

4 2 4

Julius-Kühn-Archiv

2. Nachwuchswissenschaftlerforum

17.-19.11.2009
in Berlin-Dahlem



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-Institut 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"

4 2 4

Julius-Kühn-Archiv

2. Nachwuchswissenschaftlerforum

17.-19.11.2009
in Berlin-Dahlem



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 1868-9892
ISBN 978-3-930037-64-3

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, 2010. 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 fotomechanischem 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: Janine König

Fischer, Kristin; Ruge-Wehling, Brigitte; Scholz, Margret; Habekuss, Antje; Wehling, Peter Molekulare Charakterisierung einer Wildgerstenintrogression mit dem Gelbverzweigungsresistenzgen <i>Ryd4^{Hb}</i> im Genom der Kulturgerste	7
Molecular characterization of an introgression from wild barley carrying the resistance gene <i>Ryd4^{Hb}</i>	
Lüpken, Thomas; Habekuss, Antje; Perovic, Dragan; Krämer, Ilona; Stein, Nils; Ordon, Frank Hochauflösende Kartierung der Virusresistenzgene <i>rym11</i> und <i>Ryd3</i> in Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	10
High resolution mapping of resistance genes <i>rym11</i> and <i>Ryd3</i> in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	
Riedel, Christine; Habekuss, Antje; Ordon, Frank Verbesserung der BYDV-Toleranz der Gerste durch Pyramidierung von Toleranzallelen	13
Improvement of BYDV-tolerance in barley by pyramiding of tolerance alleles	
Purfürst, Stephanie; Habekuss, Antje; Kopahnke, Doris; Krämer, Ilona; Perovic, Dragan; Cöster, Hilmar, Ordon, Frank <i>Thinopyrum</i>-Arten als Donoren von Resistenzen gegen wichtige Pathogene im Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i> L.)	16
<i>Thinopyrum</i> species as donors of resistance against important pathogens in winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.)	
Bartelmann, Anne; Balko, Christiane; Seddig, Sylvia Evaluierung von Kartoffelgenotypen bezüglich Trockentoleranz	17
Evaluation of potato genotypes regarding drought tolerance	
Schwander, Florian; Eibach, Rudolf Neue molekulare Marker für die Rebenzüchtung zur gezielten Pyramidierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau (<i>Plasmopara viticola</i>)	21
New molecular markers for downy mildew (<i>Plasmopara viticola</i>) resistance as a tool for pyramiding resistance genes in grapevine breeding	
Herzog, Katja; Flachowsky, Henryk; Deising, Holger; Hanke, Magda-Viola Ergebnisse zur Etablierung alternativer Strategien zur Erzeugung markergen-freier Apfelpflanzen mit erhöhter Resistenz	24
Preliminary results to generate marker-free apples (<i>Malus domestica</i> BORKH.) with increased fungal resistance	
Admassu, Belayneh; Friedt, Wolfgang; Ordon, Frank Diversity of <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> Population in Ethiopia and Stem Rust Resistance Genes in Wheat	24
König, J.; Perovic, D.; Kopahnke, D.; Przulj, N.; Romeis, T.; Ordon, F. Kartierung der Zwergrostresistenz der Gerste MBR1012	25
Genetic mapping of leaf rust resistance in barley accession MBR1012	
Dowideit, Kerstin; Hüskens, Alexandra Kleistogamer Raps – Eine innovative Confinement-Strategie?	28
Cleistogamous Oilseed Rape – An innovative confinement strategy?	
Schulz-Witte, Jonathan; Schulz, Hartwig; Ulrich, Detlef; Kammerer, Dietmar R.; Carle, Reinhold; Nothnagel, Thomas Evaluation genetischer Ressourcen von <i>Daucus carota</i> L. als Quelle gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe	28
Evaluation of <i>Daucus carota</i> genetic resources as a source of health promoting compounds	

Themen zum Pflanzenschutz/Phytopathologie

Moderation: Tim Hirschfeld, Stephanie Nehrlich

Joachimsmeier, Ina; Schenke, Detlef; Pistorius, Jens; Heimbach, Udo

Guttation – Nicht alles was glänzt ist Tau - ein „neuer“ Expositionsweg von systemischen Pflanzenschutzmitteln auf Honigbienen? 30

Guttation – A „new“ way of exposition from systemic plant protection products for honeybees?

