssp. *graminicola*) wurde entwickelt. Eine Kartierungspopulation mit 394 Individuen wurde erzeugt, die in anfällige und resistente Individuen aufspaltet. Die Verteilung von stark befallenen und wenig befallenen Individuen lässt auf einen einfachen, dominanten Vererbungsmodus der Resistenz schließen. Die Korrelation von Boniturdaten, die in unabhängigen Resistenz-Testungen und an Pflanzen unterschiedlichen Alters erhoben wurden, lässt auf eine gute Robustheit des entwickelten Testverfahrens und eine weitgehende Altersunabhängigkeit der Resistenz schließen. Die Resistenz individueller Pflanzen war gegenüber allen drei verwendeten Inokula unterschiedlicher Herkünfte wirksam. Ziel des Projektes ist die Entwicklung molekularer Marker für die gefundene Schwarzrostresistenz.

Stichwörter: Deutsches Weidelgras, Schwarzrost, Resistenz

Abstract

A detached-leaf test for resistance of perennial ryegrass to stem rust (*Puccinia graminis* ssp. *graminicola*) has been developed. A *L. perenne* population consisting of 394 plants and segregating with susceptible and resistant individuals was generated by crossing. The distribution of individuals displaying either severe or zero to weak stem-rust infestation indicated a simple mode of inheritance. Correlation of infestation scores obtained with independent testings and with plants of varying age indicated satisfactory robustness of the test procedure and stage-independency of the resistance. Resistance of individual plants was found to be effective towards all three inocula tested.

Key words: perennial ryegrass, stem rust, resistance

Einleitung

Lolium-Arten gehören zu den wirtschaftlich wichtigsten Gräsern in Europa. Die europäische Saatgutproduktion erfolgt in klimatisch besonders geeigneten Regionen. Auch in Deutschland wird Vorstufen- und Basissaatgut produziert. Höhere Sommertemperaturen als Folge des Klimawandels haben die Ausbreitung und Befallsstärke von Schwarzrost in Vermehrungsbeständen in den letzten Jahren stark ansteigen lassen. Daher sind Vermehrer gezwungen, prophylaktische Fungizidbehandlungen durchzuführen, die zu einer erheblichen Senkung der Deckungsbeiträge in der Grassamenproduktion führen. Die Grassamenproduktion verliert für die Landwirtschaft an Attraktivität gegenüber dem Anbau anderer Fruchtarten, so dass es immer schwieriger wird, ausreichend Vermehrungsbetriebe zu finden.

Die einzige nachhaltige Lösung dieses Problems liegt im Anbau schwarzrostresistenter Sorten. Voraussetzung für die Selektion resistenter Sorten ist die Anwendung einer kontrollierbaren Resistenzprüfmethode, da der natürliche Befall im Feld sehr witterungsabhängig ist und nicht in jedem Jahr auftritt. Neben der Entwicklung eines Resistenztests sollen genetische Ressourcen für Schwarzrostresistenz ausfindig gemacht und hinsichtlich der beteiligten Gene auf genetischer und molekularer Ebene analysiert werden. Im Folgenden werden erste Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens vorgestellt.

Material und Methoden

Zur Entwicklung des Resistenztests wurde die Kreuzungsfamilie LPSR2061 der Saatzucht Steinach GmbH verwendet. Diese Familie stammt aus einer Paarkreuzung zwischen einer Pflanze der diploiden Sorte 'Weigra' und einer Pflanze, die auf offene Abblüte einer Einzelpflanze der Sorte 'Fennema' zurückgeht. Die Gameten, die zu LPSR2061 geführt haben, sind somit in ihrem Genotyp anonym. Schwarzrostresistente und –anfällige Phänotypen, die in der Familie LPSR2061 herausspalteten, wurden als Eltern für weitere Kreuzungen ausgewählt. Auswahlkriterien waren (a) nachgewiesene starke Selbstinkompatibilität des Samenelterns (Selbstungsansatz < 2 Samen/ 2 Ähren) zur Sicherstellung von legitimen Nachkommen aus Kreuzung und (b) ein hoher Ansatz an Kreuzungssamen ($n > 220$). Zwei der Nachkommenschaften (LPSR1001 und LPSR1002) entstammten jeweils aus Kreuzungen zwischen einem resistenten und einem anfälligen Elter; zwei weitere Kreuzungen (LPSR1003 und LPSR1004) verwendeten jeweils anfällige Eltern.

In Anlehnung an Arbeiten zum Braunrost im Roggen (Wehling et al. 2003) wurde ein In-situ-Resistenztest entwickelt; hierbei wurde besonders die Temperaturführung an die Bedürfnisse von *Lolium*-Rostpilzen angepasst (Roderick und Thomas 1997). Als Inokulum dienten Gemische von Uredosporen, die aus Sporensammlungen unterschiedlicher Herkünfte und Jahre (Malchow 2003, Bornhof 2007, Steinach 2007) an isoliert angezogenen Pflanzen vermehrt worden waren. Zudem wurde von allen drei Sporenherkünften je ein Einzelpustelisolat erzeugt und zur Inokulation verwendet. Die Bonitur der Blattsegmente erfolgte 9 – 10 Tage nach der Inokulation nach einer selbst entwickelten Skala von 1 – 9 (Tabelle 1).

Tab. 1 Verwendete Boniturskala für Schwarzrost an *L. perenne*

Bonitur	Anzahl Pusteln/Gesamteindruck	Befallene Blattfläche
1	0	0 %
2	1 - 2	< 1 %
3	3 - 5	1 - 5 %
4	> 5 Keine ausgeprägte Sporulation	bis 10 %
5	Vereinzelte Sporulation mit mehr als 15 Pusteln	bis 20 %
6	Dünne gleichmäßige Sporulation	bis 30 %
7	Dünne gleichmäßige Sporulation mit teilweise stark befallenen Flächen	bis 40 %
8	Blattsegmente gleichmäßig von Pusteln bedeckt	bis 50 %
9	Blattsegmente vollständig von Pusteln bedeckt	≥ 60 %

Für Nachkommenschaftstests von bonitierten Phänotypen wurden Pflanzen der Familie LPSR1001 bei 30 °C unter Ausnutzung von Pseudokompatibilität geselbstet und ihre Nachkommen dem Blattsegmenttest unterzogen. Um die Eignung des Blattsegmenttests zur Vorhersage des Befalls im Feld zu überprüfen, wurde die Familie LPSR1001 vernalisiert, im Frühjahr 2008 verklont und die Klonteile an drei Standorten mit allgemein hohem Schwarzrostbefall (Steinach, Freising und Reckenholz (Schweiz)) als vollständig randomisierte Gitteranlage mit je 340 Prüfgliedern in zwei Wiederholungen ins Feld gepflanzt. Bonituren sollten sowohl im Sommer 2008 als auch im Sommer 2009 erfolgen. Korrelationen wurden mit PLABSTAT Version 3A (Utz 2003) berechnet; die Ergebnisse der Signifikanztests werden durch Symbole angegeben: ** = signifikant bei $\alpha = 0,01$.

Ergebnisse

In Blattsegmenttests der Kreuzungsfamilien LPSR1003 und LPSR1004, die jeweils auf Kreuzungen zwischen zwei anfälligen Eltern zurückgehen, reagierten fast alle (369/383) Individuen anfällig. Hingegen spalteten die Kreuzungsfamilien LPSR1001 und LPSR1002 in befallene und nicht befallene Individuen auf. Auf Grund des größeren Populationsumfangs ($n = 394$) wurde für alle weiteren Untersuchungen die Population LPSR1001 ausgewählt.

Tab. 2 Korrelationskoeffizienten zwischen Blattsegmenttests zu fünf Zeitpunkten und mit drei verschiedenen Sporenherkünften; 2 Wiederholungen je Inokulation; 394 Prüfglieder/ Wiederholung (alle Werte zeigen Signifikanz für $\alpha = 0,01$).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	7. Woche Ma`03									
2	7. Woche Ma`03	0.921								
3	12. Woche Ma`03	0.864	0.869							
4	12. Woche Ma`03	0.862	0.862	0.937						
5	30. Woche Bo`07	0.856	0.846	0.903	0.906					
6	30. Woche Bo`07	0.871	0.851	0.916	0.923	0.973				
7	30. Woche St`07	0.861	0.848	0.897	0.911	0.952	0.958			
8	30. Woche St`07	0.853	0.858	0.918	0.924	0.922	0.937	0.937		
9	30. Woche Ma`03	0.846	0.853	0.909	0.917	0.908	0.926	0.910	0.959	
10	30. Woche Ma`03	0.849	0.852	0.907	0.917	0.917	0.931	0.918	0.960	0.970

Vernalisation erfolgte zwischen 12. und 30. Woche; Ma`03 = Sporengemisch Malchow 2003; Bo`07 = Sporengemisch Bornhof 2007; St`07 = Sporengemisch Steinach 2007

Weitere Blattsegmenttests zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien mit Inokula aus drei Herkünften ergaben eng korrelierte Ergebnisse mit $0,846^{**} \leq r \leq 0,960^{**}$ (Tabelle 2). Inokulationen mit drei aus den unterschiedlichen Sporenherkünften entwickelten Einzelpustelisolaten ergaben ebenfalls enge Korrelationen der Boniturnoten zu den Modalwerten über die Sporenherkünfte ($0,860^{**} \leq r \leq 0,931^{**}$; nicht gezeigt).

Aufgrund der engen Korrelationen der Boniturnote wurde für jedes der 394 Individuen von LPSR1001 jeweils der Modal-Boniturnote über alle fünf Inokulationen mit je zwei Wiederholungen ermittelt. Die resultierende Häufigkeitsverteilung dieser Modalwerte war zweigipflig (Abbildung 1). Die willkürliche Zusammenfassung der Boniturnoten 1-4 zu einer "resistenten" und der Boniturnoten 5-9 zu einer "anfälligen" Gruppe ergab eine Aufspaltung von 196 : 198, welche einem 1:1 Verhältnis entspricht.

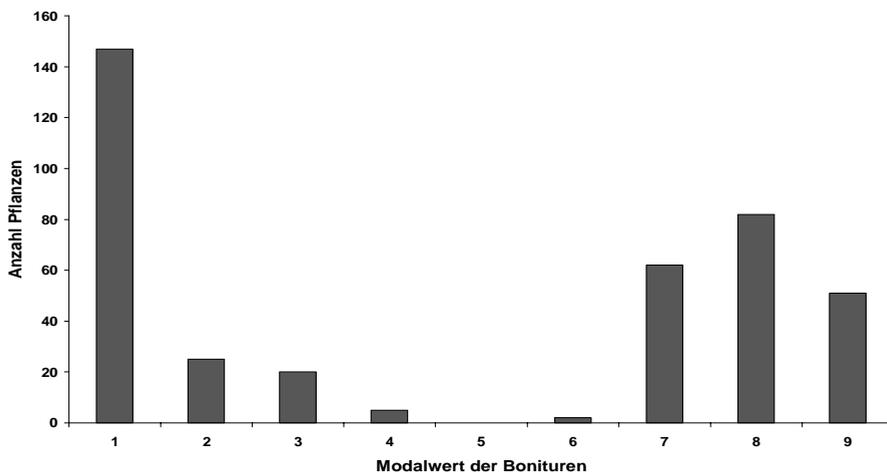


Abb. 1 Häufigkeitsverteilung der Modalwerte der Boniturnoten für Population LPSR1001 über fünf Inokulationen mit drei unterschiedlichen Sporengemischen.

Diskussion

Für die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit des vorliegenden In-situ-Tests sprechen folgende Befunde. Erstens führte der Test in den Kreuzungsfamilien LPSR1003 und LPSR1004 zu dem erwarteten Ergebnis, indem fast alle Individuen als anfällig erkannt wurden; die Rate an "escapes", d.h. an genetisch anfälligen Individuen, die einer erfolgreichen Inokulation entgehen, war somit gering. Zweitens waren die Boniturergebnisse von separaten Inokulationen der aufspaltenden Familie LPSR1001 mit verschiedenen Sporenherkünften bzw. Einpustel-Isolaten sehr eng miteinander korreliert. Der entwickelte Test ist somit in der Lage, innerhalb spaltender Populationen eine konsistente Klassifizierung in resistente und anfällige Phänotypen vorzunehmen.

Die beobachtete zweigipflige Verteilung von Klassen niedriger bzw. hoher Befallsnoten liefert erste Hinweise auf einen einfachen Vererbungsmodus der phänotypischen Variation in den Populationen LPSR2061 und LPSR1001. Der Befund steht in Übereinklang mit der Hypothese eines monogen-dominanten Erbgangs, wie er bei Kreuzung eines heterozygot-resistenten Elters mit einem anfälligen Elter auftritt. Monogen-dominante Vererbung wurde auch im Falle einer Kronenrost-Resistenz in Welschem Weidelgras (*L. multiflorum* Lam.) beobachtet (Hackauf und Lellbach 2007). Nachkommenschaftstests von Individuen der Familie LPSR1001 werden weitere Informationen zur Vererbung der vorliegenden Resistenz und zur genetischen Relevanz der gewählten Grenze für die Klassifizierung anfälliger und resistenter Phänotypen liefern und so eine Zuordnung von phänotypischen Boniturnoten und Resistenzgenotypen erlauben. Die Feldprüfungen werden zeigen, inwieweit die Ergebnisse des Blattsegmenttests geeignet sind, die Befallsituation im Feld voraus zu sagen.

Die ermittelten engen Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Blattsegmenttests zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen weisen darauf hin, dass sich die Resistenz im Laufe der Pflanzenentwicklung nicht verändert hat und es sich somit um eine stadienunspezifische Resistenz handelt, wie sie beispielsweise auch für Braunrost-Resistenz im Roggen beobachtet wurde (Roux et al. 2004). Ebenso lassen die hohen Korrelationen zwischen den Ergebnissen von Blattsegmenttests mit unterschiedlichen Sporenherkünften (Malchow, Bornhof, Steinach) vermuten, dass die in Familie LPSR1001 segregierende Resistenz keine enge Rassenspezifität aufweist und somit relativ dauerhaft sein könnte. Genauere Aussagen zur Rassenspezifität der Schwarzrost-Resistenz erfordern allerdings die Untersuchung von mehr als drei Einzelpustel-Isolaten des Erregers sowie eine Unterscheidung und Klassifizierung der Isolate nach Virulenz mit Hilfe eines Differenzialsortiments von *L. perenne*-Genotypen. Ein solches Differenzialsortiment ist gegenwärtig jedoch nicht verfügbar.

Obwohl der entwickelte Resistenztest methodisch einfach anzuwenden ist, stellt die sehr arbeits- und zeitintensive Vermehrung des Inokulums den limitierenden Faktor für direkte Phänotypisierungen in Prebreeding- und Zuchtprogrammen dar. Deshalb sollen molekulare Marker für die vorhandene Resistenz entwickelt werden. Für die Markeranalysen stehen Resistenzgen-Analoga und Microsatelliten aus verschiedenen Quellen zur Verfügung (Ikeda 2005), Li et al. 2006, Kubik et al. 1999, Jones et al. 2002, Hirata et al. 2006).

Screenings der Eltern und von Bulks resistenter bzw. anfälliger Individuen der Familie LPSR1001 sind angelaufen.

Danksagung

Dank gilt Ruth Masermann, Marion Hos und Daniela Kempke für die Unterstützung bei den technischen Arbeiten und Herrn Dr. Eickmeyer für die Bereitstellung der Kreuzungsfamilie LPSR2061. Die Arbeiten werden finanziell gefördert durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) und in Kooperation mit der Saatzucht Steinach GmbH durchgeführt.

Literatur

- Hackauf, B., Lellbach, H., 2007: Mapping of *LmPc*, a major dominant gene from *Lolium multiflorum* conferring resistance to crown rust. Proceedings of the XXIV. EUCARPIA Meeting.
- Hirata, M., Cai, H., Inoue, M., Yuyama, N., Miura, Y., Komatsu, T., Takamizo, T., Fujimori, M., 2006: Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Theoretical and Applied Genetics **113**, 270 – 279.
- Ikeda, S., 2005: Isolation of disease resistance gene analogs from Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Grassland Science **51**, 63 – 70.
- Jones, E.S., Dupal, M.P., Dumsday, J.L., Hughes, L.J., Forster, J.W., 2002: An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theoretical and Applied Genetics **105**, 577 – 584.

- Kubik, C., Meyer, W. A., Gaut, B. S., 1999: Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. *Crop Science* **39**, 1136 – 1141.
- Li, J., Xu, Y., Fei, S., Li, L., 2006: Isolation, characterization and evolutionary analysis of resistance gene analogs in annual ryegrass, perennial ryegrass and their hybrid. *Physiologia Plantarum* **126**, 627 – 638.
- Roderick, H.W., Thomas, B.J., 1997: Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. lolina*) and some effects of temperature on the establishment of the disease and sporulation. *Plant Pathology* **46**, 751 – 761.
- Roux, S.R., Hackauf, B., Linz, A., Ruge, B., Klocke, B., Wehling, P., 2004: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 2. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr3*, *Pr4*, and *Pr5*. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 192 - 201.
- Utz, H.F., 2003: PLABSTAT Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik Universität Hohenheim.
- Wehling, P., Linz, A., Hackauf, B., Roux, S. R., Ruge, B., Klocke, B., 2003: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2*. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 432 – 438.

Kontakt: Katrin Beckmann, E-Mail: katrin.beckmann@jki.bund.de

Engelmann, Uta; Kopahnke, Doris; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg

Kartierung und züchterische Nutzung neuer Resistenzquellen gegen die Weizenblattdürre (*Pyrenophora tritici-repentis*)

Mapping and exploitation of new sources of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*)

Zusammenfassung

Für eine Kartierung und die anschließende züchterische Nutzung von Resistenzen gegen die Weizenblattdürre, wurde die DH-Populationen ‚Jenga‘ x ‚Tuareg‘ in verschiedenen Versuchen im Hinblick auf ihre Resistenz gegen *Pyrenophora tritici-repentis* analysiert. Dabei zeigte sich, dass das PTR-Isolat ASC1 im Gewächshausversuch einen hohen mittleren Befall bei dieser Population verursacht und eine gute Differenzierung der einzelnen DH-Linien ermöglicht. Die durchgeführten Freilandversuche an zwei Standorten wiesen zwar deutliche Unterschiede im mittleren Befall auf, jedoch war die Reaktion der einzelnen DH-Linien vergleichbar. Eine genotypische Untersuchung mittels Mikrosatelliten- und AFLP-Analysen zur Erstellung einer genetischen Karte als Grundlage für eine QTL-Analyse wurde begonnen. Von bisher 267 getesteten SSRs waren 83 polymorph und von 256 getesteten AFLP Primerkombinationen 146.

Stichwörter: *Pyrenophora tritici-repentis*, PTR, Weizen, Resistenz

Abstract

Tan spot, caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* Drechs. (anamorph *Drechslera tritici-repentis* Shoem.), is one of the major foliar diseases of wheat in Germany which is of worldwide increasing importance. Therefore, the development of resistant wheat cultivars is essential. Marker based selection procedures can be considered as an efficient tool to enhance breeding of resistant cultivars. Therefore, the DH-population ‚Jenga‘ x ‚Tuareg‘ (110 DH-lines) was analysed in green house tests using the isolate ASC1 and in field tests at two locations for resistance to *Pyrenophora tritici-repentis*. Based on these data and a genetic map QTL analysis will be performed. Up to now out of 267 SSRs tested, 83 turned out to be polymorphic and out of 256 AFLP primer combinations polymorphisms were detected in 146 combinations.

Keywords: Tan spot, wheat, resistance

Einleitung

Die Weizenblattdürre, welche von dem pilzlichen Krankheitserreger *Pyrenophora tritici-repentis* Drechs. (anamorph *Drechslera tritici-repentis* Shoem.) hervorgerufen wird, ist weltweit verbreitet und hat aufgrund einer veränderten Produktionstechnik (enge Fruchtfolge, pfluglose Bodenbearbeitung, Verbleiben von

Ernterückständen und Ausfallgetreide auf dem Acker) sowie sich wandelnder klimatischer Bedingungen in den letzten Jahren an Bedeutung in der Landwirtschaft gewonnen. Die durch *Pyrenophora tritici-repentis* hervorgerufenen Schadsymptome betreffen vorwiegend den Blattapparat und sind gekennzeichnet durch das Auftreten von Nekrosen umgeben von einem rombenförmigen chlorotischen Hof. Im fortschreitenden Krankheitsverlauf kann es zu einer vollständigen Mazeration des Blattgewebes kommen. Bedingt durch eine Reduktion der photosynthetisch aktiven Fläche werden weniger Assimilate gebildet und es kommt zur Ausbildung von Kümmerkorn.

Abhängig von der Anfälligkeit der Weizensorten sind Ernteverluste von bis zu 60% beschrieben. Eine Vermeidung dieser Ertragsverluste durch eine Veränderung der Produktionstechnik ist aus wirtschaftlichen Gründen schwer realisierbar. Auch die Behandlung mit strobilurin- und triazolhaltigen Fungiziden unter dem Gesichtspunkt einer nachhaltigen, umweltschonenden Pflanzenproduktion ist langfristig nicht geeignet. Daher ist die Identifikation von Resistenzen gegenüber *Pyrenophora tritici-repentis* und deren züchterische Nutzung von besonderer Bedeutung. Ziel dieses Projektes ist es daher, die in Deutschland vorkommenden *P. tritici-repentis* Isolate hinsichtlich ihrer Virulenz zu charakterisieren und basierend auf diesen Erkenntnissen die Genetik der Resistenz in verschiedenen doppelhaploiden Populationen (DHs) aufzuklären und molekulare Marker zu entwickeln, welche eine beschleunigte Introgression in adaptiertes Zuchtmaterial ermöglichen ebenso wie die Kombination entsprechender Resistenzen. Diese Arbeiten sollen langfristig dazu dienen, das Resistenzniveau des Weizens gegenüber *P. tritici-repentis* zu verbessern.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: Neben anderen DH-Linien stand zur Bearbeitung obengenannter Fragestellungen eine DH-Population (110 DH-Linien) aus der Kreuzung der resistenten Sorte 'Jenga' mit der anfälligen Sorte 'Tuareg' zur Verfügung. Zur Phänotypisierung der DH-Linien wurden in der Vegetationsperiode 2007/08 an zwei Standorten (Quedlinburg und Sölingen) Feldversuche in zwei Wiederholungen mit künstlicher Inokulation mittels einer Körnerbrut durchgeführt. Zusätzlich erfolgten unter kontrollierten Bedingung Gewächshausversuche mit dieser DH-Population. Dafür wurden die Genotypen der Populationen 'Jenga' x 'Tuareg' in 13 cmØ Töpfen in Fruchtdorfer N-Erde mit 3 Körnern/ Topf bei 18 °C und 60% Luftfeuchte für ca. 4-5 Wochen angezogen. Im 4-5 Blattstadium erfolgte eine Sprüinfektion mit einem Einzelsporisolat der Konzentration von 3000 Konid/ ml.

Pyrenophora tritici-repentis: Zur Gewinnung von phäotypischen Daten standen 5 *Pyrenophora tritici-repentis* Isolate (86-124, 90-2, Alg 3-24, ASC1, SC 29) zur Verfügung, welche 5 verschiedene PTR-Rassen repräsentieren (Lamari et al. 2003). Zusätzlich wurde mit 10 weiteren PTR-Isolaten gearbeitet, die aus Deutschland und Ungarn stammen. Die Kultivierung der Pilze erfolgte auf V8-Potato-Dextrose-Agar bei 22 °C und Dunkelheit (SINGH 2006).

Konidieninduktion und Inokulation: Die Infektion der DH-Linien im Gewächshaus erfolgte mit einer Konidiensuspension der Pilzisolat. Zur Erzeugung dieser Konidien wurde fünf Tage nach Beimpfung und Kultivierung des PTR-Pilzes das Luftmycel mit 100µl sterilem Wasser benetzt und angedrückt. Nach einer 12stündigen Bestrahlung der Petrischalen mit UV-Licht wurden diese für 48h bei 8 °C und Dunkelheit inkubiert. Die sich bildenden Konidien wurden mit sterilem Wasser abgeschwemmt. Die Konidiensuspension wurde auf eine Konzentration von 3000 Konidien/ml eingestellt. Zur Benetzung der Pflanzen wurde ein Tropfen Triton zur Suspension gegeben. Die Infektion der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte mittels Sprühinokulation, wobei ca. 5 ml Konidiensuspension/Topf ausgebracht wurden. Die Pflanzen wurden 48h bei 18 °C und 100%Luftfeuchte nach Infektion kultiviert. Die weitere Anzucht erfolgte bei 22 °C. Nach 14 Tagen wurde das Schadbild bonitiert. Es wurde eine zweimalige Infektion mit ca. 3wöchigem Abstand durchgeführt.

Körnerbrut: Um einen ausreichenden Befallsdruck von PTR im Feldversuch zu erzeugen, wurde eine künstliche Inokulation mit einer Hafer-Körnerbrut durchgeführt. Dafür wurde gequollener und autoklavierter Hafer mit den verschiedenen PTR-Isolaten beimpft. Nachdem die Körner ausreichend mit Mycel bewachsen waren, wurde ein Gemisch hergestellt und im Januar 100g Körnerbrut/Genotyp auf das Versuchsfeld ausgebracht.

Bonitur: Das von *P. tritici-repentis* hervorgerufene Schadbild wurde durch den prozentualen Befall der Blattfläche anhand der Boniturhilfe von Moll et al. 2000 erfasst. Bei den Gewächshausversuchen erfolgte eine zweimalige Bonitur ca. 2 Wochen nach Sprühinokulation mit der Konidiensuspension. Der Feldversuch wurde ab Mai in Quedlinburg dreimal und in Sölingen viermal bonitiert. Die Auswertung der Boniturergebnisse erfolgte mittels Berechnung der Fläche unter der Befallsverlaufskurve (AUDPC) und der Ermittlung des mittleren Befalls der einzelnen Prüfglieder.

Mirkosatellitenmarker-Analysen: Zur Erzeugung einer Skelettkarte, welche als Basis einer Kartierung und damit einer QTL-Analyse dient, wurden die Eltern der DH-Populations Linien 'Jenag' und 'Tuareg' auf Mikrosatelliten-Polymorphismen untersucht. Anschließend wurden die DH-Populations Linien mit den polymorphen Mikrosatelliten analysiert. Die PCR-Ansätze und PCR-Reaktionen erfolgten nach einem modifizierten Protokoll von Roeder et al. 1995. Die elektrophoretischen Auftrennungen der PCR-Fragmente wurden mit einem 3130xl Genetic Analyzer durchgeführt.

AFLP-Analyse: Zur Identifikation polymorpher AFLPs wurden 256 AFLP-Primerkombinationen unter Verwendung des AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) auf den Eltern hinsichtlich Polymorphismen untersucht und polymorphe Kombinationen anschließend auf 94 Genotypen der DH-Population 'Jenga' x 'Tuareg' eingesetzt. Die Restriktion mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MseI* sowie die Adapterligation mit den entsprechenden Adaptern erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde eine Präamplifikation mit den 1+Primer E01 (+A) und M02 (+C) durchgeführt. Es folgte die Selektive Amplifikation mit 3+Primern (Vos et al. 1995). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 8%igem Polyacrylamidgel in einem DNA Analyser 4300 (Licor) nach Herstellerangaben.

Ergebnisse

Von den analysierten 15 PTR-Isolaten zeigte das Isolat ASC1 eine gute Differenzierung zwischen den Eltern und eine stabile Konidienproduktion. Daher wurden mit diesem Isolat die Gewächshausversuche an der DH-Population 'Jenga' x 'Tuareg' durchgeführt. Von der zweimaligen Versuchswiederholung wurde die Fläche unter der Befallsverlaufskurve berechnet und der mittlere Befall der einzelnen DH-Linien ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt.

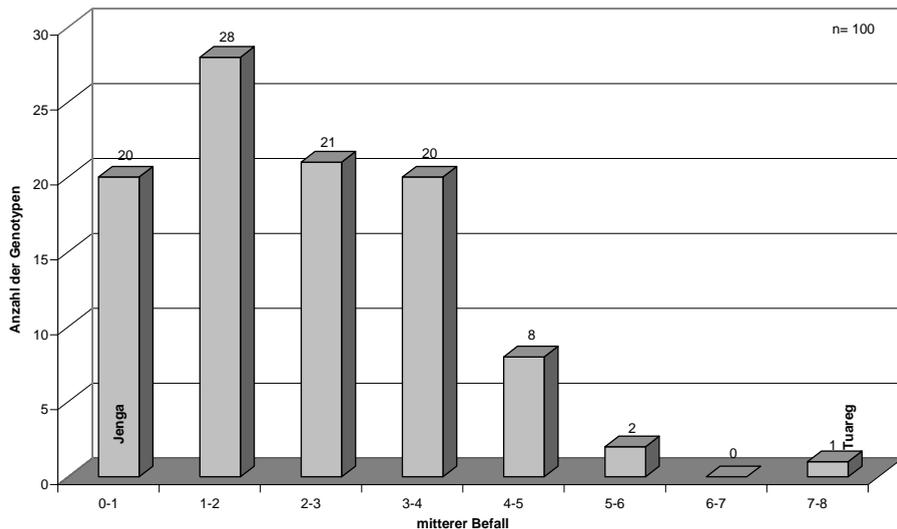


Abb. 1 Mittlerer PTR-Befall in der DH-Population 'Jenga' x 'Tuareg', Gewächshausversuche 2008

Von den Daten der beiden Feldversuche wurden ebenfalls der AUDPC-Wert und der mittlere Befall bestimmt. Die Verteilung des mittleren Befalls ist in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

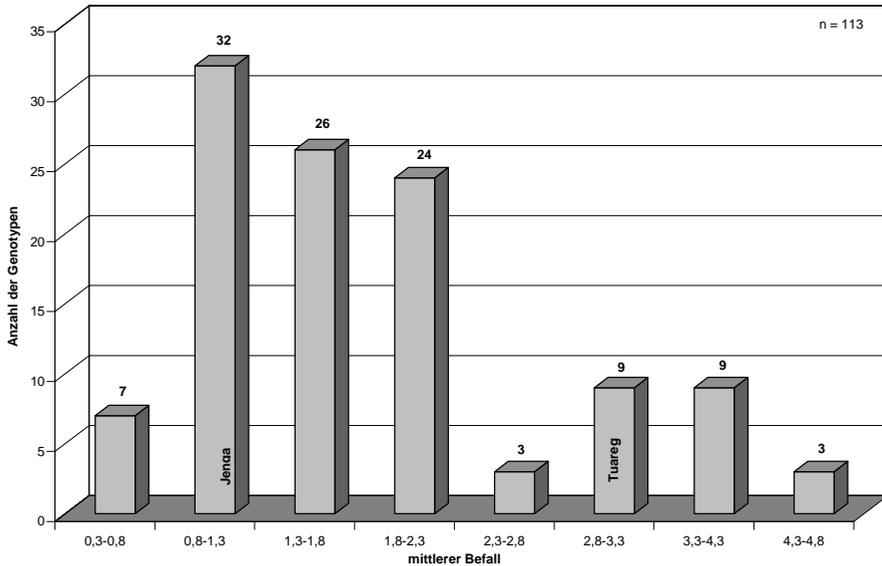


Abb. 2 Mittlerer PTR-Befall in der DH-Population ‚Jenga‘ x ‚Tuareg‘, Feldversuch 2007/08, Quedlinburg

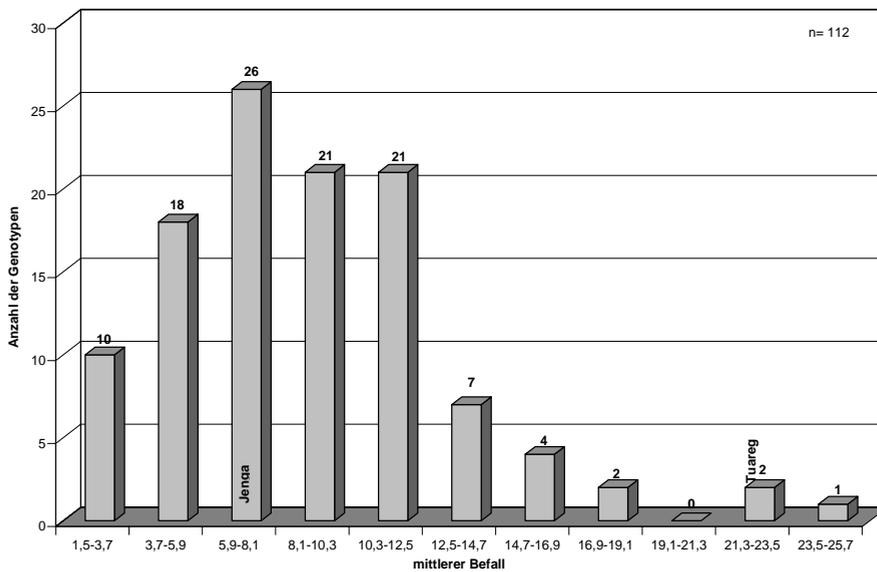


Abb. 3 Mittlerer PTR-Befall in der DH-Population ‚Jenga‘ x ‚Tuareg‘, Feldversuch 2007/08, Sölingen

Wie den Abbildungen 1-3 zu entnehmen ist, zeigte sich in allen Versuchen eine quantitative Variation, die auf die Beteiligung mehrerer Gene an der *Pyrenophora tritici-repentis* Resistenz hindeutet. Das AFLP-Elternscreening der Populationselemente ‚Jenga‘, und ‚Tuareg‘ mit 256 Primerkombinationen erbrachte 146 polymorphe AFLP-Primerkombinationen, wobei ein bis sieben polymorphe Fragmente pro Primerkombination identifiziert werden konnten. 62 polymorphe Fragmente wurden inzwischen kartiert. Bei der Genotypisierung mittels Mikrosatellitenmarkern konnten 267 Marker getestet werden. Davon zeigten 83 Polymorphismen zwischen den Eltern ‚Jenga‘ und ‚Tuareg‘ und werden für die Konstruktion einer genetischen Karte genutzt.

Diskussion

Vergleicht man die phänotypischen Ergebnisse, welche mit der DH-Population 'Jenga' x 'Tuareg' im Gewächshausversuch und den beiden Feldversuchen erzielt wurden, so ist festzustellen, dass bei allen drei Versuchen die Populationseltern deutlich differenzieren und die Genotypen der DH-Linien aufspalten. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass es eine Abstufung des mittleren Befalls gibt. Bei dem Feldversuch in Söllingen konnten deutlich höhere mittlere Befallswerte erzielt werden als in Quedlinburg. Die Daten des Gewächshausversuches liegen zwischen den beiden anderen Versuchen. Daraus ist abzuleiten, dass der Versuchsstandort Söllingen einen deutlich höheren PTR-Befallsdruck aufweist als Quedlinburg. Der Vergleich des mittleren Befalls der Genotypen aus dem Gewächshausversuch mit dem Feldversuch in Quedlinburg deutet darauf hin, dass im Freiland ein geringerer Befallsdruck vorlag als der mit einer Konidien suspension von 3000 Konidien/ml im Gewächshaus erzeugte. Diese bisher vorliegenden phänotypischen Daten zeigen eine quantitative Variation, so dass davon auszugehen ist, dass an der DTR-Resistenz mehrere Gene beteiligt sind.

Danksagung

Ich danke dem BMELV für die Finanzierung des Projektes im Rahmen der Innovationsförderung. Der FR. STRUBE Saatzeit GmbH und der Deutsche Saatveredlung AG für die Unterstützung bei den Feldversuchen, sowie Frau Schröder, Frau Weillep und Frau Oettel für die technische Assistenz.

Literatur

- Lamari, L., Strelkov, S.E., Yahyaoui, A., Orabi, J., Smith, R.B., 2003: The Identification of Two New Races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the Host Center of Diversity Confirms a One-to-One Relationship in Tan Spot of Wheat. *Phytopathology* **93** (4), 391-396.
- Moll, E., Flath, K., Piepho, H.-P.: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt Teil 3. Berlin, Parey Buchverlag, 2000, 25 S.
- Roeder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W., 1995: Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* **246** (3), 327-333.
- Singh, P.K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T. B., Elias, E.M., Hughes, G.R., 2006: Identification of New Sources of Resistance to Tan Spot, Stagonospora Nodorum Blotch, and Septoria Tritici Blotch of Wheat. *Crop Science* **46** (5), 2047-2053.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23** (21), 4407-4414.

Kontakt: Uta Engelmann, Telefon 03946 47671

Nehrlich, Stephanie

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Quedlinburg

Resistenzevaluierung von *Colletotrichum gloeosporioides* an *Gaultheria* unter *in vitro*-Bedingungen

Evaluation of resistance of *Gaultheria* to *Colletotrichum gloeosporioides* under *in vitro* conditions

Zusammenfassung

Gaultheria procumbens L. verdankt ihren Namen dem kanadischen Arzt und Botaniker H. Gautier. Durch Linné erhielt sie die heutige Bezeichnung *Gaultheria* sowie den Artnamen *procumbens* für niederliegend. Die immergrüne und winterharte Scheinbeere gehört zur Familie *Ericaceae* und zählt in Deutschland zu den 10 bedeutsamen Herbstpflanzen, Tendenz steigend.

In den letzten Jahren kam es insbesondere in Jungpflanzenbetrieben zu enormen Ausfällen bis hin zu Zusammenbrüchen ganzer Bestände. Die Pflanzen zeigten Symptome wie Blatt- und Stängelläsionen, einzelne Triebe vertrockneten, die Pflanzen starben ab. Als Verursacher hierfür konnte *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorph: *Glomerella cingulata* (Stonemann) Spauld. & H.

Schrenk). benannt werden. Weltweit tritt der Pilz als phytopathogener Schaderreger an wirtschaftlich wichtigen Kulturpflanzen wie Leguminosen, Erdbeere, Heidelbeere, Zitrusfrüchten, Kaffee, Kakao und Johanniskraut auf (Bailey & Jeger, 2004). Er ist samenübertragbar und kann auf Pflanzenresten überdauern, die somit als Inokulumquelle für Neuinfektionen dienen. Eine Vermeidung der Ausbreitung des Pathogens ist häufig nur in der juvenilen Phase durch den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel möglich. In älteren Beständen wirken diese Maßnahmen lediglich prophylaktisch, da der Pilz vor allem im unteren Stängelbereich angesiedelt ist, wo Fungizide nur unzureichend hingelangen. Ferner muss davon ausgegangen werden, dass der Erreger latent in der Pflanze vorhanden ist. Aufgrund des hohen Inokulumdrucks, der massiven Ausbreitung des Pilzes sowie der unzureichenden chemischen Bekämpfung ist die Evaluierung pflanzen genetischen Ressourcen zur Entwicklung resistenter Kulturformen von besonderer Bedeutung.

Wegen der unzureichenden Literaturangaben in Hinblick auf die Resistenzevaluierung von *C. gloeosporioides* an *Gaultheria*, der großen Variabilität der *Gaultheria*-Arten bezüglich des Habitus, der Pflanzen- und Blattgröße, der Blütenbiologie, der Latenz des Erregers sowie der eingeschränkten Verfügbarkeit von ausreichendem Pflanzenmaterial ist es schwierig geeignete Versuche zu etablieren. Für die Erschließung neuer Resistenzquellen sind praktikable und reproduzierbare Tests unerlässlich. Daher wurde ein Biotest zur Resistenzevaluierung unter In-vitro-Bedingungen verwendet, der zum einen schnell und leicht durchzuführen ist, wenig Pflanzenmaterial erfordert und weitgehend zerstörungsfrei auszuführen ist. Die Korrelation zwischen den Ergebnissen des Biotests und einem Ganzpflanzentest muss noch geprüft werden.

Stichwörter: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gaultheria procumbens*, in vitro, Biotest

Abstract

Gaultheria is named after the Canadian medical scientist and biologist H. Gautier. *Gaultheria procumbens* L. is an ericaceous perennial and hardy shrub. In Germany it has become an important species which is cultivated and used as an ornamental plant for autumn and winter (Geschäftsbericht Landgard, 2005). In the last years, German plant growers have suffered from enormous losses up to collapses of the whole crop. Lesions on stems and sometimes on leaves, shoot wilting and dieback were observed. The causal agent of this disease is *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorph: *Glomerella cingulata* (Stonemann) Spauld. & H. Schrenk). *C. gloeosporioides* is an economically important pathogen found worldwide on legumes, strawberry, blueberry, citrus fruits, coffee, cocoa and *Hypericum calycinum* (St. John's wort) (Bailey & Jeger, 2004). It is seed transferable and survives on plant residues which serve as a source of inoculum. A prevention of the propagation of the pathogen is possible but only in the juvenile phase by frequent application of chemical fungicides. In older plants the application of fungicides is only preventive, since the fungus is colonizing the lower stem part, where fungicides do not arrive.

Because of the high inoculum pressure, the lack of effective fungicides and the massive dispersion, the development of *Gaultheria* plants resistant to *C. gloeosporioides* is of high importance. To evaluate the resistance we present practicable and reproducible pathogenicity tests. Due to the insufficient knowledge of the evaluation of *G. procumbens* resistance to *C. gloeosporioides*, the huge variety of the species of *Gaultheria* in habitus, plant and foliar size, biology of the blossoms, latency of the pathogen and limited number of plants to be available, it is very difficult to establish useful tests.

Therefore we chose a bioassay for resistance evaluation under *in vitro* conditions, which is, on the one hand, fast and easy and requires only a small amount of plant material and, on the other hand, it works to a large extent without destruction of plants. The correlation between results of the bioassay and a whole-plant test must still be examined.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gaultheria procumbens*, bioassay, in vitro

Literatur

Bailey, J.A., Jeger, M.J., (2004): *Colletotrichum* – Biology, Pathology and Control. CABI publishing.

Kontakt: Stephanie Nehrlich, E-Mail: stephanie.nehrlich@jki.bund.de

Bartelmann, Anne; Badani-Dehmer, Ana, Gloria; Balko, Christiane; Seddig, Silvia

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Versuchsstation für Kartoffelforschung, Groß Lüsewitz, Sanitz

Trockentoleranz bei Kartoffeln

Drought tolerance of potato

Zusammenfassung

Im Zuge des Klimawandels werden abiotische Stressfaktoren, wie z.B. Trockenheit, einen immer stärkeren Einfluss auf die Entwicklung von Nahrungspflanzen nehmen. Trockenstress induziert diverse Stoffwechselveränderungen und Änderungen in der Genexpression, die sowohl vom physiologischen Zustand der Pflanze selbst, als auch von der Dauer und Intensität des Stresses abhängig sind. Pflanzen reagieren auf diesen Stress mit der Akkumulation von verschiedenen Metaboliten, wie z.B. Prolin, freien Aminosäuren, Abscisinsäure (ABA) oder löslichen Zuckern, die als Indikatoren für Trockentoleranz verwendet werden können. Mithilfe von *Arabidopsis thaliana* (L.) als Modellpflanze konnten bereits Stoffwechselwege, die in die Trockenstressreaktion und Trockentoleranz involviert sind, identifiziert und die entsprechenden Gene charakterisiert werden.

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), die zu den vier wichtigsten Nahrungspflanzen weltweit zählt, gilt als sehr sensitiv gegenüber Trockenstress, da sie über ein relativ schwaches Wurzelsystem verfügt und für die Ausbildung von Knollen einen sehr hohen Wasserbedarf hat. Eine gezielte züchterische Verbesserung der Kartoffel bezüglich Trockentoleranz kann einen nachhaltigen Beitrag zur Stabilisierung des Anbaus unter ungünstigen klimatischen Bedingungen leisten.

In Gefäß-Versuchen mit definierten Wassergaben unter einem Rain-out Shelter wurden verschiedene *S. tuberosum*-Genotypen in Bezug auf Trockenstress evaluiert. Dabei wurden die Entwicklung bonitiert, Inhaltsstoffe in den Blättern (z.B. Prolin, Zucker und Protein) und Knollen (z.B. Stärke) bestimmt und Ertragsparameter ermittelt. Auf Grundlage der aus diesen Experimenten gewonnenen Daten wurde ein kleines Set von trockenoleranten und -anfälligen Genotypen für eine molekulare Charakterisierung ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden einige der in *A. thaliana* identifizierten Gene, die an der Trockentoleranz beteiligt sind, wie z.B. Loci für die ABA-Synthese, Transkriptionsfaktoren, Dehydrine, Prolinoxidasen oder Late-Embryogenese-Abundant (LEA) Proteine, verwendet, um nach homologen Sequenzen in der Kartoffel zu suchen. Für diese Kandidatengene wurden Primer abgeleitet und eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA der ausgewählten Sorten durchgeführt. Für einige dieser Gene wiesen die Fragmente nach Sequenzierung Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf. Darüber hinaus wurden quantitative Reverse Transkriptase-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt, um die Expressionsprofile von verschiedenen Kandidatengenen zu vergleichen.

Zielstellung ist es letztendlich, basierend auf der Phänotypisierung eines Kartoffelsortimentes hinsichtlich ihrer Trockentoleranz, Gene zu identifizieren, die an der Trockentoleranz beteiligt sind und molekulare Marker für die schnellere Selektion von toleranten Genotypen zu entwickeln.

Abstract

In the course of climate change, abiotic stress factors such as drought will have an increasing influence on the development of food crops. Drought stress induces several metabolic changes and changes in gene expression which to some extent depend on the physiological condition of the plant itself and on the duration and severity of the drought stress applied. Plants respond to this stress with the accumulation of various metabolites, such as proline, free amino acids, abscisic acid (ABA) or soluble sugars, which may be used as indicators for drought tolerance. Using *Arabidopsis thaliana* (L.) as a model, metabolic pathways functional in drought response and drought tolerance have been identified and corresponding genes have already been characterized.

Potato (*Solanum tuberosum* L.), one of the four major food plants worldwide, is considered to be very sensitive to drought stress due to its relatively shallow root system and the very high water usage for tuber formation. Breeding to improve drought tolerance of potatoes can make a sustainable contribution to stabilize cultivation of potatoes under adverse climatic conditions, therefore.

In pot experiments using defined watering under a rain-out shelter various *S. tuberosum* genotypes were evaluated for drought stress by comparing the development, determining components in leaves (like proline or protein) and tubers (like starch) and estimating yield parameters.

Based on the data obtained in these experiments a small set of drought-tolerant and susceptible genotypes was selected for a molecular characterization. For this purpose, some of the *A. thaliana* genes operating in drought tolerance, such as loci for ABA response, transcription factors, dehydrins, proline oxidases, or late embryogenesis abundant (LEA) proteins, were used to search for homologous sequences in potato. For these candidate genes primers were deduced and polymerase chain reactions (PCR) were performed on genomic DNA of the selected varieties. For some of these genes the fragments showed single nucleotide polymorphisms (SNPs). In addition, quantitative reverse transcriptase PCRs (qRT-PCRs) were carried out to compare the expression profiles of various candidate genes.

Based on the phenotyping of diverse potato genotypes regarding their drought tolerance, the objective of these studies is to identify genes which are involved in drought tolerance and to develop molecular markers for the faster selection of tolerant genotypes.

Kontakt: Anne Bartelmann, E-Mail: anne.bartelmann@jki.bund.de

Struckmeyer, Tobias; Marthe, Frank

Julius Kühn-Institutes, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Quedlinburg

Züchterische Nutzung von Resistenz gegen den Erreger der *Septoria-Blattflecken (Septoria petroselini)* an Petersilie (*Petroselinum crispum*)

Utilization of resistance to *septoria* leaf spot caused by *Septoria petroselini* for parsley breeding (*Petroselinum crispum*)

Petersilie (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) ist mit 1750 ha Fläche die bedeutendste Gewürzpflanze im deutschen Anbau. Hervorzuheben ist das hohe Wertschöpfungspotenzial für die produzierenden Betriebe.

Zu den phytopathologisch bedeutenden Gefährdungen des Anbaus von Petersilie gehört die *Septoria*-Blattfleckenkrankheit. Der Pilz (*Septoria petroselini* (Lib) Desm.) ruft braune Läsionen auf Blättern und Stängeln hervor. Befallsbeginn und -stärke hängen wesentlich vom Witterungsverlauf ab und können in Jahren mit hohem Befallsdruck zum Totalausfall des zweiten und dritten Schnittes der Petersilie führen.

Ziele der Arbeiten sind die Überführung von Resistenzen gegen *S. petroselini* in leistungsfähiges Zuchtmaterial, die weitere Homozygotisierung resistenter, wie auch voll anfälliger Linien und Allelietests unterschiedlicher, resistenter Linien.

In zwei unabhängigen Klimakammervirulenztests wurden fünf Einsporisolate von verschiedenen Standorten mit dem bisher verwendeten Isolat ES14 vergleichend getestet. Das ES14 verursachte den höchsten Befall der getesteten Isolate und ist somit für weitere Resistenzprüfungen geeignet. Hinweise auf Rassenspezifität der Resistenz gab es hierbei nicht.

Durch mehrere Selbstbestäubungsschritte von Einzelpflanzen aus Genbankkzessionen von Petersilie wurden Linien mit hoher Resistenz bzw. Anfälligkeit gegen *S. petroselini* entwickelt. Für 30 dieser Linien wurden jeweils zwei unabhängige Klimakammertests zur Charakterisierung der Resistenz bzw. Anfälligkeit durchgeführt. Die beiden Wiederholungen des ersten Tests korrelieren mit $r_s = 0,87$ ($p \leq 0,01$) sehr gut miteinander. Der zweite Klimakammertest mit einer Wiederholung korreliert ebenso sehr gut ($r_s = 0,87$, $p \leq 0,01$) mit dem ersten Test. Die Ergebnisse belegen die gute Reproduzierbarkeit des Tests und die genetische Verankerung der Resistenz. Die anfälligen Standards unterscheiden sich signifikant von allen als resistent geprüften Linien.

Zur Erarbeitung einer effektiven Kreuzungsmethodik wurden Testkreuzungen durchgeführt. Die Hybridnachweise für die entstandenen Nachkommen wurden mittels molekularer Marker erbracht. Als geeignet hierfür erwiesen sich dpRAPD-Paare (Budahn et al. 2008: Euphytica 162:117-128). Alle 30 Nachkommen der reziproken Einzelpflanzenkreuzung waren Kreuzungsbastarde, die Selbstbestäubungsrate lag somit bei 0 %.

Zur Übertragung der Resistenz in anfälliges Leistungsmaterial wurden 97 Kreuzungen zwischen zwei Leistungseltern und 12 resistenten Linien durchgeführt. Der Samenansatz lag bei 8,4 %. Nach einer anschließenden Resistenzprüfung werden geeignete F₁-Nachkommen dieser Kombinationen mit den jeweiligen Leistungseltern rückgekreuzt. Ebenfalls wurden 63 Kreuzungen zwischen 14 resistenten Linien verschiedener Herkünfte realisiert. Der Kornansatz betrug hier 8,0 %.

Diese Arbeiten werden zur Entwicklung der ersten Petersiliensorte mit Resistenz gegen *S. petroselinii* führen und die Voraussetzungen zur Analyse der genetischen Basis der Resistenz schaffen.

Kontakt: Tobias Struckmeyer, E-Mail: tobias.struckmeyer@jki.bund.de

Herzog, Katja, Flachowsky, Henryk; Hanke, Magda-Viola

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden

Erste Ergebnisse zur Etablierung eines Sicherheitsvektorsystems an Apfel (*Malus domestica* BORKH) zur Erzeugung markergenfreier gm-Pflanzen

Preliminary results to establish a recombinase vector system on apple (*Malus domestica* BORKH) to generate marker-free gm-plants

Zusammenfassung

Die Erzeugung gentechnisch modifizierter (gm)-Pflanzen, die kein Markergen mehr enthalten, stellt ein zentrales Ziel gentechnischer Arbeiten an Apfel dar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung eines effektiven Transformationssystems zur Gewinnung markergenfreier gm-Apfelpflanzen. Dieses System arbeitet auf der Basis einer sequenzspezifischen Rekombination selektierender Antibiotikaresistenzgene. Die hierfür erstellte Monitoringkassette kombiniert die sequenzspezifische Rekombination mit einem *gusA*-Reporter gen. Die Expression der Rekombinase wurde unter die Kontrolle eines Hitzestress (HS)-induzierbaren Promotors gestellt. Nach der HS-Induktion konnten erste partiell markergenfreie gm-Pflanzen detektiert und eine anschließende Regenerationsstrategie für die Erzeugung vollständig markergenfreier gm-Apfelpflanzen erarbeitet werden.

Stichwörter: *Malus domestica*, *nptIII*, markergenfrei, sequenzspezifische Rekombination

Abstract

The production of genetically modified (gm)-plants without selectable marker genes is one of the most important goals in the field of genetic engineering on apple. This work describes the development of an effective transformation system to generate marker-free gm-apple plants. The system based on a site-specific recombination of the selectable marker gene *nptIII* controlled by a heatshock-inducible promoter. We tested the system using a monitoring vector combines the inducible site-specific recombinase for the precise elimination of *nptIII* and a GUS encoding gene (*gusA*) to realize the histochemical monitoring of recombination events. Partial marker-free gm-apple plants were obtained after heatshock and putative fully marker-free gm-plants were generated following a second regeneration strategy.

Keywords: *Malus domestica*, *nptIII*, marker-free, site-specific recombination system

Einleitung

Die Selektion transgener Zellen bei Apfel (*Malus domestica* BORKH) erfolgt überwiegend mithilfe des Neomycinphosphotransferase-II-Gens (*nptIII*). Dieses Gen vermittelt transgenen Zellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin. Das *nptIII*/Kanamycin Selektionssystem steht seit einigen Jahren kritisch in der Diskussion. Das hat letztendlich dazu geführt, dass gentechnisch modifizierte (gm)-Pflanzen, die das *nptIII* Gen enthalten, ab dem Jahr 2008 in der EU nicht mehr freigesetzt werden dürfen. Die Etablierung alternativer Markersysteme an Apfel beschränkte sich bislang auf einige wenige Verfahren, wie beispielsweise die Positivselektion mit dem Phosphomannoseisomerase-Gen aus *Escherichia coli* (Degenhardt et al., 2006, Flachowsky et al. 2004). Im Gegensatz zu den Obstgehölzen existieren für andere Kulturpflanzen bereits gut etablierte Systeme zur markergenfreien Selektion. So können z.B. bei Selbstbefruchtern markergenfreie gm-Pflanzen durch Co-Transformation von Selektionsmarker und Zielgen

erzeugt werden. Dabei wird das Markergen nach erfolgter Selektion sexuell ausgekreuzt (Puchta, 2003). Bei Fremdbefruchtungern wie dem Apfel entsteht bei einer solchen Auskreuzung ein völlig neuer Genotyp, weshalb dieses Verfahren für den Apfel ungeeignet ist. Eine Selektion, welche auf der Basis sequenzspezifischer Rekombination arbeitet, ist für Fremdbefruchter besser geeignet. Eines dieser Systeme ist das frei verfügbare Flp/FRT-Rekombinationssystem aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Flp-Rekombinase entfernt Abschnitte im Genom, die zwischen zwei spezifischen FRT-Erkennungssequenzen liegen und benötigt dafür keine zusätzlichen Protein- oder Co-Faktoren. (Kilby et al., 1995)

Im Rahmen dieser Arbeit soll geprüft werden, ob das Flp/FRT-Rekombinationssystem ein geeignetes Verfahren zu Herstellung markergenfreier gm-Apfelpflanzen darstellt. Dabei soll die Selektion von gm-Zellen mithilfe des *nptII* Gens erfolgen, welches sich gemeinsam mit der Flp-Rekombinase zwischen zwei FRT-Stellen befindet. Nach erfolgter Selektion sollen die Flp-Rekombinase und das *nptII* Gen wieder aus dem Apfelnom entfernt werden. Die Expression der Flp-Rekombinase wird dabei von einem Hitzestress (HS)-induzierbaren Promotor gesteuert.

Material und Methoden

Für die Erzeugung von gm-Apfelpflanzen wurden Blattstückchen von *In-vitro*-Sprossspitzenkulturen eines 'Pinova'-Sämlings verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101pMP90RK-pB-Npt-Hsp-Fls-Gus transformiert (T-DNA in Abbildung 1). Die Transformation und die selektive Regeneration erfolgten auf Medium mit Kanamycin wie bei Flachowsky et al. (2008) beschrieben. Der Aufbau einer transgenen Linie (T-Linie) und deren Kulturhaltung wurde wie bei Flachowsky et al. (2008) durchgeführt.

Die genomische DNA der selektierten gm-Pflanzen wurde mit dem Dneasy® Plant Mini- Kit (Qiagen) isoliert. Der Nachweis einer erfolgreichen Integration von *nptII*- und *gusA*-Gen erfolgte mittels PCR mit den Primern nptIIF 5'-ACAAGATGGATTGCACGCAGG-3', nptIIR 5'-AACTCGTCAAGAAGGCGATAG-3' sowie GusF 5'-GTTCTGCGACGCTCACACCGATACC-3', GusR 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'.

Die PCR wurde in einem 25µl Ansatz bestehend aus 50ng genomischer DNA, 10xDreamTaq™ Puffer, 2mM dNTPs, 12,5 mM je Primer und 0,5U DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas) durchgeführt. Verwendet wurde das PCR-Protokoll: Denaturierung bei 94 °C für 5 Min., gefolgt von 29 (nptIIF) bzw. 35 (GusF) Zyklen: 0,5 Min. Denaturierung bei 94°C, 1 Min. Annealing bei 57°C (nptIIF) bzw. 65 °C (GusF) und die Elongation für 0,5 Min. bei 72 °C. Nach der abschließenden Elongation bei 72 °C für 5 Min. wurden die amplifizierten Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Für die HS-induzierte Expression der Flp-Rekombinase wurden junge gm-Sprosse der T-Linie T670 für 1-24 Stunden bei 37 °C und 42 °C inkubiert. Der Erfolg der Rekombination des *nptII*-Gens wurde im Anschluss molekular und histologisch untersucht.

Der molekulare Nachweis erfolgte dabei an DNA mit dem Long range PCR Mix (Fermentas) mit den Primern P1 5'-CCAGTGACCTGCAGGCATGC-3' und P2 5'-CCCACCAACGCTGACCAATTCC-3' (Abbildung 1). Um Rückschlüsse auf die vollständige Rekombination des *nptII*-Gens ziehen zu können, wurden die erhaltenen Fragmente von HS-induzierten und unbehandelten Ausgangspflanzen sequenziert.

Zur Untersuchung der Genexpression vor und nach der HS-Induktion wurde RNA mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) aus Blättern isoliert und mittels RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die Transkription der Transgene *nptII* und *gusA* erfolgte mit den bereits beschriebenen spezifischen Primern.

Die histologische GUS Färbung wurde, wie von Jefferson et al. (1987) beschrieben, mit einem spezifischen Färbepuffer durchgeführt, welcher 1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronid (X-Gluc) enthält. Als positive Kontrolle diente dabei die *gusA*-transgene Linie T355 (Flachowsky et al. 2008). Untersucht wurden gm-Sprosse der Linie T670 vor und nach der HS-Induktion bei unterschiedlichen Temperaturen.

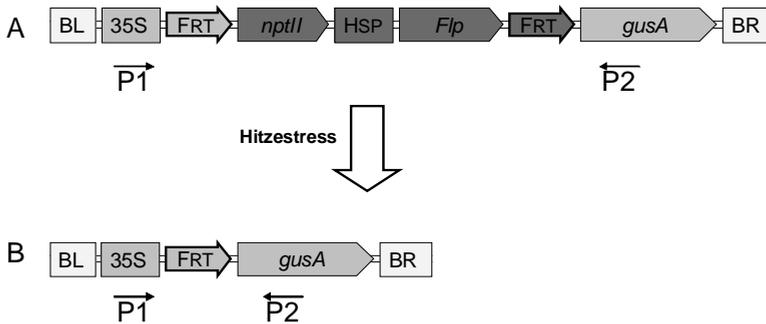


Abb. 1 T-DNA der Monitoringkassette pB-Npt-Hsp-Fls-Gus

Darstellung der gesamten T-DNA, so wie sie während des Transformationsprozesses ins pflanzliche Genom integriert wird (A) und wie sie nach der Eliminierung des *nptII*-Markergens durch eine HS-induzierte Expression der Flp-Rekombinase aussieht (B). BL – linke T-DNA Border, 35S – CaMV 35S Promotor, FRT – FRT – Flp Erkennungssequenzen, *nptII* - Neomycinphosphotransferase-II Gen, HSP – Hitze stress-induzierbarer Promotor Gm_{hsp} 17.6L, *Flp* – Flp-Rekombinase Gen, *gusA* – β -glucuronidase Gen, BR – rechte T-DNA Border, P1/P2 – Primer zur Isolierung 35S-*gusA*-Fragment.

Ergebnisse

Zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit des Flp/FRT-Rekombinasesystems an Apfel wurden mehrere Transformationen mit dem binären Vektor pB-Npt-Hsp-Fls-Gus durchgeführt. So konnten bisher 3 transgene Linien der Sorte 'Pinova'-Sämling erzeugt werden. Die T-Linie T670 wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Integration und die Expression der übertragenen Transgene *nptII* und *gusA* konnten erfolgreich mittels PCR (Daten nicht gezeigt) und RT-PCR (Abbildung 2B/C) nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Flp-Rekombinase unter Kontrolle des HS-Promotors wurden gm-Sprosse für 1-24 Stunden bei 37°C bis 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen von unbehandelten und HS-induzierten Pflanzen isoliert. In den Kontrollpflanzen und den HS-induzierten Pflanzen bei 37°C hatte das isolierte Fragment eine identische Größe von circa 4.500 Basenpaaren (bp). Nach der HS-Induktion für 2 bzw. 8 Stunden bei 42 °C betrug die Fragmentlänge in den meisten Fällen nur noch 1.200 bp (Abbildung 2A). Zur eindeutigen Überprüfung des Rekombinationserfolges wurden zwei der erhaltenen PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung der Fragmente zeigte, dass nach der Rekombination der gesamte Bereich innerhalb der FRT-Erkennungssequenzen, wie erwartet, aus dem pflanzlichen Genom entfernt wurde (Abbildung 1). Im Genom bleibt nach der Rekombination lediglich eine der beiden FRT-Erkennungssequenzen, sowie der 35S-Promotor und das *gusA*-Gen zurück.

Um zu zeigen, ob die HS-Induktion für die Entfernung des *nptII*-Gens in allen Zellen erfolgt ist, wurde die Expression von *nptII* vor und nach der Hitze stress-Induktion untersucht. Die Expression von *nptII* konnte zu beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden (Abbildung 2B), was beutet, dass die Entfernung des Selektionsmarkers nicht in allen Zellen erfolgt ist. Gleichzeitig wurden die Proben auf *gusA*-Expression überprüft. Dabei hat es sich gezeigt, dass diese nur in HS-induzierten Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2C).

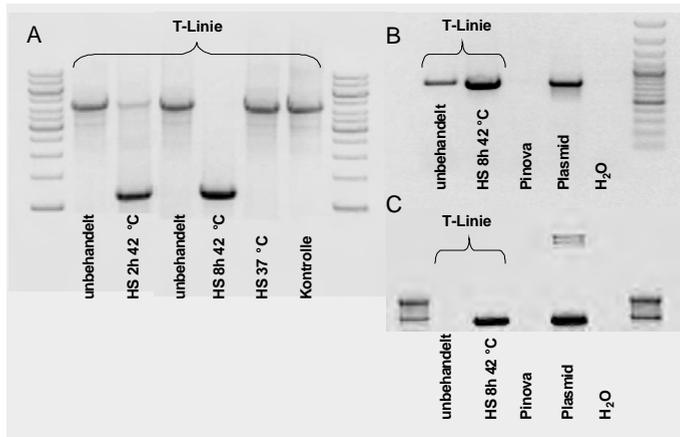


Abb. 2 Molekulare Analyse putativ markergenfreier gm-Pflanzen

Die HS-Induktion der T-Linie T670 mit Temperaturen bei 37 °C und 42 °C führte zu unterschiedlichen Rekombinationsergebnissen. Bei einer Temperatur von 37 °C konnte keine Gus-Färbung und folglich keine Rekombination detektiert werden (Abbildung 3B). Eine nahezu vollständige Gus-Färbung der jungen Sprosse zeigte sich erst nach einer Induktion bei 42°C (Abbildung 3C) bzw. bei der *gusA*-transgenen Linie T355 (Abbildung 3A). PCR zur Isolierung des 35S-*gusA*-Fragmentes von HS-induzierten und unbehandelten Pflanzen (A). Das kurze Fragment lässt sich ausschließlich in HS-induzierten Pflanzen nachweisen. Im Gegensatz hierzu wurde das große 35S-*gusA*-Fragment in den Kontrollpflanzen und den Pflanzen mit niedriger HS-Temperatur gefunden. RT-PCR zur Untersuchung der Expression von *nptII* (B) sowie der *gusA*-Expression (C) in HS-induzierten und unbehandelten Pflanzen. Die Expression von *nptII* findet auch noch nach der HS-Induktion statt, wohingegen die *gusA*-Expression erst nach einer HS-Induktion von 8h bei 42 °C gezeigt werden konnte.

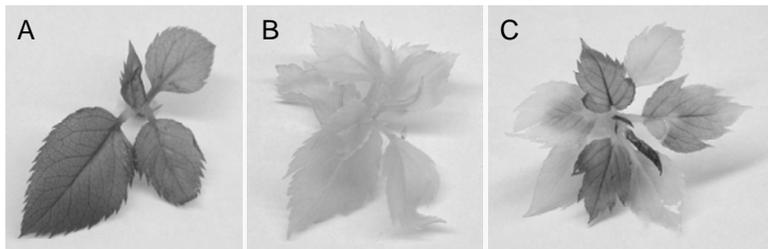


Abb. 3 Gus-Test an HS-induzierten gm-Pflanzen

Die *gusA*-transgene Linie T355 dient als Positivkontrolle (A). Untersuchung der HS-induzierten Expression der F1p-Rekombinase in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur (B) bei 37 °C (keine Blaufärbung) und (C) bei 42 °C (junge Blätter vollständig blau).

Um eine vollständige Entfernung des *nptII*-Gens zu gewährleisten, wurden Blattstücken der HS-induzierten Pflanzen erneut auf einem Regenerationsmedium ohne Zugabe selektierender Antibiotika zur Regeneration gebracht und anschließend mittels Gus-Test untersucht. Eine vollständige Blaufärbung von Regeneraten konnte erst bei Pflanzen beobachtet werden, die von Sprossen stammen, die vorher für mindestens 4 h bei 42 °C Hitzestress-induziert wurden. Eine geringere Temperatur und eine kürzere Dauer der Induktion hatten zur Folge, dass der überwiegende Teil an regenerierten Pflanzen Gus-negativ getestet wurde bzw. nur vereinzelte Regenerate eine Gus-Aktivität in allen Zellen zeigte.

Diskussion

An einer ersten transgenen Linie der Apfelsorte 'Pinova' konnte die Anwendbarkeit des Flp/FRT-Rekombinasesystems unter Kontrolle eines Hitzestress-induzierbaren Promotors geprüft und die Funktionsfähigkeit des Konstrukts pB-Npt-Hsp-Fls-Gus untersucht werden.

Die gezielte Induzierbarkeit des Gmhsp Promotors wurde bei drei Temperaturen (37°C, 40°C, 42°C) untersucht. Die untersuchten Temperatur- und Zeitregime orientierten sich dabei an denen, die bereits an gm-Tabak und -Mais erfolgreich getestet wurden (Lyznik et al., 1995; Kilby et al., 1995). Die Expression des *gusA*-Reportergens konnte erst nach der HS-Induktion gezeigt werden, wodurch belegt werden konnte, dass der HS-Promotor vor dem Hitzestress inaktiv ist und die Flp-Rekombinase nicht exprimiert werden kann. Erst ab einer Umgebungstemperatur von 42 °C steigt die Promotoraktivität stark an, was auch von Lyznik et al. (1995) beschrieben wurde. Dies führte vor allem in den jungen Blättern zu einer vollständigen Blaufärbung. Molekulare Untersuchungen mittels PCR und Sequenzierung bestätigten, dass eine Rekombination an den FRT-Erkennungssequenzen zu einer vollständigen Entfernung des FRT-NptII-HSP-Flp-FRT-Bereichs aus dem pflanzlichen Genom führt. Im Genom bleiben nur noch die funktionell notwendigen Sequenzen (Promotor und Zielgen) sowie eine FRT-Erkennungsstelle zurück.

Eine vollständige Entfernung des *nptII*-Gens aus allen Zellen des behandelten Gewebes konnte mit Hilfe der HS-Induktion jedoch noch nicht erzielt werden. Auf Grund dessen wurde eine erneute (zweite) Regeneration von HS-induzierten Zellen durchgeführt. Ziel war es dabei, vollständig markergenfreie gm-Pflanzen zu erhalten. Erste Gus-Tests an putativ markergenfreien Regeneraten haben gezeigt, dass es durch eine zweite Regeneration möglich ist, vollständig markergenfreie Pflanzen zu erzeugen. Um dieses alternative Selektionssystem gezielt für Apfeltransformationen einsetzen zu können, erscheint es hilfreich, rekombinierte Zellen während des Regenerationsprozesses gezielt zu selektieren.

Die Verwendung eines weiteren Selektionsmarkers, der nur in nicht-rekombinierten Zellen vorkommt und deren Wachstum hemmt, birgt hierbei entscheidende Vorteile. Der Selektionsdruck begünstigt nicht nur die Regeneration von rekombinierten Zellen und verhindert so das Wachstum chimärer bzw. nicht-rekombinierter Zellen (gezeigt bei Schaart et al., 2004), sondern bewirkt auch eine einfache Selektion putativ markergenfreier gm-Pflanzen.

Literatur

- Degenhardt J., Poppe A., Montag J., Szankowski I., 2006: The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Rep* **25**, 1149–1156
- Flachowsky H., Birk T., Hanke V., 2004: Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. *ISHS Acta Horticulturae* **663**, 425–430.
- Flachowsky H., Riedel H., Reim S., Hanke M.-V., 2008: Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **11** (1), 1–13.
- Kilby J.N., David G.J., Snaith M.R., Murray J.A.H., 1995: FLP recombinase in transgenic plants – constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **8**(5), 637–652.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **6**, 3901 – 3907.
- Lyznik L.A., Hirayama L., Rao K.V., Abad A., Hodges T.K., 1995: Heat-inducible expression of *FLP* gene in maize cells. *The Plant Journal* **8** (2), 177–186.
- Puchta H., 2003: Marker-free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**, 123–134.
- Schaart J.G., Krens F.A., Pelgrom K.T.B., Mendes O. and Rouwendal G.J.A., 2004: Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 233–240.

Kontakt: Magda-Viola Hanke, Telefon. 0351-2616240, E-Mail: viola.hanke@jki.bund.de

Hättasch, Conny, Flachowsky, Henryk; Hanke, Magda-Viola

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden

Erste Ergebnisse zur Mobilität von *gusA*-spezifischen Silencing-Signalen in Apfelpflanzen

Preliminary Results about the mobility of *gusA*-specific silencing signals in apple plants

Zusammenfassung

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein mobiler, RNA-vermittelter Mechanismus zum Stilllegen von Genen (Silencing), der in vielen Eukaryonten einschließlich der Pflanzen vorhanden ist. Um eine systemische Ausbreitung des Silencing-Effekts erstmalig in Apfelpflanzen zu untersuchen, wurde mit Hilfe des binären Vektors pHELLSGATE8::*sigus* ein RNAi-Konstrukt in das Genom eines ‚Pinova‘-Sämlings übertragen, welches ein *gusA* „Hairpin“-RNA-Homolog (*sigus*) exprimiert. Anschließend wurden die gewonnenen *sigus*-transgenen Apfelpflanzen mit *gusA*-transgenen Pflanzen veredelt. Untersuchungen mittels Real-Time PCR und Gus-Färbung zeigten, dass die *gusA*-Expression in den *gusA*-transgenen Sprossen im Vergleich zu *gusA*-transgenen Pflanzen, die auf nicht-transgene Unterlagen veredelt waren, reduziert war.

Stichwörter: *Malus domestica*, Veredlung, Hairpin-RNA

Abstract

RNA interference is a mobile, RNA-guided, gene regulatory mechanism in many eukaryotes, including plants. Using the vector pHELLSGATE8::*sigus*, we transferred a RNAi construct based on a *gusA* hairpin RNA homolog (*sigus*) into the genome of a ‚Pinova‘ descendant, to evaluate the mobility of silencing for the first time on a woody plant like apple. Following, *gusA* transgenic apple shoots were grafted onto *sigus* transgenic rootstocks. Real-time PCR and GUS staining assays showed that the *gusA* expression in the *gusA* transgenic scion was clearly decreased compared to control shoots grafted onto non-transgenic shoots.

Keywords: *Malus domestica*, grafting, hairpin RNA

Einleitung

Apfelbäume werden in der Regel als Veredlung angebaut. Dabei wird die fruchttragende Apfelsorte als Edelreis auf eine wuchsbeeinflussende Unterlage gepfropft. Ein veredelter Apfelbaum besteht damit aus mehreren, genetisch unterschiedlichen Einheiten. Bei gentechnischen Arbeiten an Apfel wurden bisher die (fruchttragenden) Apfelsorten direkt transformiert. Durch die Verwendung von Genkonstrukten, die eine systemische Ausbreitung der Eigenschaft im gesamten Organismus gewährleistet, könnte man die gentechnische Modifikation auf die Unterlage beschränken. Dadurch könnten gentechnische Methoden zur Erzeugung nicht-transgener Apfelfrüchte verwendet und die Ausbreitung transgener Pollen und Samen im Freiland vermieden werden.

Die RNAi-Technologie bietet eine solche Möglichkeit. RNAi, auch bekannt als RNA-Silencing oder posttranskriptionelles Gensilencing, ist ein wichtiger Mechanismus in vielen Eukaryonten zur Regulierung von Entwicklungsprozessen, der Unterdrückung von Transposonaktivitäten sowie der Abwehr von fremdem Erbgut. RNAi basiert auf der Erkennung und dem Abbau von doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu kurzen RNA-Molekülen (sRNA) durch DICER-ähnliche Proteine. Diese sRNAs werden entwunden und führen ARGONAUTE-ähnliche Proteine (AGO) zu komplementären mRNA-Sequenzen, welche anschließend abgebaut werden oder deren Translation gehemmt wird (Baulcombe, 2005). Der Silencing-Effekt ist nicht unmittelbar an den Ort seiner Entstehung gebunden. Er kann sich von Zelle zu Zelle und über lange Strecken ausbreiten. Der Transport des Silencing-Effekts kann dabei über die Plasmodemesmen und das Phloem erfolgen (Himber et al., 2003; Tournier et al., 2006). Um die systemische Ausbreitung des Silencings erstmalig an Holzgewächsen wie dem Apfel zu untersuchen, wurden transgene Apfelinien hergestellt, die entweder das Reporter-gen *gusA* oder ein *gusA* RNAi-Konstrukt (*sigus*) exprimieren. Diese Pflanzen wurden miteinander veredelt, um anschließend das Silencing des *gusA*-Transgens im *gusA*-transgenen Spross zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Transformation eines Sämlings von *Malus domestica* Borkh. cv. ‚Pinova‘ (PinS) erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* pHELLSGATE8::*sigus* wie bei Flachowsky et al. (2007) beschrieben. Desweiteren wurde die *gusA*-transgene Apfelinie T355 (Flachowsky et al. 2008) verwendet. Die Kultivierung, Vermehrung, Bewurzelung und die Überführung der Pflanzen ins Gewächshaus erfolgte wie bei

Flachowsky et al. (2007) beschrieben. Die genomische DNA wurde mittels CTAB-Methode aus den Blättern isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) extrahiert. Im Anschluss wurde die RNA mit *DnaseI* behandelt und mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) in cDNA umgeschrieben.

Die Integration und Transkription von *sigus* und *nptII* wurde mittels PCR bestimmt. Dabei wurden DNA oder cDNA als Template und die spezifischen Primer

- GusF 5'-GTTCTGCGACGCTCACACCGATACC-3' und
- HG3 5'-GGATCCTCTAGACCACTTGTAC-3' (*sigus*)
- sowie nptIIF 5'-GGTCTCCG-GCCGCTGGGTG-3' und
- nptIIR 5'-CGGCAGGAGCAAGGTGAGATGAC-3' (*nptII*) verwendet.

Für die histochemische Gus-Färbung wurde das Pflanzenmaterial komplett mit einer X-Gluc-Lösung bestehend aus 50 mM Natriumphosphat pH 7, 1 mM EDTA, 0,2% Triton X100, 0,05% SDS, 0,033% N-Lauryl-Sarcosine, 1 mM Kaliumferricyanid und 50 mg X-Gluc (MBI Fermentas) bedeckt und für 1 h vakuum-infiltriert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Chlorophyll wurde mit Ethanol/Essigsäure (3:1) entfernt.

Die Real-Time PCR-Reaktion wurde in einem iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) unter Verwendung von iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1:50 verdünnter cDNA und den Primern GusF und GusR (5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTC-CAG-3') durchgeführt. Das ermittelte Transkriptlevel wurde gegen das mRNA-Level von β -ACTIN (ActF 5'-GTGAGGCTCTATCCAACCATC-3', ActR 5'-GGAACACAAATTG-GGCAAGTAT-3') normalisiert.

Ergebnisse

Das *sigus*-Konstrukt von pHELLSGATE8::*gus* besteht aus einem sense- und einem antisense-orientierten, 444 bp-Fragment des Gens *gusA*. Diese Fragmente sind durch ein Intron voneinander getrennt. Nach der Transkription hybridisieren beide Fragmente und bilden eine dsRNA in Form einer Hairpin-Struktur aus. Die dsRNA wird von DCL erkannt und zu sRNAs abgebaut, welche dann den Silencing-Mechanismus aktivieren (Abbildung 1).

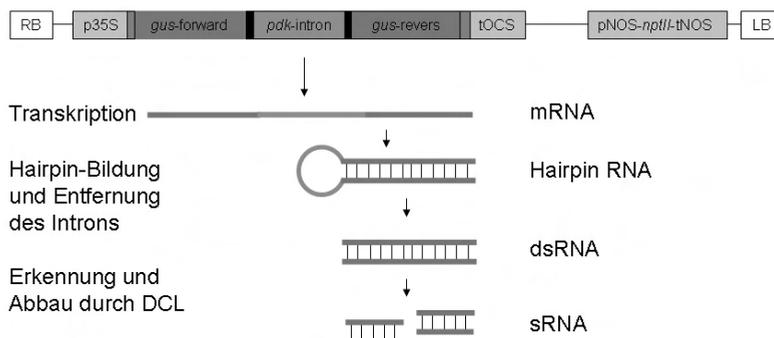


Abb. 1 Die T-DNA des Vektors pHELLSGATE8::*sigus* als Grundlage für die Synthese von *gusA*-spezifischen sRNAs.

Um zu testen, ob der Silencing-Effekt in Apfelpflanzen über Veredlungsstellen hinaus transportiert wird, wurden zunächst Apfelpflanzen hergestellt, die *gusA*-spezifische Silencing-Signale produzieren. Nach der Transformation mit dem Vektor pHELLSGATE8::*sigus* wurden 13 kanamycinresistente Apfellinien erhalten. Alle Pflanzen wiesen die Integration des RNAi-Konstruktes *sigus* und des Selektionsmarkergens *nptII* auf. Die Transkription von *sigus* und *nptII* wurde mittels RT-PCR bestätigt. Anschließend wurden *in vitro*-Sprosse der *gusA*-transgenen Linie T355 (oben) mit *in vitro*-Sprossen der *sigus*-transgenen Linien (Unterlage) veredelt. Als Kontrolle wurden T355-Sprosse auf nicht-transgene PinS-Unterlagen veredelt. Die Real-Time PCR-Analysen zeigten, dass die *gusA*-Expression in zufällig geernteten Blättern der veredelten *gusA*-transgenen Sprosse im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert war (Abbildung 2C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mobile Silencing-Signale über die Veredlungsstelle in den oberen Pflanzenteil gelangten und dort ein Silencing des *gusA*-Transgens auslösten.

Um zu testen, in welchem Maß sich die Expressionshemmung von *gusA* auf den Phänotyp der Veredlungen auswirkt, wurden mit den *in vitro*-Veredlungen Gus-Färbungen durchgeführt. Die Blätter der Kontrollpflanzen waren komplett blau gefärbt, während die Unterlagen wie erwartet weiß blieben (Abbildung 2A). Dagegen waren die Blätter der *gusA*-transgenen Sprosse, die mit *sigus*-transgenen Unterlagen veredelt waren, nur teilweise blau gefärbt und wiesen weiße Flächen auf (Abbildung 2B). Diese weißen Flächen sind offensichtlich eine Folge des Silencings der *gusA*-Expression. Dabei trat der Silencing-Effekt sowohl in jungen als auch älteren Blättern auf.

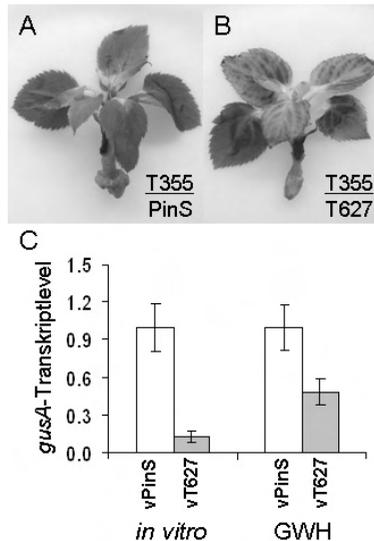


Abb. 2 Expressionshemmung des *gusA*-Transgens durch Veredlung mit *sigus*-transgenen Linien am Beispiel der Linie T627. (A) Die Kontrolle besitzt PinS (untransformiert) als Unterlage und weist keinen Silencing-Effekt auf. (B) Die *sigus*-transgene Linie T627 als Unterlage bewirkt eine Reduktion der Blaufärbung im *gusA*-transgenen Spross T355. (C) Unter *in vitro*- und Gewächshausbedingungen (GWH) kommt es bei den Veredlungen mit T627 im Vergleich zur Kontrolle vPinS zur Reduktion des *gusA*-mRNA-Gehaltes.

Um zu untersuchen, ob der Silencing-Effekt auch in verholzten Apfelpflanzen mobil ist, wurden die transgenen Linien ins Gewächshaus überführt. Dort wurden einjährige Pflanzen der *sigus*- und *gusA*-transgenen Pflanzen miteinander veredelt. Nach fünf Monaten wurde die *gusA*-Expression in den Blättern der *gusA*-transgenen Reiser mittels Real-Time PCR untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die *gusA*-Expression in Veredlungen mit *sigus*-transgenen Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert war. Somit ist davon auszugehen, dass auch in verholzten Pflanzen ein Transport des Silencing-Effekts erfolgt.

Diskussion

Nach der Veredlung von *sigus*-transgenen Apfelpflanzen mit *gusA*-transgenen Apfelpflanzen wurde eine Reduktion der *gusA*-Expression auf RNA- (Real Time-PCR) und Proteinebene (Gus-Färbung) festgestellt. Bereits bei Gilissen et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass Apfelpflanzen über einen Silencing-Mechanismus verfügen. Dabei wurden Apfelpflanzen mit einem *Mal d 1*-spezifischen RNAi-Konstrukt transformiert. In anschließenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Expression des Gens *Mal d 1* reduziert ist und Apfelpflanzen somit über einen Silencing-Mechanismus verfügen, der durch RNAi-Konstrukte induziert werden kann. Bei RNAi-Konstrukten hybridisieren die komplementären Sequenzabschnitte und bilden dadurch eine Hairpin-Struktur. Nach dem Entfernen des Introns entsteht eine dsRNA, die durch DCL zu sRNAs abgebaut wird (Mitter et al., 2006). Diese sRNAs bewirken einen Silencing-Effekt, indem sie im Komplex mit AGO an homologe Sequenzen binden und die Expression dieser Zielsequenzen hemmen (Baulcombe, 2005). Durch die Verwendung eines *gusA*-spezifischen RNAi-Konstruktes ist davon auszugehen, dass *gusA*-homologe sRNAs entstehen, die den Silencing-Mechanismus aktivieren können.

Um den Silencing-Effekt auslösen zu können, müssen diese sRNAs in den oberen Pflanzenteil der Veredlungen (Linie T355) transportiert werden. Der Phänotyp der T355-Pflanzen die auf T627-Pflanzen veredelt waren (Abbildung 2B) lässt vermuten, dass die Ausbreitung der Silencing-Signale von der Unterlage über das Phloem in die Blättern und von dort in die Blattspreite erfolgt. Untersuchungen zur Mobilität und dem Transport von Silencing-Signalen sind für Apfel noch nicht beschrieben. Jedoch konnte in Veredlungsexperimenten mit transgenen Tabakpflanzen die Übertragung eines Silencing-Effektes nachgewiesen werden. Dabei wurden *gusA*- bzw. *gfp*-transgene Tabakpflanzen, die ein spontanes Silencing aufwiesen, mit normalen *gusA/gfp*-transgenen Pflanzen veredelt. Anschließend wurde ein spezifisches Silencing der Transgene in den normalen, transgenen Linien beobachtet (Palauqui et al., 1997; Tournier et al., 2006). Dabei erfolgte die Ausbreitung des Silencing-Effektes mit dem Phloemstrom (Tournier et al., 2006). Da wir in unseren Experimenten einen ähnlichen Effekt beobachtet haben, ist anzunehmen, dass bei Apfelpflanzen *gusA*-spezifische Silencing-Signale in Form der sRNAs über Veredlungsstellen hinaus transportiert werden und den Silencing-Mechanismus unabhängig vom Ort ihrer Synthese aktivieren können. Im Anschluss muss nun getestet werden, ob mit RNAi-Konstrukten auch die Expression apfeleigener Gene kontrolliert werden kann. Damit könnten durch RNAi-transgene Unterlagen Merkmale in nicht-transgenen Früchten gezielt beeinflusst werden. Die Expression der Transgene bliebe ausschließlich auf die Unterlage beschränkt.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und durch das EU-Forschungsprojekt ISAFRUIT (Contract no. FP6-FOOD-CT-2006-016279) gefördert.

Literatur

- Baulcombe, D. 2005. RNA silencing. *TRENDS in Biochem. Science* 30(6):290-293.
- Flachowsky, H., Peil, A., Sopanen, T., Elo, A. and Hanke, V. 2007. Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breed* 126:137-145.
- Flachowsky, H., Riedel, M., Reim, S. and Hanke, M.-V. 2008. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic J Biotech.* 11:1-13.
- Gilissen, L.J.W.J., Bolhaar, S.T.H.P., Matos, C.I., Rouwendal, G.J.A., Boone, M.J., Krens, F.A., Zuidmeer, L., van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C., Bosch, D., van de Weg, W.E. and van Ree, R. 2005. Silencing the major apple allergen Mal d1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 115:364-369.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22:4523-4533.
- Mitter, N., Mitchell, R. and Dietzgen, R.G. 2006. Fate of hairpin transcripts components during RNA silencing and its suppression in transgenic virus-resistant tobacco. *J Biotechnol* 126:115-122.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M. and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16:4738-4745.
- Tournier, B., Tabler, M. and Kalantidis, K. 2006. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant J* 47:383-394.

Kontakt: Magda-Viola Hanke, Tel. 0351-2616240

Engel, Josefine; Weinzierl, Karina; Klocke, Evelyn

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Quedlinburg

Pelargonium Suspensionskultur - Charakterisierung und Möglichkeiten der Verwendung

Pelargonium suspension culture - Characterization and prospects for utilization

Zusammenfassung

Es konnten Suspensionskulturen der *Pelargonium* Genotypen 503, 519, 301 und 609 aus Kalluskulturen etabliert werden. Für die Isolierung stabiler Protoplasten aus den Zellsuspensionen wurde ein Protokoll entwickelt. Die erhaltenen Protoplasten wurden sowohl für den Test von Fluoreszenzfarbstoffen als auch für

Protoplastenfusionen eingesetzt. Durch die Verwendung von grünen Mesophyllprotoplasten und farblosen Suspensionsprotoplasten ist es möglich, den Verlauf der Fusion visuell im Durchlichtmikroskop zu beobachten und zu bewerten. Deshalb sind Zellsuspensionen eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung der somatischen Hybridisierung bei *Pelargonium*.

Stichwörter: *Pelargonium*, Suspensionskultur, Protoplasten, Protoplastenfusion

Abstract

Suspension cultures from callus of *Pelargonium* genotypes 503, 519, 609 and 301 could be established. A method for the isolation of stable protoplasts from these cell suspensions was developed. The isolated protoplasts have been used for testing of fluorescence dyes as well as for somatic hybridisation. Application of green protoplasts from leaves and colourless suspension protoplasts is of high value giving the possibility to observe the fusion process under the light microscope. For that reason cell suspensions are very useful for the establishment of the somatic hybridisation of *Pelargonium*.

Keywords: *Pelargonium*, suspension culture, protoplasts, somatic hybridization

Einleitung

Die bakterielle Pelargonienwelke (*Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, Xhp) und die bakterielle Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*, RS) sind zwei sehr bedeutende Krankheiten an Pelargonien, die zu erheblichen finanziellen Einbußen vor allem in Jungpflanzenbetrieben führen können. Im Rahmen eines umfangreichen Resistenzscreenings gegen beide Erreger (Xhp, Rs) wurde der Genotyp 609 als resistent identifiziert. Die Übertragung der Resistenz vom Genotyp 609 (Wildform) auf den Genotyp 503 (Kulturform) konnte bisher durch Kreuzung nicht realisiert werden. Ein Grund dafür könnte die Zugehörigkeit der Genotypen zu unterschiedlichen Sektionen sein. Pelargonien sind mit über 270 Arten in insgesamt 16 unterschiedliche Sektionen eingeteilt (Dreyer u.a. 1992).

Als Alternative zur Kreuzung besteht die Möglichkeit, über Protoplastenfusion bzw. somatische Hybridisierung die Resistenz in die Kulturform zu übertragen. Bisher gelang nur Nassour und Dorion (2003) eine erfolgreiche somatische Hybridisierung. Aus diesem Grunde ist es notwendig, nach zuverlässigen Quellen für Protoplasten zu suchen und die Parameter des gesamten Prozesses zu etablieren. In der hier vorgelegten Arbeit wird sowohl die erfolgreiche Etablierung von Suspensionskulturen verschiedener *Pelargonium* Genotypen als auch die Isolation von stabilen Protoplasten aus diesen Kulturen beschrieben. Für die Erhaltung der Suspensionskulturen über viele Passagen hinweg wurden Kultivierungsbedingungen wie Medium und Zelldichte den jeweiligen Kulturen angepasst. Die Suspensionsprotoplasten wurden zur Testung von möglichen Fluoreszenzfarbstoffen und als Fusionspartner verwendet. In beiden Fällen ermöglichen die Suspensionsprotoplasten den Fusionsprozess im Mikroskop zu beobachten, eine wichtige Voraussetzung für die weitere Optimierung der Fusionsparameter. Daher ist die Entwicklung und Erhaltung der Suspensionskulturen eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung der somatischen Hybridisierung bei *Pelargonium*.