Schwabe, Kristin; Heimbach, Udo

Forschungsprogramm des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz zum Westlichen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*) 31

German *Diabrotica* research program of the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection

Krügener, Silke

Ausbreitungsszenarien zum Westlichen Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera* 32

Models of Western Corn Rootworm Spread (*Diabrotica virgifera virgifera*)

Georgiadis, P.-Th.; Pistorius, J.; Heimbach, Udo

Vom Winde verweht – Abdrift von Beizstäuben – ein Risiko für Honigbienen (*Apis mellifera* L.)? 33

Gone with the wind – drift of abrasive dust from seed treatments – a risk for honey bees (*Apis mellifera* L.)?

Jacobs, Alexandra; Bischoff, Gabriela; Büttner, Carmen; Pestemer, Wilfried

Rückstandsverhalten von ausgewählten Pflanzenschutzmitteln in/auf Kartoffelpflanzen und Bienen 34

Krengel, Sandra; Freier, Bernd

Die Temperatur - Eine bedeutende Driving variable in Populationen der Marienkäfer *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* 34

The temperature - an important driving variable in populations of *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis*

Reim, Stefanie

Erhaltung von *Malus sylvestris* unter In-situ-Bedingungen im Osterzgebirge 38

In situ Management of *Malus sylvestris* in the Ore Mountains

Bisutti, Isabella Linda

Einfluss der Fermentation auf gefriergetrocknete Zellen des antagonistischen Bakteriums *Pseudomonas fluorescens*, Stamm Pf153 40

Influence of the different fermentation parameters on freeze-dried cells the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153

Haas, Sabrina; Perovic, Dragan; Schliephake, Edgar; Ordon, Frank

Erste Ergebnisse zur Kartierung der Resistenz des Weizens (*Triticum aestivum*) gegen die Orange Weizengallmücke (*Sitodiplosis mosellana*) 41

First results on mapping the resistance of wheat (*Triticum aestivum*) against the Orange wheat blossom midge (*Sitodiplosis mosellana*)

Waßmuth, Birte; Verschwele, Arnd

Herbizidwirkung von Mesotrione, Thifensulfuron, Mecoprop-P und Pelargonsäure auf *Ambrosia artemisiifolia* bei früher und später Applikation 42

Effects of mesotrione, thifensulfuron, mecoprop-p and pelargonic acid on *Ambrosia artemisiifolia* at early and late herbicide application

Nehrlich, Stephanie

Untersuchungen zur Ausbreitung von *Colletotrichum gloeosporioides* in *Gaultheria* 45

Investigations of distribution of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Gaultheria*

Hirschfeld, T.; Ellner, F.; Buschhaus, H.; Goßmann, M.; Büttner, C.

Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende *Fusarium* spp. 46

Influence of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin producing *Fusarium* spp.

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

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Extraktfraktionen aus *Glycyrrhiza glabra* gegen den Falschen Mehltau an der Gurke 49

Investigations on the efficacy of extract fractions of *Glycyrrhiza glabra* against downy mildew of cucumber

Schuster, C.; Nowak, A.; Marx, P.; Gärber, U.; Konstantinidou-Doltsinis, S.; Seddon, B.; Schmitt, A.

Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) im Praxisversuch 50

Biological control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumbers in commercial trials

Serfling, Albrecht; Ordon, Frank

Untersuchungen zur Adaptation pilzlicher Pathogene an Azolwirkstoffe 50

Analyses of adaptation of fungal pathogens to azole fungicides

Wunderle, J.U.; Koch, E.

Künstliche Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Flugbranderreger (*Ustilago nuda*) und Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten 56

Artificial inoculation of barley with the loose smut (*Ustilago nuda*) and mode of infection on the ovary

Grineva, Aksana

Schimmelpilze in gelagertem Triticale und Einfluss des Insektenbefalls auf das Wachstum von Schimmelpilzen 61

Ullrich, Christian; Freier, Bernd

Auswertung einer deutschlandweiten Studie zur Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Obstbaubetrieben 61

Analyses of a German study on pesticide use in apple growing farms

Lorenz, S.; Adler, C.; Reichmuth, Ch.