Material und Methoden

Die Suspensionskulturen wurden von Kallus entwickelt, welcher sich spontan an In-vitro-Pflanzen bildete. Der Kallus wurde abgenommen und über verschiedene Sieb- und Waschschrte in ein Suspensionsmedium überführt. Die Suspensionen der beiden *Pelargonium zonale* Genotypen 503 und 301 wurden im Pelargonien Suspensionsmedium Pel Sus 2 (Tabelle 1) kultiviert. Die Schüttelkulturen wurden im Dunkeln (25 °C) bei 100 rpm inkubiert. Nach jeweils 7 Tagen wurden die Suspensionen durch einen Filter (Porengröße 500 µm) gesiebt und in frisches Pel. Sus. 2 Medium überführt.

Tab. 1 Medienzusammenstellung (Angaben pro 1 l)

Medienbestandteil	Pel Sus 2	Ta Medium
MS Medium*	X	X
Saccharose	30 g	40 g
BAP	0,45 mg	-
2,4-D	2,21 mg	1 mg
Askorbinsäure	50 mg	-
Zitronensäure	50 mg	-
pH	5,6	5,7

*MS Medium: Murashige und Skoog (1962)

Für die Protoplastengewinnung wurden 10 ml Suspension zentrifugiert und das Pellet mit der Enzymlösung E-Api I (1% Cellulase, 1% Macerozym, 0,5% Driselase) über Nacht, im Dunkeln (25 °C) bei 30 rpm verdaut. Bei der anschließenden Aufarbeitung wurden die Protoplasten zunächst durch einen Filter (Porengröße 50 µm) gesiebt und in einem Saccharose-Gradienten aufgereinigt.

Der Kallus der beiden Genotypen 609 und 519 wurde im Ta Medium (Tabelle 1) kultiviert. Diese Suspensionen wurden ebenfalls regelmäßig nach 7 Tagen durch einen Filter (Porengröße 500 µm) gesiebt und in frisches Ta Medium überführt. Die Protoplastengewinnung erfolgte analog zu den Kulturform Genotypen. Die Färbung der Protoplasten wurde mit 5 µg/ml Vitalfarbstoff durchgeführt. Als Farbstoffe konnten Rhodamin G (Fluka) und CellTracker Blue (Invitrogen) verwendet werden. Für die Anfärbung wurden die Protoplasten 25 min mit dem entsprechenden Farbstoff im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Färbung erfolgte ein Waschschrift. Im Anschluss konnten die gefärbten Suspensionsprotoplasten kultiviert und für Fusionen weiter verwendet werden.

Die bearbeiteten Genotypen wurden von der Firma Elsner pac® Dresden zu Verfügung gestellt.

Ergebnisse

Es ist gelungen, vitale Suspensionskulturen über einen Zeitraum von einem Jahr zu erhalten. Die Suspensionen der einzelnen Genotypen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Struktur. Während die Kallussuspensionen bei den Genotypen 503 und 301 eine sehr feine Struktur aufwiesen, hatten die Kallussuspensionen der Genotypen 519 und 609 eine festere und kompaktere Struktur (Tabelle 2).

Tab. 2 Kallussuspension und Protoplastengröße

Genotyp	Kallussuspension	Ø der Protoplasten
301	sehr feiner, homogener Kallus	50 µm
503	feiner, homogener Kallus	ca. 20 µm
519	kompakter, fester Kallus	20 - 50 µm
609	grober, kompakter, fester Kallus	10 - 20 µm

Die Kulturmedien wurden den Kulturansprüchen der jeweiligen Genotypen angepasst. Dadurch war ein kontinuierliches Wachstum der Zellsuspensionen bei allen Genotypen gewährleistet. Die regelmäßige wöchentliche Passage auf frisches Medium ist neben der Medienzusammensetzung der wichtigste Faktor für den Fortbestand der Suspensionen. Aus allen etablierten Suspensionskulturen ließen sich zuverlässig stabile Protoplasten isolieren. Die Protoplasten waren stets hoch aufgereinigt, Bruchstücke konnten sicher entfernt werden. Die so gewonnenen stabilen Protoplasten standen für eine weitere Verwendung in der Protoplastenfärbung und –fusion zur Verfügung (Abbildung 1). Neben der Stabilität ist die Farblosigkeit ein weiterer Vorteil für die nachfolgenden Untersuchungen.

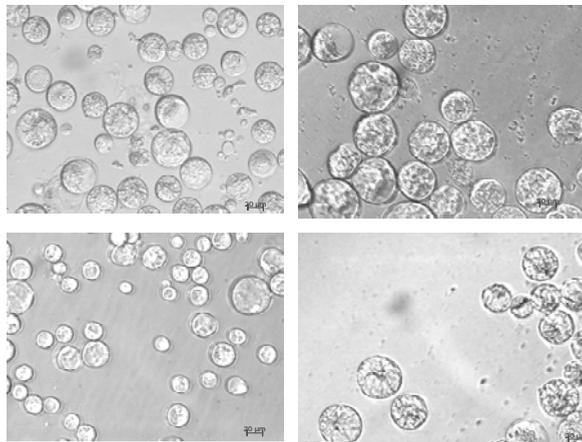


Abb. 1 Stabile Suspensionsprotoplasten nach der Aufreinigung im Saccharosegradienten, a) 503; b) 301; c) 609; d) 519.

Die mit Rhodamin G (Abbildung 2) bzw. CellTracker Blue angefärbten Protoplasten konnten bis zum Kallus weiter kultiviert werden. Es gab weder zeitliche noch morphologische Unterschiede im Regenerationsverlauf zu den nicht gefärbten Kontrollen.

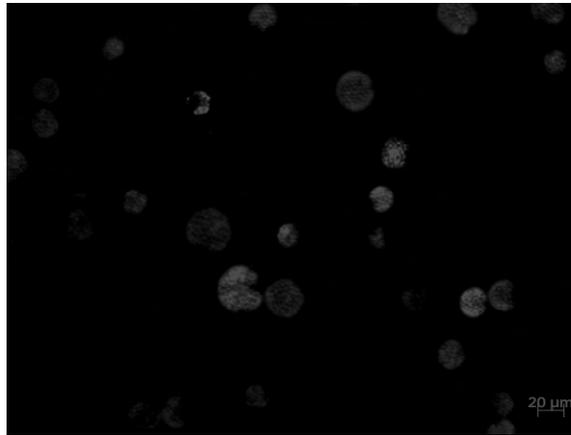


Abb. 2 Suspensionprotoplasten 503, gefärbt mit Rhodamin G .

Diskussion

Für die Entwicklung eines erfolgreichen Protokolls zur somatischen Hybridisierung ist es notwendig, genügend stabile Protoplasten mit einem guten Regenerationspotenzial zur Verfügung zu haben. Zur Protoplastenfusion bei Pelargonien gibt es bisher nur eine kurze Veröffentlichung (Nassour und Dorion 2003). Die eigenen Arbeiten haben die Resistenzübertragung aus Wildformen in Kulturformen zum Ziel. Bei Pelargonien gibt es in dieser Hinsicht bisher keine Erfahrungen. Die anfängliche Isolierung aus Blättern verlief aufgrund der Instabilität der Protoplasten erfolglos (nicht veröffentlicht). Mit den hier vorgestellten Suspensionskulturen gelang es erstmals, stabile Protoplasten von den gewünschten Genotypen in ausreichender Menge zu isolieren und weiter zu kultivieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier unterschiedliche *Pelargonium* Genotypen als Suspensionskultur erfolgreich etabliert werden. Auch die Kultivierung des Genotyps 609 (Wildform) mit hohem Gehalt an ätherischen Ölen ist überraschender Weise gut gelungen. Es ist bekannt, dass ätherische Öle und weitere pflanzliche Sekundärstoffe die In-vitro-Kultivierung oft nachteilig beeinflussen. Bei der Vermehrung und Erhaltung von *Pelargonium* Genotypen *in vitro* spielt dieser Fakt durchaus eine wichtige Rolle. (Ryschka, pers. Mitteilung). Die gelungene Etablierung der Suspensionskultur des Genotyps 609 ist eine wichtige Voraussetzung für die Realisierung der Protoplastenfusionen mit diesem Genotyp und damit der Übertragung der gefundenen Resistenz in Kulturformen. Die Regeneration der Suspensionsprotoplasten über einen Kallus bis hin zur vollständigen Pflanze wird zurzeit getestet. Yarrow u. a. (1987) erzielten unterschiedliche Ergebnisse bei der Regeneration der Suspensionsprotoplasten. Ihnen ist die erfolgreiche Regeneration von *P. x hortorum* aus Suspensionsprotoplasten gelungen.

Die Stabilität und die Auswirkungen der Farbstoffe auf die Protoplastenentwicklung müssen noch weiter untersucht werden. Zurzeit ließ sich feststellen, dass die Regeneration bis zum Kallus nicht durch die Farbstoffe beeinflusst wird. Die Versuche zur Anfärbung der Protoplasten stellen somit einen weiteren wichtigen Beitrag zur Etablierung der somatischen Hybridisierung bei *Pelargonium* dar. Damit ist es möglich, die Protoplasten gut visuell zu differenzieren. Darüber hinaus könnten diese Anfärbungen ein erster Schritt für eine automatische Zellsortierung mittels lasergestützter Flowzytometersysteme sein. Fluoreszenzfarbstoffe werden vielseitig in der Biologie angewendet. Die Nutzung dieser Farbstoffe für die Anfärbung pflanzlicher Protoplasten wurde jedoch bisher kaum beschrieben, so dass es zu den Auswirkungen auf das Wachstum der Protoplasten keine Angaben gibt.

Erste Untersuchungen lassen erkennen, dass die Suspensionsprotoplasten auch für die eigentlichen Fusionsprotokolle mit Polyethylenglycol geeignet sind. An diesen Untersuchungen wird derzeit intensiv gearbeitet.

Danksagung

Wir danken der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Verbundprojektes 28-1-41.014-06 mit der Firma Elner pac® Dresden

Literatur

- Dreyer L. L., Albers F., Van der Walt J. J. A., Marschewski D. E., 1992: Subdivision of *Pelargonium* sect. *Cortusina* (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution* **183**, 83–97.
- Murashige, T. und Skoog, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **57**, 35–41.
- Nassour, M. und Dorion, N., 2003: Somatic hybridisation between *Pelargonium x hortorum* und *P. x domesticum* towards resistance to *Xanthomonas pelargonii*. *Acta Horticulturae* **612**, 75–82.
- Yarrow, S. A., Cocking, E. C., Power, J. B., 1987: Plant regeneration from cultured cell- derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, *P. x hortorum* and *P. peltatum*. *Plant Cell Reports* **6**, 102–104.

Kontakt: Josefine Engel, E-Mail: josefine.engel@jki.bund.de

Weber, Maria; Ulrich, Detlef

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Quedlinburg,

Charakterisierung des Aromamusters der Wilderdbeere *Fragaria nilgerrensis* (Schldl.) als Voraussetzung für die Nutzung in der Erdbeerzüchtung

Characterisation of the aroma pattern of the wild strawberry *Fragaria nilgerrensis* (Schldl.) as a precondition for the use in strawberry breeding

Zusammenfassung

Die erstmalige Untersuchung des Aromas der Wilderdbeere *F. nilgerrensis* wurde mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Gaschromatographie-Olfaktometrie (GCO) ausgeführt. Die GCO (Nasal Impact Frequency Methode - NIF) wurde mit einem Expertenpanel bestehend aus sieben Personen zur Identifizierung der Hauptaromastoffe vorgenommen. Die Aromaanalyse der *F. nilgerrensis* zeigte eine Vielzahl von aromarelevanten Substanzen mit zumeist hohen Konzentrationen. Neben den wichtigen Komponenten Mesifuran und Furanol wurden Lactone als herausragende und intensiv wahrgenommene Inhaltsstoffe identifiziert. Desweiteren enthält die Wilderdbeere Methylanthranilat in geringer Konzentration. Aufgrund der Konzentration und Anzahl der Lactone, stellt *F. nilgerrensis* einen hervorragenden Donor für diese Substanzklasse in der Pflanzenzüchtung dar.

Stichwörter: GC-MS, GCO, Wilderdbeere, Elsanta, Pflanzenzüchtung

Abstract

The first-time aroma investigation of the wild strawberry *F. nilgerrensis* was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography olfactometry (GCO). For GCO (nasal impact frequency method - NIF) a panel of seven experts was used to identify the key aroma compounds. The aroma analysis of *F. nilgerrensis* indicated a broad range of aroma-relevant substances with mostly high concentrations. Beside the important components mesifuran and furaneol, lactones were identified as character impact compounds. Furthermore methylanthranilat was found in low concentration. Due to the concentrations and number of lactones, *F. nilgerrensis* represents an outstanding donor for this substance class in plant breeding.

Keywords: GC-MS, GCO, wild strawberry, Elsanta, plant breeding

Einleitung

Die Erdbeere zählt zu einer der beliebtesten Obstarten der Welt. Beim Vergleich von frisch geernteten Früchten aus dem heimischen Garten mit den käuflich erworbenen Erdbeere sind zumeist ein großer Geschmacksunterschied und Differenzen in Größe und Farbe, festzustellen. Das Resultat der jahrzehntelangen

Hochleistungszüchtung sind ganz wenige handelsübliche Sorten, mit großen, festen, hellroten Früchten sowie hohem Ertrag und guter Lagerfähigkeit aber nur geringem Aroma.

Durch mehrjährige Untersuchungen im Julius Kühn-Institut konnten zwischen modernen Hochleistungssorten, alten Kultursorten und Wildarten genetisch manifestierte Unterschiede in den Metabolitmustern gefunden werden (Ulrich, 2007; Olbricht, 2008). Die inhaltsstofflichen Unterschiede weisen auf eine genetische Erosion (genetischen Trichtereffekt) hin. Dieser Effekt beeinflusst offensichtlich auch sensorisch bedeutende Merkmale wie das Aromamuster [WWW.BAFZ.DE]. Das geringe oder nahezu fehlende Aroma neuer Hochleistungssorten ist eine Folge der Züchtung auf hohen Ertrag und technologische Parameter wie hohe Festigkeit der Früchte.

Verbraucher bevorzugen jedoch verstärkt Sorten mit hoher sensorischer Qualität. Deshalb wird nach einer Erdbeeresorte gesucht, die alle positiven Eigenschaften mit einem typischen Aromas vereint. Diese Zielstellung soll durch Kreuzung von Hochleistungssorten mit alten Sorten und mit Wilderdbeeren erreicht werden. Eine für dieses Züchtungsprogramm in Frage kommende, vielversprechende Wildart könnte die weiße Wilderdbeere *Fragaria nilgerrensis* (Schltdl.) sein. Mit dem derzeitigen Stand des Wissens kann aber keine genaue Aussage über die sensorischen Eigenschaften und das Aromaprofil dieser Wildart getroffen werden. Das Erscheinungsbild der kleinen Wildfrüchte zeichnet sich durch eine creme bis blassrosa Färbung mit rot-braunen Nüsschen aus. Bei der sensorischen Qualität existieren in der Literatur gegensätzliche Meinungen. Die Wissenschaftler Olbricht und Staudt behaupten, die Früchte seien „eine regelrechte Aromabombe“ (Hein, 2006; Staudt et al., 1975). Hingegen findet man in der Literatur auch Hinweise auf einen schlechten Geschmack der Früchte (Darrow et al, 1966).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Aromastoffe der Wildart *F. nilgerrensis* mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Gaschromatographie-Olfaktometrie (GCO) zu untersuchen und mit der Hochleistungssorte Elsanta zu vergleichen, um eine Aussage über die mögliche Verwendung der Wilderdbeere für die Züchtungsprogramme zu geben.

Material und Methoden

Material. Als Untersuchungsmaterial standen die asiatische Wilderdbeere *F. nilgerrensis* (Schltdl.), spp. Yunnan (Ernte 2006; 426 g) und die Kulturbeere Elsanta (Ernte 2008; 241 g) für die Analysen zur Verfügung. Beide Erdbeerarten wurden im Zuchtgarten des „Julius Kühn-Instituts“ angebaut, vollreif geerntet und -86 °C bis zur Analyse gelagert.

Probenvorbereitung. Für die Isolierung der flüchtigen Inhaltsstoffe der Beeren eine Flüssig-flüssig-Extraktion der Aromastoffe mit Dichlormethan verwendet (Ulrich, 2007). Der Dichlormethanextrakt wurde durch das Abdampfen des Lösungsmittels über eine Vigreux -Kolonne auf ein Volumen von etwa 200 µl eingeeengt.

Gaschromatographie. Parallel zur Olfaktometrie erfolgten Analysen mittels GC-MS und GC-FID.

GC-FID-Analyse: a) Hewlett Packard GC 6890 Serie II, Säule: HP5 (15 m x 0,32 mm x 1,0 µm), b) Agilent 6890 N Network GC System, Säule: HP INNOWax (15 m x 0,32 mm x 0,5 µm), Temperaturprogramm: 45 °C (3 min) – 10 K/min – 210 °C (13,5 min); Wasserstoff als Trägergas, Injektor 250 °C, Split: 1:3, Detektor: FID, 250 °C.

GC-M-Analyse: a) Hewlett Packard GC MS-System GC 5890 plus und MSD 5972, Säule: HP 5 (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm), b) Agilent 6890 N Network GC System mit 5977 MSD; Säule: Zebron ZB-Wax (30m x 0,25mm x 0,5 µm), Temperaturprogramm: 45 °C (5 min) – 3 K/min – 210 °C (20 min); Helium als Trägergas; Injektor 250 °C, Split: 1:3, Detektor: MS, 280 °C

GCO: Die Gerätetechnik und die Methodenparameter entsprechen denen der GC-FID-Analysen, wobei der Trägergasstrom jedoch auf einen Sniffingport geleitet wurde (OPD2 von Gerstel). Für die sensorische Charakterisierung der Extrakte wurde die Nasal Impact Frequency Methode (NIF) angewendet (Wijaya, 2005). Die sensorische Bewertung am Sniffingport wurde mit einem Panel bestehend aus sieben trainierten Personen ausgeführt. Die Aufzeichnung der Länge der Geruchswahrnehmungen erfolgte durch Drücken einer Joysticktaste. Zusätzlich wurde die Geruchsqualität verbal beschrieben und registriert.

Ergebnisse

GC-FID- und GC-MS-Analysen: Die konzentrierten Methylenchloridextrakte der beiden Erdbeerproben sind durch einen intensiven Geruch charakterisiert. Während der Elsantaextrakt dem typischen Kulturerdbeergeruch ähnelt, weist die Wilderdbeere deutliche Pfirsich- und Lactonnoten auf. Die gaschromatographischen Trennungen ergeben stark strukturierte Chromatogramme mit einer Vielzahl von Peaks. Während

der Wilderdbeerextrakt 186 (HP5) bzw. 184 (Wax) Peaks aufweist, werden für die Kulturerdbeere mit 103 (HP5) bzw. 143 (Wax) deutlich weniger Metabolite detektiert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit früheren vergleichenden Untersuchungen an Wild- und Kulturerdbeeren (Ulrich, 1997; Ulrich, 2007), die ebenfalls qualitative und quantitative Unterschiede in den Aromamustern nachweisen konnten.

Abbildung 1 zeigt die gaschromatographischen Trennungen beider Proben. Im Vergleich zur Wilderdbeere, die eine Vielzahl von kleinen bis mittleren Peaks enthält, ist das Elsantachromatogramm ärmer, zeigt aber einige wenige dominierende Substanzen. Die Substanzen mit der größten Konzentration in der *F. nilgerrensis* sind Acetoin, Mesifuran sowie Hexansäure und Benzylalkohol mit mittleren Gehalten. Im Vergleich dazu enthält der Elsantaextrakt die Substanzen (E)-2-Hexenal, Buttersäure, 2-Methylbuttersäure und Hexansäure („Bocksäure“, sog. Off-flavour) als dominierende Peaks, sowie Furaneol und γ -Decalacton in mittleren Mengen. In der Wilderdbeere wurden nahezu alle aus der Literatur bekannten Schlüsselkomponenten gefunden (Ulrich, 1997).

Weitere auffällige Unterschiede im Aromastoffgehalt treten bei Methylantranilat und einigen Terpenen auf. Methylantranilat, das einen intensiv, blumig-aromatischen Geruch aufweist, fehlt in der Elsanta, ist in der Wilderdbeere jedoch vorhanden. Dieser Ester ist eine der Schlüsselsubstanzen neben Mesifuran und Furaneol. Elsanta weist hohe Gehalte des angenehm, blumig riechenden Terpens Linalool auf, das in der Wilderdbeere nicht nachgewiesen werden konnte.

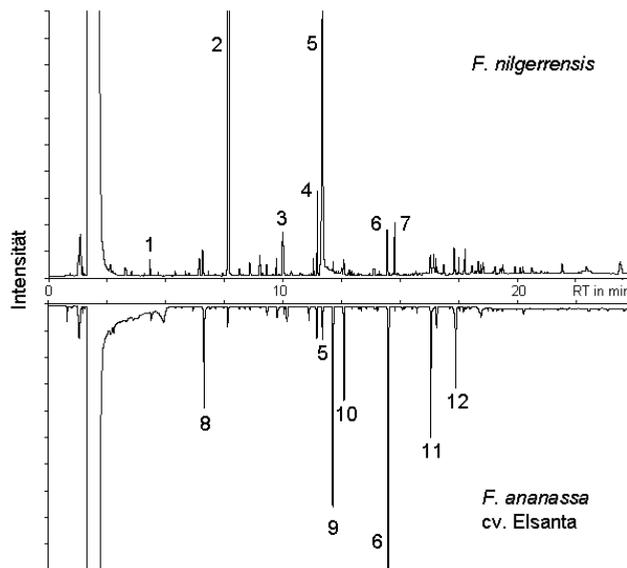


Abb. 1 Gaschromatogramme der Wild- und Kulturerdbeere. INNOWax-Trennsäule, Detektor FID. 1 - Hexanal, 2 - Acetoin, 3 - Essigsäure, 4 - Octylacetat, 5 - Mesifuran, 6 - Hexansäure, 7 - Benzylalkohol, 8 - (E)-2-Hexenal, 9 - Buttersäure, 10 - 2-Methylbuttersäure, 11 - Furaneol, 12 - γ -Decalacton

Aus den Peakhöhen oder -flächen (Konzentration) der einzelnen Substanzen kann jedoch kein einfacher Rückschluss auf die sensorische Wirkung eines Aromastoffes gezogen werden, da für den menschlichen Sinneseindruck nicht die Konzentration einer Substanz, sondern deren Aromawert entscheidend ist. Der Aromawert ist als Quotient aus Konzentration und Geruchsschwellenwert eines Aromastoffes definiert.

Olfaktometrische Analyse: Bei der für diese Arbeit verwendeten Gaschromatographie-Olfaktometrie-Methode NIF handelt es sich um eine statistische Methode im Gegensatz zu den verschiedenen sog. Verdünnungsmethoden. Für die NIF-Untersuchungen wird ein Panel bestehend aus trainierten Testern zur olfaktometrischen Analyse eingesetzt. Dadurch wird verhindert, dass die Messwerte durch individuelle Unterschiede in der Geruchswahrnehmung (sog. totale oder partielle Anosmien) entscheidend verfälscht werden können. Der Einsatz eines trainierten Panels glättet individuelle Unterschiede, erfordert jedoch einen hohen personellen und organisatorischen Aufwand. Die von den einzelnen Testern angegebenen Geruchsbeschreibungen sind auch bei trainierten Personen individuell geprägt und müssen im Anschluss an

die Analysen diskutiert werden. Die in Tabelle 1 aufgeführten Geruchsbeschreibungen stellen deshalb eine Konvention der sieben Tester dar.

Abbildung 2 zeigt eine Gegenüberstellung einer FID-Analyse und eines NIF-Chromatogramms bestehend aus sieben einzelnen GCO-Läufen. Die Graphik verdeutlicht das oben erwähnte Prinzip des Aromawertes. Es besteht keine lineare Korrelation zwischen Peakhöhen in der instrumentellen FID-Analyse und der olfaktomerischen Wirkung auf den Geruchssinn. Die Abbildung zeigt für einige sehr kleine Peaks hohe NIF-Werte, das heißt, starke Geruchseindrücke. Auch der gegensätzliche Fall, dass Substanzen in hohen Konzentrationen keine oder geringe Geruchseindrücke verursachen, ist für einige Substanzen zu verzeichnen.

Die bei den instrumentellen Analysen gefundene größere Vielfalt der Metabolite in der Wilderdbeere spiegelt sich auch in den olfaktometrischen Messungen wider. Für die Wilderdbeere *F. nilgerrensis* wurden als Summe aller Tester 183 Geruchseindrücke verzeichnet. In der Analyse des Elsantaextraktes traten 156 Wahrnehmungen auf.

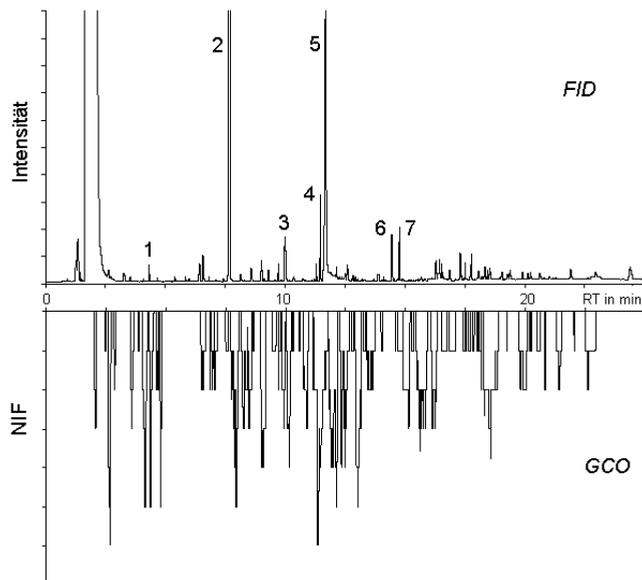


Abb. 2 Gegenüberstellung von instrumenteller und olfaktometrischer Analyse auf der INNOWax-Trennsäule. Oben: FID-Chromatogramm. Unten: NIF-Chromatogramm, d. h. Summierung von 7 GCO-Läufen. Der NIF ist als Höhe des jeweiligen Peaks definiert und kann somit Werte zwischen 0 und 7 annehmen.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse aller GCO-Messungen zusammengefasst. Die Geruchsbeschreibungen und NIF-Werte basieren auf insgesamt 42 Analysenläufen auf zwei analytischen Trennsäulen (HP5 und Wax).

Tab. 1 Schlüsselaromasubstanzen der Wilderdbeere *F. nilgerrensis* und der Kulturerdbeersorte Elsanta

Klasse*	Substanz	Geruch	<i>F. nilgerrensis</i>		Elsanta	
			HP5	Wax	HP5	Wax
Ald	(E)-2-Hexenal	grün, fettig	6		3	3
Ald	Hexanal	grün, Gras	5	5	7	4
E	Ethylbutyrat	fruchtig, esterartig, Ananas	5	4	3	6
E	Ethylcaproat	fruchtig, grün, Banane	4			3
E	Butylacetat	Bonbon, fruchtig, Verdünner		5		
F	Mesifuran	fruchtig, Karamell, muffig	5	4	4	4
F	Furaneol	intensiv karamellartig			3	3

Klasse*	Substanz	Geruch	<i>F. nilgerrensis</i>		Elsanta	
			HP5	Wax	HP5	Wax
K	2,3-Butandion	Butter, Karamell, süß	7	6	5	5
K	2-Heptanon	fleischig				3
Sre	Hexansäure	unangenehm, fettig, säuerlich	5	3	3	4
Sre	2(o.3)-Methylbuttersäure	Käse, stinkig, säuerlich, süß	6	5	5	3
Sre	Benzoesäure	unangenehm	4		4	
Sre	Buttersäure	butterartig, ranzig		5	3	4
Sre	Isobuttersäure	säuerlich, Käse, Butter		4	6	5
S	Benzylalkohol	blumig, fruchtig, chemisch	3	3		3
S	beta-Ionon	herb, floral		4		
S	Linalool	blumig, süß				4
L	delta-Octalacton	Kokos, fruchtig, Aprikose	4	3		
L	delta-Decalacton	Karamell, Erdbeere, Zuckerwatte		3	2	2
L	gamma-Decalacton	fruchtig, Kokos, Pfirsich	3			2
L	gamma-Hexalacton	pflanzlich, Kokos, Tabak	6			
L	gamma-Heptalacton	Kokos, Karamell, Heu	4			
L	gamma-Nonalacton	Kokos, süß, Butter, ölig		4		
L	delta-Decenolacton	fruchtig Pfirsich, pflanzlich		3		

Substanzklasse: Ald - Aldehyde, E - Ester, F - Furanone, K - Ketone, Sre - Säure, S - Sonstiges, L Lactone

Schlussfolgerung

Die Aromaanalyse der Wilderdbeere *Fragaria nilgerrensis* (Schtdl.) weist im Vergleich zu der Kulturerdbeersorte Elsanta ein sehr reiches Aromamuster auf. Die Vielfalt der flüchtigen Metabolite spiegelt sich auch in den sensorischen Eigenschaften der Beeren wider. Im Vergleich zur Kulturerdbeere fallen insbesondere angenehme Geruchseindrücke (fruchtig, süßlich, Karamell, Pfirsich...) auf, die auf die Vielzahl der enthaltenen Lactone zurückzuführen sind. Aufgrund der qualitativen und quantitativen Vielfalt des Aromamusters kann *F. nilgerrensis* in der Erdbeerrzüchter als ein wertvoller Donor für flüchtige Metabolite, insbesondere aromawirksame Lactone dienen.

Literatur

- DARROW, G.M, GEORGE, M.: The Strawberry: History, Breeding and Physiology - Wild Strawberry Species of the World. Holt, Rinehart and Winston, New York, Chicago and San Francisco, 1966.
- HEIN, T., 2006: Die Rückkehr von Miese Schindler; Zeit online **23/2006**, 55.
- OLBRICHT, K., GRAFE, C., WEISS, K., ULRICH, D., 2008: Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. Plant Breeding **127**, 87-93.
- STAUDT, G., DRAWERT, F., TRESSL, R., 1975: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Differenzierung der Aromastoffe von Erdbeerarten, II *Fragaria nilgerrensis*. Zeitung Pflanzenzüchtung **75**, 36 -42.
- ULRICH, D.; HOBERG, E.; RAPP, A.; KECKE, S., 1997: Analysis of strawberry flavour - discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A-Food Research and Technology **205** (3), 218-223.
- ULRICH, D., KOMES, D., OLBRICHT, K., HOBERG, E., 2007: Diversity of aroma patterns in wild and cultivated strawberry accessions, Genet Resour Crop Evol, **54**, 1185-1196.
- WIJAYA, C., ULRICH, D., LESTARI, R., SCHIPPEL, K., EBERT, G., 2005: Identification of potent odorants in different cultivars of snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss] using Gas Chromatography-Olfactometry. J. Agric. Food Chem. **53**, 1637-1641.
- Aktuelle Ergebnisse der BAZ-Forschung: <http://www.bafz.de/baz2006V4/index.php?id=489>; Stand: August 2008.

Kontakt: Maria Weber, E-Mail: maria-weber1@gmx.net; Dr. Detlef Ulrich, E-Mail: detlef.ulrich@jki.bund.de

Themen zum Pflanzenschutz/Phytopathologie

Moderation Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann

Njontje, Charles; Schiemann, Joachim; Hüsken, Alexandra

Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen, Braunschweig

Forschungsprojekte zur Sicherung der Koexistenz bei Mais (*Zea Mays L.*)

Research Projects to Ensure the Coexistence by Maize (*Zea Mays L.*)

Zusammenfassung

Die gleichberechtigte Koexistenz verschiedener landwirtschaftlicher Anbausysteme mit und ohne Nutzung gentechnisch veränderter (GV) Pflanzen ist ein Anliegen europäischer und nationaler Regelungen. In der nahen Zukunft sollen in der Europäischen Union verbindliche Schwellenwerte für GV-Beimengungen im konventionellen Saatgut festgelegt werden. Saatgut steht am Anfang der Nahrungskette, darin enthaltene GV-Beimengungen pflanzen sich in der gesamten Nahrungskette fort. Deshalb ist es wichtig, die Konsequenzen von GV-Beimengungen im Saatgut auf das Erntegut zu untersuchen. Im Rahmen des EU-finanzierten Forschungsprojektes Co-Extra (**Co**existence and **Tr**aceability) wurden in den Jahren 2005 bis 2007 Feldversuche mit dem transgenen Mais MON810 durchgeführt.

Ziel der Versuche war es, die Auswirkungen einer GV-Saatgutbeimengung auf das Ernteprodukt zu untersuchen und die visuelle GV-Detektion (von Züchtern verwendet) mit der real-time PCR-Methode (Empfehlung der Europäischen Kommission (2004/787/EC)) zu vergleichen. Hier konnte gezeigt werden, dass GV-Saatgutbeimengungen von 0,3%, 0,5% und 1% im Ernteprodukt GVO-Anteile von 0,24%, 0,47% und 0,8% ergaben (Standardabweichung: 0,11, 0,13 und 0,22). Beim Vergleich zwischen visueller und real-time PCR-Detektion lagen die Ergebnisse der real-time PCR-Detektion unter der visuellen Detektion. Dies kann zurückgeführt werden auf die Zygotie, den Ploidiegrad der verschiedenen Proben sowie auf das Referenzmaterial, das zur Kalibrierung verwendet wird.

Stichwörter: GVO-Saatgut-Beimengungen, Koexistenz, Bt-Mais, GVO-Detektionsmethoden

Abstract

The coexistence of farming systems with and without the use of genetically modified plants has been regulated in the EU. In the near future, EU thresholds for adventitious presence of genetically modified (GM) materials in certified seeds will be set. Seed lots are starting points in an ever increasing supply food chain; therefore it is important to investigate the consequences of GM seed admixture in seed lots on the harvest product. Field trials have been conducted in the frame of the EU-funded project Co-Extra (**Co**existence and **Tr**aceability) with the transgenic maize event MON810 between 2005 and 2007. The aim of the field trials was to find out the consequences of GM seed admixture on the harvest product and to compare the visual detection method (common used by plant breeders) with the real-time PCR detection method (recommended by the European Commission (2004/787/EC)).

Using GM-seed admixtures of 0.3%, 0.5% and 1% an amount of 0.24%, 0.47% and 0.80% GM in the harvest product (Standard deviation: 0.11, 0.13 and 0.22, respectively) was determined. Comparing visual detection with real-time PCR, lower real-time PCR values were obtained than visually detected. Possible explanations for the discrepancy include the fact that the IRMM reference material for the real-time PCR calibration carries the transgene by the female parent, whereas the transgene in our samples is paternally inherited.

Keywords: GMO seed admixture, coexistence, *Bt*-maize, detection methods

Priegnitz, U., Kühne, S., Ellmer, F., Moll, E., Kowalska, J.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Strategien und Folgeabschätzungen im Pflanzenschutz, Kleinmachnow

Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Spinosad-, Neem- und *B.t.t.*-Präparaten auf die Regulierung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) im Ökologischen Landbau

Effect of Spinosad, Neem and *B.t.t.* on the control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in organic farming

Zusammenfassung

Der Kartoffelkäfer ist der wichtigste Schädling im Kartoffelanbau (*Solanum tuberosum*). Vorbeugende Maßnahmen sind oftmals nicht ausreichend, um Ertragseinbußen zu mindern. Deshalb sollten auch im Ökologischen Landbau Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden um Ernteverluste zu begrenzen. Die biologischen Pflanzenschutzmittel Novodor FC (Wirkstoff: *Bacillus thuringiensis* v. *tenebrionis* (B.t.t.) und NeemAzal-T/S (Wirkstoff: Azadirachtin des Neembaumes) dürfen im Ökologischen Landbau angewendet werden und regulieren den Kartoffelkäfer in der kombinierten Anwendung wirkungsvoll (Kühne et al., 2008). Der Wirkstoff Spinosad, gewonnen durch Fermentation aus dem Bodenbakterium *Saccharopolyspora spinosa*, wurde im Jahr 2008 in den Anhang II B der EU-Ökoverordnung 2092/91 aufgenommen. Pflanzenschutzmittel mit diesem Wirkstoff sind in Deutschland bisher im Weinbau, bei Zierpflanzen und im Gemüsebau gegen verschiedene Schadinsekten zugelassen. In Kartoffeln mit der Indikation Kartoffelkäfer ist mit einer Zulassung des Pflanzenschutzmittels SpinTor im Jahr 2010 zu rechnen. Aus diesem Grund wurden schon im Jahr 2008 Feldversuche durchgeführt, um die Wirksamkeit dieses neuen Pflanzenschutzmittels im Vergleich zu Neem- und B.t.t.-Präparaten zu prüfen. Die Versuche wurden auf den nach EU-Öko Richtlinien zertifizierten Versuchsfeldern (Kontroll Nr.: D-BB-043-4143 A) des Julius Kühn-Instituts in Dahnsdorf (Bundesland Brandenburg) durchgeführt. Der Standort ist durch einen schwach-lehmigen Sandboden (sL) mit einem pH-Wert 5,8 gekennzeichnet. Die jährliche Niederschlagssumme liegt bei 526 mm mit einer jährlichen Durchschnittstemperatur von 8,5 °C. Die Versuche wurden als randomisierte einfaktorielle Blockanlage mit je vier Wiederholungen durchgeführt. Eine Wiederholung besteht aus 8 Kartoffelreihen im Abstand von 75 cm (Parzellengröße je Wiederholung: 6 m x 34 m). Um den optimalen Zeitraum der Anwendung zu bestimmen, wurde zusätzlich das Prognosemodell SIMLEP3 verwendet. Vor der Anwendung der Pflanzenschutzmittel wurden durchschnittlich 27 Larven pro Pflanze gezählt; diese Anzahl lag somit deutlich über dem Schadschwellenwert. Die Pflanzenschutzmittel wurden wie folgt angewendet: 1: einmalige Spinosad Applikation (0,05 l/ha; 24 g/ha aktive Wirksubstanz (a.i.)) 2: erste Applikation mit B.t.t. (3 l/ha; 60 g/ha a.i.), zweite Applikation (+4 Tage) B.t.t. (5 l/ha/100 g/ha a.i.) 3: erste Applikation Neem (2,5 l/ha; 25 g/ha a.i.), zweite Applikation (+4d) B.t.t. (5 l/ha; 100 g/ha a.i.). 25 Tage nach der Anwendung konnte bei allen drei Pflanzenschutzmitteln, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ein ähnlich hoher Wirkungsgrad hinsichtlich der Reduzierung des Fraßschadens ermittelt werden (78%–82%). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, mit einem durchschnittlichen Ertrag von 158 dt/ha, konnte ein signifikanter Mehrertrag in allen drei Prüfvarianten erzielt werden: 1: Spinosad - 103 dt/ha, 2: B.t.t. + B.t.t. (+4 d) - 54 dt/ha, 3: Neem + B.t.t. (+4 d) - 55 dt/ha.

Stichwörter: Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* Say), Spinosad, Neem, *B.t.t.*, Prognosemodell SIMLEP3

Abstract

The Colorado potato beetle (CPB) is one of the most important pests on potatoes (*Solanum tuberosum*). In many areas, preventive measures are not sufficient enough to prevent the damage caused by the CPB. Therefore insecticides such as NeemAzal-T/S (active ingredient: Azadirachtin of Neem tree) and Novodor FC (active ingredient: *Bacillus thuringiensis* v. *tenebrionis* (B.t.t.)) have an important role in organic potato production in Germany (Kühne et al., 2008). The new insecticide Spinosad was added to Council Regulations (EEC) No. 2092/91 on organic production in 2008. Spinosad is used to control pests, mainly in greenhouses, orchards and storage facilities. Now it is possible to use Spinosad in organic agriculture in the EU. The active ingredient of Spinosad is obtained from the bacterium *Saccharopolyspora spinosa* through fermentation. Therefore field studies were carried out at a test site of the Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI) in Dahnsdorf (Federal State: Brandenburg, Germany) that is certified for organic farming according to the EU regulations (Control No.: D-BB-043-4143 A; soil type: sandy loess (sL), mean annual precipitation: 526 mm, mean annual temperature: 8,5 °C). The trials were conducted as a randomised, single-factor experiment with

block design and four replicates (plot size per replicate: 6 m x 34 m, eight rows, distance per row 75 cm). Three treatments were compared in 2008: 1: single Spinosad treatment (24 g/ha active ingredient (a.i.)) 2: first treatment B.t.t. (60 g/ha a.i.), second treatment (+4d) B.t.t. (100 g/ha a.i.) 3: first treatment neem (25 g/ha a.i.), second treatment (+4d) B.t.t. (100 g/ha a.i.). There was an average of 27 larvae per plant before the treatments. All treatments displayed nearly the same significant degree of effectiveness (78 % - 82 %) with regards to the damaged leaf area 25 days after treatment in comparison to the untreated control. Best results in control populations of the CPB were obtained by Spinosad and neem/B.t.t. (no.3: two treatments). The increment to untreated control was significant with more than 103 dt/ha (active ingredient: Spinosad), 54 dt/ha (active ingredient: B.t.t./B.t.t.) and 55 dt/ha (active ingredient: neem/B.t.t.).

Keywords: Colorado potato beetle, Spinosad, neem, B.t.t., forecast model SIMLEP3

Kontakt: Uta Priegnitz, E-Mail: uta.priegnitz@gmx.de; Dr. Stefan Kühne: stefan.kuehne@jki.bund.de

Schuster, C.¹, Konstantinidou-Doltsinis, S.²; Schmitt, A.¹

¹Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; ²NAGREF, Plant Protection Institute of Patras, Griechenland

Untersuchung der Wirksamkeit eines Pflanzenextraktes gegen die Braunfäule an Tomatenpflanzen (*Phytophthora infestans*)

Investigations on the effectiveness of a plant extract against infection of tomato plants with late blight (*Phytophthora infestans*)

Zusammenfassung

Die Braunfäule (*Phytophthora infestans*) an Tomaten spielt im ökologischen Tomatenanbau im Freiland eine wichtige Rolle, da er bei ungünstiger Witterung zu Totalausfällen führen kann. Da zur Regulierung der Krankheit derzeit nur Kupferpräparate für den Ökolandbau zur Verfügung stehen, ist die Suche nach Alternativen dringend notwendig.

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte durch einen ethanolischen Pflanzenextrakt aus der Fabaceae *Glycyrrhiza glabra* (P1-Extrakt) insgesamt eine gute Wirkung gegen *P. infestans* an Tomatenpflanzen beobachtet werden. So wurde durch Behandlung mit einem 5%igen Extrakt im Klimaraum ein Wirkungsgrad von 74% und im Freiland von 45% erzielt. Die Ergebnisse sind viel versprechend, wobei weitere Untersuchungen zur Optimierung des Extraktes geplant sind.

Stichwort: Ökologischer Gemüsebau

Abstract

Late blight (*Phytophthora infestans*) on tomato plants plays an important role in organic tomato production in the field. The disease can cause a complete loss of the harvest, depending on climatic conditions. Since presently only copper-based products are available for control of *P. infestans*, identification of alternative agents are of high importance.

Trials with an ethanolic plant extract from *Glycyrrhiza glabra* L. (P1-extract) belonging to family Fabaceae showed good results against infection of tomato plants by *P. infestans*. In trials on potted plants in climate chambers and in a field experiment, with application of 5% P1-extract, efficacies of 74% and 45% were achieved. The results are promising, and further investigations on optimisation of the extract are planned.

Keywords: organic horticulture

Einleitung

Phytophthora infestans ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln und der Braunfäule an Tomaten, der bei ungünstiger Witterung zu Totalausfällen führen kann. Da zur Regulierung der Krankheit derzeit nur Kupferpräparate für den Ökolandbau zur Verfügung stehen, ist die Suche nach Alternativen dringend notwendig.

Methoden

Extrakterstellung: Das Pflanzenmaterial für die Extraktgewinnung bestand aus getrockneten und gemahlene Blättern von *G. glabra* L. (P1), die in Griechenland gesammelt wurden. Der Rohextrakt wurde mittels einer Soxhlet – Apparatur hergestellt. Hierfür wurde gemahlene Pflanzenmaterial in eine Extraktionshülse eingewogen und mit 96 %igem Ethanol zehn Stunden bei ca. 60 °C extrahiert. Der entstandene Rohextrakt wurde anschließend mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers eingeengt und das so entstandene Konzentrat in Ethanol (96%ig) aufgenommen, so dass ein 50%iger (w/v) Extrakt (P1-Extrakt) entstand. Verschiedene mit voll entsalztem (VE)-Wasser angesetzte Verdünnungsstufen dieses Extraktes wurden später für alle Versuche eingesetzt.

Pathogenanzucht: *Phytophthora infestans* wurde auf Roggenagar bei 17 °C in Dauerkultur erhalten. Für die Gewinnung einer Zoosporensuspension wurden Sporangien von einer etwa zwei Wochen alten Kultur mit ca. 5 ml VE-Wasser abgewaschen, anschließend unter einem Mikroskop ausgezählt und dann mit VE-Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Suspension wurde anschließend zum Schlüpfen der Zoosporen für etwa vier Stunden bei 8 °C in einen Kühlschrank gestellt.

Versuche an abgetrennten Pflanzenteilen: Die Tomatenpflanzen der Sorte „Harzfeuer“ waren zu Versuchsbeginn etwa fünf Wochen alt und hatten etwa sechs bis sieben Blättertage entwickelt. Verschiedene Verdünnungsstufen des P1-Extraktes wurden mit Hilfe eines Glassprühers (DESAGA) auf die Blattober- und Unterseiten aller Blättertage appliziert. Am darauf folgenden Tag wurden einzelne Blätter von den Pflanzen abgeschnitten und je 21 Blätter pro Variante mit der Blattunterseite nach oben in drei feuchte Kammern aufgeteilt. Auf die Blätter wurden dann mit einem Glassprüher und einer Pumpe je 2 ml des Pathogens pro Schale aufgesprüht. Anschließend wurden die Schalen verschlossen und in einem Klimaraum aufgestellt. Die Blätter wurden in den verschlossenen Schalen bei 15 °C für sieben Tage inkubiert. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Versuche an getopften Pflanzen: Für die Biotests an getopften Tomatenpflanzen wurden die Pflanzen ebenso vorbereitet, wie für den Versuch an abgetrennten Blättern. Einen Tag nach der Extraktapplikation wurden die Pflanzen auf den Blattunterseiten mit *P. infestans*-Suspension (1×10^5 Sporangien / ml) inokuliert. Die Pflanzen wurden anschließend bei 15 °C in einem Klimaraum unter Plexiglaszylindern feucht gestellt. Die Bonitur erfolgte nach zehn Tagen. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

Freilandversuch mit Tomatenpflanzen: Es wurden je drei Pflanzen pro Variante (randomisierte Anlage; nach Schuster & Lochow, 1978) in drei Wiederholungen mit den Präparaten behandelt. Einen Tag nach dem Auspflanzen wurden die Testlösungen erstmalig mit einem Hochleistungs-Sprühergerät (Gloria 141 T) auf die gesamte Pflanze ausgebracht. Vier Tage später wurde die *P. infestans*-Suspension auf die Blattunterseiten des dritten und vierten Fiederblattes mit einem Glassprüher appliziert. Die Suspension war auf 1×10^5 Sporangien / ml eingestellt und es wurden ca. 3 ml pro Pflanze verbraucht. Die weiteren Behandlungen mit den Mitteln erfolgten einmal pro Woche. Sechzehn Tage nach der Inokulation wurde das erste Mal bonitiert, was darauf alle sieben Tage erfolgte.

Ergebnisse

Versuch an abgetrennten Blättern von Tomatenpflanzen: In den Versuchen an abgetrennten Tomatenblättern (Abbildung 1) zeigte sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für den *G. glabra* (P1)-Extrakt. Die Blätter, welche mit dem 5%igen P1-Extrakt behandelt wurden, waren mit 11,9% signifikant am niedrigsten befallen. Der Wirkungsgrad betrug hier 87,5%. Der höchste Befall mit 88,8% bzw. 87,8% war nach Anwendung des 0,63%igen bzw. 0,31%igen Extraktes zu beobachten. Die unbehandelte Kontrolle zeigte einen Befall von 95%.

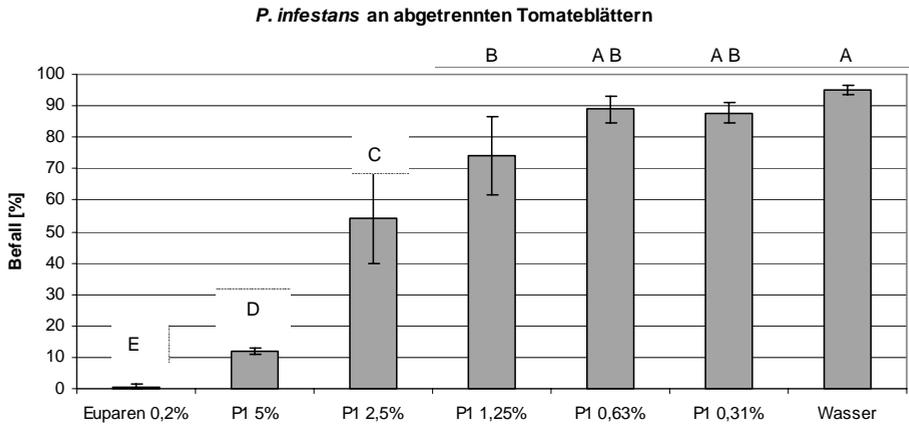


Abb. 1 Einfluss des *G. glabra*-Extraktes (P1) auf den Befall durch *P. infestans* an abgetrennten Tomatenblättern. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach dem Student-Newmann-Keuls-Test (P=0,05)

Biotest an getopften Tomatenpflanzen im Klimaraum: Im Biotest an getopften Pflanzen (Abbildung 2) zeigte sich ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit. Mit durchschnittlich 55% Befall in der unbehandelten Kontrolle war der Befallsdruck nicht sehr hoch. Durch den 5%igen und den 2,5 %igen Extrakt wurde der Befall auf 14,4% bzw. auf 24,6% reduziert, was einem Wirkungsgrad von 73,9% bzw. 55,2% entsprach.

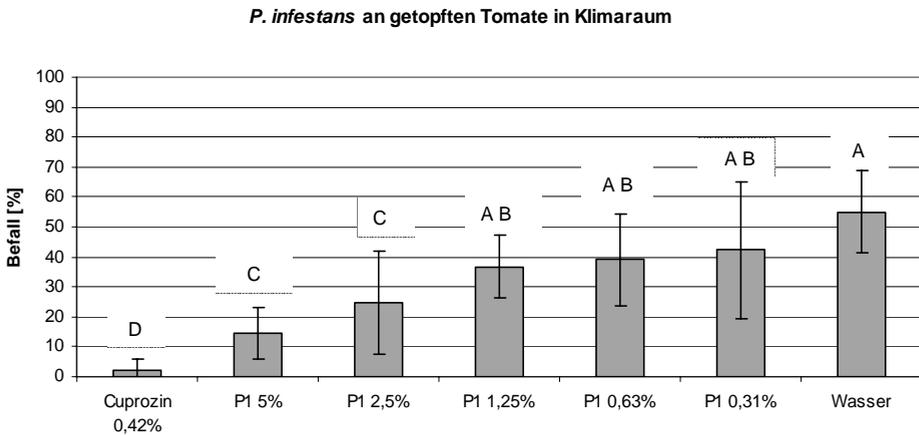


Abb. 2 Einfluss des *G. glabra* (P1)-Extraktes auf den Befall durch *P. infestans* an Tomatenpflanzen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach dem Student-Newmann-Keuls-Test (P=0,05)

Freilandversuch mit Tomatenpflanzen: Die erste Bonitur des Versuches fand 16 Tage nach der Inokulation der Pflanzen mit *P. infestans* statt und wurde daraufhin wöchentlich durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Versuchsabschlusses zeigte die Wasserkontrolle mit 89,5% den stärksten Befall mit dem Pathogen. Die Pflanzen, welche mit dem 1%igen P1-Extrakt behandelt wurden, zeigten einen Befall von 68,3%. Der 5%ige Extrakt führte mit 49,2% zu einem etwa 40% geringeren Befall als in der Wasserkontrolle. Die Fungizidkontrolle zeigte einen Befall von 30%. Die Befallswerte aller Varianten waren signifikant verschieden zueinander (Abbildung 3).

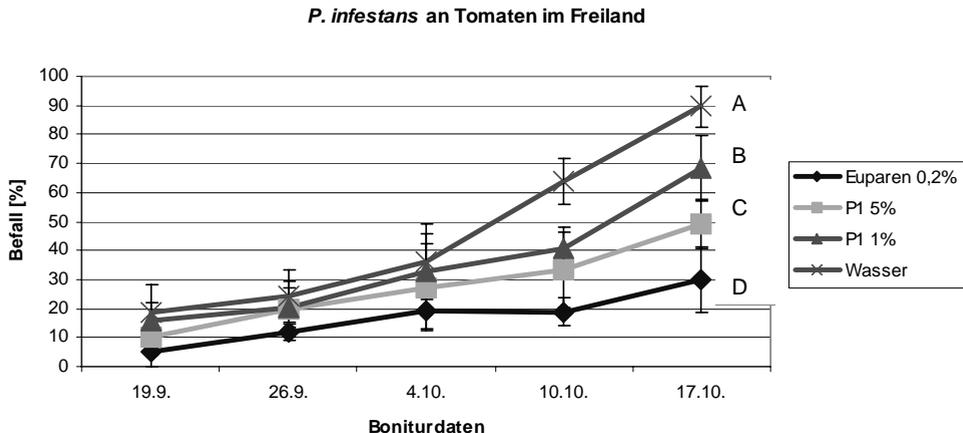


Abb. 3 Einfluss des *G. glabra*-Extraktes (P1) auf den Befall durch *P. infestans* auf Tomatenpflanzen im Freiland. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach dem Student-Newmann-Keuls-Test ($P=0,05$)

Diskussion

Pflanzenextrakte bieten für den ökologischen Gemüseanbau eine gute Möglichkeit Pflanzenkrankheiten zu bekämpfen. So fanden Blaeser [2002] und Latten [1994] viele Pflanzen, die eine hohe Wirksamkeit gegen verschiedene Phytopathogene, darunter auch *P. infestans*, aufwiesen. Blaeser erreichte Wirkungsgrade bis zu 90% (Extrakt aus *Potentilla erecta*). Der in den eigenen Untersuchungen verwendete *G. glabra*-Extrakt (P1-Extrakt) zeigte bei 5%iger Anwendung jeweils die beste Wirkung. An Tomatenpflanzen im Klimaraum führte die Anwendung dieser Extraktkonzentration zu einem Wirkungsgrad von 74%. Der 0,31%ige Extrakt hatte noch eine Wirkung von 23%. Auch in den anderen Tomaten-Testsystemen konnte eine dosisabhängige Wirkung festgestellt werden. Schmitt et al. [2008] erzielten bei Anwendung des 5%igen *G. glabra*-Extraktes gegen den Oomyceten *Pseudoperonospora cubensis* an getopften Gurkenpflanzen einen sehr hohen Wirkungsgrad von 99%.

Die gute Wirkung des Pflanzenextraktes gegen *P. infestans* konnte auch durch Versuche an abgetrennten Tomatenblättern bestätigt werden. Durch den 5%igen Extrakt wurde ein Wirkungsgrad von 90% erzielt, während er nach Applikation des 2,5%igen Extraktes 43% betrug. Bei Anwendung des 2,5%igen Extraktes an getopften Pflanzen im Klimaraum wurde ein Wirkungsgrad von 55% erreicht. Konstantinidou-Doltsinis und Markellou [2008] fanden in Versuchen an abgetrennten Tomatenblättern der Sorte „Manthos“ bei Anwendung eines 2,5%igen *G. glabra*-Extraktes einen Wirkungsgrad von 100%. In Versuchen an getopften Tomatenpflanzen im Klimaraum und im Gewächshaus betrug die Wirksamkeit nach einmaliger Anwendung des 1%igen Extraktes 20 bzw. 45 Tage nach der Inokulation mit *P. infestans* 100% bzw. 74%. Die Unterschiede zwischen den eigenen Versuchen und denen von Konstantinidou-Doltsinis und Markellou lassen sich vermutlich durch versuchstechnische Unterschiede, die Verwendung verschiedener Tomatensorten, bzw. Nutzung eines anderen Pathogen-Isolats erklären.

Im Freiland lag in den eigenen Versuchen der Befall der Pflanzen, welche mit 5%igem und 1%igem Extrakt behandelt wurden, unter dem der unbehandelten Kontrolle und über dem der mit Euparen M behandelten Pflanzen. In der letzten Bonitur, etwa sieben Wochen nach der Inokulation, war ein deutlicher Befall mit *P. infestans* zu sehen. Die Pflanzen der unbehandelten Kontrollen waren zu durchschnittlich 87% befallen. Der Befall der mit dem 5%igen bzw. 1%igen Extrakt behandelten Pflanzen war signifikant niedriger. Der Wirkungsgrad betrug 45% bzw. 24%. Typische Symptome von *P. infestans* waren als Nekrosen an Blättern und Stängeln an allen Pflanzen sichtbar.

Die Ergebnisse sind viel versprechend, wobei weitere Untersuchungen zur Optimierung des Extraktes geplant sind.

Literatur

- Blaeser, P., Steiner, U., Dehne, H.-W., 2002: Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL 97.
- Konstantinidou-Doltsinis, S. and Markellou, E., 2008: Antifungal activity of ethanolic *Glycyrrhiza glabra* L. extracts against infection of tomato plants by *Phytophthora infestans*. Summaries of papers and posters presented at the 14th Hellenic Phytopathological Congress, Nafplio, Greece, October 7-10, 2008 (in greek).
- Latten, J., 1994: Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten. Dissertation, Universität Gießen.
- Schmitt, A., Nowak, A., Gärber, U., Marx, P., Leinhos, G., Mattmüller, H., Konstantinidou-Doltsinis, S., Seddon, B., 2008: Falscher Mehltau im ökologischen Gemüseanbau – neue biologische Präparate. Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut **417**, printed by Arno Brynda GmbH 2008, 251-252.
- Schuster, W.H., Lochow, J. von : Anlage und Auswertung von Feldversuchen. 2. erweiterte Auflage, DLG Verlag, 1978.

Krengel, Sandra

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Strategien und Folgenabschätzung im Pflanzenschutz, Kleinmachnow

Effekte einer Temperaturerhöhung auf die natürliche Regulation durch die Marienkäfer *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* bei Blattläusen in Weizen

The Impact of Increased Temperature on the Predatory Effect of *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* (Coccinellidae) on Aphids in Wheat

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde anhand von Klimakammer- und Klimakammer-Laborversuchen der Einfluss einer Temperaturerhöhung um 3 K auf die natürliche Regulation von Blattläusen in Weizen durch die Coccinellidenarten *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* untersucht.

In den Untersuchungen kamen die zwei Temperaturregime 18,7 °C (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C) und 21,7 °C (Tag: 25 °C, Nacht: 15 °C) Tagesmitteltemperatur zum Einsatz. Die kühlere Temperaturstufe entspricht dabei der normalen durchschnittlichen Tagesmitteltemperatur Ende Juni, dem für einen Blattlausbefall von Getreidepflanzen in unserer Region relevanten Zeitraum. Die höhere Temperaturstufe entspricht demzufolge besagtem Temperaturanstieg um 3 K. Erfasst und ausgewertet wurden in einem Klimakammerversuch die Effekte der Coccinelliden auf die Massenvermehrung eines wichtigen Getreideschädling, der Großen Getreideblattlaus (*Sitobion avenae*), an Weizenpflanzen und in einem Klimakammer-Laborversuch biologische Parameter (Entwicklungszeiten, Mortalitäten, Fraßleistungen und Gewichte) der Coccinelliden.

Die Auswertung ergab für keine der beiden Arten eine eindeutige Begünstigung im um 3 K wärmeren Temperaturregime. Allerdings war der Effekt auf die Massenermehrung der Blattläuse durch beide Arten beachtlich. Anhand der näheren Untersuchung zu den unterschiedlichen Reaktionen der beiden Coccinellidenarten auf die besagte Temperaturerhöhung konnten teilweise erhebliche Unterschiede bei ihren biologischen Parametern, z.B. bei absoluter Fraßleistung und Gewicht, ermittelt werden.

Zur Beurteilung wie sich diese festgestellten Unterschiede auf die Etablierung von *Harmonia axyridis* in Getreide, eine mögliche Verdrängung einheimischer Arten wie *Coccinella septempunctata* und letztendlich die natürliche Regulation von Blattläusen in Getreide langfristig auswirken werden, sind weitere Untersuchungen zur Überprüfung und Ergänzung der gewonnenen Ergebnisse unerlässlich.

Stichwörter: Siebenpunkt-Marienkäfer (*Coccinella septempunctata*), Asiatischer Marienkäfer (*Harmonia axyridis*), Große Getreideblattlaus (*Sitobion avenae*), natürliche Regulation, Temperaturerhöhung

Abstract

This study investigates the impact of a 3 K temperature increase on the predatory effect of the coccinellids *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* on aphids by means of climate chamber and laboratory experiments.

Two temperature systems were used in the investigation, 18,7 °C (day: 22 °C, night: 12 °C) and 21,7 °C (day: 25 °C, night: 15 °C) average daily temperature (65.66 °F and 71.06 °F). The lower temperature corresponds to the normal average daily temperature at the end of June, the time period that is most relevant for aphid infestation of wheat plants in our region. The higher temperature is the result of the 3 K temperature increase.

In a climate chamber experiment the coccinellids' impact on the mass reproduction of the grain aphid (*Sitobion avenae*), an important pest in wheat, and in a laboratory experiment their biological parameters (development rate, mortality, feeding activity and weight) were also recorded and evaluated.

The analysis showed that a temperature increase of 3 K did not provide either species with a distinct advantage. The impact of the coccinellids on the outbreak of the aphids, however, was considerable. A closer examination of the two species' reactions to the temperature increase allowed significant differences, in part, to be identified in their biological parameters, such as absolute feeding activity and weight.

Further analyses and supplementation of the obtained knowledge are required in order to assess the long-term effects of the determined differences on the establishment of *Harmonia axyridis* in grain, on the possible displacement of native species such as *Coccinella septempunctata* and on the natural regulation of aphids in grain.

Keywords: Seven-spot ladybird or ladybug (*Coccinella septempunctata*), Asian lady beetle or Harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*), Grain aphid (*Sitobion avenae*), natural regulation, temperature increase

Einleitung

Zum Thema der natürlichen Regulation von Schädlingen durch Coccinelliden in Kulturpflanzen wurden in den letzten Jahrzehnten intensive wissenschaftliche Studien durchgeführt. Coccinelliden als Antagonisten von Blattläusen (Aphiden) standen dabei sehr häufig im Fokus der Betrachtungen. Blattläuse sind in Getreidebeständen wichtige Schaderreger und können unter anderem durch Assimilateentzug die Erträge der Getreidebestände empfindlich mindern. Die unterschiedlichen Ansprüche an die Temperatur zwischen Coccinelliden und Aphiden und das unterschiedliche Vermehrungspotential bewirken einen wesentlichen Einfluss auf den Umfang der natürlichen Regulation.

Verschiedenste Arbeiten setzten sich mit der objektiven Einschätzung des regulativen Effektes dieser Prädatoren auf Getreideblattläuse auseinander (z.B. Brown (2008); Freier et al. (2007); Hemptinne & Dixon (1991); Wetzel et al. (1987)). Es wurden Untersuchungen zu populationsdynamischen Prozessen und biologischen Parametern verschiedenster Coccinellidenarten, auch unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen, durchgeführt (z.B. Triltsch (1996); Obrycki & Tauber (1981); Hodek (1958)). Unter dem Aspekt des Klimawandels und der Einwanderung neuer Coccinellidenarten wächst das Interesse an Erkenntnissen über mögliche Konsequenzen bezüglich der natürlichen Regulation von Aphiden durch Coccinelliden sowie an den Auswirkungen auf einheimische Arten (z.B. *Coccinella septempunctata* und *Propylea quatuordecimpunctata*) unter dem Gesichtspunkt einer Etablierung neuer Arten wie *Harmonia axyridis*.

Trotz des bereits enormen Erkenntnisstandes gestaltet sich die Einschätzung des Effektes der Coccinelliden als schwierig. Vor allem vergleichende Studien zwischen o.g. einheimischen und sich neu etablierenden Arten unter dem Gesichtspunkt in Deutschland realistischer Temperaturen wurden in den letzten Jahren im Institut für Strategien und Folgeabschätzungen im Pflanzenschutz des Julius Kühn-Institutes in Kleinmachnow durchgeführt. Über einige Ergebnisse aus diesem Projekt soll im folgenden Beitrag berichtet werden.

Material und Methoden

Im Rahmen eines mehrjährigen Projektes der BBA in Kleinmachnow fanden bereits in den 90er Jahren Freiland-, Klimakammer und Laborversuche zur Untersuchung des Effektes von hauptsächlich *C. septempunctata* statt. In den letzten Jahren wurden vermehrt vergleichende Untersuchungen zwischen den Coccinellidenarten *C. septempunctata* und *H. axyridis* durchgeführt. Dazu erfolgten Klimakammer- und Klimakammer-Laboruntersuchungen die besondere Aspekte des tritrophischen Systems Weizen – Blattläuse – Marienkäfer aufgriffen.

In vorliegender Klimakammerstudie kamen die zwei Temperaturstufen 18,7 °C (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C) und 21,7 °C (Tag: 25 °C, Nacht: 15 °C) und zusätzlicher Trockenstress zum Einsatz. Die Temperaturen wurden mit Hilfe eines Tag-Nacht-Regimes aus unterschiedlichen Temperaturen realisiert, das die o.g. Tagesmittelwerte ergeben hat. Sie wurden in Abstimmung mit dem Potsdam-Institut für Klimafolgenforschung festgelegt und stellen die derzeitige durchschnittliche Tagesmitteltemperatur Ende Juni (in Brandenburg) und den besagten Temperaturanstieg um 3 K dar. Der Versuch bestand aus 4 Varianten pro Temperaturregime und jeweils 8 Wiederholungen. Zunächst wurden für diese Untersuchung Weizenpflanzen vorgezogen und zu jeweils 18 Pflanzen in ein Versuchsgefäß gesetzt. Wegen ihrer besonders trockenresistenten Eigenschaften wurde die Winterweizensorte Capo gewählt. Diese Weizenpflanzen wurden entweder nur mit Blattläusen, mit Blattläusen und *in*em *C. septempunctata* pro Versuchsgefäß oder mit Blattläusen und einem *H. axyridis* pro Versuchsgefäß besetzt. Eine zusätzliche befallsfreie Kontrolle diente zur Überprüfung der Ontogenese des Weizens. In siebentägigem Rhythmus wurden die entsprechenden Blattlausdichten bonitiert.

Im ergänzend durchgeführten Klimakammer-Laborexperiment wurden jeweils 30 Eier der beiden o.g. Coccinellidenarten einzeln in Versuchsgefäßen angesetzt und ebenfalls den beiden Temperaturregimen 18,7 °C (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C) und 21,7 °C (Tag: 25 °C, Nacht: 15 °C) ausgesetzt. Der Versuch bestand also aus 4 Varianten zu jeweils 30 Wiederholungen. Die heranwachsenden Tiere wurden täglich mit Großen Getreideblattläusen (*Sitobion avenae*) und Wasser versorgt und die Entwicklung bis zum adulten Tier beobachtet. Im Zeitraum der Beobachtungen erfolgten Fraß- (Imagines), Mortalitäts- und Gewichtserfassungen (Larvenstadium 4 und Imagines). Zusätzlich wurde die Entwicklungsdauer in den einzelnen Stadien festgehalten.

Beide Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Moll (JKI, Kleinmachnow) mit dem Programm SAS 9.1 statistisch ausgewertet (z.B. Varianzanalyse, t-Test, Tukey-Test, Regressionsanalyse und Kontingenztafel Analyse). Im Folgenden sollen einige dieser gewonnenen Ergebnisse vorgestellt werden.

Ergebnisse und Diskussion

1. Klimakammerversuch

Blattlausdichten: In Bezug auf die Blattlausdichten der Varianten im Klimakammerversuch konnte ein beachtlicher Effekt beider Marienkäfer in beiden Temperaturstufen (18,7 °C und 21,7 °C) auf die Massenvermehrung der Großen Getreideblattläuse an Weizen verzeichnet werden. Die Reduzierung der maximalen Blattlausdichten durch die Coccinelliden lag im Vergleich zu den maximalen Blattlausdichten der reinen Blattlausvariante zwischen 38,2% (*H.axyridis* bei 21,7 °C) und 52,7 % (*C.septempunctata* bei 18,7 °C). Die Unterschiede zwischen den maximalen Blattlausdichten der Varianten mit Coccinelliden und der reinen Blattlausvariante waren allerdings nur im Temperaturregime 21,7 °C signifikant ($p=0,05$).

Die Unterschiede in den Effekten der beiden Arten *C. septempunctata* und *H. axyridis* auf die Massenvermehrung der Blattläuse fielen in beiden Temperaturstufen hingegen deutlich geringer aus. Auch der Einfluss der Temperaturerhöhung um 3 K zeigte nur geringfügige Auswirkungen auf die Unterschiede zwischen den Coccinellidenarten. Die Vermehrung der Blattläuse verlief in beiden Temperaturregimen im Verlauf der Bonituren nahezu gleich, obwohl das Temperaturoptimum der Großen Getreideblattlaus bei ca. 22 °C (Triltsch 1996) angegeben wird. Der zusätzlich induzierte Trockenstress scheint auf das Vermehrungspotential der Aphiden, die als Assimilatesauger an den Weizenpflanzen vorkommen, hemmend zu wirken. So konnte das Potential für erhöhte Vermehrungsraten durch Temperaturen nahe dem Optimum nicht ausgenutzt werden. Der Effekt der Coccinelliden auf die Massenvermehrung der Blattläuse war sehr beachtlich, obwohl die beiden verwendeten Temperaturregime noch nicht dem Optimum der Coccinelliden entsprachen. Diese liegen für *C. septempunctata* nach Triltsch (1996) bei ca. 25 °C und für *H. axyridis* nach Yuan et al. (1994) bei ca. 23–25 °C. Eine Überlegenheit in den Effekten auf die Massenvermehrung der Aphiden konnte bei keiner der beiden Arten abgeleitet werden.

Erträge: Erwartungsgemäß ordneten sich die Erträge der Weizenpflanzen, die mit Blattläusen und Marienkäfern besetzt wurden, zwischen die reine Blattlausvariante mit den geringsten Erträgen und die Kontrollvariante (ohne Blattlausbefall und ohne Coccinelliden) mit den höchsten Erträgen im Klimakammerversuch ein. Die Schwankungen zwischen den Erträgen der einzelnen Varianten fielen im Temperaturregime 21,7 °C geringer aus als im normalen Temperaturregime 18,7 °C. Auch hier ist höchstwahrscheinlich der zusätzlich erzeugte Trockenstress Ursache dieser Ergebnisse. Innerhalb der beiden mit Blattläusen und Marienkäfern besetzten Varianten und der reinen Blattlausvariante gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Temperaturstufen ($p=0,05$). In der Kontrollvariante zeigten sich dahingegen zwischen den beiden Temperaturstufen signifikante Unterschiede ($p=0,05$). Die Höhe der

mittleren Tausendkorngewichte der Kontrollvariante wies dabei eine Differenz von 6,23 g auf, wobei im 3 K wärmeren Temperaturregime höhere Tausendkorngewichte erzielt wurden. Auch zwischen den Erträgen der mit *C. septempunctata* und *H. axyridis* besetzten Weizenpflanzen konnten in keinem der beiden Temperaturregime signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p=0,05$). Zwischen den indirekten Effekten der beiden Coccinellidenarten (durch Minderung Blattlausdichte) auf die Erträge der Versuchspflanzen konnten folglich auch hier in keinem Temperaturregime deutlichen Unterschiede ermittelt werden.

2. Klimakammer-Laborversuch

Entwicklungszeiten: Die Erfassung der Entwicklungszeiten beider Coccinellidenarten unter dem Einfluss der beiden unterschiedlichen Temperaturregime 18,7 °C (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C) und 21,7 °C (Tag: 25 °C, Nacht: 15 °C) ergab für beide Arten im 3 K wärmeren Regime etwa 5 bis 6 Tage kürzer andauernde Entwicklungszeiten. Die Unterschiede zwischen den beiden Arten *C. septempunctata* und *H. axyridis* innerhalb des jeweiligen Temperaturregimes waren nur gering und nicht signifikant ($p=0,05$).

Fraßleistungen: In der vorliegenden Klimakammer-Laborstudie konnte die absolute Fraßleistung der Coccinelliden über eine Dauer von 24 h unter dem Einfluss der beiden o.g. Temperaturstufen erfasst werden. Nach der Auszählung der nach 24 h verbleibenden Menge an Blattläusen (*Sitobion avenae*) ergaben sich für beide Coccinellidenarten in 21,7 °C signifikant höhere Fraßleistungen. Bei *H. axyridis* lagen diese im Mittel bei 130 Blattläusen und bei *C. septempunctata* im Mittel bei 161 vertilgten Blattläusen innerhalb von 24 h. Beide Arten wiesen im 3 K wärmeren Temperaturregime signifikant höhere Fraßleistungen auf ($p=0,05$), was im Zusammenhang mit steigenden Stoffwechselfvorgängen und deshalb steigendem Energiebedarf steht. Der relative Anstieg der Fraßleistung bei zunehmender Temperatur belief sich bei *H. axyridis* auf 29% und bei *C. septempunctata* auf 33%. Ebenfalls konnte in beiden Regimen eine signifikant höhere Fraßleistung des einheimischen *C. septempunctata* gegenüber der des *H. axyridis* ermittelt werden ($p=0,05$). Zu beachten ist hier, dass es sich um Laborbedingungen handelte und somit die Fraßleistung deutlich über der im Freiland realisierbaren liegt. Diese tendiert, je nach Blattlausdichte im Bestand und Aphidenart, nach Freier & Schläge (2006) zwischen 10 und 30 Blattläusen pro Tag.

Setzt man die ermittelten Gewichte ins Verhältnis zu den erbrachten Fraßleistungen, kann man feststellen, dass im kühleren Klimaregime die Fraßleistung pro mg Körpergewicht bei *H. axyridis* (etwa 4,07 Blattläuse) überraschenderweise deutlich über der des *C. septempunctata* (etwa 3,12 Blattläuse) lag (Abbildung 1). Im Temperaturregime 18,7 °C zeigte sich *H. axyridis* also gegenüber *C. septempunctata* als „Vielfraß“. Im um 3 K wärmeren Klimaregime waren die Fraßleistung pro mg Körpergewicht mit 4,50 Blattläusen (*H. axyridis*) und 4,67 Blattläusen (*C. septempunctata*) nahezu gleich. *C. septempunctata* hat also, wie in Abbildung 1 ersichtlich, im Rahmen des Temperaturanstieges um 3 K deutlich höhere Zunahmen (+ 1,55 Blattläuse) der Fraßleistung pro mg Körpergewicht als *H. axyridis* (+ 0,43 Blattläuse). Allerdings zeigte *C. septempunctata* geringere Imaginalgewichte im 3 K wärmeren Temperaturregime und *H. axyridis* höhere Imaginalgewichte in diesem Regime. Daraus lässt sich eine bessere Umsetzbarkeit der aus der Nahrung (Blattläuse) gewonnenen Energie, trotz gestiegener Aktivität und erhöhtem Stoffwechsel, durch *H. axyridis* vermuten.

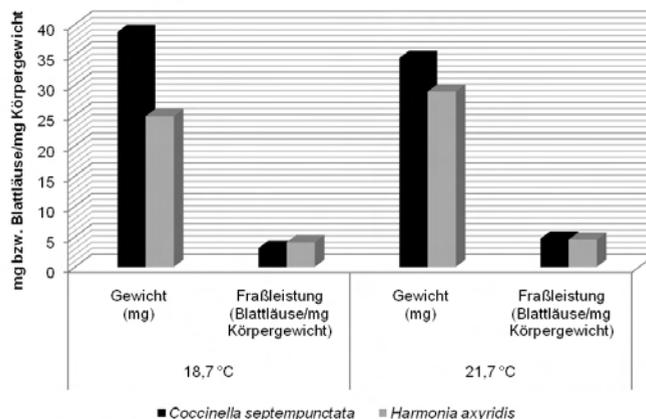


Abb. 1 Gewicht (mg) und Fraßleistung pro mg Körpergewicht der beiden Coccinellidenarten *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* im Klimakammer-Laborversuch 2008 bei 18,7 °C (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C) und 21,7 °C (Tag: 25 °C, Nacht: 15 °C) (n=4)

Mortalitäten: In der Literatur wird häufig von hohen Mortalitäten bei Coccinelliden berichtet (Iperti 1991; Frazer 1988). Dies ließ sich anhand der durchgeführten Untersuchungen bestätigen. Die maximale Sterblichkeit hat im Klimakammer-Laborversuch *H. axyridis* unter dem Einfluss des normalen Temperaturregimes 18,7 °C aufgewiesen (83%). Die höchsten Mortalitäten beider Arten wurden im Eistadium der Entwicklung verzeichnet und nahmen sukzessive im Laufe der Entwicklung zum adulten Tier hin ab. Ein im Anschluss ausschließlich mit *H. axyridis* durchgeführter Versuch, in dem ebenfalls eine Erfassung der Gesamtmortalität stattgefunden hat, konnte diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Hier zeigte sich vielmehr ein entgegengesetztes Bild und höhere Mortalität bei *H. axyridis* im 3 K wärmeren Regime. Um klare Schlussfolgerungen zum Einfluss der Mortalität auf die Konkurrenzfähigkeit der Coccinelliden ziehen zu können, sind weitere Untersuchungen hierzu unerlässlich.

Dass die beiden Coccinellidenarten *C. septempunctata* und *H. axyridis* einen beachtlichen Effekt auf die Massenvermehrung der Großen Getreideblattlaus (*Sitobion avenae*) haben können, konnte durch diese Untersuchungen bestätigt werden. Die Vermutung, dass *H. axyridis* dabei von einem prognostizierten Temperaturanstieg um 3 K profitieren würde, konnte nicht bestätigt werden.

Um eindeutige Aussagen zu möglichen langfristigen Konsequenzen der Etablierung dieser neuen Art treffen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen zur Ergänzung und Überprüfung der in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse unbedingt notwendig. Die Anwendung von Simulationsmodellen wie z.B. dem Modell GETLAUS 01 (Simulation Populationsentwicklung Blattläuse) können dabei sehr hilfreich sein.

Literatur

- Brown P.M.J.; Adriaens T.; Bathon, H.; Cuppen, J.; Goldarazena, A.; Hägg, T., Kenis, M.; Klausnitzer, B.E.M.; Kovar, I.; Loomans, A.J.M.; Majerus, M.E.N.; Nedved, O.; Pedersen, J.; Rabitsch, W.; Roy, H.E.; Ternois, V.; Zakharov, A. & Roy, D.B. (2008): *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl* **53**, 5-21.
- Frazer, B.D. (1988): Coccinellidae. In: MINKS, A.K. & HARREWIJN, P. (ed), *Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control*, Volume B. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 231-247.
- Freier, B. & Schlage, B. (2006): Workshop „Alternativen zum chemischen Pflanzenschutz im Ackerbau“ 23.-24. November 2005. Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft **132**, 1- 77.
- Freier B.; Triltsch, H.; Möwes, M. & Moll, E. (2007): The potential of predators in natural control of aphids in wheat: Results of a ten-year field study in two german landscapes. *BioControl* **52**, 775-788.
- Hemptinne, J.-L. & Dixon, A.F.G (1991): Why ladybirds have generally been so ineffective in biological control? In: POLGAR, L.; CHAMBERS; R.J.; DIXON; A.F.G. & HODEK, I. (ed): *Behaviour and impact of Aphidophaga*. SPB Academic Publishing, The Hague, 149-157.
- Hodek, I. (1958): Influence of temperature, relative humidity and photoperiodicity on the speed of development of *Coccinella septempunctata* L. *Acta Societatis Entomologicae Cechosloveniae* **55**, 121-141.
- Iperti, G. (1991): Abiotic and biotic factors influencing distribution of aphidophagous Coccinellidae. In: POLGAR, L.; CHAMBERS, R. J.; DIXON, A. F. G. & HODEK, I. (ed): *Behaviour and impact of aphidophaga*. SPB Academic Publishing, The Hague, 163 – 166.
- Obyrcki, J.J. & Tauber M.J. (1981): Phenology of three coccinellid species: Thermal requirements for development. *Annals of the Entomological Society of America* **74**, 31-36.
- Triltsch, H. (1996): Untersuchungen zum Einfluss abiotischer und biotischer Umweltfaktoren auf den Marienkäfer *Coccinella septempunctata* L. (Col., Coccinellidae) in der Interaktion Winterweizen-Getreideblattlaus-Prädator – Freilandherbungen, Klimakammerversuche und Computersimulationen. Dissertation. Berlin: Humboldt Universität, 119 S.
- Wetzel, T.; Holz, F. & Stark, A. (1987): Bedeutung von Nützlingspopulationen bei der Regulation von Schädlingpopulationen im Getreidebestand. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **39**, 1-7.
- Yuan, R. C.; Zhang, F. M. & Wen, G. Z. (1994): Study on control of soybean aphid by *Harmonia (Leis) axyridis*. *Journal of Jilin Agricultural Sciences* **44**, 30 – 57.

Kontakt: Sandra Krengel, E-Mail: sandra.krengel@web.de

Arntjen, Anja; Jelkmann, Wilhelm

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

Herstellung eines infektiösen Voll-Längen cDNA Klons und Untersuchungen zur Variabilität des *Apple stem pitting virus*

Construction of an infectious full-length cDNA clone and investigations on variability of *Apple stem pitting virus*

Zusammenfassung

Im kommerziellen Apfelanbau entstehen durch latente Infektionen mit RNA Viren Ertragseinbußen um bis zu 60%. *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) und *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) gehören zu den weit verbreitetsten latenten Apfelviren. Sie zeichnen sich durch eine hohe Variabilität und damit verbunden einem großen Symptom- und Wirtsspektrum aus. Infektiöse cDNA Klone von Viren werden u.a. zur Erforschung von Krankheitsaspekten genutzt, da sie es möglich machen eine determinierte Variante des Virus zu untersuchen. An der Erstellung eines infektiösen ASPV cDNA Klons wird mit zwei verschiedenen Strategien gearbeitet. In der ersten Strategie wird die klassische Ligationsstrategie als Grundlage verwendet, während die zweite Strategie auf einer Voll-Längen PCR beruht. Bei der Generierung der Fragmente für die erste Strategie zeigte sich eine hohe Sequenzvariabilität zum Ausgangsisolat. In einem Bereich des Hüllproteins betrug die Sequenzidentität nur noch 77%. Mit Primern an den terminalen Enden des ASPV Genoms gelang eine PCR Amplifikation eines 9.35 kbp Fragments.

Stichwörter: latente Apfelviren, ASPV, ASGV, ACLSV, Voll-Längen cDNA Klon

Abstract

In commercial cultivars the infection with viruses causes yield losses up to 60%. *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) are the three most common latent viruses in apple worldwide. These viruses are highly variable and infect several woody host plants with different symptoms. Infectious cDNA clones provide the opportunity to study pathogenicity and symptomatology of a determined variant of a virus. The generation of an infectious full-length cDNA clone of ASPV is in progress. Two strategies are being followed. The first strategy is based on classical ligation strategy whereas the second strategy is based on a full-length PCR fragment. During the amplification of the fragments for the first strategy high sequence variability was encountered. An analyzed region in the coat protein shows only 77% sequence identity with the original isolate. A 9,35 kbp full-length fragment of the ASPV genome was successfully generated with primers at the 3' and 5' end.

Keywords: latent apple virus, ASPV, ASGV, ACLSV, full-length cDNA clone

Einleitung

Im Apfelanbau treten verschiedene Viren auf, die den Ertrag mindern und damit von ökonomischer Bedeutung sind. Einige Apfelviren sind latent, weshalb sie nur auf wenigen Apfelsorten Symptome hervorrufen. Zu dieser Gruppe gehören das *Apple stem pitting virus* (ASPV), das *Apple stem grooving virus* (ASGV) und das *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Sie wurden früher über Bioindikatoren, deren Symptome gleichzeitig namensgebend für die Krankheiten sind, nachgewiesen. Alle drei Viren sind verantwortlich für eine Reihe von Krankheitssymptomen auf verschiedenen Wirtspflanzen, die dazu geführt haben, dass es Synonyme für die mit ASPV, ASGV und ACLSV assoziierten Krankheiten gibt. Die Ätiologie dieser Krankheiten ist bis heute wenig erforscht.

ASPV ist ein *Foveavirus* und gehört zur Familie der *Flexiviridae* (Adams et al., 2004; Martelli und Jelkmann, 1998). Es besitzt ein lineares ssRNA Genom, das für fünf offene Leserahmen („open reading frame“, ORF) kodiert. Der erste ORF beinhaltet sämtliche Proteine, die für die Replikation des Virus benötigt werden. Der Triple Gene Block (ORF 2 – 4) kodiert Proteine, die für den Transport innerhalb der Pflanze verantwortlich sind. Das Hüllprotein wird von ORF 5 kodiert. Die Wirtspflanzen des ASPV sind Apfel, Birne, Weißdorn und Quitte. Eine Übertragung erfolgt nur durch Veredelung und Wurzelkontakte. Übertragungen durch mechanische Abreibung sind auf *Nicotiana occidentalis* möglich. Als Bioindikatoren werden *Malus pumila* cv. Virginia crab und Spy 227 benutzt, wobei es bei Virginia crab zur namensgebenden Stammnarbung (Abbildung 1) ab der Veredelungsstelle kommt, während Spy 227 einen starken Verfall und Epinastie der Blätter zeigt.



Abb. 1 Stammnarbung durch ASPV hervorgerufen ab der Veredelungsstelle auf *Malus pumila* cv. *Virginia crab*

Die Erforschung der durch Viren hervorgerufenen Krankheiten und die damit verbundene unterschiedliche Symptomausprägung in verschiedenen Wirtspflanzen wird seit langer Zeit mit Hilfe von infektiösen Voll-Längen cDNA Klonen durchgeführt (Stevens und Viganó, 2007). Diese ermöglichen die Untersuchung einer Variante innerhalb der Viruspopulation in der Wirtspflanze und die durch sie hervorgerufenen Krankheitsaspekte. Die Herstellung eines Voll-Längen cDNA Klons beansprucht meistens viel Zeit, da eine aufwendige Ligationsstrategie (Rico und Hernández, 2006) verwendet werden muss. Mit Hilfe des ASPV soll eine neue Technik zur Erstellung von Voll-Längen cDNA Klonen gefunden werden, die sowohl technologisch wie auch in zeitlicher Hinsicht einen Fortschritt bedeutet.

Material und Methoden

ASPV (Isolat PA 66) wurde mit Hilfe von mechanischer Abreibung von Apfel auf *Nicotiana occidentalis* 'Wheeler' 37B übertragen und dieser im Gewächshaus zur Vermehrung von Virusmaterial genutzt. Die Isolierung der Virus RNA aus infizierten Tabakblättern erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) für die Generierung von größeren Fragmenten und mit Hilfe der Silica capture (Menzel et al., 2002) für die Nachweis PCR. Die isolierte Virus RNA wurde mit einer Reversen Transkriptase (Invitrogen) und Random Primer oder Oligo(dT) (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. In der Nachweis PCR wurden die Primer nach Menzel (Menzel et al., 2002) verwendet und das Virusmaterial mit Hilfe der Taq-Polymerase (Invitrogen) amplifiziert. Für die einzelnen Fragmente der Ligationsstrategie wurden die Primer auf der Basis der ASPV-Sequenz D21829 (Jelkmann, 1994) mit Hilfe des Programms Primer Select (Lasergene) entwickelt. Die Fragmente wurden mit der Phusion Hot Start Polymerase (BioCat) amplifiziert, danach „blunt end“ in den Vektor pJet 1.2 (Fermentas) ligiert, in *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

Der Stammbaum wurde mit Hilfe von Clustal X (Larkin et al., 2007) und Mega 4 (Arizona State University) evaluiert.

Ergebnisse

Der infektiöse Voll-Längen cDNA Klon wird über die klassische Ligationsstrategie und über eine Voll-Längen PCR erstellt. Mit Primern an den terminalen Endes des ASPV Genoms wurde ein Voll-Längen PCR Fragment (Abbildung 2) generiert. Auf Grund der Schwierigkeiten mit Versuchen zur „blunt end“ Klonierung wurden Primer mit Restriktionsschnittstellen entwickelt.

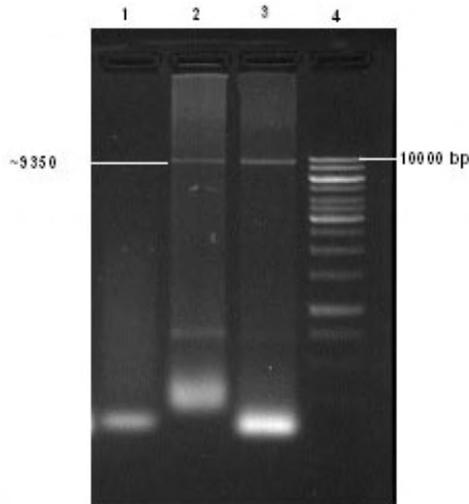


Abb. 2 Gelbild einer Voll-Längen PCR (Spur 1: gesunder Tabak; Spur 2 und 3: ASPV Proben; Spur 4: 1 kb ladder)

Für die klassische Ligationsstrategie wurde das ASPV-Genom in sechs Fragmente unterteilt, wobei die Fragmente am 3'- und am 5'-Ende kleiner sind. Die sechs Fragmente wurden bereits amplifiziert und in einen Vektor ligiert. Durch Restriktionsverdau der erhaltenen Fragmente konnte ein Verlust von Restriktionsschnittstellen gezeigt werden, weshalb die Fragmente sequenziert wurden. Die sequenzierten Genomabschnitte des ASPV zeigten hohe Variabilität zur Ausgangssequenz. Eine vollständige Sequenzierung des ASPV-Genotyps ist noch nicht abgeschlossen.

Auf Grund der existierenden Datenlage von verschiedenen ASPV-Isolaten wurde ein phylogenetischer Stammbaum (Abbildung 3) mit einer ungefähr 400 bp langen Sequenz innerhalb des Hüllproteins durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Sequenz vom Genotyp PA 1 66 in diesem Bereich nur noch 77% Identität zum Ausgangsisolat PA 66 hat, während das Ausgangsisolat zum Beispiel 99% Sequenzidentität mit einem Isolat aus Birne, das „Pear vein yellows“ Symptome hervorruft, hatte.

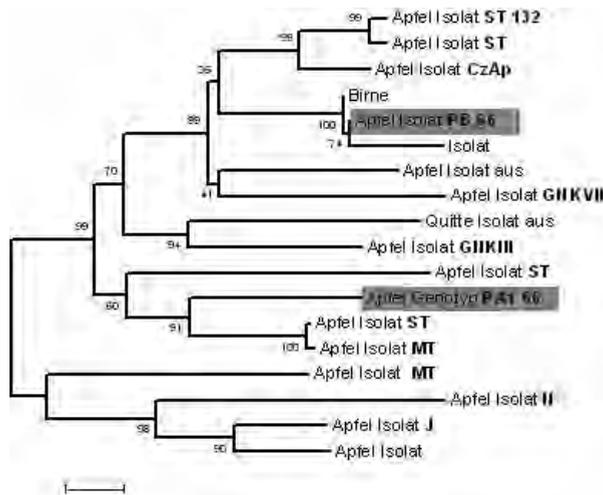


Abb. 3 Phylogenetischer Stammbaum von ASPV-Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen auf der Grundlage einer ungefähr 400 bp langen Sequenz innerhalb des Hüllproteins (Ausgangsisolat PA 66, neuer Genotyp PA 1 66 grau hinterlegt).

Diskussion

Bei Pflanzenviren findet man häufig eine hohe Variabilität zwischen den Isolaten aus unterschiedlichen Herkünften bzw. verschiedenen Genotypen innerhalb einer Pflanze. Diese werden als Quasispecies (Eigen und Schuster, 1978) bezeichnet. Sie gehen auf die hohen Mutationsraten der viralen RNA Genome zurück, wobei sich verschiedene Genotypen gemäß ihrer evolutionären Fitness parallel entwickeln können. Während der Amplifikation der Fragmente für die klassische Ligationsstrategie und beim Verdau der erhaltenen Fragmente konnte festgestellt werden, dass das Isolat eine hohe Variabilität zur Ausgangssequenz aufwies, welche sich nach der Sequenzierung der Teilstücke bestätigte und zu einer Anpassung der ersten Strategie führte.

Die beiden Genotypen hatten in dem für den phylogenetischen Stammbaum verwendeten Bereich nur noch eine Sequenzidentität von 77%, während das Isolat PA 66 mit einem Isolat aus Birne 99% Sequenzidentität aufwies. Auch die anderen bereits sequenzierten Bereiche zeigten hohe Variabilität innerhalb der Sequenz. Diese hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Virusisolaten trat ebenfalls bei den beiden anderen latenten Apfelnviren ASGV (Magome et al., 1997) und ACLSV (Adams et al., 2004) auf.

Die hohe Variabilität dieser Viren erschwert die zuverlässige Detektion, da man nicht sicher sein kann, dass alle Varianten mit den von Menzel (Menzel et al., 2002) entwickelten Primern nachgewiesen werden können. Die Möglichkeit Voll-Längen PCR Fragmente zu generieren umgeht das Problem der hohen Variabilität innerhalb der Sequenz, da das 3'- und 5'-Ende konservierter sind.

Für die Amplifikation eines sehr großen DNA Fragmentes werden spezielle Polymerasen benötigt, die zusätzlich noch eine „Proofreading“-Funktion haben sollten. Die in dieser Arbeit verwendete Polymerase erzeugte „blunt end“- Fragmente, deren Ligation in einen Vektor, zusätzlich zur Schwierigkeit durch die Größe, erschwert wurde. Die Möglichkeit Voll-Längen cDNA Klone durch eine PCR und einen Ligationsschritt zu generieren stellt eine innovative Technik dar, die insbesondere bei vorliegenden Variabilitätsproblemen Vorteile bietet.

Literatur

- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G., Fauquet, C.M., 2004: The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* **149**, 1045-1060.
- Eigen, M., Schuster, P., 1978: The Hypercycle: A principle of natural self-organization. *Naturwissenschaften* **65**, 7-41.
- Jelkmann, W., 1994: Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *Journal of General Virology* **75** (7), 1535-1542.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Miyakawa, T., 1997: Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* **87** (4), 389-396.
- Martelli, G.P., Jelkmann, W., 1998: *Foveavirus*, a new plant virus genus. *Archives of Virology* **143** (6), 1245-1249.
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E., 2002: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* **99** (1-2), 81-92.
- Rico, P., Hernández, C., 2006: Infectivity of *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *Journal of Plant Pathology* **88** (1), 103-106.
- Stevens, M., Viganó, F., 2007: Production of a full-length infectious GFP-tagged cDNA clone of *Beet mild yellowing virus* for the study of plant-polerovirus interaction. *Virus Genes* **34**, 215-221

Kontakt: Anja Arntjen, E-Mail: anja.arntjen@jki.bund.de

Gehring, Isabel¹, Rausch, Thomas¹; Geider, Klaus²

¹Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften; ²Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

Identifizierung und Differenzierung von *Erwinia amylovora* und epiphytischer Erwinien mit PCR Methoden

Identification and differentiation of *Erwinia amylovora* and epiphytic bacteria by PCR methods

Zusammenfassung

Epiphytische Erwinien wurden als Antagonisten gegen *Erwinia amylovora* in Labor- und Freilandversuchen eingesetzt. *Erwinia billingiae* und *Erwinia tasmaniensis* zeigten Wirkungsgrade über 80% in Laborversuchen, zu denen Blüten- und Birnentests gehörten. Um Populationsstudien im Freiland durchzuführen wurden spezifische Primer für Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in „house keeping“ Genen, wie z.B. *recA* und *gpd*, kreiert. Mit Hilfe dieser Primer können acht Erwinien Arten differenziert werden. Für die quantitative Verteilung der Erwinien im Pflanzengewebe wurden diese Primer für eine RealTime PCR Analyse verwendet und Mischkulturen aus Dossenheim und Kärnten (Österreich) mit dieser Methode untersucht.

Stichwörter: Feuerbrand, Differenzierung von Bakterien, „house keeping“ Gene, SNPs

Abstract

Epiphytic bacteria can be used as antagonists against *Erwinia amylovora*. In laboratory tests with flowers and pearslices *E. billingiae* and *E. tasmaniensis* showed pathogen suppression. A specific PCR method was created to differentiate epiphytic *Erwinia* species. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in house keeping genes such as *recA* and *gpd* were used to design specific primers for population studies in the field. To determine their distribution in plant tissue these primers were used to differentiate eight *Erwinia* species by RealTime PCR. Mixed cultures from Dossenheim and Carinthia (Austria) were analysed with this method.

key words: fire blight, differentiation of bacteria, house keeping genes, SNPs

Einleitung

Das gram-negative Bakterium *Erwinia amylovora* verursacht bei Rosaceen Feuerbrand. Zu den Wirtspflanzen dieser Krankheit gehören wirtschaftlich wichtige Kernobstarten, wie z.B. Apfel, Birne und Quitte aber auch Ziergehölze, wie z.B. Cotoneaster. Das Bakterium *Erwinia amylovora* dringt vorwiegend über die Blüten in die Pflanzen ein und breitet sich dort aus (Vanneste, 2000). Zu den typischen Symptomen gehören neben verbräunten Blüten auch Schleimtropfen und Verformungen von Trieben (Abbildung 1). Der Schleimtropfen enthält ein Exopolysaccharid (EPS), Wasser und Bakterien.



Abb. 1 Symptome: A: infizierter Blütenstand mit Schleimtropfen (Pfeil); B: Verformung des Triebes; Hirtenstab

Das EPS, Amyloran, wird vom Bakterium produziert und in die Umgebung abgegeben (Belleman et al., 1994). Die in diesem Schleimtropfen vorhandenen Bakterien werden unter anderem durch Insekten in Blüten gebracht. Als Hirtenstab bezeichnet man einen jungen Trieb mit für Feuerbrand typischen Welkesymptomen, die auf die Ausbreitung von *E. amylovora* im Pflanzenmaterial zurückzuführen sind.

Die Hauptinfektionszeit für Feuerbrand ist während der Blüte; die Tagestemperatur und der Niederschlag spielen eine entscheidende Rolle für den Infektionsdruck.

Die Gattung der Erwinien (Abbildung 2) enthält epiphytische, apathogene Bakterien, die als Antagonisten eingesetzt werden könnten. Zu diesen epiphytischen Bakterien gehören unter anderem *E. billingiae*, *E. tasmaniensis*, *E. persicina* und *E. rhapontici*. Die Typstämme von *E. billingiae* (Eb661) und *E. tasmaniensis* (Et1/99) wurden sequenziert (Kube et al., 2008).

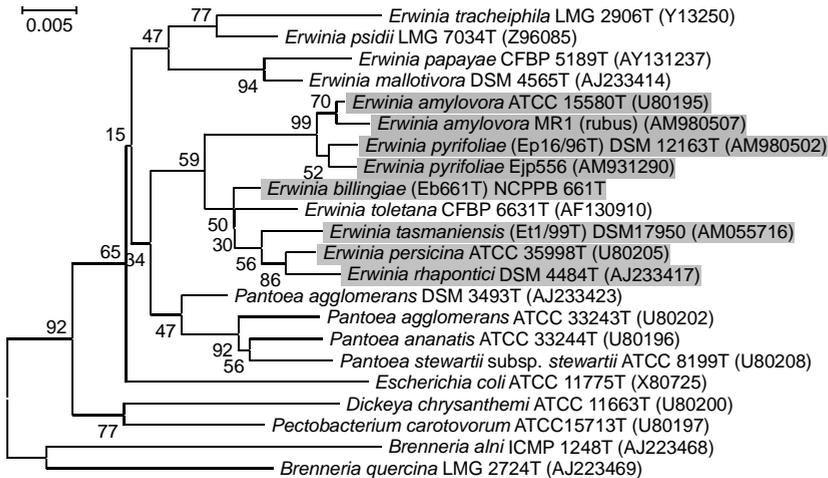


Abb. 2 Der Stammbaum aus 16S rRNA Sequenzen zeigt die Gattung *Erwinia* und nah verwandte Arten. Hervorgehoben sind die Pathogene *E. amylovora* und *E. pyrifoliae* sowie die bereits erwähnten epiphytischen Arten *E. billingiae*, *E. tasmaniensis*, *E. persicina* und *E. rhapontici*

Die Epiphyten wurden im Labor und Freiland auf ihre Wirkung gegen *E. amylovora* getestet. Die Wirkung basiert auf der Besiedelung der Blüte, wodurch das Pathogen in seiner Vermehrung behindert wird. Erst ab einer höheren Zelldichte verursacht *E. amylovora* Symptome. Während der Blütezeit konnten vom Versuchsfeld in Dossenheim von symptomfreien Blüten die Epiphyten *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. rhapontici* und *E. tasmaniensis* isoliert werden. Dies zeigt, dass die Epiphyten in Deutschland auf Apfelblüten vorkommen.

Für eine Identifizierung und Differenzierung der Erwinien, die auch Populations-untersuchungen ermöglicht, sollte eine schnelle Methode entwickelt werden, die direkt für Misch-kulturen anwendbar ist. Bakterien einer Gattung unterscheiden sich auf Genomebene und können über „house keeping“ Gene differenziert werden. Die „house keeping“ Gene *recA* (Rekombinase A) und *gpd* (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; Brown et al., 2000) wurden für acht Erwinien Arten untersucht und charakteristische Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) für die einzelnen Arten gefunden. Diese Sequenzunterschiede wurden für spezifische Primer genutzt und es wurde eine PCR Methode entwickelt, um damit die acht Erwinien Arten auch in Mischkulturen zu identifizieren. MALDI TOF ist eine weitere Methode zur Identifizierung von Erwinien. Bei dieser Methode werden Spektren analysiert, deren Signale kleine Proteine aus ganzen Zellen darstellen. Jede Erwinien Art verursacht ein spezifisches Muster. Mit Hilfe von Computeranalysen können Isolate durch Vergleich dieser Muster zugeordnet und somit auch Stammbäume erstellt werden (Sauer et al., 2008).

Eine weitere Methode zur Differenzierung von Stämmen einiger Erwinien ist RFLP (restriction fragment length polymorphism) durch PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) Analyse (Jock et. al, 2002; Zhang und Geider, 1997). Es wurden auch „house keeping“ Gene amplifiziert und anschließend mit bestimmten Restriktions-enzymen verdaut. Eine Zuordnung in bestimmte Gruppen erfolgte durch die entstandenen Bandenmuster (Waleron et al., 2008).

Material und Methoden

Für die Birnentests wurden unreife Birnen in etwa 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Übernachtskulturen der Epiphyten wurden auf 10^8 CFU eingestellt und die Birnenscheiben für 10 min in diese Bakteriensuspension getränkt. Die Birnenscheiben wurden dann in Petrischalen unter der Sterilbank getrocknet und anschließend mit 500 CFU *E. amylovora* Sm (Streptomycin resistente Mutante des Stamms Ea1/79; EaSm) infiziert. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 5 Tage oder länger bei 28 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Birnenscheiben nur mit EaSm bzw. nur mit den Epiphyten inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die durch EaSm hervorgerufene Verbräunung der Birnenscheiben und der Schleimproduktion.

Für die Blütentests wurden Apfelbäume aus der Kühlkammer im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Es wurden einzelne Blüten in mit Wasser gefüllte 2 ml Eppendorfgläser gestellt. Die Blüten wurden mit einer Bakteriensuspension (10^8 CFU) der Epiphyten besprüht. Anschließend wurden die Blüten getrocknet und mit EaSm (5000 CFU) direkt auf den Stempel infiziert. Als Positivkontrolle wurden die Blüten mit Wasser besprüht und mit EaSm (5000 CFU) infiziert. Die Blüten wurden für 5 Tage bei 28 °C und einem Kunstlicht inkubiert. Dann wurden die Bakterien aus der Blüte extrahiert und in einer Verdünnung von 10^{-4} auf Standard I Platten mit Streptomycin plattiert. Nach 2 Tagen bei 28 °C wurden die EaSm Kolonien ausgezählt.

Ergebnisse

Labor- und Freilandversuche: Die Behandlung mit epiphytischen Erwinien, vor allem *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* führte bei den Birnentests zu einer deutlichen Reduktion der Symptome. Auf den Birnenscheiben war fast keine Schleimbildung mehr zu sehen und auch die Verfärbung der Oberflächen wurde reduziert. Die Behandlung mit den Epiphyten führte in der Kontrolle zu keiner Verbräunung der Birnen bzw. Schleimbildung.

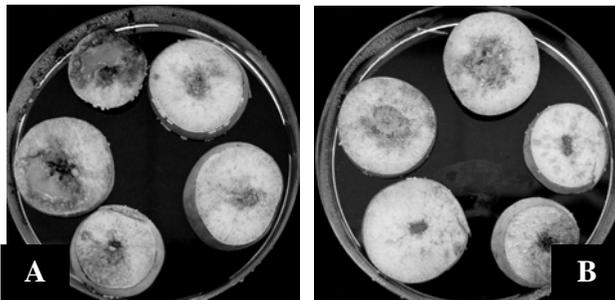


Abb. 3 Ergebnis Birnentest Eb661: A: Positivkontrolle auf der linken Seite, nicht infizierte Birnenscheiben auf der rechten Seite; B: vor Infektion mit EaSm wurden die Birnenscheiben mit *E. billingiae* behandelt

Bei Blütentests führten die Epiphyten zu einer deutlichen Reduktion der EaSm Kolonien. Vor allem die beiden Epiphyten *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* zeigten eine deutliche Reduktion der reisolierten EaSm-Zellen.

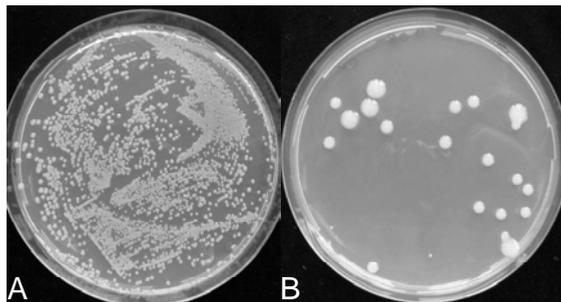


Abb. 4 Ergebnis Blütentest Et1/99: A: Kontrolle, Blüten vor Infektion mit EaSm mit Wasser behandelt; B: Blüten vor Infektion mit EaSm mit *E. tasmaniensis* behandelt

Die guten Wirkungsgrade bei der Verringerung der Symptome für *E. tasmaniensis* konnten auch in den Freilandversuchen in der Feuerbrand-Versuchsanlage Kirschgartshausen bestätigt werden. *E. tasmaniensis* hatte 2007 einen Wirkungsgrad von 63%, 2008 von 68%. Im Gegensatz hierzu hatte *E. billingiae* im Freiland 2007 nur einen Wirkungsgrad von 28% und 2008 von 31%. Während des Versuches wurden Blütenproben entnommen und mit der PCR Methode ausgewertet. *E. tasmaniensis* konnte bis zu 2 Wochen nach Start des Experiments nachgewiesen werden, jedoch nicht *E. billingiae*.

Differenzierung von Erwinien: Während der Blütezeit sollten Populationsstudien durchgeführt werden. Hierfür wurde eine PCR Methode entwickelt deren Spezifität auf Sequenzabweichungen (SNPs) basiert. Die zwischen den Arten vorhandenen SNPs innerhalb der Sequenz der Gene *recA* bzw. *gpd* wurden als letzte Base der Primer festgelegt. Diese Base der jeweiligen Primer (forward und reverse) ist für eine Art spezifisch. Die übereinstimmende bzw. nichtübereinstimmende Base am 3' Ende der Primer führt bei hoher Temperatur zum Binden bzw. Nicht-Binden der Primer. Der Sequenzunterschied von einer Base ist bei hoher Annealing-Temperatur ausreichend, um die Arten zu unterscheiden. Diese spezifischen Primer wurden für die Pathogene *E. amylovora* und *E. pyrifoliae* sowie für die Epiphyten *E. billingiae*, *E. tasmaniensis*, *E. persicina*, *E. rhapontici*, *E. psidii* und *E. mallotivora* kreiert und auf ihre Spezifität innerhalb dieser Erwinien Arten getestet. Die PCR Methode wurde auch bei Mischkulturen angewandt. Hierbei wurden Kulturen aus nekrotischem Holz oder aus Blütenständen direkt als DNA Template für die PCR eingesetzt. Dies ermöglichte eine schnelle Untersuchung von Proben und eine Populationsuntersuchung von Blüten. Mittels dieser PCR Methode wurden auch Feuerbrandproben aus Kärnten untersucht. Hierbei konnte nicht nur *E. amylovora*, sondern auch die Epiphyten nachgewiesen werden. Bei der Analyse von Mischkulturen von Apfelblüten aus der Anlage in Dossenheim konnten die Epiphyten (*E. billingiae*, *E. tasmaniensis*, *E. persicina* und *E. rhapontici*) mittels PCR nachgewiesen und anschließend aus den Proben isoliert werden.

Zum Differenzieren von Stämmen wurden für die Epiphyten auch Sequenzuntersuchungen des *wbdN* Gens und der *lsc* Region durchgeführt.

Diskussion

Epiphytische Erwinien zeigten in Labortests sehr gute Wirkungsgrade gegenüber der Vermehrung von *E. amylovora* in Pflanzengewebe. Auch wenn die Labortests der natürlichen Umgebung des Pathogens ähneln, zeigte sich in den Freilandversuchen in Kirschgartshausen, dass der Wirkungsgrad der Epiphyten als biologische Kontrolle gegen Feuerbrand verschieden ist. Die beiden eingesetzten Epiphyten *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* zeigten in Labortests vergleichbare Ergebnisse. Trotzdem unterscheidet sich ihr Wirkungsgrad im Freiland deutlich (31% zu 68%). Durch die verwendete PCR Methode zur Identifizierung der Epiphyten konnte herausgefunden werden, dass *E. billingiae* nach kurzer Zeit nicht mehr, *E. tasmaniensis* hingegen über einen längeren Zeitraum auf der Blüte nachweisbar ist. Dies könnte die unterschiedlichen Wirkungsgrade erklären.

Mit Hilfe der spezifischen PCR Methode war es nicht nur möglich Feuerbrandproben schnell zu analysieren, es konnten auch Populationsuntersuchungen durchgeführt werden. In der Versuchsanlage in Dossenheim konnten die Epiphyten *E. billingiae*, *E. tasmaniensis*, *E. persicina* und *E. rhapontici* nachgewiesen und Einzelkolonien isoliert werden. Diese Feldisolate können nun mit den Typstämmen aus der Stammsammlung in Bezug auf Wirkung gegen *E. amylovora* verglichen werden. Der große Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen Methoden (MALDI-TOF, RFLP) ist, Mischkulturen zu analysieren.

Bei Sequenzuntersuchungen des *wbdN* Gens und der *pstS-glmS* Region wurde deutlich, dass es eine hohe Variabilität der Sequenzen bei *E. billingiae* Isolaten gibt. Bei einem Sequenzvergleich zwischen Stämmen, die in Österreich isoliert wurden, konnten Sequenzabweichungen gefunden und die isolierten Stämme hierdurch unterschieden werden. Bei *E. tasmaniensis* Isolaten hingegen gab es nur sehr wenige Sequenzabweichungen. Die untersuchten australischen Isolate stimmten in ihrer Sequenz überein, wie auch die südafrikanischen Isolate untereinander übereinstimmten. Auch ein Vergleich zwischen den beiden in Deutschland isolierten Stämmen zeigte eine Übereinstimmung der Sequenzen.

Literatur

- Barionovi, D., Giorgi, S., Stoeger, A., Ruppitsch, W., Scortichini, M., 2006: Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *Journal of Applied Microbiology*, **100**, 1084–1094.
- Bellemann, P., Bereswill, S., Berger, S., Geider K., 1994: Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **16** (6), 290-296.

- Brown, E., Davis, R., Gouk, C., van der Zwet, T., 2000: Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , **50**, 2057–2068.
- Jock, S., Donat, V., López, M., Bazzi, C., Geider, K., 2002: Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology* **4**(2), 106–114.
- Kube, M., Migdoll, A., Müller, I., Kuhl, H., Beck, A., Reinhardt, R., Geider, K., 2008: The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environmental Microbiology* **10**(9), 2211–2222.
- Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., Geider, K., 2008: Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS ONE* **3**(7), 1–10.
- Vanneste, J: Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Wallingford (UK), CABI Publishing, 2000.
- Waleron, M., Waleron, K., Geider, K., Lojkowska, E., 2008: Application of RFLP analysis of *recA*, *gyrA* and *rpoS* gene fragments for rapid differentiation of *Erwinia amylovora* from *Erwinia* strains isolated in Korea and Japan. *Eur J Plant Pathol* , **121**, 161–172.
- Zhang, Y., Geider, K., 1997: Differentiation of *Erwinia amylovora* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(11), 4421–4426.

Kontakt: Isabel Gehring, E-Mail: Isabel.Gehring@jki.bund.de

Müller, Ina; Geider, Klaus; Jelkmann, Wilhelm

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

Biologische Kontrolle des Feuerbrands mittels Bakteriophagen und Bacteriocinen

Biological control of fire blight by bacteriophages and bacteriocins

Zusammenfassung

Das Bakterium *Erwinia amylovora* ist der Erreger von Feuerbrand bei Rosaceengewächsen. Bakteriophagen und Bacteriocine können eine biologische Alternative zum Antibiotikum Streptomycin sein, was zur Zeit eine effiziente Bekämpfungsmethode darstellt. Verschiedene *Erwinia*-spezifische Bakteriophagen wurden auf ihren Wirtsbereich untersucht. Die Bakteriophagen wurden über Restriktionsverdau und Sequenzierungen charakterisiert. Über spezifische PCR-Primerpaare wurde eine Unterscheidung und Gruppierung der Phagen möglich. Im Birnentest konnte mit einem der Bakteriophagen eine deutliche Reduktion der Feuerbrand-symptome erreicht werden. Mit Lysozym, welches von einem der Bakteriophagen produziert wird, ließ sich nach der induzierten Expression in *E. amylovora* eine deutliche Reduktion der Zellzahl erreichen. Bei *E. tasmaniensis* konnte ein Bacteriocin nachgewiesen werden.

Stichwörter: Feuerbrand, Bakteriophagen, Lysozym, Bacteriocin

Abstract

Erwinia amylovora causes the bacterial plant disease fire blight on rosaceous plants. Bacteriophages and bacteriocins can be a biological alternative to the antibiotic streptomycin, which is currently used as most efficient remedy. Various *Erwinia*-specific bacteriophages were tested concerning their host-range. A characterisation by restriction analysis and sequencing was conducted. Differentiation and grouping of phages was possible by use of specific PCR primers. One bacteriophage showed a fair reduction of fire blight symptoms in pear assays. By induced expression of bacteriophage-lysozyme a reduction of *E. amylovora* cell density was achieved. Synthesis of a bacteriocin in *E. tasmaniensis* could be shown.

Keywords: Fire blight, bacteriophages, lysozyme, bacteriocin

Einleitung

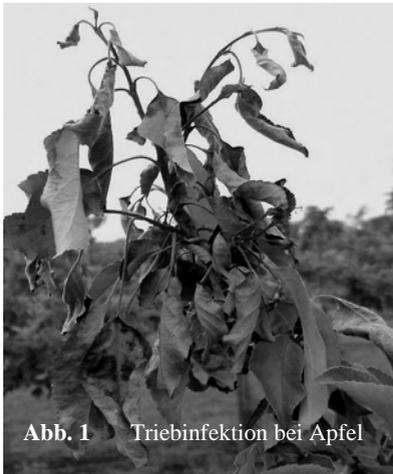


Abb. 1 Triebinfektion bei Apfel

Das gramnegative Bakterium *Erwinia amylovora* ruft bei mehreren Rosaceen Feuerbrand hervor. Diese Pflanzenkrankheit kann neben den wirtschaftlich wichtigen Obstsorten Apfel, Birne und Quitte auch Ziergehölze betreffen. Folge einer Infektion bei Kernobst sind hohe Ertragsverluste. Als Vektoren dienen neben Wind und Regen vor allem blütenbesuchende Insekten wie Bienen. Die Bakterien dringen durch den Blütenboden aber auch durch Wunden, wie sie zum Beispiel nach Hagelschlag entstehen, in das Pflanzen-gewebe ein. Sie können sich im Xylem der Pflanze ausbreiten und auf diese Weise sogar zum Unterlagensbefall führen (Bogs, 1998). Ein systemischer Befall kann zum Absterben der gesamten Pflanze führen. Typische Symptome sind das Verbräunen der Blüten und Blätter, hängende Zweige (Abbildung 1) und Schleimbildung an den befallenen Organen. Der Schleim besteht u. a. aus Exopolysacchariden (EPS), die von *Erwinia amylovora* abgegeben werden und zum Verstopfen der Leitgewebe führen, was Welkeerscheinungen hervorruft. Infizierte Bäume wirken durch die braunen oder schwarzen Äste wie verbrannt, was für die Krankheit namensgebend war. Birnen zeigen eine generell höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Erreger.

Eine effektive Bekämpfung ist durch das Antibiotikum Streptomycin möglich, das zur Blütezeit angewendet wird (Norelli, et al., 2003). Um in Europa der Resistenzbildung, wie sie in den USA und anderen Ländern aufgetreten ist, vorzubeugen, ist die Streptomycinanwendung streng reglementiert. In Deutschland wurde Streptomycin in den vergangenen Jahren kurz und befristet nach dem sogenannten Warnaufruf Feuerbrand (nach §14 PSchG) eingesetzt. Die Strategie „Feuerbrand“ des BMELV beinhaltete auch eine Intensivierung der Forschung bei der Suche nach biologischen Mitteln zu Streptomycin. *Erwinia*-spezifische Bakteriophagen und Bacteriocine können eine Möglichkeit zur biologischen Bekämpfung von Feuerbrand sein (Parisien, et al., 2008; Jabrane, et al. 2002; Schnabel and Jones, 2001). In dieser Arbeit wurden verschiedene *Erwinia*-spezifische Bakteriophagen auf ihren Wirkungsbereich untersucht (Gill, et al. 2003). Eine Charakterisierung der Bakteriophagen konnte über Restriktionsverdau und Sequenzierungen erreicht werden. Spezifische PCR-Primerpaare ließen eine Unterscheidung und Gruppierung der Phagen zu. In Birnentests wurde die Effizienz der Bakteriophagen hinsichtlich der Reduktion der typischen Feuerbrandsymptome getestet. Nach induzierter Expression eines Bakteriophagen-Lysozyms konnte eine Wirkung auf *E. amylovora* Zellen erreicht werden (Kim, et al., 2004; Salm and Geider, 2004). Bei *E. tasmaniensis* wurde wie bei *Klebsiella* sp. (Chavan, et al., 2005) die Produktion eines Bacteriocins nachgewiesen.

Material und Methoden

Softagartest mit Bakteriophagen: 100 µl einer *E. amylovora* Übernachtskultur wurden in 2,5 ml LB-Softagar (0,4%) pipettiert und 100 µl einer Phagenverdünnung zugegeben. Für die Bacteriocin-Tropftests wurden 100 µl eines sensitiven *E. tasmaniensis* Stamms in den Softagar pipettiert. Nach Mischen wurde der LB-Softagar auf LB-Platten plattiert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Bei der Auswertung wurden die entstandenen Lysebereiche bzw. die Hemmhöfe dokumentiert.

DNA-Präparation, Restriktionsverdau: Die Phagen DNA-Präparation erfolgte auf Basis der alkalischen Lyse. Nach der Lyse wurde das DNA-Pellet mit Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in Wasser aufgenommen und die Nukleinsäurekonzentration bestimmt. Der Verdau der Phagen-DNA erfolgte über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank.

Sequenzierungen: Die Sequenz der Bakteriophagen Genome wurde nach teilweiser Sequenzierung durch das Max Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin und Ergänzungen am JKI Dossenheim zugänglich (Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Firma SeqLab, Göttingen).

Birnentest: Unreife Birnen wurden in ~5 mm dicke Scheiben geschnitten und in unterschiedlich konzentrierten Suspensionen der Phagen für 10 min getaucht. Die Birnenscheiben wurden danach kurz getrocknet und mit 500 *E. amylovora* Zellen (Streptomycinresistente *E. amylovora* Mutante Ea1/79Sm) inokuliert. Der Versuchsansatz wurde für fünf Tage bei 28°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Birnen mit Wasser und dann mit Ea1/79Sm behandelt. Die Phageneffizienz wurde auf die Symptombildung (Verbräunung, Schleimbildung) bezogen.

Bacteriocin-Tropftest: Die bacteriocinproduzierenden *E. tasmaniensis* Stämme wurden bei 28 °C in LBg (1% Glc) angezogen. Bei OD 0,6 wurde MitomycinC zur Induktion der Bacteriocinproduktion zugegeben und die Kulturen zwei Stunden unter Schütteln inkubiert. Bei OD 1,0 wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen und durch Ultraschall aufgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der bacteriocinhaltige Überstand abgenommen und bei –20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Ergebnisse

Wirtsbereich der Bakteriophagen: Die verwendeten *Erwinia*-spezifischen Bakteriophagen wurden auf ihre Wirkung mit verschiedenen *Erwinia*-Arten untersucht. Es zeigte sich, dass die Phagen sich in ihrer Effizienz *E. amylovora* Stämme zu lysieren unterscheiden. Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Lyseeffizienz der Phagen und der EPS-Produktion der *Erwinia* Stämme zu bestehen. Die Vermehrung von Bakteriophagen mit Hilfe von apathogenen Erwinien Arten erwies sich als schwierig. Nur einer der Phagen zeigte hier Potential.

Unterschiede im Bakteriophagenom und Gruppierungsmöglichkeiten: Um die Bakteriophagen näher zu charakterisieren wurde die DNA präpariert. Nach Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte die Auftrennung auf einem Agarosegel. Im Ergebnis zeigten sich bei den einzelnen Phagen Unterschiede im Bandenmuster der Restriktionsverdau. Zwei der Phagen zeigten ein ähnliches Bandenmuster. Das Alignment der Genome ließ bei den Phagen mit dem gleichen Restriktionsmuster große Ähnlichkeit, sowohl untereinander als auch mit einem bereits annotierten Phagen, erkennen. Die Insertionen und Basenabweichungen, die im Alignment der Genomsequenz vorlagen, wurden über PCR und anschließende Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass zwischen den beiden Bakteriophagen keine Insertionen, sondern lediglich Abweichungen in einigen Basenpaaren vorliegen, die über eine hochspezifische two step-PCR sogar eine klare Unterscheidung der Phagen zulassen. Die Unterschiede, die im Restriktionsverdau bereits deutlich geworden waren, wurden mit Hilfe der Sequenzierungen bestätigt. Mit verschiedenen Primerpaaren, die auf Basis der vorhandenen Sequenzen erstellt wurden, konnten die Bakteriophagen unterschieden werden. Diese Primer konnten auch zur Einordnung von Freilandisolaten verwendet werden.

Birnentest: Die Wirksamkeit der Bakteriophagen in einem naturnahen System wurde über einen Symptomreduktionstest auf unreifen Birnen ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Phagen sich in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Eine deutliche Symptomreduktion im Vergleich zur Positivkontrolle konnte für einen der getesteten Phagen nachgewiesen werden. Die Verbräunung der Birnenscheiben und die aufgetretene Schleimbildung war nicht so stark wie bei der Positivkontrolle.

Induktion der Lysozymexpression in *E. amylovora*: Lysozym, was im Lebenszyklus von Bakteriophagen zur Lyse der Wirtszelle und Freisetzung der reifen Phagenpartikel führt, wurde in *E. amylovora* Zellen unter Verwendung eines Induktors exprimiert. Das Lysozymgen wurde in einen Expressionsvektor inseriert und *E. amylovora* Zellen mit diesem Vektor transformiert. Eine zusätzliche Transformation mit einem Plasmid, welches den *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert, ließ eine kontrollierte Expression zu. Nach Zugabe des Induktors zeigten die Bakterienkulturen eine deutliche Abnahme der Zelldichte.

Bacteriocin-Tropftest: Der nach MitomycinC-Zugabe gewonnene bacteriocinhaltige Überstand einer Bacteriocin-produzierenden *E. tasmaniensis* Kultur wurde auf eine Softagar beschichtete LB-Platte pipettiert. In den Softagar waren zuvor 100 µl eines für das Bacteriocin sensitiven *E. tasmaniensis* Stamm pipettiert worden. Nach Trocknen des Tropfens wurde die Platten bei 28 °C über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag, wobei sich im Bereich des Tropfens eine Hemmung des Bakterienwachstums feststellen ließ. Bei einem australischen *E. tasmaniensis* Isolat führte die Behandlung mit dem induzierten Bacteriocin (Tasmancin) zur Phageninduktion. Die Sequenzierung ergab, dass dieser Phage nicht mit bekannten *E. amylovora* Phagen verwandt ist (M. Kube, MPI molGen, Berlin). Dieser Phage PP2 lässt sich der Gruppe der Myoviridae zuordnen. Der PP2 Phage liegt im Genom des *E. tasmaniensis* Isolats lysogen vor. Über PCR soll die Integrationsstelle des Phagen herausgefunden werden. Es wurden verschiedene *E. tasmaniensis* Isolate auf das Vorhandensein des Phagen untersucht. Allerdings konnten nur zwei der getesteten Phagen als Träger des Bakteriophagen, der eine hohe Wirtsspezifität auf *E. tasmaniensis* aufweist, ermittelt werden.

Diskussion

Die *E. amylovora*-spezifischen Bakteriophagen wiesen einen unterschiedlichen Wirtsbereich auf wobei sich eine Tendenz zur EPS-Abhängigkeit der Lyseeffizienz feststellen ließ. Dies kann in der unterschiedlichen EPS-Abhängigkeit der Bakteriophagen begründet sein. Einer der Phagen verfügt nicht über das

Depolymerasegen, was zur Spaltung der EPS-Kapsel der Bakterien benötigt wird. Gleichzeitig zeigt dieser Phage eine gute Lyseeffizienz hinsichtlich *Erwinia* Stämmen mit niedriger EPS-Produktion.

Die Vermehrung von Bakteriophagen in apathogenen *Erwinia*-Stämmen zeigte, dass dies nicht für alle der untersuchten Bakteriophagen möglich ist. Lediglich bei einem der Phagen ließ sich hier die Möglichkeit zur Anzucht auf avirulenten Erwinien erkennen. Dieser Ansatz wird weiterentwickelt, da auf diese Weise ein pathogenfreies Phagenlysat zur Behandlung von feuerbrandgefährdeten Kulturen gewonnen werden könnte. Unterschiede zwischen den Bakteriophagen bestehen auch auf Ebene des Genoms. Zwei der Phagen weisen große Ähnlichkeit zueinander auf. Eine Gruppierung der Phagen wurde durch spezifische PCR-Primer möglich. Diese Primer wurden mit Erfolg bei der Einordnung von Freilandisolaten angewendet. EM-Aufnahmen der Bakteriophagen (R. Lurz, MPI molGen, Berlin) stützen die Ergebnisse der Gruppierung die durch PCR gewonnen werden konnten. Die Phagen konnten den Podoviridae bzw. den Myoviridae zugeordnet werden.

Tests hinsichtlich der praktischen Anwendbarkeit der Bakteriophagen in einem naturnahen System wurden auf unreifen Birnen durchgeführt. Hier erwies sich einer der Phagen den anderen überlegen. Im weiteren Verlauf werden die Bakteriophagen auf ihre Stabilität in möglichen Verdünnungsmedien und ihre Überdauerungsfähigkeit unter Trockenheit getestet. Dies, sowie UV-Persistenz, sind zusätzlich zur Lyseeffizienz in einem breiten *E. amylovora* Stammspektrum, wichtige Faktoren, die die mögliche Verwendung von Bakteriophagen im Freiland bestimmen werden.

Die Expression von Lysozym in *E. amylovora* Zellen führte zur Wachstumsinhibition. Die induzierten Bakterienkulturen wiesen eine deutliche Abnahme der Zelldichte auf was den starken Effekt des Lysozyms auf die Bakterien aufzeigt. Das in den Zellen exprimierte Lysozym hat eine toxische Wirkung auf die Bakterien; eine niedrige Konzentration des Enzyms kann bereits zu nachweisbaren Auswirkungen führen. Eine starke Kontrolle des Promotors ist daher unabdingbar, was durch die Expression des *lac*-Repressors gewährleistet wurde. Voruntersuchungen zur Übertragbarkeit von Lysozym mit Hilfe eines broad host-range Plasmids werden zur Zeit durchgeführt. Mit Hilfe von apathogenen Bakterien, die das broad host-range Plasmid übertragen können, kann das Lysozymgen innerhalb einer Erwinienpopulation verbreitet werden und auf diese Weise dezimiert werden. Problematisch ist dabei das Inverkehrbringen eines solchen Ansatzes, da die Akzeptanz der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen aktuell nicht gegeben ist.

Das durch MitomycinC-Zugabe induzierte Bacteriocin von *E. tasmaniensis* zeigte bei sensitiven *E. tasmaniensis* Stämmen eine Inhibition des Wachstums. Wie durch PCR gezeigt werden konnte, besitzen diese sensitiven Stämme kein Immunprotein, welches sonst das Bacteriocin bei Produzentenstämmen inaktivieren könnte. Ein im Genom von *E. amylovora* vorliegendes, dem ColicinA ähnliches Gen, soll durch Mutation auf seine Aktivität geprüft werden. Dieses System soll zeigen, ob *E. amylovora* über ein funktionales Bacteriocin verfügt und soll daher kein Ansatz zur Feuerbrandbekämpfung sein. Diesem Ansatz steht entgegen, dass im Freiland vorhandene *E. amylovora* Stämme gegenüber dem Bacteriocin nicht sensitiv sind, da sie über ein entsprechendes Immunprotein-Gen verfügen, wie der Genomsequenz entnommen werden kann. Ein Nachweis von natürlicherweise sensitiven Stämmen muss noch erbracht werden.

Literatur

- Bogs J., Bruchmüller I., Erbar C., and Geider K., 1998: Colonization of Host Plants by the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* Marked with Genes for Bioluminescence and Fluorescence. *Phytopath.* **88** (5), 421-421.
- Gill, J. J., Svircev, A. M., Smith, R., and Castle, A. J., 2003: Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (4), 2133-2138.
- Jabrane, A., Sabri, A., Compère, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., van Beeumen, J., and Thonart, P., 2002: Characterization of Serracin P, a Phage-Tail-Like Bacteriocin, and Its Activity against *Erwinia amylovora*, the Fire Blight Pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (11), 5704-5710.
- Kim, W.-S., Salm, H., and Geider, K., 2004: Expression of bacteriophage phi-Ea1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiol.* **150**, 2707-2714.
- Norelli, J. L., Jones, A. L., Aldwinckle, H. S., 2003: Fire Blight Management in the Twenty-first Century using New Technologies that Enhance Host Resistance in Apple. *Plant Disease* **87** (7), 756-765.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., and Lan, C. Q., 2008: Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1-13.
- Chavan M., Rafi H., Wertz J., Goldstone C., Riley M. A., 2005: Phage Associated Bacteriocins Reveal a Novel Mechanism for Bacteriocin Diversification in *Klebsiella*. *J. Mol. Evol.* **60**, 546-556.

- Salm, H., and Geider, K., 2004: Dual Activity of a Viral Lysozyme with High Efficiency for Growth Inhibition of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **94** (12), 1315-1322.
- Schnabel, E. L., and Jones, A. L., 2001: Isolation and Characterization of Five *Erwinia amylovora* Bacteriophages and Assessment of Phage Resistance in Strains of *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (1), 59-64.

Kontakt: Ina Müller; E-Mail: ina.mueller@jki.bund.de

Nowak, A.¹; Konstantinidou-Doltsinis, S.²; Seddon, B.³; Schmitt, A.¹

¹Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; ²NAGREF, Plant Protection Institute of Patras, Griechenland; ³University of Aberdeen, Aberdeen, Großbritannien

Alternative Präparate in der Bekämpfung des Falschen Mehltaus an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*)

Alternative agents for control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumbers

Zusammenfassung

Die Infektion mit Falschem Mehltau ist im ökologischen Gurkenanbau eines der größten Probleme.

Die Wirkung von Pflanzenextrakten aus *Salvia officinalis* (Salbei) und *Glycyrrhiza glabra* L. einer Pflanze aus der Familie der Fabaceae, sowie Kulturen von *Brevibacillus brevis* Nagano wurden in einem Praxisversuch untersucht. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Biotests, bei denen Salbei-Extrakt die beste Wirkung gegen den Falschen Mehltau zeigte, war im Praxisversuch die Wirkung des *G. glabra*-Extraktes deutlich besser als die von Salbei-Extrakt oder *B. brevis*. Dies könnte auf Versuchsparmeter wie zu geringe Extraktkonzentrationen bzw. zu lange Applikationsabstände im Praxisversuch zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen auch hinsichtlich Wirkungsweise und wirksamer Inhaltsstoffe wurden begonnen.

Stichwörter: Ökologischer Gurkenanbau, biologischer Pflanzenschutz, Pflanzenextrakte, antagonistische Mikroorganismen

Abstract

In organic cucumber production the infection with downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) is one of the major problems.

Plant extracts from *Salvia officinalis* (sage) and *Glycyrrhiza glabra* L., a plant belonging to the family Fabaceae, as well as cultures of *Brevibacillus brevis* Nagano were investigated for their efficacy under commercial growing conditions. Contrary to bioassays, where sage extract showed highest activity, in these trials *G. glabra*-extract was more effective than sage extract or *B. brevis* against *P. cubensis*. Trial parameters in the commercial trial such as concentrations of the preparations or application intervals could be the reason for this. Further investigations, also on the mode of action and active ingredients are under way.

Keywords: organic cucumber production, biological control, plant extracts, antagonistic microorganisms.

Einleitung und Zielsetzung

Eine der problematischsten Krankheiten im ökologischen Gurkenanbau ist der Falsche Mehltau. Bei entsprechender Witterung und Temperatur kann es zu Totalausfällen kommen. Insbesondere bei Kulturen unter Glas oder Folie stellt der Einsatz von biologischen Präparaten eine interessante Alternative zur Eindämmung des Falschen Mehltaus dar. Basierend auf Ergebnissen zur guten Wirkung von P1-Extrakt (*G. glabra*) auf einen anderen Oomyceten, *P. infestans*, (Konstantinidou-Doltsinis, S. and Markellou, E 2008) und eigenen Vorversuchen gegen *P. cubensis* wurde im Sommer 2008, unter der Leitung des Instituts für Biologischen Pflanzenschutz des JKI, an der LVG Heidelberg ein Praxisversuch mit ethanologischen Pflanzenrohextrakten aus *G. glabra* und *Salvia officinalis* und Kulturbrühen eines Bakteriums (*Brevibacillus brevis* Nagano) an zwei Gurkensorten (Eminentia und Airbus) durchgeführt. Diese Präparate werden im Rahmen des durch das Bundesprogramm Ökologischer Landbau geförderten Projektes zur Regulierung des Falschen Mehltaus an Gurke untersucht.

Methoden

Die Gurkenpflanzen der Sorten Eminentia und Airbus wurden getrennt voneinander (in der Südhälfte und der Nordhälfte) in einem Foliengewächshaus mit je 180 Pflanzen kultiviert. Jede Sorte war in drei Doppelreihen (Wiederholungen) angepflanzt, wobei jede Doppelreihe aus fünf Pazellen mit jeweils 2 mal 6 Pflanzen bestand. Es wurden alle 12 Pflanzen einer Parzelle behandelt und jeweils die mittleren 8 Pflanzen ausgewertet. Jeder Pazelle war ein Präparat zugeordnet. Die Versuchspflanzen waren von unbehandelten Randpflanzen umgeben. Die Pflanzenextrakte wurden aus getrockneten und gemahlenden Blättern und Stängeln von *S. officinalis* dalmat. (Firma Galke) und *Glycyrrhiza glabra* L. (P1) aus Griechenland gewonnen. Das Pflanzenpulver wurde zwei Stunden bei 60 °C in 70 %igem Ethanol gerührt (Bläser 1999). Die Fermentation von *Brevibacillus brevis* erfolgte 3-4 Tage in Trypton Soja Brühe. Die Kulturen wurden in Anlehnung an Edwards and Seddon (2001) bei 37 °C im Fermenter angezogen. Für die Versuche wurden die Präparate mit Wasser verdünnt und mit einer 15 l Motorspritze in der Kultur ausgebracht. Die Erstbehandlung mit P1- und Salbei-Extrakt erfolgte 5%ig. In allen nachfolgenden Spritzungen wurde P1-Extrakt 2,5%ig und Salbei-Extrakt 2%ig ausgebracht. *B. brevis* wurde als 1:5 Verdünnung der gesamten Flüssigkultur appliziert. Die Behandlung mit ElotVis als Vergleichsmittel erfolgte wie vom Hersteller angegeben 5%ig. Jedem dieser Ansätze wurde zur Prophylaxe gegen Echten Mehltau Milsana (0,5%ig) beigegeben. Am Tag nach der ersten Behandlung erfolgte die Inokulation auf der Blattunterseite der untersten beiden Blätter jeder Pflanze mit $5 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ Sporangien / ml. Die Präparate wurden im 10tägigen Rhythmus ausgebracht. Die erste Bonitur (09.07.2008) wurde beim ersten Auftreten der Symptomen des Falschen Mehltaus in der Kultur durchgeführt. Die nachfolgenden drei (Eminentia) beziehungsweise vier (Airbus) Bonituren erfolgten in siebentägigem Abstand. Ausgewertet wurde der prozentuale Befall der Blattfläche in den Schritten 1%, 2,5%, 5%, ab 5% bis 50% in 5er Schritten und ab 50 % in 10er Schritten. Bonitiert wurden sechs Blättern der mittleren Blatttage je Pflanze. Zur Berechnung der Signifikanz der Befallsunterschiede wurden die Daten Arcus-Sinus transformiert und einer ANOVA mit dem Programm WinStat für Excel (Version 2007.1) unterzogen.

Ergebnisse

In beiden Gurkensorten konnte trotz künstlicher Infektion nur ein mittlerer Befall der Versuchspflanzen (<50%) erzielt werden. Die Sorte Eminentia war ab der zweiten Bonitur tendenziell etwas stärker befallen als die Sorte Airbus. Auch der wöchentliche Befallsanstieg fiel bei der Sorte Eminentia deutlicher aus (Abbildung 1 und 2). In allen Bonituren und in beiden Sorten zeigten der P1- Extrakt (*G. glabra*) und ElotVis die höchsten Wirkungsgrade (WG) gegenüber der Wasserkontrolle (P1 WG 32%-60%; ElotVis WG 32%-42%). Diese Varianten zeigten von Bonitur 2 bis Bonitur 4 jeweils einen signifikant geringeren Befall als die Wasserkontrolle (Abbildung 1 und 2).

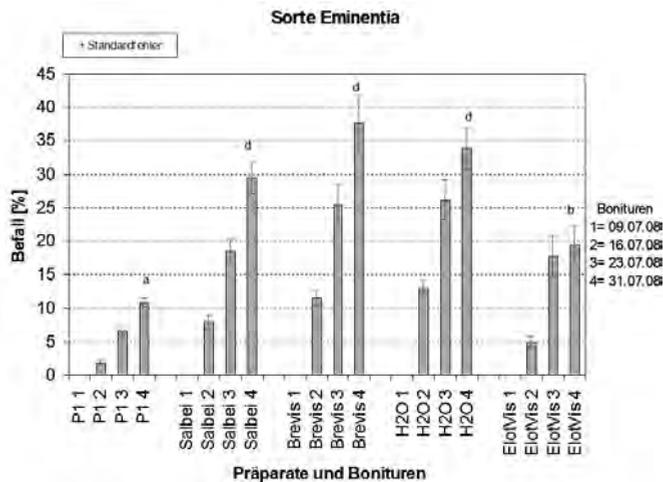


Abb. 1 Darstellung der Mittelwerte des Befalls mit Falschem Mehltau pro Bonitur und Präparat in einem Praxis-Gewächshausversuch an Gurken (Sorte Eminentia); Ergebnisse der ANOVA sind hier nur für die vierte Bonitur dargestellt: unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede (p=0,05).

Die Pflanzen, welche mit Salbei-Extrakt behandelt wurden, zeigten in beiden Sorten in Bonitur 2 einen signifikant geringeren Befall als die Pflanzen der Wasserkontrolle. Bei der Sorte Eminentia wurde im Gegensatz zur Sorte Airbus auch in Bonitur 3 noch eine signifikante Befallsverminderung durch den Salbei-Extrakt beobachtet (Abbildung 1). Die Behandlungen mit *Brevibacillus brevis* hatten in beiden Sorten zu keinem Termin einen signifikanten Effekt auf den Befall mit Falschem Mehltau (Abbildung 1 und 2).

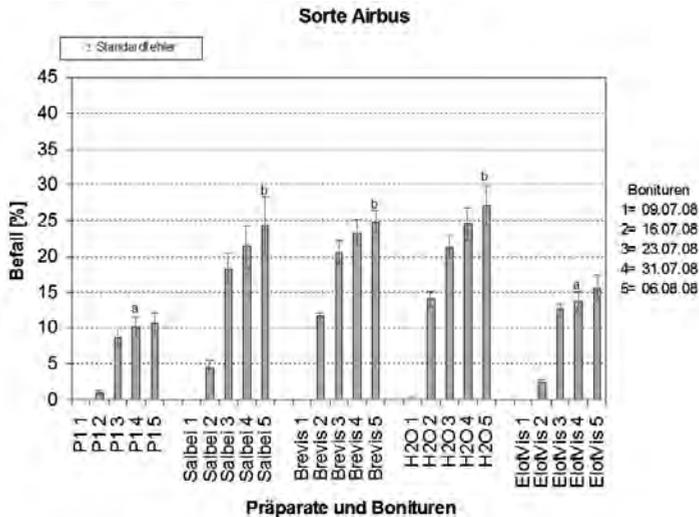


Abb. 2 Darstellung der Mittelwerte des Befalls mit Falschem Mehltau pro Bonitur und Präparat in einem Praxis-Gewächshausversuch an Gurken (Sorte Airbus); Ergebnisse der ANOVA sind hier nur für die vierte Bonitur dargestellt; unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ($p=0,05$).

Insgesamt waren ein sehr viel stärkerer Befall der Randpflanzen auf der Westseite im Vergleich zur Ostseite der Versuchsanlage und noch eine Verstärkung des Befalls in der südlichen Hälfte zu beobachten.

Diskussion

In Versuchen an getopften Pflanzen führte die Behandlung der Gurkenpflanzen mit P1-Extrakt (*G. glabra*), Salbei-Extrakt und *B. brevis* jeweils zu einer signifikanten Verringerung des Befalls mit *P. cubensis* (Nowak et al. 2008). Im Gegensatz dazu konnte in dem Praxisversuch unter Folie nur für den *G. glabra*-Extrakt eine signifikante Befallsverminderung über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Sorten erzielt werden. Auffällig war außerdem, dass die mit diesem Extrakt behandelten Pflanzen eine deutliche Grünfärbung und Kräftigung der Gurkenblätter zeigten, was möglicherweise auf eine pflanzenstärkende Wirkung hindeutet.

Obwohl Salbei-Extrakt in Biotests an getopften Pflanzen bei Konzentrationen <1% noch eine fast 100%ige Wirkung auf Falschen Mehltau hatte (Nowak et al. 2008), fiel die Wirkung unter Praxisbedingungen bei 2%iger und 10-tägiger Behandlung deutlich schlechter aus. In einem Gewächshausversuch 2006 zeigte Salbei-Extrakt 5%ig bei siebentägiger Anwendung und 92% Befall in der Wasserkontrolle einen Wirkungsgrad von ca. 70% (Daten nicht veröffentlicht). Die im Praxisversuch erzielte geringere Wirkung lässt sich daher wahrscheinlich auf die niedrigere Extraktkonzentration in Kombination mit dem längeren Applikations-interval zurückführen. Die Anwendung von *B. brevis* (Verdünnung 1:5) zeigte im Praxisversuch nur unzureichende Wirkung. Auch hier könnte der Grund in einer zu starken Verdünnung bzw. in zu langen Behandlungsabständen gelegen haben. Aus früheren Arbeiten ist ein Metabolit von *B. brevis* (Gramicidin S) bekannt, der eine starke befallsreduzierende Wirkung gegen *B. cinerea* zeigt (Edwards and Seddon 2001). Erste eigene Untersuchungen deuten auf die Beteiligung dieses Metaboliten auch bei der Wirkung auf *P. cubensis* hin, wobei die Konzentration im Praxisversuch möglicherweise zu gering war. Weiterführende Arbeiten dazu sind begonnen.

In Gewächshausversuchen, die 2007 durchgeführt wurden, war die Sorte Eminentia deutlich geringer befallen als die Sorte Airbus (Marx et al. 2008). Im diesjährigen Praxisversuch zeigte im Gegensatz dazu die Sorte Eminentia insgesamt höheren Befall als die Sorte Airbus. Die unterschiedliche Befallsstärke der Sorten

scheint im eigenen Versuch 2008 vor allem Standort-bedingt zu sein, da die Randpflanzen (Sorte Torreón) im südlichen Teil der Versuchsanlage, in dem die Sorte Eminentia angepflanzt war, einen deutlich höheren Befall mit Falschem Mehltau aufwiesen. Ein Vergleich der Wirkung der Präparate unter Praxisbedingungen mit der Wirkung im Biotest macht deutlich, dass die Übertragung von Ergebnissen aus kontrollierten Laborbedingungen auf Gewächshaus oder Freiland nicht immer direkt möglich ist. Aus früheren Arbeiten zur biologischen Bekämpfung mit Pflanzenextrakten ist bekannt, dass unter anderem der Applikationszeitpunkt und die Dauer der Wirksamkeit eine wichtige Rolle für den erfolgreichen Einsatz (Latten 1994) spielen. Darüber hinaus sind Informationen zu Wirkmechanismen und wirksamen Inhaltsstoffen für die Optimierung der Anwendung und Extraktion/Fermentation wichtig. Entsprechenden Untersuchungen wurden am JKI, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, bereits begonnen.

Danksagung

Wir danken Heike Sauer und Rita Schäfer (Lehr und Versuchsanstalt für Gartenbau, Heidelberg), sowie Karin Bald, Mona von Eitzen - Ritter, Mariandel Steinmetz und Christina Schuster (JKI, Institut für Biologischen Pflanzenschutz) für die tatkräftige Unterstützung in der Vorbereitung und Durchführung der Versuche. Mirco Egyedy und Dr. Hubertus Kleeberg (Trifolio-M GmbH) danken wir für die Herstellung der Pflanzenextrakte, sowie Gudrun Mögel und Dr. Stefan Kunz für die in den Praxisversuchen verwendeten Fermenterproduktionen von *B. brevis*. Das Vorhaben wird über das Bundesprogramm Ökologischer Landbau aus Mitteln des Bundesministeriums für Verbraucherschutz (BMELV) gefördert.

Literatur

- Edwards S.G., Seddon B., 2001: Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of applied Microbiology*. 91:652 -659.
- Bläser, P., 1999: Isolierung und Charakterisierung Von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung. Shaker Verlag.
- Latten, J., 1994: Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Marx, P., Gärber, U., Mattmüller, H., Schäfer, R., Gebelein, D., 2008: Falscher Mehltau im ökologischen Gurkenanbau – erste Ergebnisse zu neuen Regulierungsstrategien. *Mitteilungen aus dem JKI*, 56, 443.
- Konstantinidou-Doltsinis, S. and Markellou, E (2008): Antifungal activity of ethanolic *Glycyrrhiza glabra* L. extracts against infection of tomato plants by *Phytophthora infestans*. Summaries of papers and posters presented at the 14th Hellenic Phytopathological Congress, Nafplio, Greece, October 7-10, 2008 (in greek).
- Nowak, A., Konstantinidou-Doltsinis, S., Seddon, B., Schmitt, A., akzeptiert 2008: Möglichkeiten der Bekämpfung des Falschen Mehltaus an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) mit alternativen Präparaten. *Organic Eprints*.

Kontakt: Andrea Nowak, E-Mail: andrea.nowak@jki.bund.de

Fischer, D.¹; Pelz, H.-J.¹; Prokop, A.²

¹Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung, Münster; ²W. Neudorff GmbH KG, An der Mühle 3, 31860 Emmerthal

Die Vergrämung von Schermäusen, *Arvicola amphibius* (früher *Arvicola terrestris*), mit Hilfe von Geruchs- und Geschmacksrepellentien auf Basis von pflanzlichen Sekundärmetaboliten

The effect of secondary plant compounds for repelling water voles, *Arvicola amphibius* (previously *Arvicola terrestris*)

Zusammenfassung

Schermäuse, *Arvicola amphibius* (früher *Arvicola terrestris*), können erhebliche Schäden an den Wurzeln diverser Gehölzpflanzen verursachen und führen zu nur schwer lösbaren Pflanzenschutzproblemen sowohl in der Landwirtschaft als auch im Obst- und Gartenbau. Aktuell auf dem Markt erhältliche Mittel und Geräte zur Vergrämung von Schermäusen zeigen keine ausreichende Wirkung. Ebenso kann der Einsatz diverser "Hausmittel", wie zum Beispiel der Anbau bestimmter Pflanzenarten oder das Einbringen von Glasscherben, Fraßschäden nicht verhindern.

In einem Kooperationsprojekt des Julius Kühn-Instituts (JKI), der Firma Neudorff GmbH KG und des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg (IPMB) wird derzeit ein neues integriertes Pflanzenschutzverfahren entwickelt. Zur Vergrämung der Schermäuse von Kulturflächen sollen Repellentien auf Basis pflanzlicher Sekundärmetabolite entwickelt werden.

Sekundäre Pflanzenstoffe haben eine große Bedeutung bei der Verteidigung der Pflanzen gegen Herbivore, Mikroorganismen und andere Pflanzen. Sie steigern als natürliche Schutzstoffe die Leistungsfähigkeit und Überlebenschance der Pflanze. Das Potential pflanzlicher Sekundärmetabolite für Gartenbau und Landwirtschaft ist bisher wenig erforscht und stellt im Hinblick auf fast 300.000 Pflanzenarten ein enormes Reservoir dar.

Im Projekt werden die Schermäuse mit verschiedenen pflanzlichen Sekundärmetaboliten konfrontiert, um deren Wirkung auf die Tiere herauszufinden. Zum Einsatz kommen Stoffe, die geschmacklich und geruchlich abstoßend auf die Tiere wirken sollen, wie z.B. diverse ätherische Öle und Reizstoffe.

Um geeignete Geschmacksrepellentien zu finden, wurden den Schermäusen in einem systematischen Screening 30 unterschiedliche Substanzen angeboten. Die Extrakte wurden auf Apfelreiser (größengenormte Apfelzweige) aufgebracht und den Tieren im Laborversuch angeboten. Der Grad der Benagung der behandelten Reiser wurde mit unbehandelten Kontrollreisern verglichen. Es wurden zwei Stoffe gefunden, die eine abwehrende Wirkung zeigen. Diese Stoffe werden zurzeit hinsichtlich ihrer Konzentration und Formulierung optimiert und in weiteren Testreihen im Labor überprüft.

Die Analyse von sechs volatilen Stoffen wurde mit Hilfe eines T-Labyrinthes (zweikammerige Versuchsapparatur) durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist, wie durch umfangreiche methodische Vorversuche nachgewiesen wurde, geeignet, um die Repellenzeigenschaften von volatilen Substanzen an Schermäusen zu überprüfen. Dabei wurden den Mäusen eine mit einem Extrakt „bedufete“ Testbox und eine „unbedufete“ Kontrollbox zur Wahl gestellt, die beide ein Stück Apfel als Köder enthielten. Die Stoffe galten als repellent, wenn die Testbox gemieden wurde. Die Auswertung der aktuell erhobenen Daten steht noch aus.

Im weiteren Verlauf des Projekts sollen Extrakte, die sich in den Apfelreiser- und Labyrinth-Versuchen als wirksam erwiesen haben, in Gehege- und Halbfreilandversuchen auf ihre Effizienz getestet werden. Zudem sollen abstoßend wirkende Substanzen später so aufbereitet werden, dass sie in der Praxis leicht anzuwenden sind. Das resultierende Produkt muss anwenderfreundlich, umweltschonend und toxikologisch unbedenklich sein. Außerdem sollen die Kulturen zur Gewinnung der Pflanzenextrakte problemlos erhältlich und kostengünstig sein. Ein wirkungsvolles Vertreibungsmittel könnte zukünftig nicht nur Schäden an Kulturpflanzen reduzieren, sondern auch den Einsatz von Schlagfallen und Rodentiziden deutlich minimieren. Damit würden Risiken für Nichtzielorganismen verringert und die Umwelt geschont.

Stichwörter: *Arvicola amphibius* (früher *Arvicola terrestris*), Geruchstoffe, Geschmackstoffe, pflanzliche Sekundärmetabolite, Repellent, T-Labyrinthversuch, Vergrämung, Wahlversuch, Wühlmaus

Abstract

Water voles, *Arvicola amphibius* (previously *Arvicola terrestris*), are known to cause enormous damage to the roots of various plants, thus posing a major threat to harvests in agriculture as well as fruit- and horticulture. Currently available substances and devices, designed to repel water voles, do not show adequate effects. The use of various household remedies, such as the additional planting of certain species close to the cultivated plants or bringing out fragments of glass, has been proven not prevent the damage caused by the voles.

This project represents a cooperation between the Julius Kühn-Institute (JKI), the Neudorff GmbH KG and the Institute for Pharmacy and Molecular Biotechnology (IPMB) of the University of Heidelberg. The aim is to develop a new and environmentally sustainable water vole deterrent on the basis of secondary plant metabolites.

Many plants produce a variety of biochemical substances that are of great importance in the plants defence against herbivores, microorganisms and other plants. Increasing the chance of the plant's survival these substances act as natural protective agents. The potential use of secondary plant metabolites for horti- and agriculture is widely recognized, but in spite of the enormous pool of nearly 300.000 different species, few studies so far dealt with it in much detail.

In this project water voles will be exposed to various secondary plant metabolites e.g. ethereal oils or flavour additives, to study their repulsive effect on the animals. The experimental design targeted the taste as well as the olfactory sense of the voles.

In order to find suitable taste repellents the water voles were confronted with 30 different substances. The extracts were applied on size-standardized branches of apple trees and offered to the animals in a cage experiment. The degree of gnawing of the treated branches was compared to untreated control branches. Two potentially repelling substances were isolated. These substances are currently optimized regarding their concentration and formulation and examined in further test rows in the laboratory.

The analysis of six volatile substances was performed with the help of a T-maze (maze with two boxes). The voles were made to choose between a "test box", including a test substance and a "control box" without flavour. Both boxes contained a piece of apple as bait. The extracts were considered to be a potential repellent, if the "test box" was avoided. No further results can be presented, as the data analysis is ongoing.

Extracts, which proved to be potentially repellent in the taste as well as in the olfactory experiment, will be further tested on their efficiency in larger scale enclosures and outdoor exposure tests. Ultimately, successful isolated, repulsive substances will have to be processed for commercial use, as the end product has to fulfil certain characteristics (environmentally sustainable, user-friendly and toxicological harmless). Additionally, the extract producing plant species have to be widely available and sustainable in their production.

The isolation and commercialisation of an effective water vole deterrent could not only help reducing the damage to crops and other cultivated plants but also minimize the use of lethal traps and rodenticides, potentially harmful to other organisms and the environment in general.

Keywords: *Arvicola amphibius* (previously *Arvicola terrestris*), choice-test, deterrent, flavour, odour, repellent, secondary plant compounds, T-maze-test

Kontakt: Daniela Fischer, Tel.: 0251-8710641, E-Mail: daniela.fischer@jki.bund.de

Jandewerth, Pia; Pelz, Hans-Joachim

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung, Münster

Tierschutz und Fallenfang – Ertränkungsfallen auf dem Prüfstand

Animal Welfare and Trapping – Testing Drowning Traps

Zusammenfassung

Jedes Jahr werden Millionen von Nagetieren als Schädlinge bejagt. Erst seit dem Ende des 20. Jahrhunderts gewann der Begriff „tierschutzgerecht“ im Zuge der Tötung von Tieren an Bedeutung. 1998 wurde z.B. zwischen der Europäischen Gemeinschaft, Kanada und der Russischen Föderation ein internationales Übereinkommen in Bezug auf tierschutzgerechte Fangnormen (engl. AIHTS) vereinbart, um den gefangenen Tieren so wenig Schmerzen, Stress und Leiden wie möglich zuzufügen.

Das Projekt „Fallenstandards“, welches am Julius Kühn-Institut in Münster im Auftrag der EU Kommission bearbeitet wird, befasst sich mit der Entwicklung von Standards für die Prüfung von Säugetierfallen unter Tierschutzgesichtspunkten mit Schwerpunkt Bisam (*Ondatra zibethicus*).

Laut des AIHTS darf in den Schlagfallen, die u.a. bei der Bisamjagd eingesetzt werden, die Zeitspanne von 300s bis zum Eintritt der irreversiblen Bewusstlosigkeit nicht überschritten werden. Damit eine solche Falle den Normen genügt und nicht verboten wird, müssen Daten über mindestens 12 Tiere erfasst werden, von denen mindestens 80% innerhalb der maximalen Zeitspanne von 300s irreversibel bewusstlos sind. Die Zeitspanne bis zur Bewusstlosigkeit wird bei herkömmlichen Tötungsfallen, wie z.B. der oben genannten Schlagfalle, ab dem Zeitpunkt des AuslöSENS der Falle gemessen, d.h. der Stress beginnt in der Regel für das entsprechende Tier direkt nach dem Betreten der Falle.

Die gängigste Methode Bisame zu fangen ist jedoch das Ertränken mittels Ertränkungsfallen (ca. 80% innerhalb von Deutschland). Aufgrund seiner semiaquatischen Lebensweise ist es allerdings unwahrscheinlich, dass die Ertränkungsfaller direkt beim Betreten Stress verursacht. Die Problematik in Bezug auf die Prüfung der Ertränkungsfallen liegt also darin, den genauen Anfang des einsetzenden Stresses zu ermitteln.

Im Zuge der Entwicklung eines zuverlässigen Testverfahrens zur Bewertung von Ertränkungsfallen unter Tierschutzgesichtspunkten wurden die Versuche so konzipiert, dass das Verhalten, die Physiologie (EEG, EKG, Stresshormone) und pathologische Untersuchungen gemessen werden konnten. Eine weitere Möglichkeit Rückschlüsse auf den Stress, den das Tier in der Falle erfährt, zu gewinnen, können Aversionstests sein.

Die in diesem Projekt erarbeiteten Daten werden einen wesentlichen Beitrag für die geplante Beurteilung von Fallen hinsichtlich des Tierschutzes im Rahmen des AIHTS leisten.

Stichwörter: Fallenfang, Tierschutz, AIHTS, Bisam, *Ondatra zibethicus*, Ertränkungsfall

Abstract

Many millions of pest rodents are killed each year. It was only since the end of the 20th century that “animal welfare” in the context of killing animals gained increasing importance. In 1998 an Agreement on International Humane Trapping Standards (AIHTS) was signed by the European Union, Canada and the Russian Federation, to avoid as much pain, distress and suffering of trapped animals as possible.

By order of the European Commission the Julius Kühn-Institute in Münster is currently conducting a research project on the development of methods for the evaluation of animal welfare criteria of traps, according to the standards set by the AIHTS. The focal animal of the project is the muskrat (*Ondatra zibethicus*).

According to the AIHTS for muskrat spring traps the time to irreversible unconsciousness must not exceed 300 seconds. A trap passes the criteria of the AIHTS if at least 80% of at least 12 animals tested are killed or rendered irreversibly unconscious within 300 seconds. The time to irreversible unconsciousness is usually measured from the point of time the spring trap is fired as the distress of the trapped animal starts with entering the trap.

The most common method for catching muskrats is drowning using so called drowning traps (approx. 80% within Germany). However, due to its semi-aquatic way of live distress is unlikely to begin immediately the animal enters the underwater cage. Hence one of the main issues of the study is to determine the point of onset of distress in muskrats in the drowning cage.

In order to assess the animal welfare criteria in the course of the development of a reliable testing procedure for traps, trials are designed to record behavioural, physiological (EEG, ECG, hormones of distress) and pathological parameters. Further conclusions on the level of distress muskrats experience during drowning can probably be drawn from aversion trials. The results of the project will substantially contribute to the planned assessment of traps with regard to animal welfare aspects within the framework of the AIHTS.

Keywords: trapping, animal welfare, AIHTS, muskrat, *Ondatra zibethicus*, drowning traps

Kontakt: Pia Jandewerth, E-Mail: Pia.Jandewerth@Jki.bund.de

Kluge, Alexander; Nordmeyer, Henning

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

Verfahren der Bildverarbeitung zur Unkrauterkenennung

Weed recognition by image processing

Zusammenfassung

Es wurde ein System zur Bildanalyse von Unkräutern entwickelt. Unter Halfreilandbedingungen wurden Farbbilder von *Galium aparine* in Winterweizen bei verschiedenen Unkrautdichten und Verteilungsmustern angefertigt. Nach Segmentierungsschritten, die den Farbton berücksichtigen, wurden die Einzelpflanzen sowohl durch Vermessung, als auch durch das Verfahren des Template Matching klassifiziert. Mit diesen kombinierten Verfahren konnte eine mittlere Erkennungsrate bis 90% erreicht werden.

Stichwörter: Unkraut, *Galium aparine*, Bildanalyse, Farbkameras, Template Matching, Pattern Recognition, Farbfilter

Abstract

A system for image analysing of weeds was developed. Colour pictures of *Galium aparine* were taken in winter wheat with different weed densities and distribution pattern by tests in natural and controlled conditions. After steps of segmentation, which is affected by colour, plants were characterised by measuring and template matching. Using these combined methods a recognition rate up to 90% could be achieved.

Keywords: weed, *Galium aparine*, image analysis, colour camera, template matching, pattern recognition, colour filter

Einleitung

Landwirtschaftlich genutzte Böden enthalten eine Vielzahl von Unkrautsamen verschiedener Unkrautarten, die zum Teil über 10 Jahre lebensfähig sind. Daraus entwickelt sich alljährlich eine standortspezifische Unkrautflora. Die Unkräuter konkurrieren mit den Kulturpflanzen um die begrenzt verfügbaren Wachstumsfaktoren Wasser, Nährstoffe und Standortraum. Zur Sicherung der Erträge müssen daher Maßnahmen der Unkrautbekämpfung durchgeführt werden. Gegenwärtig beruht die Unkrautbekämpfung in Deutschland im Wesentlichen auf der Anwendung von Herbiziden. Die Herbizidanwendung erfolgt dabei im Allgemeinen einheitlich auf dem gesamten Ackerschlag ohne Berücksichtigung des räumlichen variierenden Unkrautvorkommens. Viele Untersuchungen zeigten jedoch, dass Unkräuter immer heterogen verteilt vorkommen, und dass eine Unkrautbekämpfung nicht immer auf dem gesamten Schlag durchgeführt werden muss (Häusler 1999, Oebel 2005). Bei Berücksichtigung des heterogenen Unkrautauftritts können erhebliche Einsparungen bei Herbizidmengen ohne Verlust der Bekämpfungsleistung erreicht werden (Nordmeyer 2006).

Eine Anpassung der Unkrautbekämpfung an die natürliche Variabilität des Unkrautvorkommens wird als Precision Farming in der Unkrautbekämpfung oder als teilflächenspezifische Unkrautbekämpfung bezeichnet. Dazu müssen jedoch das Vorkommen und die Verteilung der Unkräuter auf der Ackerfläche bekannt sein.

Voraussetzung ist, dass geeignete Verfahren zur Unkrauterfassung zur Verfügung stehen. Die erforderlichen Daten können z. B. bei einer manuellen Unkrautkartierung durch Feldbegehung erfasst werden. Dieses zeitaufwändige Verfahren ist für die landwirtschaftliche Praxis nicht geeignet (Gerhards 1996). Es werden automatische Verfahren mit hoher Flächenleistung zur Unkrauterkenntung benötigt. Für die Unkrauterkenntung eignen sich Bildanalyseverfahren basierend auf einer raumbezogenen Bilderkennung und -verarbeitung (z. B. Pflanzenerkennung über Formmerkmale) (Sökefeld 2007). Dazu werden verschiedene Ansätze verfolgt (z. B. Schuster et al. 2007). Die Erfassung der kleinräumigen Verteilungsmuster von Unkräutern ist eine große technische Herausforderung. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Unkräuter in Kulturpflanzenbeständen mittels Bildanalyse zu erkennen, um die Unkrautbekämpfung situationsgerecht, teilflächenspezifisch durchführen zu können.

Material und Methoden

Es wurden Bilder von Feldausschnitten (Winterweizen mit *Galium aparine*-Pflanzen) mit Hilfe digitaler Kameras, die über FireWire, einer genormten Schnittstelle, Daten mit dem Rechner austauschen, erstellt (Abbildung 1).

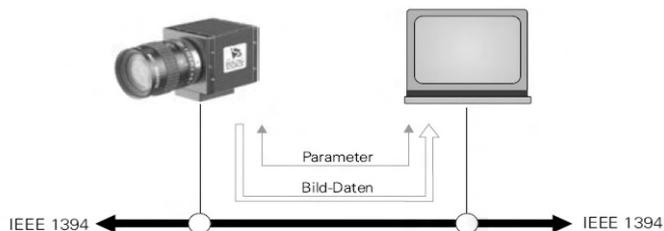


Abb. 1 Verbindung von Kamera und PC durch eine FireWire-Schnittstelle

Zusätzlich wurden Gefäßversuche mit Winterweizen und *Galium aparine* (GALAP) unter Halfreilandbedingungen durchgeführt. Dazu wurden Pflanzschalen (45 x 28 cm) mit Boden bis zu einer Höhe von 5 Zentimetern gefüllt. Es wurden zwei Reihen Winterweizen mit einem Reihenabstand von 12 cm und einem Kornabstand von 2 cm ausgesät. *Galium aparine* wurde zunächst gesondert ausgesät. Eine Woche

nach dem Auflaufen des Winterweizens wurden *Galium aparine*-Pflanzen im Entwicklungsstadium BBCH 10 in verschiedenen Dichten (0-80 Pflanzen/m² ≙ bis zu 10 Pflanzen/Schale) in die Pflanzschalen mit Winterweizen pikiert. Dabei wurden folgende Unkrautverteilungsmuster in den Pflanzschalen eingestellt:

- GALAP zwischen den Winterweizenreihen (zdR)
- GALAP in der Winterweizenreihe (idR)
- GALAP zwischen und in der Winterweizenreihe (zdR und idR)

Von den Pflanzen wurden täglich über einen Zeitraum von drei Wochen Bildaufnahmen erstellt, so dass Bilder über verschiedene Entwicklungsstadien vorliegen.

Für die Bildaufnahmen wurden die Pflanzschalen in eine Messvorrichtung, über der drei verschiedene Kameratypen in einer Höhe von 36 cm über dem Boden befestigt waren, gestellt und fixiert. Die erste Kamera (IEEE 1394a, FireWire) mit CMOS-Technologie, sowie die zweite Kamera (IEEE 1394a, FireWire) mit CCD-Technologie waren gegenüber dem senkrechten Lot mit einem Winkel von 2,3° gedreht, während die dritte Kamera (Digitale Kleinbildkamera, Chipkarte) senkrecht über der Szene (Pflanzschale) befestigt war (Abbildung 2).

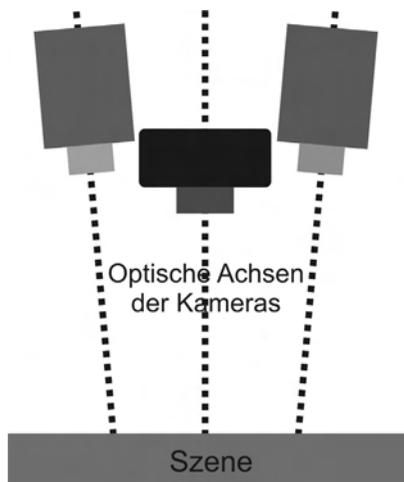


Abb. 2 Anordnung der drei verwendeten Kameras

Die Auflösungen der Bilder der FireWire-Kameras betragen jeweils 1,3 Megapixel (1280 x 960). Die Auflösung der Kleinbildkamera betrug 5 Megapixel im 4 zu 3 Format. Die Bilder wurden ohne Verarbeitung durch die in den Kameras abgelegten Algorithmen, d. h. ohne Informationsverluste, für eine spätere Verarbeitung im standardisierten DNG-Format (**D**igital **N**egative) gespeichert. Auf den Bildern sollte *Galium aparine* im Entwicklungsstadium BBCH 11 (erster Blattquirl) im Kulturpflanzenbestand erkannt werden. Es wurde eine Kameratechnik mit 3 Kameras gewählt, weil damit verschiedene Ansätze der Datengewinnung experimentell überprüft werden können. Im Wesentlichen bezieht sich das auf die Gewinnung von dreidimensionalen Bildern und die Arbeit mit unterschiedlichen Bildauflösungen.

Im ersten Verarbeitungsschritt wurden die Bilder mit Hilfe eines Histogrammausgleichs verbessert, da ohne künstliche Lichtquellen gearbeitet wurde. Der Histogrammausgleich ist eine mathematische Funktion, die den Wertebereich der aufgenommenen Pixelwerte auf die Pixelwerte, die ein Bild beinhalten kann, verteilt und damit die Dynamik des Bildes erhöht.

Im weiteren Verlauf der Bildverarbeitung werden die Pflanzen mit Hilfe eines grün-sensitiven Filters vom Hintergrund getrennt (Abbildung 3). Dabei hilft die vorherige Anwendung eines Gaußfilters (Unschärfe) die Objektgrenzen besser zu finden, da kleinere, störende Strukturen entfernt werden können. Mit Hilfe des Canny-Algorithmus werden die Objektkonturen ermittelt.



Abb. 3 Segmentierung der Pflanzen vom Hintergrund. (links: nach Segmentierung, rechts: Originalbild)

Alle geschlossenen Linienzüge gelten als ein eigenständiges Objekt. Objekte, die aus mehreren Pflanzen bestehen, müssen als solche erkannt und getrennt werden. Überlappende Objekte werden durch eine Abwandlung des Geometrischen Pattern Matching-Verfahrens (Quan 1996) gefunden. Dabei wird davon ausgegangen, dass nur bestimmte Grundformen existieren, die angenommen werden können. Zu große Abweichungen deuten auf mehrere Objekte hin. Die einzeln vorliegenden Objekte müssen als nächstes in Objektklassen, die eine Unkrautart repräsentieren, eingeordnet werden. Es wurden verschiedene geometrische Merkmale ausgewählt und für die Objekte (Pflanzen) berechnet. Dazu gehören z. B. der Ausdehnungsquotient, der Umfang, die Kompaktheit u. a. (Tabelle 1).

Tab. 1 Verwendete geometrische Merkmale

Geometrische Merkmale
Ausdehnungsquotient(Q) = $\frac{x - \text{Richtung}}{y - \text{Richtung}}$
Fläche(A) = Ausdehnung(x) * Ausdehnung(y)
Fläche _{kr} (A_{kr}) = Ausdehnung(x_{min}) * Ausdehnung(y_{min})
Umfang(U) = \sum Außenpixel (Obj)
Kompaktheit(C) = $4\pi \frac{\text{Fläche}}{\text{Umfang}}$
Fiberlänge(L_f) = $\frac{1}{4} \text{Umfang} - \sqrt{\text{Umfang}^2 - 16\text{Fläche}}$
Fiberbreite(B_f) = $\frac{\text{Fläche}}{L_f}$

Mit diesem Verfahren lässt sich ein Großteil der Objekte unterscheiden. Einige Objekt-/Pflanzenklassen überschneiden sich jedoch in ihren Merkmalsklassen. Für deren Unterscheidung müssen zusätzliche Verfahren angewendet werden. Eines der weiterführenden Verfahren ist das Template Matching (Burger & Burge 2006). Aus den Berechnungen in Tabelle 2, kann man weitere mathematische Merkmale wie z. B. Momente, also Angaben über die Lage des Objekts, berechnen. Daraus lässt sich die Transformationsmatrix bestimmen mit der das Objekt gedreht wird damit die längste Seite des Objekts waagrecht vorliegt. Diese Normierung wird deshalb nötig, weil das Template Matching nicht invariant gegenüber Rotationen ist.

Über ein Bild, welches aus diesen Objekten generiert wird, wird nun das Template, welches eine idealisierte Abbildung eines Blattquirls darstellt, verschoben und ein Distanzbild erzeugt. Mathematisch entspricht dies der Faltung von Bild und Template. Bei dem Distanzbild handelt es sich um ein Intensitätsbild (Grauwertbild), dessen Intensität einer Wahrscheinlichkeit zugeordnet wird. Daraus wird eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit getroffen, wie ähnlich die Objekte sind und geschlussfolgert, ob es sich um eine *Galium aparine*-Pflanze handelt oder nicht.

Allerdings steigt der Rechenaufwand, und damit die Bearbeitungszeit, mit der Größe des Templates und des Bildes, in dem das Template gesucht wird, exponentiell.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Erkennung von Unkräutern in Kulturpflanzenbeständen wurde ein Bildaufnahme- und analyseverfahren zur Identifikation von Unkräutern entwickelt. In einer ersten Entwicklungsstufe des Systems soll Kletten-Labkraut (*Galium aparine*) in Winterweizen erkannt werden. Mit Hilfe der beschriebenen Methoden wurden verschiedene Unkrautverteilungen und Unkrautdichten untersucht. Die Pflanzen zeigten bei den Entwicklungsstadien BBCH 10-12 zum Teil deutliche morphologische Unterschiede. Die Anzahl der Blätter eines Quirls von *Galium aparine* variierte zwischen 4 und 6 Blätter.

Tabelle 2 zeigt den Mittelwert, Min/Max-Werte und die Standardabweichung der Objektmerkmale aus Tabelle 1 aus einer Stichprobe von 400 Pflanzen. Die einzelnen Werte unterliegen einer großen Streuung. So liegen die Objektbreiten zwischen 87 und 546 Bildpixeln, die Länge zwischen 82 und 161 Bildpixel und daraus resultierend die Flächen zwischen 5556 und 58282 Pixeln. Da die Fiberlänge und Fiberbreite Abhängigkeiten zur Fläche aufweisen, findet man auch hier eine große Streuung der Werte zwischen 244 und 1192 Pixel der Fiberlänge und 21,2 und 57,5 Pixel für die Fiberbreite. Die Dezimalwerte nach der Kommastelle resultieren aus der mathematischen Berechnung.

Tab. 2 Geometrische Merkmale und Pixelanzahl im Entwicklungsstadium BBCH 10-12 der *Galium aparine*-Pflanzen (n = 400).

Merkmal [Pixel]	Mittelwert	Min	Max	Standardabweichung
Breite	273	87	546	43
Länge	121	82	161	20
Ausdehnungsquotient Q	2,3	0,76	4,14	0,47
Fläche A	22570	5556	58282	6028
Fläche kl. Rechteck A_{kr}	33151	8280	87906	8834
Umfang U	1047	477	1934	141
Kompaktheit C	0,267	0,144	0,417	0,040
Fiberlänge L_f	-598	-1192	-244	90
Fiberbreite B_f	-37,4	-57,5	-21,2	6,5

Tabelle 3 fasst die Ergebnisse für niedrige Unkrautdichten von *Galium aparine* zu verschiedenen Zeitpunkten zusammen. Dabei lässt sich feststellen, dass auf Grund der Ausbildung des Blattquirls die Erkennungsrate mit zunehmendem Entwicklungsstadium steigt. Bei etwas höheren Unkrautdichten fällt auf Grund der Überlappungen jedoch die Erkennungsrate wieder niedriger aus.

Tab. 3 Veränderung der Erkennungsrate von *Galium aparine* in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (BBCH-Stadium) der durchgeführten Versuche

Versuch	Galium aparine		Erkennungsrate	
	Unkrautdichte (Pfl/m ²)	BBCH 10-11	BBCH 12 (Blattquirl)	
I	24	62,5 %	87,5 %	
V	24	87,5 %	90,0 %	
III	32	86,7 %	70,0 %	

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse nach Durchlaufen der in Material und Methoden beschriebenen Schritte für alle untersuchten Unkrautdichten über einen Zeitraum von 6 Tagen. Es wird die Unkrautdichte und die Anordnung der *Galium aparine*-Pflanzen zum Winterweizen gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die daraus berechnete Erkennungsrate eine hohe Schwankungsbreite aufweist. Im Wesentlichen liegt die Erkennungsrate zwischen 64,3% und 78,6%. Bei Versuch II lässt sich mit 34,0% eine unterdurchschnittliche Erkennungsrate, die durch starke Pflanzenüberlappungen verursacht wird, feststellen.

Tab. 4 Erkennungsraten: Unterscheidung von *Galium aparine* und Winterweizen bei unterschiedlicher Unkrautverteilung (zufällig: sowohl innerhalb, als auch zwischen den Saatreihen) über einen Zeitraum von 6 Tagen zusammengefasst, BBCH 10-12

Versuch	Unkrautverteilung	<i>Galium aparine</i> (Unkrautdichte in Pflanzen/m ²)	<i>Galium aparine</i> bildanalytisch erkannt (Pflanzen)	Erkennungsrate (%)
I	zufällig	24	17 von 23	73,9
II	i.d. Kulturreihe	32	16 von 47	34,0
III	i.d. Kulturreihe	48	22 von 30	73,3
IV	zufällig	64	27 von 42	64,3
V	zufällig	80	22 von 28	78,6

Eine Abhängigkeit zwischen Erkennungsgüte und Unkrautdichte lässt sich nicht nachweisen, da bei Unkrautdichten von 24 oder 32 Pflanzen/m² ähnliche Erkennungsraten wie bei Unkrautdichten von 64 oder 80 Pflanzen/m² auftreten. Die Schwankungen in den Erkennungsraten lassen sich dadurch begründen, dass in Fällen mit höheren Erkennungsraten die *Galium aparine*-Pflanzen „frei“ standen und bei niedrigeren Erkennungsraten von der Kulturpflanze überdeckt wurden.

Die Segmentierung von Boden und Pflanze lässt sich mit Hilfe eines Grünfilters in hoher Geschwindigkeit durchführen. Beim Durchlaufen der einzelnen Bildpunkte kann gleichzeitig die Objektgröße und der Umriss erkannt werden. Effekte wie Farbsäume (Philipp 2004) konnten nicht beobachtet werden. Zum einen war kein Stroh in den Szenen vorhanden, und zum anderen wiesen die Kameras diesen Effekt nicht auf.

Die Erkennungsrate durch geometrische Merkmale war in Echtzeit möglich, erzielte aber nur eine mittlere Erkennungsrate von 72%. Für Pflanzen mit niedrigen Schadensschwellenwerten von beispielsweise 0,1 – 0,2 Pflanzen/m² wie *Galium aparine* ist diese Genauigkeit zu gering. Für Pflanzen mit höheren Schadensschwellenwerten (z. B. 20 bis 30 Pflanzen/m²) kann diese Erkennungsrate unter bestimmten Bedingungen ausreichend sein, wenn man dementsprechend die Schwellenwerte anpasst. Dies muss jedoch mit Hilfe von Simulationsrechnungen oder weiteren Experimenten verifiziert werden. Bei *Galium aparine* resultiert die geringe Erkennungsrate aus der Pflanzenmorphologie, da der Blattquirl aus einer unterschiedlichen Anzahl von Blättern bestehen kann. Dadurch erklären sich die hohen Abweichungen in der Fläche und den Messgrößen, die von der Fläche ebenso wie von Kompaktheit, Faserlänge und Faserbreite abhängen. Daher sollte eine andere Erkennungsmethode verwendet werden, die beispielsweise die Blätter des Quirls von *Galium aparine*, die in einem Kreis angeordnet sind, zählen kann.

Literatur

- Burger, W., Burge, M. J., 2006: Digitale Bildverarbeitung - Eine Einführung mit Java und ImageJ. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gerhards, R., Sökefeld, M., Knuf, D., Kühbauch, W., 1996: Kartierung und statistische Analyse der Unkrautverteilung in Zuckerrübenschlagen als Grundlage für eine teilflächenspezifische Bekämpfung. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 176, 259 – 266.
- Häusler, A., Nordmeyer, H., 1999: Characterizing spatial and temporal dynamics of weed seedling populations. *Proceedings 2nd European Conference on Precision Agriculture*, 463 – 472. Sheffield Academic Press.
- Nordmeyer, H., 2006: Patchy weed distribution and site-specific weed control in winter cereals. J. Stafford, ed., *Precision Agriculture*, 7, 219 – 231. Wageningen Academic Publishers.
- Oebel, H., Gerhards, R., 2005: Site-specific weed control using digital image analysis and georeferenced application maps: On-farm experiences. J. Stafford, ed., *Precision Agriculture*, 231 – 238. Wageningen Academic Publishers.
- Philipp, I., 2004: Development and use of automatic weed detection in sugar beet based on image processing. Diss., Universität Hannover.
- Quan, R.J., Huang, T.S., 1996: A Scale Space Based Deformable Template Matching Algorithm. In: *Advances in Imaging and Electronic Physics*, 1996, 1187 – 1192.
- Schuster, I., Nordmeyer, H., Rath, T., 2007: Comparison of vision-based and manual weed mapping in sugar beet. *Biosystems Engineering*, 98, 17 – 25.
- Sökefeld, M., Gerhards, R., Oebel, H., Therburg, R., 2007: Image acquisition for weed detection and identification by digital image analysis. J. Stafford, ed., *Precision Agriculture*, 523 – 528. Wageningen Academic Publishers.

Kontakt: Dipl.-Inform. Alexander Kluge, Email: Alexander.Kluge@jki.bund.de

Themen zum Pflanzenbau/Bodenkunde und weitere Themen

Moderation Dr. Ute Menge-Hartmann

Schick, Judith¹; Kratz, Sylvia¹; Adam, Christian²; Schnug, Ewald¹

¹Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig; ²Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin

Zum Düngepotential thermochemisch behandelter Klärschlammaschen – das EU-Projekt SUSAN

Fertilizing potential of thermochemically treated sewage sludge ashes – the EU-Project SUSAN

Zusammenfassung

Phosphor ist als Baustein von Eiweißen, organischen Basen, Enzymen und Vitaminen ein essentielles Element in der Pflanzenernährung und in seiner Funktion nicht durch ein anderes Element substituierbar. Da die Vorräte der Rohphosphate, die als Ausgangsprodukt für die Herstellung mineralischer P-Dünger dienen, von endlicher Natur sind, ist das P-Recycling aus sekundären Rohstoffquellen erstrebenswert. Ein geeigneter Sekundärrohstoff für die Herstellung P-haltiger Düngemittel ist aufgrund ihres hohen P-Gehaltes (6,5-11% P) die Klärschlammasche. Allerdings wird diese Eignung durch hohe Gehalte an umweltrelevanten Schwermetallen und einer im Vergleich zum Klärschlamm verhältnismäßig schlechten P-Verfügbarkeit eingeschränkt. Ziel des EU-Projektes SUSAN ist es, mittels eines thermochemischen Verfahrens die Schwermetallkonzentrationen von Klärschlammaschen unter die Grenzwerte in Europa gültiger nationaler Düngemittelverordnungen zu senken und eine Düngewirkung zu erzielen, die mit konventionellen Düngern vergleichbar ist. Im Labor und im Gefäßversuch wurde das agronomische Potential verschiedener aschebasierter Produkte getestet.

Stichwörter: P-Recycling, Klärschlammaschen, P-Dünger, P-Löslichkeit, Gefäßversuch

Abstract

Phosphorus is a constituent of proteins, organic bases, enzymes as well as vitamins and therefore an essential nutrient in the field of plant nutrition which can not be substituted by any other element. Since rockphosphate deposits are a finite, non-renewable resource, P-recycling from secondary raw materials is desirable to conserve this resource. Due to its high P-content (6,5-11% P) sewage sludge ash is a suitable raw material for the production of P-containing fertilizers. However, high heavy metal concentrations as well as a low P-bioavailability compared to sewage sludges diminish this suitability. The aim of the EU-project SUSAN is the production of a P-containing thermochemically treated sewage sludge ash, whose fertilizing potential is comparable to conventional P-fertilizers and whose heavy metal contents are below the threshold values of the European countries' national fertilizer ordinances. The agronomic potential of these ash-based products was tested in the laboratory as well as in greenhouse pot experiments.

Keywords: P-recycling, sewage sludge ash, P-fertilizer, P-solubility, greenhouse pot experiment

Einleitung

Klärschlämme enthalten für die Pflanzenernährung wichtige Makro- und Mikronährstoffe. Insbesondere eine ökologisch vertretbare Rückgewinnung des in den Klärschlämmen enthaltenen Phosphors ist hinsichtlich des Gedankens der Nachhaltigkeit zur Schonung der endlichen Phosphorressourcen wünschenswert. Derzeit können etwa 18 Mrd. t der Weltphosphatreserven als abbauwürdig erachtet werden; ihre statistische Lebensdauer liegt bei etwa 115 Jahren. Weitere 50 Mrd. t nachgewiesener Reserven sind noch nicht hinreichend untersucht oder zu heutigen Bedingungen nicht wirtschaftlich zu erschließen (Elsner, 2008). Bei einer direkten P-Rückgewinnung aus dem Klärschlamm oder der Klärschlammasche sind in Deutschland jährlich etwa 64000 t P rückgewinnbar. Bei einem Mineraldüngerabsatz von ca. 115646 t P/a (2006/2007) in der BRD wäre es demnach theoretisch möglich, etwa 55% der durch Mineraldünger gedüngten P-Menge mit aus Klärschlämmen rückgewonnenem Phosphor zu substituieren und so die Rohphosphatreserven zu schonen (Jardin, 2003; Industrieverband Agrar, 2008). Durch die Zufuhr von organischer Substanz (Humuswirkung) und Kalk erfolgt mit der Klärschlammaschubringung neben einer Düngewirkung auch eine Verbesserung der Bodeneigenschaften (Stadelmann et al., 2002).

Ungünstigerweise birgt aber der Einsatz unbehandelter Klärschlämme in der Landwirtschaft ein hohes Gefährdungspotential: Neben den für die Pflanzenernährung erwünschten Makro- und Mikronährstoffen gelangen durch Klärschlammdüngung auch eine Vielzahl von anorganischen und organischen Schadstoffen sowie Pathogene auf landwirtschaftlich genutzte Flächen; daher kann durch die Ausbringung von unbehandelten Klärschlämmen in der Landwirtschaft kein sicheres Recycling hinsichtlich einer Erzeugung qualitativ hochwertiger Nahrungsmittel und dem Erhalt der Bodenfruchtbarkeit erfolgen (Rogasik et al., 2003). Darüber hinaus zeigt der in Klärschlämmen enthaltene Phosphor im Vergleich zu mineralischen P-Düngern eine geringere Pflanzenverfügbarkeit (Gutser, 1996). Die durch die landwirtschaftliche Nutzung von Klärschlämmen entstehenden Vor- und Nachteile für Umwelt, Landwirtschaft und nicht zuletzt für die Wirtschaft werden je nach Interessenlage von den Befürwortern und Gegnern der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung mehr oder weniger deutlich in den Vordergrund gerückt und seit langem heftig diskutiert. Auch die landwirtschaftliche Verwendung der aus der Monoverbrennung von Klärschlämmen stammenden Klärschlammaschen ist nicht uningeschränkt zu empfehlen. Zwar werden durch die Verbrennung die organischen Schadstoffe reduziert oder aber vollständig entfernt, es erfolgt aber durch Massenverlust eine Aufkonzentrierung der enthaltenen anorganischen Schadstoffe teilweise auf ein Niveau über den Grenzwerten der Düngemittelverordnung (DüMV). Durch eine thermochemische Behandlung der Klärschlammaschen kann die weitgehende Schwermetallentfrachtung erreicht und somit die ökologisch vertretbare landwirtschaftliche Verwertung gewährleistet werden. Eine wichtige Voraussetzung für diesen Prozess ist die Verbrennung der Klärschlämme in Mono-Verbrennungsanlagen, denn die Mitverbrennung mit phosphorarmen Abfällen führt zu geringeren P-Gehalten in der Asche. Während der auf die Verbrennung folgenden Behandlung der Klärschlammaschen werden diese mit einem Chlordonator ($MgCl_2$ oder $CaCl_2$) gemischt und bei etwa 850-1000 °C im Drehrohrofen thermochemisch behandelt. Durch die Bildung flüchtiger Schwermetallchloride und -oxichloride, die im Reaktor verdampfen und im Abgasreinigungssystem aus der Gasphase abgeschieden werden, kommt es zu einer Schwermetallentfrachtung der Asche. Des weiteren erfolgt eine Neubildung der phosphorhaltigen mineralischen Phasen, die eine verbesserte Pflanzenverfügbarkeit aufweisen als die Mineralphasen in der unbehandelten Klärschlammasche (Adam et al., 2008). Ein Ziel des EU-Projektes SUSAN ("Sustainable and Safe Re-Use of Municipal Sewage Sludge for Nutrient Recovery") ist neben der technischen Entwicklung des thermochemischen Verfahrens die Ermittlung des Düngepotentials thermochemisch behandelter Klärschlammaschen im Labor und im Gefäßversuch.

Material und Methoden

Um das Düngepotential thermochemisch behandelter Klärschlammaschen zu untersuchen, wurde im Jahr 2007 ein 10-wöchiger Gefäßversuch mit Mais und 8 aschebasierten reinen P-Düngern durchgeführt. Die getesteten Produkte unterschieden sich hinsichtlich ihrer Ausgangsasche (KSA1 – eisenarm [2,24% Fe] und aluminiumreich [13,2% Al] oder KSA2 – eisenreich [11,4% Fe]), dem verwendeten Chlordonator ($CaCl_2$ oder $MgCl_2$), der Beheizungstechnik (direkt [Gasfeuerung] oder indirekt [elektrisch]) und zusätzlicher Nachbehandlung mit oder ohne H_2SO_4 -Teilaufschluss (Zugabe von 15 Massenprozent einer 94 %igen H_2SO_4). Die thermochemische Behandlung aller Produkte erfolgte für 30 min bei 1000 °C; für die Behandlung von 1 kg Asche wurden 150 g Cl in Form des jeweiligen Chlordonators ($MgCl_2$ oder $CaCl_2$) zugegeben. Zur Kontrolle wurden für den Gefäßversuch zusätzlich eine Variante eines marktüblichen P-Düngers (SSP 18%) sowie eine Variante ohne jegliche P-Gabe (Nullvariante) angesetzt. Als Versuchssubstrat diente pro Gefäß 8 kg eines Gemisches aus einem anmoorigen Boden und Sand, dessen P_{CAL} -Gehalt bei 52 mg/kg lag. Die P-Gabe erfolgte in 3 Stufen (250-500-750 mg P/Gefäß). Jede Variante wurde in 4 Wiederholungen angesetzt und mit gleichen Mengen der Nährstoffe N, K, Ca, Mg und S versorgt. Nach der Ernte erfolgte nur eine Weiterverarbeitung der oberirdischen Pflanzenteile, die Wurzeln der Versuchspflanzen wurden nicht weiter berücksichtigt. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden im Trockenschrank bei einer Temperatur von 65 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach der Trockenmassenbestimmung wurden die Pflanzen in einer Schwingscheibenmühle mit Zirkonoxideinsatz vermahlen und mittels Mikrowellenaufschluss (HNO_3 [6 ml] und H_2O_2 [1,5 ml]) aufgeschlossen.

Das Versuchssubstrat wurde luftgetrocknet und auf 2 mm gesiebt. Die Ermittlung des verfügbaren P-Gehaltes im Versuchsboden nach der Ernte erfolgte mittels CAL-Extraktion (nach Schüller, 1969). Die P-Gehalte der Extrakte wurden colorimetrisch bestimmt (nach Murphy und Riley, 1962).

Die P-Löslichkeiten der im Gefäßversuch verwendeten Produkte in unterschiedlich starken Extrakten wurde nach den Methoden der DüMV ermittelt. Die verwendeten Extrakte waren (der Stärke nach geordnet): Wasser (W) <alkalisches Ammoniumcitrat (AAC) <Wasser+neutrales Ammoniumcitrat ($W_{FN}+NAC_{FN}$) <2%ige Zitronensäure (CA) <2%ige Ameisensäure (FA).

Ergebnisse

P-Löslichkeiten thermochemisch behandelter P-Dünger und Kontrolldünger: Die Wasserlöslichkeit der im Gefäßversuch getesteten aschebasierten P-Dünger ohne nachträglichen Teilaufschluss ist im Gegensatz zum sehr gut löslichen Kontrolldünger nur sehr gering (Tabelle 1). Ein Teilaufschluss thermochemisch behandelter Aschen führt zu einem

Tabelle 1: P_{KW}-Gehalt (%) and P-Löslichkeiten (% P_{KW}) der im Gefäßversuch verwendeten Dünger

Dünger	P-KW (%)	W (% P-KW)	AAC (% P-KW)	FNW+FNC (% P-KW)	CA (% P-KW)	FA (% P-KW)
KSA2/CaCl ₂ [dir]	8,4	0,1	1,9	15	67	51
KSA2/MgCl ₂ [ind]	7,6	0,1	7,1	29	92	84
KSA2/CaCl ₂ [ind]	7,2	0,0	0,4	16	90	82
KSA2/CaCl ₂ [dir] + H ₂ SO ₄	7,0	25	26	40	88	75
KSA2/CaCl ₂ [ind] + H ₂ SO ₄	6,5	34	40	45	100	78
KSA1/CaCl ₂ [dir]	7,9	0,3	2,4	14	72	46
KSA1/CaCl ₂ [ind]	7,0	0,1	7,4	17	81	64
KSA1/MgCl ₂ [ind]	7,4	0,5	13	43	96	77
SSP 18% (Kontrolle)	11,8	78	82	84	87	89

KSA: Klärschlamm-asche; ind: indirekt beheizter Drehrohrofen/dir: direkt beheizter Drehrohrofen, +H₂SO₄: teilaufgeschlossen (Zugabe von 15 w-% einer 94%igen Schwefelsäure)

deutlichen Anstieg der Wasserlöslichkeit. Dabei zeigt die im indirekten Drehrohrofen beheizte, nachträglich aufgeschlossene Asche höhere Werte als die im direkten Drehrohrofen beheizte Asche. Eine bessere Löslichkeit der im indirekt beheizten Drehrohrofen behandelten Aschen lässt sich mehr oder weniger deutlich bei allen aschebasierten Produkten in allen Extrakten beobachten. Auch führt die Verwendung von MgCl₂ als Chlordonator im Vergleich zu CaCl₂ zu deutlich höheren P-Löslichkeiten in allen Extrakten. In weniger starken Extrakten (AAC und FNW+FNC) liegt die Löslichkeit der aschebasierten Produkte deutlich unter der Löslichkeit des Kontrolldüngers. Bei den stärkeren Extrakten (CA und FA) weisen insbesondere die mit MgCl₂-behandelten aber auch die indirekt beheizten CaCl₂-Aschen Löslichkeiten auf, die mit den Ergebnissen des Kontrolldüngers vergleichbar sind.

Gefäßversuch: Im Vergleich zum Ertrag der Nullvariante zeigen die meisten Varianten die stärkste Trockenmasseertragssteigerung zur P-Stufe 500, während mit einem weiteren Anstieg der P-Gabe zur P-Stufe 750 eine Tendenz stagnierender oder rückgängiger Erträge zu beobachten ist. Ausnahmen bilden die unter direkter Beheizung produzierten CaCl₂-Dünger, die erst bei P-Stufe 750 den stärksten Trockenmasseertrag zeigen, und das Superphosphat, dessen Ertrag steigender P-Stufe kontinuierlich ansteigt. Eine genauere Betrachtung der als annähernd optimal anzusehenden P-Stufe 500 zeigt, dass die mit MgCl₂ behandelten, sowie die nachträglich teilaufgeschlossenen Varianten einen Trockenmasseertrag erreichen, der sich auf der einen Seite nicht signifikant von jenem des gut wasserlöslichen Kontrolldüngers (Superphosphat) unterscheidet und auf der anderen Seite signifikant höher als der Ertrag der Nullvariante ist (Abbildung 2). Die Trockenmasseerträge der mit CaCl₂ behandelten und nicht nachträglich aufgeschlossenen Produkte unterscheiden sich dagegen nicht signifikant von dem der Nullvariante. Aus Abbildung 3 geht hervor, dass die P-Aufnahme der SSP-Kontrollvariante am höchsten ist und mit steigender P-Gabe ebenfalls zunimmt.

Mit steigender P-Gabe zeigen auch die MgCl₂- und teilaufgeschlossenen CaCl₂-Varianten ansteigende P-Aufnahmen, die zwar tendenziell über jenen der CaCl₂-Varianten und Nullvariante liegen, sich aber nicht signifikant von ihnen unterscheiden. Eine Ausnahme bilden die teilaufgeschlossenen Varianten bei P-Stufe 750, dort ist eine P-Aufnahme zu beobachten, die signifikant über der Aufnahme der Nullvariante liegt, dennoch auf einem signifikant niedrigerem Niveau als die Aufnahme der SSP-Variante (hier nicht gezeigt). Für den P_{CAL}-Gehalt im Versuchssubstrat nach der Ernte zeigen neben dem SSP auch die mit MgCl₂ behandelten und nachträglich teilaufgeschlossenen Varianten steigende Werte mit steigender P-Stufe, allerdings auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die SSP-Kontrollvariante (Abbildung 4). Im Gegensatz dazu ist für die CaCl₂-Varianten im Substrat trotz steigender P-Gabe kein Anstieg der Gehalte an verfügbarem P im Substrat zu erkennen.

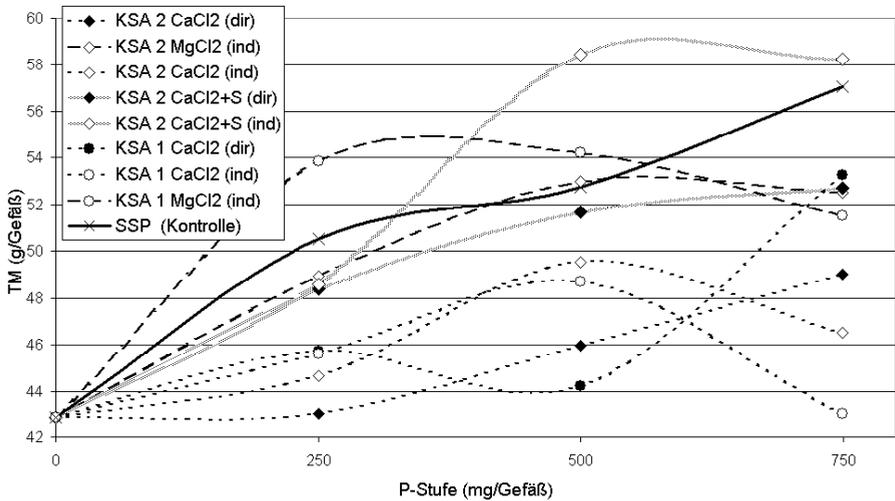


Abb. 1 TM-Ertrag Mais (g/Gefäß) (alle P-Stufen) nach 10 Wochen

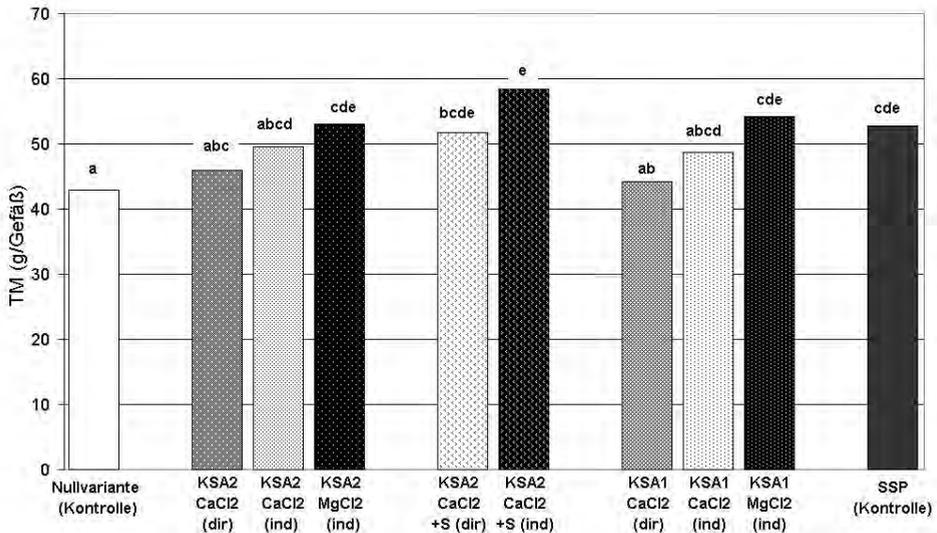


Abb. 2 Trockenmasseerträge P-Stufe 500 mg P/Gefäß nach 10 Wochen, Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Differenzen (nach Tukey ($p < 0,05$))

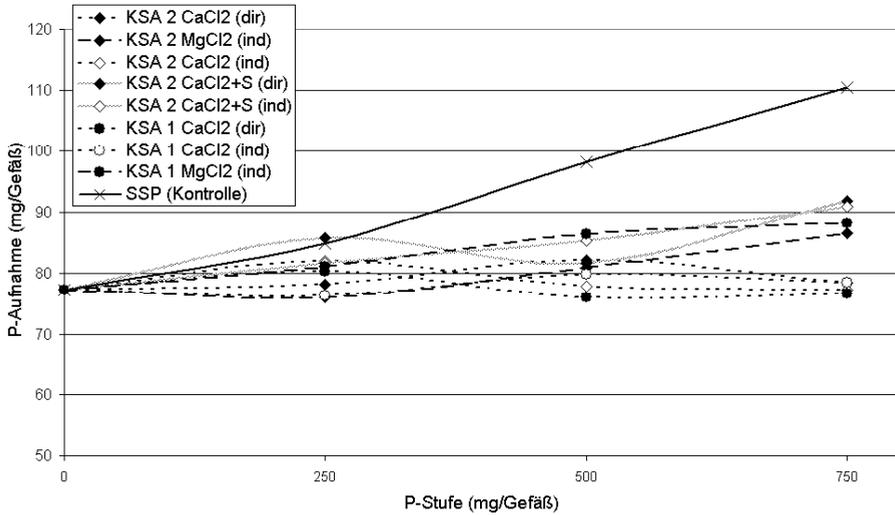


Abb. 3 P-Aufnahme Mais (mg/Gefäß) (alle P-Stufen) nach 10 Wochen

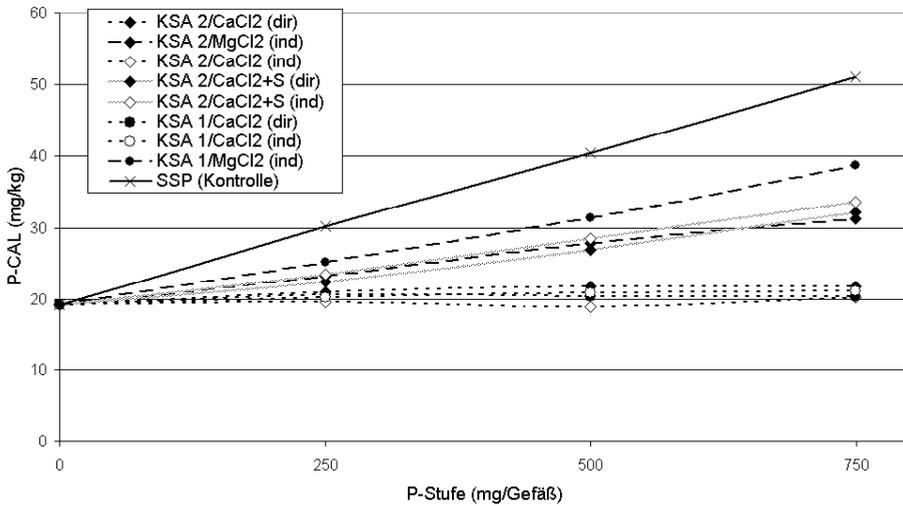


Abb. 4 P_{CAL}-Gehalte im Substrat nach Versuchsende (mg/Gefäß) (alle P-Stufen) nach 10 Wochen

Diskussion

P-Löslichkeiten thermochemisch behandelter Klärschlammaschen: Die sehr schlechte Wasserlöslichkeit (unter 1% des Gesamt-P-Gehaltes) und auch relativ geringe P-Löslichkeit in AAC der thermochemisch behandelten Aschen lässt vermuten, dass es durch die thermochemische Behandlung nur in sehr geringem Maße zur Bildung gut wasserlöslicher und schnellverfügbarer Phosphate (Monocalciumphosphat [MCP]) oder wasserunlöslichen, aber pflanzenverfügbaren P-Fractionen (z.B. Dicalciumphosphat oder pflanzenverfügbare Fe-Al-Phosphate) kommt (Kratz und Schnug, 2009). Aufgrund der schlechten P-Löslichkeit in Wasser und AAC ist anzunehmen, dass in thermochemisch behandelten Klärschlammaschen schlechter lösliche P-Verbindungen vorliegen, wie z.B. Apatite, die, allerdings wie aus der Literatur bekannt, z.T. in stärkeren Extraktionsmitteln wie CA und FA löslich sind (Kratz und Schnug, 2009). Dem entsprechen auch die hohen P-Löslichkeiten der behandelten Aschen in CA und FA. Mittels einer XRD-Analyse unbehandelter und behandelter Klärschlammaschen konnte die Bildung von Chlorapatit während des thermochemischen Prozesses bestätigt werden (Adam et al., 2008). Die besseren Löslichkeiten der $MgCl_2$ -Varianten in den schwächeren Extrakten außer Wasser deuten darauf hin, dass es bei der Behandlung mit $MgCl_2$ im Vergleich zur $CaCl_2$ -Behandlung zu einer erhöhten Bildung gut löslicher Phosphate kommt. Aufgrund von Ergebnissen der Röntgendiffraktometrie ist hier insbesondere an das Magnesiumphosphat Farringtonit [$Mg_3(PO_4)_2$] und das Magnesium-/Calciumphosphat Stanfieldit [$Ca_4Mg_5(PO_4)_6$] zu denken, die eindeutig als wesentliche Bestandteile in den $MgCl_2$ -Varianten identifiziert werden konnten (Peplinski et al., 2008). Auch in den stärkeren Extrakten CA und FA zeigen insbesondere im direkt beheizten Drehrohrföfen behandelten $CaCl_2$ -Varianten deutlich geringere Werte als die $MgCl_2$ -Varianten. Möglicherweise werden bei der Verwendung von $CaCl_2$ bei der thermochemischen Behandlung verstärkt Phosphate gebildet, die nur mineralisäurelöslich und somit nicht pflanzenverfügbar sind. Der nachträgliche Teilaufschluss behandelter Aschen mit H_2SO_4 führt offensichtlich zu einer Umbildung eines Anteils der vorhandenen, schlecht löslichen in schnell verfügbare Phosphatverbindungen. Die hohen P-Löslichkeiten des vollaufgeschlossenen Kontrolldüngers in Wasser und AAC (78 und 82%) zeigen, dass diese Phosphate zu einem hohen Anteil schnell verfügbar sind.

Wirksamkeit im Vegetationsversuch: Betrachtet man die Parameter Trockenmasseertrag, P_{CAL} im Substrat und P-Aufnahme in Bezug zu den verwendeten Chlordonatoren zeigen sich deutliche Unterschiede. Während das mit $CaCl_2$ behandelte Produkt im Vergleich zur (Null-)Kontrolle praktisch keinen Einfluss auf die Trockenmasse hat, kann nach der Düngung mit $MgCl_2$ -Varianten ein Düngeeffekt beobachtet werden. Die Trockenmasseerträge dieser Varianten waren mit denen der SSP-Kontrolle vergleichbar. Wie schon die Ergebnisse der P-Löslichkeiten andeuteten, enthalten die thermochemisch behandelten Aschen aufgrund des verwendeten Chlordonators unterschiedlich gut lösliche und verfügbare Phosphatverbindungen, die in einem 10-wöchigen Gefäßversuch signifikant unterschiedliche Trockenmassen erzielen. Da die P_{CAL} -Werte im Versuchssubstrat der $CaCl_2$ -Varianten keine Reaktion auf steigende P-Gaben zeigen, ist zu vermuten, dass es im Substrat dieser Varianten zu einer Immobilisierung der Düngerphosphate kommt. Möglicherweise erfolgt dies durch die Bildung schwerlöslicher Calciumphosphate, die durch höhere Ca-Gehalte im Substrat infolge der Düngung mit $CaCl_2$ -Varianten begünstigt wird. Von einer drastisch sinkenden P-Verfügbarkeit von Ca-Phosphaten, wenn ihr Ca-Gehalt über dem des $CaHPO_4$ (=29,4% Ca) liegt, berichtet ebenfalls Römer (2006). Es ist anzunehmen, dass bei zu hohen Ca-Gehalten Tricalcium- oder Octocalciumphosphate und apatitische Phosphate ausfallen, die „von sauren Moorböden abgesehen, als P-Dünger ineffektiv“ sind. Offenbar tritt dieses Phänomen auch bei den thermochemisch behandelten $CaCl_2$ -Varianten auf, auch wenn deren Ca-Gehalt bei max. 21% liegt. Durch den nachträglichen Teilaufschluss mit H_2SO_4 werden offensichtlich ein Teil der schwer löslichen Phosphate in den mit $CaCl_2$ -behandelten Varianten in gut lösliche und verfügbare Formen umgewandelt, wodurch ein Trockenmasseertrag auf dem Niveau eines konventionellen Superphosphates erreicht werden kann. Allerdings belegen P-Aufnahme und P_{CAL} -Gehalt im Substrat, dass ein konventionelles SSP im Vergleich zu allen aschebasierten Varianten in einer Vegetationsperiode von 10 Wochen deutlich höhere Mengen lösliches und verfügbares P zur Verfügung stellt.

Abschließend lässt sich für die getesteten thermochemisch behandelten Klärschlammaschen sagen, dass die mit $MgCl_2$ behandelten Produkte trotz ihrer sehr geringen Wasserlöslichkeit eine gute P-Verfügbarkeit haben. Dies spiegelt sich in Trockenmasseerträgen wider, die mit denen konventioneller P-Dünger vergleichbar sind. Die Pflanzenverfügbarkeit von Ca-Phosphaten ist dagegen nur sehr gering, daher ist besonders für diese Varianten ein nachträglicher Teilaufschluss empfehlenswert, um Trockenmasseertrag und P-Aufnahme der Pflanzen zu erhöhen.

Literatur

- Adam, C., Peplinski, B., Kley, G., Kratz, S., Schick, J., Schnug, E., 2008: Phosphorrückgewinnung aus Klärschlammaschen - Ergebnisse aus dem EU-Projekt SUSAN. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft (ÖWAW)* **3/4**: 55-64.
- Elsner, H., 2008: Stand der Phosphat-Reserven weltweit. Beitrag zu den Braunschweiger Nährstofftagen 2008. [online] http://www.jki.bund.de/cln_045/nn_1269000/DE/veroeff/bs__naehrstofftage/2__Elsner.pdf.html (letzter Zugriff: 11.12.2008)
- Gutser, R., 1996: Klärschlamm und Kompost als Sekundärrohstoffdünger. *VDLUFA-Schriftenreihe* **44**: 29-43. *Industrieverband Agrar* (2008) [online] http://www.iva.de/fachliches/ern_production_market.asp?r=B8F86A7C-D08A-46E9-966E-417C5E647994 (letzter Zugriff: 15.11.2008)
- Jardin, N., 2003: Phosphorbilanz bei der Abwasser- und Klärschlammbehandlung. 66. Darmstädter Seminar. Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlamm und Klärschlammasche. 07.11.2002. *Schriftenreihe WAR, Darmstadt*. S. 17-31.
- Kratz, S., Schnug, E., 2009: Zur Frage der Löslichkeit und Pflanzenverfügbarkeit von Phosphor in Düngemitteln. *Journal für Kulturpflanzen* **61** (1), 2-8.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962: A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta* **27**: 31-36.
- Peplinski, B., Adam, C., Michaelis, M., Kley, G., Emmerling, F., Simon, F.-G., 2008: Reaction sequences in the thermochemical treatment of sewage sludge ashes revealed by X-ray powder diffraction – A contribution to the European project SUSAN. 11. European Powder Diffraction Conference (EPDIC-11), Conference proceedings.
- Rogasik, J., Rosyadi, I., Fan, X., Fleckenstein, J., Haneklaus, S., Scholz, R., Schnug, E., 2003: Phosphorpotenziale von Tiermehl und Schlachtabfällen sowie Möglichkeiten des Phosphorrecyclings. Symposium „Rückgewinnung von Phosphor in der Landwirtschaft und aus Abwasser und Abfall.“ Tagungsband zum Symposium, Berlin, 06-07.02.2003. S. 8/1-8/11.
- Römer, W., 2006: Pflanzenverfügbarkeit von Phosphat aus P-Recycling-Produkten. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169**: 826-832.
- Schüller, H., 1969: Die CAL-Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphats im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **123**: 48-64.
- Stadelmann, F.X., Külling, D., Herter, U., 2002: Klärschlamm: Dünger oder Abfall. *EAWAG news* **53**: 9-11.

Kontakt: Judith Schick, judith.schick@jki.bund.de

Al Hassoun, R.; Rogasik, J.; Stöven, K.; Schnug, E.

Julius Kühn-Institute, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

Soil infiltration as affected by the age and ecological groups of earthworm population

Die Einflüsse des Alters und der ökologischen Gruppen von Regenwürmern auf die Infiltrationsrate des Bodens

Abstract

The earthworm population was investigated in differently fertilized plots of a long term field experiment in Braunschweig. The investigation was conducted in order to estimate the different impacts of the earthworm population as abundance, biomass, age and ecological groups on the water infiltration rate of agricultural soils. The results revealed that the effect of earthworm abundance on soil infiltration rate was greater compared to the effect of earthworm biomass. The numbers of juvenile individuals were higher and more effective on infiltration than numbers of adult individuals. The soil infiltration rate was found significantly associated with the ecological groups of earthworms.

Keywords: Infiltration, Earthworms, Abundance, Biomass

Zusammenfassung

Die im Boden lebenden Regenwürmer eines Dauerfeldversuches mit unterschiedlicher Düngung in Braunschweig wurden untersucht. Die Untersuchung wurde durchgeführt, um die Wirkung verschiedener Eigenschaften der Regenwurmpopulation wie Regenwurmabundanz, Biomasse, Entwicklungsstufe und ökologischer Funktion auf die Wasserinfiltration des Bodens zu zeigen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Einfluss der Regenwurmabundanz den Einfluss der Regenwurmbiomasse übertraf. Der höhere Anteil juveniler Regenwürmer zeigte einen größeren Einfluss auf die Infiltrationskapazität als die Anzahl adulter Individuen. Die Infiltrationsrate des Bodens war signifikant mit den ökologischen Gruppen der Regenwürmer verknüpft.

Stichwörter: Infiltration, Regenwürmer, Vorkommen, Biomasse

Introduction

Soil infiltration is considered as an essential agent to reduce the risk of water erosion, support water storage capacity and mitigate the risk of temporal flooding of soil during heavy rainfall events (Rogasik et al., 2004). Thus, it can be concluded that water infiltration is an active preservative means of soils against erosion induced by surface runoff (Shainberg and Levy, 1995). In addition, infiltration has many beneficial functions in the agricultural treatments. Infiltration provides water requirements of vegetation growth and it supports the ground water supply to wells and springs. Elevated soil water infiltration rates are associated with high earthworm activity in the soil (Edwards et al., 1988). Earthworms, through burrowing activity and casting, can significantly affect soil properties. The worms produce bio-channels in the soil, which facilitate root development and support water and air flow inside the soil (Lee, 1985). Earthworms create stable vertically macro-pores with high continuity, which provide water flow paths resulting in increased infiltration rates (Rogasik et al., 2004). Shallow-dwelling worms produce small channels throughout the topsoil enhancing overall porosity and improving water and air relationships. In addition, the deep worms generate large vertical channels which can greatly increase water infiltration while extraordinary rainfall events (Kladivko, 1993). Earthworm species can be divided into three main ecological groups. The first group, "epigeic", surface-dwelling, they live above the mineral soil surface in the litter layers, they have no burrows and they have a dark red color and small volume. The second group, topsoil species or "endogeic", they inhabit mineral soil horizons and feed on soil organic matter, they produce permanent burrows opening to soil surface and they are unpigmented and medium in volume. The third group, subsoil species or "aneicic", they feed on dead leaves, they create permanent and vertical burrows below surface and they have red to brown color and very large volume (Lee, 1985).

Material and methods

Experimental design: Three differently fertilized plots with 4 replicates were studied in long term field experiment in Braunschweig (Table 1). The three plots were planted with winter rapeseed under conventional tillage.

Tab. 1 Experimental design for the studied plots (Braunschweig, 2006)

Treatments	N (Kg ha ⁻¹)	P	K	Organic (t ha ⁻¹)
NPK	250	45	120	0
FYM	0	0	0	12.8
NPK+FYM	100	45	120	12.8

FYM = Farm yard manure

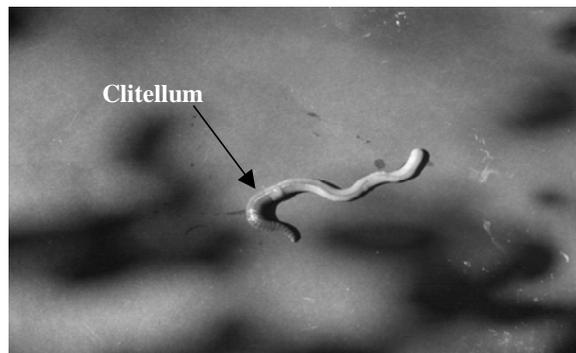
The soil type of the investigated plots can be characterized based on the German classification system (KA 5) as listed in Table 2.

Tab. 2 Soil texture of the studied plots

	topsoil	subsoil
NPK	sandy silt	strong silty sand
FYM	sandy silt	sandy silt
NPK+FYM	sandy silt	strong silty sand

Infiltration measurement: Soil infiltration rate has been measured using Hood Infiltrometer. It is a device devoted for measuring the soil hydraulic conductivity near the saturated zone in field. Infiltration measurements based on the pressure applied in the water-filled hood that is connected to the soil surface (Schwärzel and Punzel, 2007). The Hood Infiltrometer consists of acrylic column with a capacity of 5 liters (Marriott – water supply), a hood with 24 cm diameter, tension-chamber with 24 cm diameter and U-pipe manometer. Soil infiltration has been measured with 4 replicates. The infiltration measurement was conducted by connecting the hood to the Marriott firmly and placing it on the soil surface. Then, the hood was filled gradually with water to the mark from Marriott bottle and infiltration measurement started after raising the water inside the standpipe of the hood to the scale 20 and closing the Marriott tap. The measurement readings were recorded for each minute for getting steady state infiltration rate.

Earthworm sampling: Earthworms have been sampled from the studied plots on the basis of International Standard (ISO, 2003) and Lee (1985). The earthworm sampling method based on the combination of hand-sorting and formalin extraction of worms from soil. Sampling was accomplished in autumn time. Four points were selected at each trial plot to extract earthworms. At each point, the soil was excavated from a square of 50*50 cm to a depth of 20 cm and spread on a plastic sheet and searched carefully by hand for earthworms. During the hand-sorting, 5 liters of 0.5% formalin solution was carefully applied with two doses into the sampling hole. The hole was carefully observed during the application of formalin and the earthworms appearing on the soil surface of the sampling hole were collected by forceps. The formalin solution used in sampling was prepared by diluting 25 ml formalin (37%) in 5 liters water. The fresh weight of earthworm equaled the weight obtained by balance minus 10% as the weight of soil content in the gut. Earthworm biomass was expressed as dry weight of the population per square meter by converting the fresh weight to dry weight using a factor of 15% (dry substance). The earthworm age was identified using the dissecting lens. Adult earthworms had a collar called “clitellum” in the front part of the body whereas juvenile individuals had no “clitellum” (Picture).



Picture Adult worm has “clitellum” in the front part of the body near the head. The total earthworm abundance was expressed as number of individuals per square meter.

Results: The earthworm populations obviously varied among the differently fertilized plots where differences in earthworm abundance and biomass have been observed (Table 3).

Tab. 3 Earthworm abundance and biomass for different fertilization treatments (Braunschweig, 2006)

	NPK	FYM	NPK+FYM
Abundance (worms m ²)	50 a	64 b	60 b
Biomass (g m ²)	27 a	39 b	41 b

Mean values followed by the same letters are not significantly different by Duncan’s test at 0.05 Levels.

It was found that earthworm abundance and biomass were significantly greater in the organic (FYM) and combined (NPK+FYM) fertilized plots compared to the mineral (NPK) fertilized plot. No significant differences were noted in earthworm abundance and biomass between organic and combined fertilized plots. The differences in earthworm abundance and biomass between the studied plots were accompanied with variations in soil infiltration rate (Figure 1).

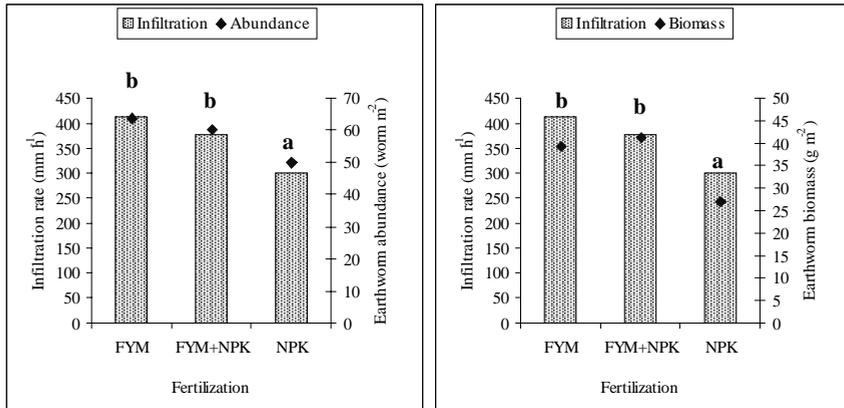


Fig. 1 Soil infiltration rate as affected by earthworm abundance and biomass for different fertilization treatments (Braunschweig, 2006)
 Mean values followed by the same letters are not significantly different by Duncan's test at 0.05 Levels

As can be seen in Figure 1, the high infiltration rates were markedly associated with high earthworm abundance and biomass. However the relationship between soil infiltration rate and earthworm abundance as well as the relationship between soil infiltration rate and earthworm biomass are depicted in Figure 2. It can be noted in Figure 2 that the soil infiltration rate was significantly influenced by earthworm abundance and biomass. It can be observed that the relationship between soil infiltration rate and earthworm abundance was stronger compared to earthworm biomass. The numbers of juvenile individuals were found higher than numbers of adult individuals in all studied plots except of the organic fertilized one where similar numbers of juvenile and adult worms were found (Table 4).

Tab. 4 The age of earthworm population for different fertilization treatments (Braunschweig, 2006)

Treatments	Earthworms age	
	Juvenile	Adult
NPK	30	20
FYM	31	33
NPK+FYM	37	23

Regression analysis revealed that the ecological groups of earthworm population differently affected infiltration. The results reported that epigeic individuals had no significant effect on infiltration rate, whereas endogeic and anecic individuals had significant influences on infiltration with R² of 0.80 and 0.73 respectively.

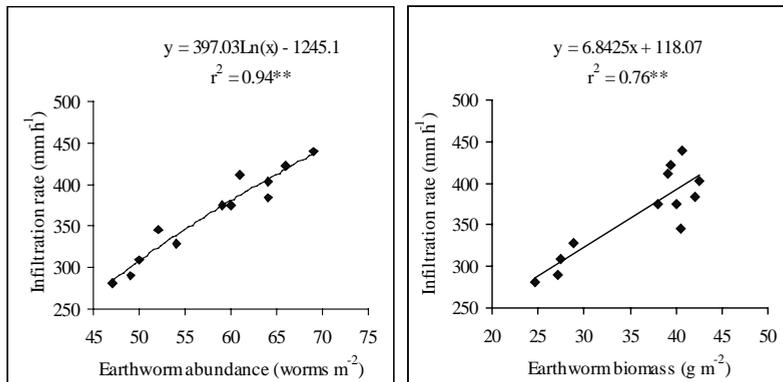


Fig. 2 Relationship between soil infiltration rate and earthworm abundance and biomass (Braunschweig, 2006)

Discussion

The increases occurred in earthworm abundance and biomass in the organic and combined fertilized plots can be attributed to the high soil organic carbon content induced by organic fertilizers. This proves that earthworm number and biomass are positively correlated with the organic matter content of the soil (Edwards and Bohlen, 1996). As the relationship between soil infiltration rate and earthworm abundance was stronger compared to earthworm biomass, it can be deduced that earthworm abundance has greater effect on water infiltration rates of soil in comparison with earthworm biomass. This result tends to be consistent with other studies which revealed that the greater earthworm number results in higher number of burrows which in turn contributes to higher infiltration rate of soil (Shipitalo et al., 2004).

It seems that the high number of small earthworms, related to high number of channels, is more active for infiltration than less number of big earthworms related to less number of channels that support water infiltration in the soil. Higher numbers of thin channels throughout the soil will support infiltration more than less numbers of wide channels especially under soil compaction conditions. The increase of juvenile worms number, compared to adult worms number, is in agreement with the other researches which reported that the numbers of juvenile worms are higher than adult ones in the earthworm populations of most soils (Raw, 1962). As young worms are much more than mature worms and since soil infiltration rate significantly related to earthworm numbers, it can be concluded that juvenile worms had stronger impact on infiltration compared to adult worms. Endogeic and anecic worms create permanent burrows in the soil while epigeic worms never produce burrows in the soil (Lee, 1985). Therefore, endogeic and anecic worms had positive and important influences on infiltration, whereas epigeic worms had no impact on soil infiltration.

Conclusions

Based on the results obtained by this study, it can be stated that soil infiltration rate was influenced by the whole earthworm population, as abundance and biomass, and by the components of earthworm population as ecological groups and individuals age. It can be concluded that soil infiltration rate was more influenced by earthworm abundance compared to earthworm biomass. As well, soil infiltration rate was affected by the number of juvenile worms more than by the number of adult ones. Epigeic worms had non significant effect on infiltration while endogeic and anecic worms significantly supported the infiltration rate of soil.

References

- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) *Biology and Ecology of Earthworms*, 3rd end. Chapman and Hall, London, 426 pp.
- Edwards WM, Norton LD, Redmond CE (1988) Characterizing macro-pores that affect infiltration into nontilled soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52,pp. 483-487.
- International Standard (ISO) 23611-1 (2003): Soil quality- Sampling of soil invertebrates- Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms.
- Kladivko EJ (1993) Earthworms and crop management. *Agronomy* 279. Purdue Univ.
- Lee KE (1985) *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. CSIRO, Sydney Australia. 411 pp.
- Raw F (1962) Studies of earthworm populations in orchards 1. Leaf burial in apple orchards. *Ann. app. Biol.* 50: 389-404.
- Rogasik J, Panten K, Schnug E, Rogasik H (2004) Infiltration Management Factors. *Encyclopedia of Soil Science* DOI: 10.1081 /E-ESS-120019048.
- Schwärzel K, Punzel J (2007) Hood Infiltrometer. A new type of tension infiltrometer. *Soil Sci Soc. Am* 71:1438-1447
- Shainberg I, Levy GJ (1995) Infiltration and Seal Formation Processes. In: *Soil Erosion Conservation and Rehabilitation*. Agassi M. United States Of America: Marcel Dekker, Inc, 402 p, 0-8247-8984-9. pp 1 – 20.
- Shipitalo M J, Nuutinen V, Butt K R (2004) Interaction of earthworm burrows and cracks in a clayey, Subsurface-drained, soil. *Applied Soil Ecology* 26 (2004) 209–217.

Rajeh Al Hassoun, E-mail: rajeh.al-hassoun@jki.bund.de

Hartmann, K.; Lilienthal, H.; Schnug, E.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

Optimierung des Erntezeitpunktes von Erbsen durch ein kostengünstiges Verfahren der Fernerkundung

Optimizing the harvest date of fresh peas using low cost remote sensing.

Zusammenfassung

Erbsen, die für die Konservierung und Frostung angebaut werden (Markerbsen), müssen besondere Eigenschaften hinsichtlich der Qualität erfüllen. Dabei ist der Erntezeitpunkt von ausschlaggebender Bedeutung, da eine optimale Erbsenqualität nur während weniger Tage erreicht werden kann. In der landwirtschaftlichen Praxis bedarf es intensiver Pflanzenbeprobungen, um diesen Zeitraum zu ermitteln. Bei vielen Kulturpflanzen sind teilflächenspezifische Unterschiede in Ertrag und Qualität dokumentiert. Bei Markerbsen kommt hinzu, dass der optimale Erntezeitpunkt teilflächenspezifisch verschieden sein kann. Zur großflächigen Erkennung und Kartierung des aktuellen Entwicklungszustandes kann die Fernerkundung einen wichtigen Beitrag liefern. In dieser Arbeit wurden 12 Erbsenfelder in Großbritannien vor dem Erntetermin auf Heterogenitäten des Pflanzenwachstums untersucht. Vier von 12 Feldern wiesen starke Unterschiede des Wachstums und der Erbsenqualität innerhalb eines Feldes auf. Mit einem kostengünstigen Verfahren der Fernerkundung (Schrägaufnahmen) und der Anwendung eines speziellen Algorithmus konnte eine Kartierung und Zonierung des Pflanzenbestandes in unterschiedliche Qualitätsstufen ermöglicht werden.

Die Arbeit zeigt, dass für die landwirtschaftliche Praxis eine gezielte Beprobung der unterschiedlichen Wachstumszonen im Feld sinnvoll ist und eine separate Ernte dieser Zonen eine Möglichkeit darstellt, die Qualität der Ernte zu optimieren. Die Erkennung und Einteilung von Wachstumsunterschieden wird durch die verwendete, fernerkundliche Methode ermöglicht.

Stichwörter: Erbsen, Tenderness, Reife, Teilflächenspezifische Bewirtschaftung, Fernerkundung

Abstract

Peas cultivated for frozen food or canning have to fulfil high quality standards. The timing of the harvest is of major importance to secure the quality and final yield. The time frame of the harvest is narrow and varies up to only a few days. Recently it needs intensive crop sampling to determine the right time. Site-specific variations in yield and quality are documented for a range of crops. Especially for peas the variation of the optimal harvest date can be of major importance for the farmer. To detect these heterogeneities remote sensing (RS) is a suitable tool. The study focused on 12 sites in Great Britain, where heterogeneities and site-specific qualities of the peas were analysed. Four sites showed variations of crop growth and quality. Using a low cost remote sensing system (oblique view imagery) we were able to detect growth variations and to zone the varying qualities within a field. The study concludes that the site specific variation of crop growth influences the final pea quality. Using targeted crop sampling and low cost mapping methods will enable a site specific harvest to guarantee quality and therefore a maximum economic benefit.

Keywords: Peas, tenderness, maturity, site-specific management, Remote Sensing

Einleitung

Markerbsen werden für die Konservierung und Frostung angebaut. Im Gegensatz zu Trockenspeiseerbsen werden Markerbsen vor der physiologischen Reife der Pflanze geerntet (BBCH Stadium 74-76). Dabei mindert eine frühzeitige Ernte den Ertrag, wohingegen eine späte Ernte die Qualität der frischen Erbsen verringert (Anderson and White, 1974; Fallon et al., 2005). Aus diesem Grund ist es wichtig, den Erntezeitpunkt so zu wählen, dass die Qualität und der Ertrag in einem optimalen Verhältnis zueinander stehen (Kjølstad et al., 1990), um ökonomisch optimal zu sein. Die Qualität von Speiseerbsen wird mittels eines Zartheitswertes (engl.: „tenderness value“) bestimmt und ist u.a. von dem Zuckergehalt der Erbsen abhängig (vgl. Martens, 2006). Diese Messung erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis durch ein spezielles Messgerät, dem Tenderometer. Ein Tenderometer gibt die benötigte Kraft an, um eine definierte Menge Erbsen zu zerdrücken. Basierend auf den Tenderometermessungen werden Erbsen in sechs Klassen (AA, A, B, C, D, DD) eingeteilt. Dabei gilt, dass sich die Qualität von Klasse AA bis zur Klasse DD verringert und höchste Erzeugerpreise nur in den besseren Klassen erzielt werden können (vgl. Fallon et al., 2005). Generell wird der „tenderness“-Wert 105 als optimal für Qualität und Ertrag angenommen. Um eine hohe Erntequalität zu sichern werden in der landwirtschaftlichen Praxis mehrfach Feldproben vor dem geschätzten Erntezeitpunkt genommen und auf die

„tenderness“-Werte untersucht. Dabei wird jedes Feld durch eine Mischprobe beprobt und somit als homogen angenommen. Jedoch sind teilflächenspezifische Wachstumsunterschiede und darauf folgende Heterogenität in Ertrag und Qualität für zahlreiche Kulturpflanzen bekannt und können somit auch für Speiseerbsen angenommen werden. Aufgrund der hohen Erzeugerpreise für Markerbsen können Wachstums- und Qualitätsheterogenitäten auch erhebliche ökonomische Auswirkungen haben. Zurzeit ist jedoch keine Studie veröffentlicht, die teilflächenspezifische Heterogenitäten der Erbsenqualität untersucht hat.

Eine Möglichkeit Wachstumsunterschiede zu erkennen ist die passive Fernerkundung, die Messung der reflektierten Sonnenstrahlung. Die klassische Methode ist hierbei die Auswertung von Luft- und Satellitenbildern. Lilienthal (2003) zeigte den möglichen Nutzen eines alternativen Verfahrens auf, durch welches Schrägaufnahmen mittels eines Algorithmus zu sogenannten pseudo-nadir (pseudo-Senkrecht-aufnahmen) umgerechnet werden können. Anhand des Verfahrens ist eine relativ kostengünstige und wetterunabhängige, flächendeckende Kartierung des aktuellen Pflanzenwachstums gegeben. Eine solche Kartierung ermöglicht die Zonierung eines Erbsenbestandes in unterschiedliche Wachstumszonen ermöglichen (Lilienthal, 2003) und kann teilflächenspezifische Qualitätszonen ausweisen.

Diese Arbeit untersucht erstmalig die Qualitätsunterschiede, die innerhalb eines Markerbsenfeldes auftreten können. Zudem wird ein kostengünstiges Verfahren vorgestellt, mit dem die Ausweisung von Wachstumsunterschieden im Feld ermöglicht wird. Eine Kartierung ist für eine optimierte Bewirtschaftung von Bedeutung, da eine teilflächenspezifische Ernte ermöglicht wird (vgl. Bramley et al., 2003).

Material und Methoden

Anfang Juli 2007 wurde in der Region Lincolnshire (Großbritannien), in der Nähe von Spalding Geländearbeiten durchgeführt. Die schluffig, lehmigen Böden in der Region zählen zu den fruchtbarsten Böden Großbritanniens und werden intensiv landwirtschaftlich genutzt. Diese Region ist die Hauptanbauregion für Erbsen in England (Defra, 2007).

Geländearbeiten: Zwölf Markerbsenfelder standen für die Untersuchung zur Verfügung. Durch Begehung der Felder wurden auf vier Schlägen stark auffällige Heterogenitäten des Pflanzenwachstums festgestellt. Die Felder wurden daraufhin in zwei Zonen eingeteilt. Pflanzen mit Gelbfärbung der Blätter und niederem Wuchs wurden als geringere Bestandesgüte klassifiziert und grüne, vitale Pflanzen stellten die Klasse hoher Bestandesgüte dar. Aus den beiden Zonen wurden jeweils Mischproben (10 kg Frischgewicht), aus je fünf Einzelproben entnommen (Tabelle 1). Die Erbsenqualität („tenderness“) wurden wenige Stunden nach Probenahme mittels eines Tenderometers ermittelt.

Tab. 1 Zeitpunkt der Probenahme und „tenderness“-Messung (X = Probenahmetermin).

	03. Jul 07	04. Jul 07	05. Jul 07	06. Jul 07	07. Jul 07	08. Jul 07
Feld 1	X	-	X	X	X	X
Feld 2	X	-	X	X	X	X
Feld 3	-	X	X	X	X	X
Feld 4	-	-	X	X	-	-

Schrägaufnahmen: Die vier Felder mit sichtbaren Wachstumsheterogenitäten wurden am 03.07.2007 mit Schrägaufnahmen aus 8,5 m fotografiert. Ein Hubwagen diente als Plattform für die Aufnahmen, die Fotos wurden mit einer handelsübliche RGB Digitalkamera (Canon Ixus 60) aufgenommen. Der Aufnahmestandort und die Koordinaten weniger Geländepunkte des Feldes wurden für die nachfolgende Berechnung der flächendeckenden Kartierung des Bildes mit einem GPS gemessen.

Berechnung der georeferenzierten Karte: Die Umrechnung der Schrägaufnahmen zu einer pseudo-nadir Abbildung diente zu einer Kartierung des aktuellen Pflanzenbestandes. Mehrere Bearbeitungsschritte waren nötig, um die Schrägaufnahmen umzurechnen. In der Arbeit wurde ein auf der Bildgeometrie basierender, eigens entwickelter Algorithmus angewandt. Dabei spielen die Eckkoordinaten des Bildes (Passpunkte) und der Aufnahmestandort eine entscheidende Rolle für die Qualität der Berechnung. Ausgehend von den Aufnahmekoordinaten und den Eckpunkten des Bildes transformiert der Algorithmus jeden Bildpunkt (Pixel) der Schrägaufnahme in die jeweilige georeferenzierte Lage. Eine Interpolation der georeferenzierten Bildpunkte führt zu der pseudo-nadir Kartierung. Um die verschiedenen Belichtungsverhältnisse der einzelnen Schrägaufnahmen zu minimieren wurde ein Index, der Quotient aus rotem und grünem Kanal berechnet. Des Weiteren dient der Indexwert zur Unterteilung in Wachstumszonen geringer und hoher Bestandesgüte (Schwellenwert: 1,3). Zusätzlich wurde für ein Feld (Feld 1) die berechnete Zonierung durch eine manuelle GPS Kartierung validiert.

Ergebnisse

Qualitätsheterogenitäten: In den vier untersuchten Flächen konnten deutliche Unterschiede der Erbsenqualität gemessen werden. In allen Fällen weist die Zone der geringen Bestandesgüte eine höhere „tenderness“ und somit eine geringere Erbsenqualität auf, verglichen mit der Zone höherer Bestandesgüte (Abbildung 1). Die Qualitätsunterschiede variierten so stark, dass die Erbsen der beiden Zonen in unterschiedliche Qualitätsklassen fielen und dadurch unterschiedliche Erzeugerpreise liefern. Der Erntezeitpunkt der eine optimale Erbsenqualität für die Zone geringerer Bestandesgüte sichern würde lag circa 3-5 Tage vor der durchgeführten Ernte. Die optimale Ernte der höheren Bestandesgüte hingegen war in drei von vier Fällen zum Erntezeitpunkt noch nicht erreicht (Abbildung 1).

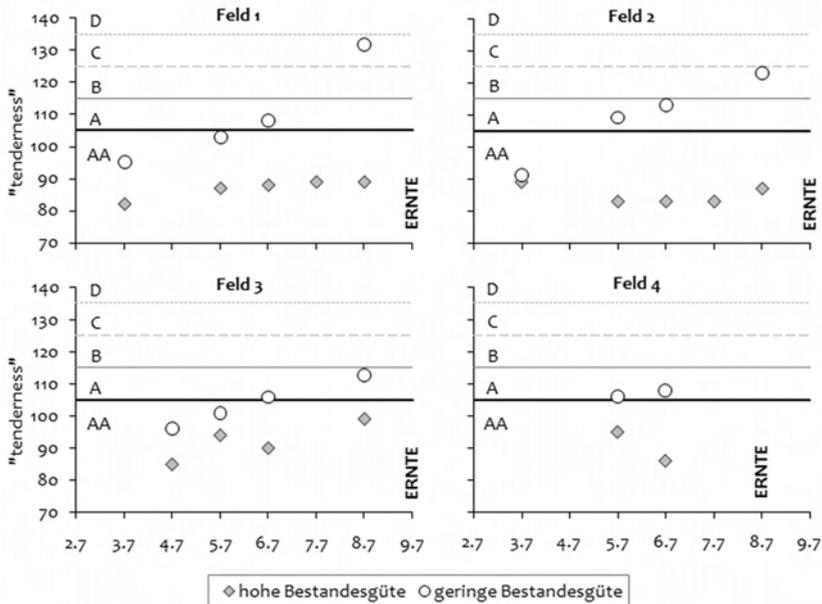


Abb. 1 Feldheterogenitäten der Erbsenqualität gemessen als „tenderness“-Werte. Die Einteilung der Werte erfolgt in den dargestellten Klassen (AA bis D), wobei der „tenderness“-Wert 105 als optimal angesehen wird.

Die Fläche der Zonen geringerer Bestandesgüte nahm weniger als 10% bis circa 50% der Gesamtfläche des Feldes ein (Tabelle 2).

Tab. 2 Die Fläche der vier heterogenen Felder und der Anteil der Zonen hoher und geringer Bestandesgüte.

	Gesamtgröße [ha]	hohe Bestandesgüte [%]	geringe Bestandesgüte [%]
Feld 1	19	68	32
Feld 2	14	93	7
Feld 3	20	94	6
Feld 4	12	53	47

Kartierung: Die Schrägaufnahmen mitsamt der Umrechnung zu pseudo-nadir Aufnahmen erlaubt eine Kartierung des aktuellen Pflanzenbestandes und zudem die Unterscheidung in die erwähnten zwei Wachstumszonen hoher und niedrigerer Bestandesgüte. Für die Klassifizierung der zwei Zonen wurde der Indexwert (Grün/Rot) verwendet. Der Grenzwert von 1,3 diente als Schwellenwert, wobei Werte größer als 1,3 als Zonen mit hoher Bestandesgüte und Werte kleiner als 1,3 Zonen geringerer Bestandesgüte klassifiziert wurden (Abbildung 2).

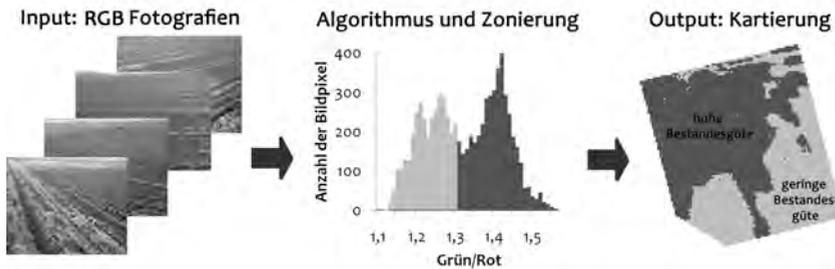


Abb. 2 Kartierung der unterschiedlichen Wachstumswonzonen durch Schrägaufnahmen und Einteilung in hohe und geringe Bestandesgüte.

Bei dem Vergleich der GPS vermessenen Zonen mit der Kartierung der Schrägaufnahmen ergab sich bei Feld 1 eine gute Übereinstimmung beider Messungen (Abbildung 3).

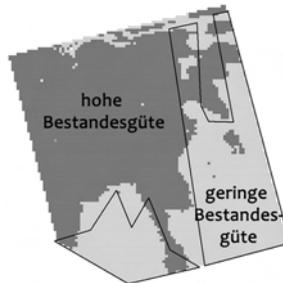


Abb. 3 Kartierung durch pseudo-nadir Aufnahmen und Vergleich mit GPS vermessenen Zonen (schwarze Linie).

Diskussion

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass starke Wachstumsheterogenitäten in Erbsenfeldern vorkommen. Diese Unterschiede haben Einfluss auf die Qualität der Erbsen und folglich auch auf die Einstufung in unterschiedliche Erzeugerpreise. Markerbsen können hohe Preise erzielen und eine teilflächenspezifische Bewirtschaftung kann daher von ökonomischer Bedeutung für den Landwirt sein. Eine optimierte Ernte ist die räumlich getrennte Ernte der Zonen, um bessere und schlechtere Erbsenqualitäten voneinander zu separieren. Zudem bietet sich an, die unterschiedlichen Wachstumswonzonen zeitlich getrennt zu beernten, um die optimale Qualität jeder Zone zu sichern. Begünstigt wird die Möglichkeit einer teilflächenspezifischen Ernte durch die flexiblen Erntemaschinen. Diese besitzen eine relativ geringe Arbeitsbreite und sind nicht an Fahrspuren im Feld gebunden. Eine Voraussetzung für eine zeitlich und räumlich getrennte Ernte ist die Kartierung der unterschiedlichen Erbsenqualitäten. Die Unterschiede des Pflanzenwachstums und Erbsenqualitäten können mit fernerkundlichen Mitteln, durch die Messung der Bestandesreflexion erkannt werden. Das verwendete Verfahren der pseudo-nadir Aufnahmen ermöglicht eine Kartierung des Bestandes (vgl. Lilienthal, 2003), die in diesem Fall keine teuren Messgeräte benötigt. Somit steht ein kostengünstiges Verfahren zur Verfügung, durch welches heterogene Felder kartiert und zonierte werden können, um eine gezielte Pflanzenbeprobung und Ernte zu unterstützen. Zudem ist das Verfahren relativ wetterunabhängig, da im Gegensatz zu Luft- oder Satellitensystemen unterhalb der Wolkendecke arbeitet. Bei den 12 ausgewerteten Feldern traten Wachstumsunterschiede nur in vier Feldern auf, somit bedarf nicht jedes Feld einer gezielten Beprobung oder Ernte. Eine teilflächenspezifische Bewirtschaftung von heterogenen Erbsenfeldern kann wie folgt beschrieben werden (vgl. Godwin et al., 2003):

- Visuelle Erkennung von Wachstumsheterogenitäten.
- Kartierung der Heterogenitäten (manuell oder durch fernerkundliche Methoden).
- Separate Beprobung der unterschiedlichen Wachstumswonzonen für die „tenderness“ Messungen.
- Erkennung des optimalen Reifezeitpunktes jeder Zone.
- Räumlich und zeitlich getrennte Ernte der Zonen.

Literatur

- Anderson, J. A. D., White, J. G. H. 1974: The relationship between green pea yield and tenderometer readings. *NZ J. Exp. Agric.* **2**:31-33
- Bramley, R., Pearse, B., Chamberlain, P. 2003. Being profitable precisely – a case study of precision viticulture from Margaret river. *The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker. Annual Technical Issue 2003.* **84-87**
- Defra (UK Government, Department for Environment, Food and Rural Affairs). 2007. Economics and Statistics. URL: <https://statistics.defra.gov.uk/esg/> (accessed on 16.11.2008).
- Fallon, E., Tremblay, N., Desjardins, Y. 2006: Relationships among growing degree-days, tenderness, other harvest attributes and market value of processing pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in Quebec. *Canadian Journal of Plant Science*, **86**(2):525-537.
- Godwin, R. J. Wood, G. A., Taylor, J. C., Knight, S. M., Welsh, J. P. 2003: Precision Farming of Cereal Crops: A Review of a Six Year Experiment to develop Management Guidelines *Biosystems Engineering* (2003) **84**(4), 375–391
- Kjølstad, L., Isaksson, T., Rosenfeld, H. J. 1990: Prediction of sensory quality by near infrared reflectance analysis of frozen and freeze dried green peas (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Aroc.* **51**: 247-260
- Kraft, J. M., Wilkens, D. W., Ogg, A. G., Williams, L., Willett, G. S. 1991: Integrated pest management for green peas in the Blue Mountain Region. *Washington State Univ. Coop. Ext. Bull.* EB1599.
- Lilienthal, H. 2003: Entwicklung eines bodengestützten Fernerkundungssystems für die Landwirtschaft. *Landbauforschung Völkenrode*, 254.
- Martens, M. 1986: Sensory and Chemical/Physical Quality Criteria of Frozen Peas Studies by Multivariate Data Analysis. *Journal of food science* **51**(3):599-603
- Pumphrey, F. V., Ramig, R. E., Allmaras, R. R. 1975: Yield-tenderness relationships in 'Dark Skinned Perfection' peas. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **100**:507–509.

Kontakt: Knut Hartmann, E-Mail: Knut.Hartmann@jki.bund.de, Tel: 0531-5962145

Abu-Hashim, M.; Lilienthal, H.; Stöven, K.; Schnug, E.

Julius Kühn-Institute, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

Characteristics of soil infiltration capacity under different agricultural management

Eigenschaften der Infiltrationskapazität von Böden bei unterschiedlicher Bewirtschaftungsweise

Abstract

The extreme flood events in recent times led to great economic damage. Beside unfavourable weather conditions, the loss of infiltration capacity by soil sealing and the loss of mechanical stability and biological activity in arable soils produce faster runoff and increase the risk of severe flooding events. The impact of management on the infiltration properties of agriculturally used soils has been investigated. Soils located at five field sites with two management practices (conventional and organic); have been sampled for infiltration capacity, earthworm abundance and several other soil parameters. The results show that the abundance of earthworms at the organic farm soils is about 40% higher than in conventionally managed (CM) farms. Apparently earthworm numbers are major contributors to the measured infiltration capacity in OM, where the infiltration capacities of the OM soils are approximately twice as high as in CM farms. Overall, the results reveal that OM is beneficial to the soil properties in terms of infiltration capacity and could be used as an alternative strategy for preventive flood protection.

Keywords: Infiltration; Earthworm abundance; Organic management; Penetration resistance

Zusammenfassung

Die extremen Hochwasserereignisse der letzten Jahre haben zu großen wirtschaftlichen Schäden geführt. Neben ungünstigen Witterungssituationen führen insbesondere der Verlust der Infiltrationskapazität der Böden durch Bodenversiegelung, der Verlust mechanischer Stabilität und der Rückgang der biologischen Aktivität zu einem schnelleren Oberflächenabfluss, und somit zu einem höheren Risiko von Hochwasser. Der

Einfluss der Bewirtschaftungsweise auf die Infiltrationseigenschaften landwirtschaftlicher Böden wurde auf fünf Flächen mit unterschiedlicher Bewirtschaftung (konventionell, ökologisch) hinsichtlich ihrer Infiltrationskapazität, der Regenwurmpopulationen und anderer Bodenparameter untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Regenwurmpopulation um 40 % größer auf den ökologisch bewirtschafteten Flächen im Vergleich zu den konventionellen ist. Die Abundanz der Regenwürmer hat eine große Bedeutung für die Infiltrationskapazität. Diese war unter ökologischer Bewirtschaftung doppelt so groß wie unter konventioneller Bearbeitung. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für den Eindringwiderstand, die Lagerungsdichte, den Bodenwasser- und den Humusgehalt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Art der Bewirtschaftung einen Einfluss auf die Infiltrationskapazität hat und somit ein Bewirtschaftungswechsel einen Beitrag zum vorbeugenden Hochwasserschutz leisten kann.

Stichwörter: Infiltration, Regenwurm, ökologischer Landbau, Bodenverdichtung

Introduction

Agriculture is the largest land user in Germany (60% of the total area); so the impact of small changes in soil properties can result in large effects. Soil sealing for urban growth and traffic on the one hand, compaction and loss of mechanical stability and biological activity in agricultural soils on the other hand, cause reductions of infiltration capacity and increase the risk of severe flooding events. Schnug and Haneklaus (2002) revealed that organic farmed soils resulting in twice as high infiltration rates than conventional farmed soils. Earthworm quantity and activity increases in conservation tillage compared to conventional tillage. Mele and Carter (1999) link the adoption of conservation tillage practices with increased earthworm activity; mulched stubble in particular favouring large increases in earthworm numbers. Retention of maximum levels of crop residues on the soil surface and lack of soil disturbance apparently create a more favourable habitat for soil animals. Radford et al. (1995) also showed there was a 4-fold increase in earthworm numbers with zero tillage compared to conventional tillage.

Earthworm channels increase the volume of soil pores, which should increase aeration and the rate of water entry into the soil (Ehlers, 1975; Holt et al., 1993). All levels of compaction reduce water infiltration capacity and increase penetration resistance.

The aim of the current work is to describe the soil physical changes induced by conventional or organic management practices to preserve soil quality and to investigate the impact of organic farming practices as alternative strategy for a preventive flood protection.

Materials and methods

Test sites: Five sample fields which were located at Tauberbischofsheim, Southern Germany (3540103, 5492464, Gauss Krüger, Zone 3), with two management practices, conventional and organic (bio-dynamic), have been investigated. Two adjacent fields are one sample; the fields have the same soil texture (Table 1) and differ only in the applied management.

Determination of soil physical properties: The particle size distribution, soil bulk density, soil water content, total porosity, organic soil carbon were determined (Table 1) as described by (Carter 1993). Infiltration capacity was measured with a hood infiltrometer according to Schwärzel and Punzel (2007). Penetration resistance was measured with a Penetrologger from Eijkelkam.

Tab. 1 Characteristics of the test sites.

Sample	Management	Texture			Soil Type	Bulk density	Porosity	Organic Matter
		Sand [%]	Silt [%]	Clay [%]				
1	Organic (OM)	2.1	52.1	45.8	German	1.31	50.39	3.47
	Conventional (CM)	2.2	51.5	46.3	classification			
2	OM	11.3	52.1	36.5	Tu 2	1.38	48.02	3.28
	CM	11.3	58.5	30.3	Tu 3	1.39	47.53	3.61
3	OM	3.3	44.6	52.0	Lu/Tu3	1.32	50.18	3.41
	CM	3.0	60.8	36.2	Tu 2	1.21	54.20	4.46
4	OM	3.3	63.0	33.7	Tu 2	1.29	51.60	3.55
	CM	3.3	63.0	33.7	Tu3	1.34	49.34	4.24
5	OM	6.1	56.6	37.4	Tu3	1.38	48.05	4.13
	CM	1.2	60.9	37.8	Tu3	1.47	44.65	2.48
	CM	1.9	54.9	43.5	Tu3	1.36	48.49	3.84

Earthworm abundance and diversity: The earthworm abundance (number/m²) and species diversity (grouped in ecological category) have been measured by using the formalin method (ISO-23611-1-2003).

Soil biological activity: Dehydrogenase activity was measured according to Schinner et al. (1996).

Results

Infiltration capacity: The steady-state infiltration was approximately two times higher under organic management compared to conventional management (Figure 1). The obtained results of the physical soil properties for the soils under investigation showed that changing the management from CM to OM leads to an improvement in soil infiltration capacity.

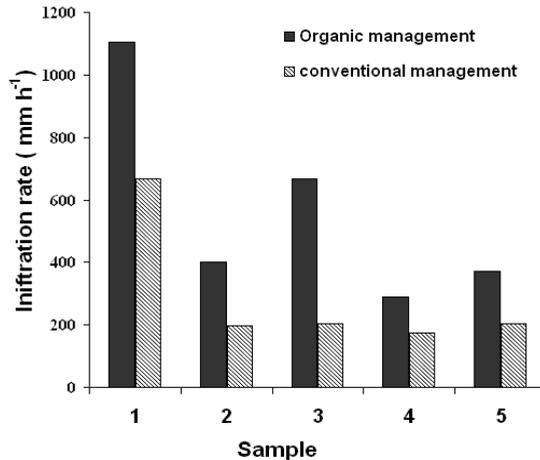


Fig. 1 Infiltration capacity under different

Penetration resistance: Changing the soil management from conventional to organic generally resulted in a decrease of penetration resistance. Compaction of the soil surface at 0-5 cm soil depth was approximately found the same in both management practices. Whereas, compaction in conventionally managed soils can be found at 5-40 cm depth (Figure 2), which is higher than in organically managed soils.

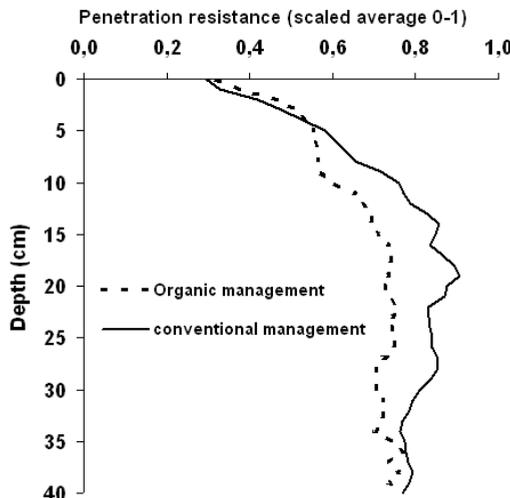


Fig. 2 Penetration resistance with soil depthmanagement

Soil biological activity and water content: The soil water content (Figure 3) at conventional management (20%) is lower compared to organic management (25%). This improvement was associated with enhanced biological activity in organically managed fields. Dehydrogenase activity, which is used as an indicator of biological activity in soils, reveals a higher activity in organically managed soils compared to the conventional management (Figure 4).

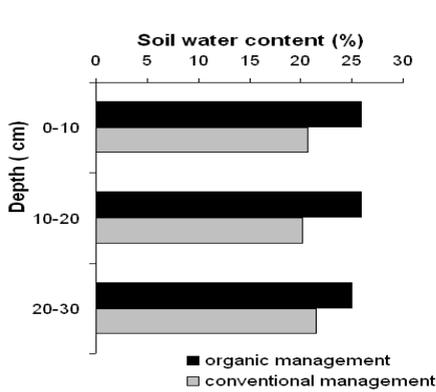


Fig. 3 Soil water content in the investigated

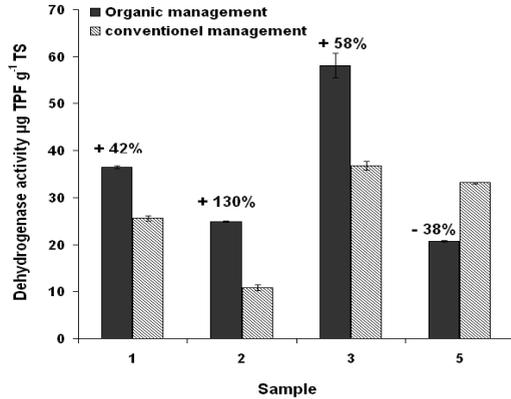


Fig. 4 Dehydrogenase activity in soils

Abundance and diversity of earthworms: The results of the soils under investigation showed that more earthworms could be found in organic management compared to the conventional management (Figure 5), whereas the earthworm abundance at the OM is about 40% higher than in CM farms. Under both soil managements, epigeic (litter dwelling) earthworms were 7.3% in total compared to the number of another species. The endogeic numbers were 102 m⁻² in OM (Figure 6) compared to the CM where the abundance was 57 m⁻². The dominant species under the investigated soils are endogeic and anecic, and the results illustrated their higher density in organic management compared to the conventional management.

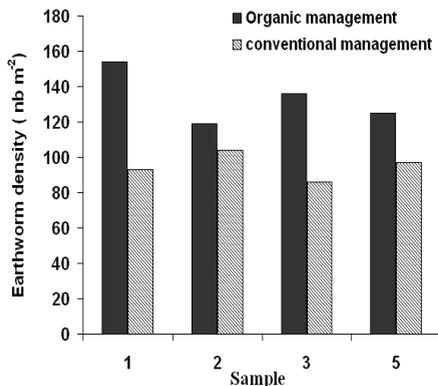


Fig. 5 Earthworm density at different soil management

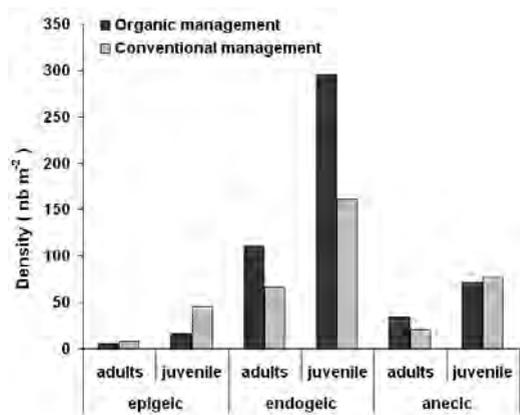


Fig. 6 Number of earthworm species (by ecological category)

Discussion

Compaction by agricultural machinery decreases infiltration rates, increases soil erodibility and increases the risk of severe flooding events (Evans, 1980; Morgan, 1980; Fullen, 1985). An improvement of physical soil properties was identified under OM compared to CM after changing of the management to organic farming

eight years ago. The infiltration capacities of the OM soils are approximately twice as high as in CM farms, similar to the results found by Schnug and Haneklaus, (2002) in organic farming. Changing the soil management to low or no tillage also enhances the infiltration rate (McGarry et al. 2000, and Franzluebbbers 2002) by leaving organic mulch at the soil surface, which limits soil erosion, increases the soil organic matter content and improves aggregate stability, which can be recognised on the OM fields. The results show increasing soil water content in OM, (McGarry, 1997 and Radford et al.1995), which has a strong potential to improve the conditions for plant growth and lead to an increase of the biological activity. Dehydrogenase activity is highest in water saturated soils (Glinski et al. 1986), so the improvement in soil infiltration capacity also lead to an improvement in soil biological activity. The soil tillage strongly influences earthworm populations and their activity. The tillage operation systems in CM are the main reason for the physical destruction of burrows and the earthworms themselves; the results of the soils under investigation showed that more earthworms could be found in organic management, which used a no tillage management. Moreover the abundance of earthworms was approximately seven times higher in OM compared to CM soils, which corresponds to Friebe and Henke (1992).

Conclusions

Arable soils have a differently utilised potential of infiltration according to their management practice, which could be used for a preventive flood protection. Changing the soil management from conventional to organic farming increases the infiltration rate, the biological activity, and improves the physical soil properties. Increasing the infiltration in soils, sustainable amounts of water could be cached and surface runoff will be reduced.

Acknowledgements

Appreciation is extended to Knut Hartmann and Rajeh Al-Hassoun for their valuable assistance.

References

- Carter MR (1993) Soil sampling and methods of analysis. Canadian society of soil science. ISBN 0-87371-861-5. Lewis Publisher.
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) Biology and ecology of earthworms. 3rd ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Ehlers W (1975) Observations on earthworm channels and infiltration on tilled and untilled loess soil. *Soil Sci.* 119:242-249.
- Evans R (1980) Characteristics of water-eroded fields in lowland England. In: M. De Boodt and D. Gabriels (Editors) *Assessment of Erosion*. Wiley, Chichester, 77-87.
- Franzluebbbers AJ (2002) Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil Till. Res.* 66:95-106.
- Friebe B, Henke W, (1992) Regenwürmer und deren Abbauleistung bei abnehmender Bearbeitungsintensität. In: Friebe, B. (Ed.), *Wechselwirkungen von Bodenbearbeitungssystemen auf das Ökosystem Boden*. Wiss. Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen, 139-146.
- Fullen MA (1985) Compaction, hydrological processes and soil erosion on loamy sands in east Shropshire, England. *Soil & Tillage Res* 6:17-29.
- Glinski J, Stepniewska Z, Brzezinska M (1986) Characterization of dehydrogenase and catalase activity of the soils of the two natural sites with respect to the soil oxygenation status. *Polish J. Soil Sci.* 19:47-52.
- Holt JA, Robertson LN, Radford BJ (1993) Effects of tillage and stubble residue treatments on termite activity in two central Queensland Vertisols. *Aust. J. Soil Res.* 31: 311-317.
- ISO 23611-1 (2006) Bodenbeschaffenheit - Probenahme von Wirbellosen im Boden – Teil 1: Handauslese und Formalinextraktion von Regenwürmern.
- McGarry D (1997) The structure and grain size distribution of Vertisols. In: Ahmad N, Mermut A (Eds.) *Vertisols and Technologies for their Management*. Developments in Soil Science, Vol. 24. Elsevier, Amsterdam, 231-259.
- McGarry D, Bridge BJ, Radford BJ (2000) Contrasting soil physical properties after zero and traditional tillage of an alluvial soil in the semi-arid subtropics *Soil & Tillage Research.* 53:105-115.
- Mele PM, Carter MR (1999) Impact of crop management factors in conservation tillage farming on earthworm density, age structure and species abundance in south-eastern Australia. *Soil Till. Res.* 50:1-10.
- Morgan RPC (1980) Soil erosion and conservation in Britain. *Prog. Phys. Geogr.*, 4:24-47.
- Radford BJ, Key AJ, Robertson LN, Thomas GA (1995) Conservation tillage increases soil water storage, soil animal populations, grain yield and response to fertiliser in the semiarid subtropics. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:223-232.
- Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E and Margasin R (1996) *Methods in Soil Biology*. Berlin: Springer, 426 p.

Schnug E, Haneklaus S (2002) Agricultural production technique and infiltration significance of organic farming for preventive flood protection. *Landbauforsch Völkenrode* 52(4):197-203.

Schwärzel K, Punzel J (2007) Hood Infiltrometer – A new type of tension infiltrometer. *Soil Sci. Soc. Am.* 71:1438-1447.

Kontakt: Mohamed Abu-Hashim, E-Mail: mohamed.abu-hashim@jki.bund.de

Autoren

A		Kühne, S.	42
Abu-Hashim, M.	91	L	
Adam, Christian	76	Lellbach, Hans	12
Ahlemeyer, Jutta	6	Lilienthal, H.	87, 91
Al Hassoun, R.	82	M	
Ana, Gloria	22	Marthe, Frank	23
Arntjen, Anja	52	Moll, E.	42
B		Müller, Ina	60
Badani-Dehmer	22	N	
Balko, Christiane	22	Nehrlich, Stephanie	20
Bartelmann, Anne	22	Njontie, Charles	41
Beckmann, Katrin	12	Nordmeyer, Henning	70
Bergmann, Britta	9	Nowak, A.	64
E		O	
Ellmer, F.	42	Ordon, Frank	6, 9, 16
Engel, Josefine	32	P	
F		Pelz, H.-J.	67, 69,
Fischer, D.	67	Priegnitz, U.	42
Flachowsky, Henryk	24, 29	Prokop, A.	67
Friedt, Wolfgang	6	R	
G		Rausch, Thomas	56
Gehring, Isabel	56	Rode, Jeannette	6
Geider, Klaus	56, 60	Rogasik, J.	82
H		S	
Hanke, Magda-Viola	24, 29	Schick, Judith	76
Hartmann, K.	87	Schiemann, Joachim	41
Hättasch, Conny	29	Schmitt, A.	43, 64
Herzog, Katja	24	Schnug, E.	82, 76, 87, 91
Hüsken, Alexandra	41	Schuster, C.	43
J		Seddig, Silvia	22
Jandewerth, Pia	69	Seddon, B.	64
Jelkmann, Wilhelm	52, 60	Stöven, K.	82, 91
K		Struckmeyer, Tobias	23
Klocke, Evelyn	32	U	
Kluge, Alexander	70	Ulrich, Detlef	36
Konstantinidou-Doltsinis, S.	43, 64	W	
Kopahnke, Doris	9, 16	Weber, Maria	36
Kowalska, J.	42	Wehling, Peter	12
Kratz, Sylvia	76	Weinzierl, Karina	32
Krengel, Sandra	47		

Veröffentlichungen des JKI

Öffentlichkeit und die Fachwelt versorgen wir mit verschiedenen Informationsangeboten über alle Aspekte rund um die Kulturpflanzen. Hierfür stehen verschiedene Broschüren, Faltblätter, Fachzeitschriften und Monographien aber auch verschiedene Datenbanken als Informationsressourcen zur Verfügung.

Für die Allgemeinheit sind vor allem die Faltblätter gedacht, die über Nützlinge im Garten, aber auch über spezielles wie den Asiatischen Laubholzbockkäfer informieren. Außerdem ist der regelmäßig erscheinende Jahresbericht allgemein interessant, vor allem mit den umfassenden Artikeln zu besonderen Themen, die Sie aber auch hier im Internet auf den thematisch dazugehörigen Seiten finden.

Seit 1906 erscheinen die Mitteilungshefte, eine Reihe von Monographien unterschiedlichster Themen aus dem Bereich der Forschungsarbeiten und gesetzlichen Aufgaben. Alle bisher erschienenen Ausgaben sind OPEN ACCESS kostenfrei im Internet zu lesen. Die älteste wissenschaftliche Zeitschrift des JKI ist seit den 1920er Jahren das Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes.

Ab 2009 wird vom Julius Kühn-Institut als wissenschaftliches Fachorgan das Journal für Kulturpflanzen – Journal of Cultivated Plants monatlich herausgegeben.

Vieles wird als downloadbare PDF- oder HTML-Datei angeboten. Anderes kann bei unseren Verlagen oder bei der Pressestelle gedruckt bestellt werden.

Weiterführende Informationen über uns finden Sie auf der Homepage des Julius Kühn-Instituts unter <http://www.jki.bund.de> im Bereich Veröffentlichungen.

Spezielle Anfragen wird Ihnen unsere Pressestelle (pressestelle@jki.bund.de) gern beantworten.

Anschrift für **Tauschsendungen**:

Please address **exchanges** to:

Adressez **échanges**, s'il vous plait:

Para el **canje** dirigirse por favor a:

Informationszentrum und Bibliothek
Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Königin-Luise-Straße 19
D-14195 Berlin, Germany
E-Mail: ib@jki.bund.de

Vom 24.-26.11.2008 trafen sich im Julius Kühn-Institut in Quedlinburg 35 junge Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftler zum wissenschaftlichen Gedankenaustausch. Sie präsentierten und diskutieren Ihre aktuellen Forschungsergebnisse aus den Bereichen Pflanzenzüchtung, Pflanzenbau und Bodenkunde, Pflanzenernährung sowie Pflanzenschutz. Schwerpunkte und Stand ihrer Arbeiten sind im vorliegenden Tagungsband zusammengefasst.

From 24 to 26 November 2008, the young generation of scientists met for an exchange of ideas at the Julius Kühn Institute in Quedlinburg. The 35 junior scientists presented and discussed their recent research results, thus featuring a broad variety of topics, ranging from plant breeding, plant cultivation and soil science to plant nutrition and plant protection.

The proceedings summarize the focal points and current state of their scientific work.