***Holepyris sylvanidis*, ein natürlicher Gegenspieler des Amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum*; Untersuchungen zur Eindringfähigkeit des Parasitoiden in das Nahrungssubstrat seines Wirtes** 65

Holepyris sylvanidis, a biological antagonist of the confused flour beetle *Tribolium confusum*; Investigations on the ability of the parasitoid to penetrate into the feeding substrate of its host

Hassoun, Rula; Schnug, Ewald

A statistical evaluation of the contribution of mineral and tap water to the dietary intake of AS, B, Cu, Li, Mo, Ni, Pb, U and Zn by humans 69

Themen zum Pflanzenbau/Bodenkunde und weitere Themen

Moderation: Dr. Maik Kleinwächter

Kleinwächter, Maik; Selmar, Dirk; Schnug, Ewald

Impact of drought and salt stress on the accumulation of secondary plant products 70

Knolle, Friedhart

Neue Befunde zur Herkunft von Uran in Grund- und Leitungswässern aus Phosphatdüngern 70

New findings on uranium in ground and tap water originating from phosphorous fertilizers

Sipos, Marianna

Contamination of agricultural soils by mineral fertilization 73

Imholt, Christian; Esther, Alexandra; Perner, Jörg; Volk, Thomas; Jacob, Jens

Mäuse als Schädlinge in der Landwirtschaft: Entwicklung eines Prognosemodells zur Vorhersage von Massenvermehrungen der Feldmaus (*Microtus arvalis*) 74

Voles as pests in agriculture: Development of a forecast model for outbreaks of common voles (*Microtus arvalis*)

Leukers, A.; Jacob, J.

Ausbreitungsmuster von Feldmäusen (*Microtus arvalis*) 75

Dispersion patterns of common vole populations (*Microtus arvalis*)

Fischer, D.; Jacob, J.; Prokop, A.; Wink, M.; Mattes, H.

Nachhaltige Maßnahmen gegen Schermäuse: Der vergrämende Effekt sekundärer Pflanzenmetabolite auf *Arvicola amphibius*. 77

Sustainable measures against Water voles: The repelling effect of secondary plant compounds against *Arvicola amphibius*

Congyanghui, Wu

Sulfur supply reduces cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) 78

Thöle, Heinrich

Statistische Analyseansätze für On-Farm-Versuche mit räumlichen Daten 78

Approaches for statistical analysis of on-farm trials with spatial data

Autoren 80

Themen zur Züchtungsforschung/Züchtung

Moderation: Janine König

Fischer, Kristin¹; Ruge-Wehling, Brigitte¹; Scholz, Margret¹; Habekuss, Antje²; Wehling, Peter¹

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI); ¹ Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (ZL); ² Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (RS)

Molekulare Charakterisierung einer Wildgerstenintrogression mit dem Gelbverzweigungsresistenzgen *Ryd4^{Hb}* im Genom der Kulturgerste

Molecular characterization of an introgression from wild barley carrying the resistance gene *Ryd4^{Hb}*

Zusammenfassung

Aus einer interspezifischen Kreuzung der Wintergerste *Hordeum vulgare* cv. 'Igri' mit der virusresistenten Wildgerste *H. bulbosum* wurden spaltende Kartierungspopulationen entwickelt, die eine 3HL-Introgression tragen, welche Resistenz gegenüber BYDV vermittelt. Die genetische Analyse einer BC₂F₄-Familie zeigte eine monohybride Aufspaltung der Resistenz mit dominanter Merkmalsausprägung. Es konnten bisher vier Gersten-Ankermarker und vier TC-Marker um das Resistenzgen *Ryd4^{Hb}* kartiert werden. Zwei der aus den orthologen Bereichen des Reisgenoms abgeleiteten TC-Marker kosegregieren mit dem Resistenzgen *Ryd4^{Hb}*.

Sichwörter: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, BYDV, Resistenz, Selektionsmarker

Abstract

Interspecific crosses between winter barley *H. vulgare* cv. 'Igri' and a virus-resistant accession of the wild species *H. bulbosum* yielded mapping populations segregating with individuals resistant towards barley yellow dwarf virus. Genetic analysis of a BC₂F₄ family revealed a dominant inheritance of the resistance. GISH analysis indicated an *Hb* introgression on chromosome 3HL. Four 3HL barley anchor markers and four TC markers of the orthologous rice genome region, respectively, were mapped on either side of the resistance locus *Ryd4^{Hb}*. Two of the TC markers cosegregated with the BYDV resistance.

Keywords: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, BYDV, resistance, selection markers

Einleitung

Die Gelbverzweigung der Gerste wird durch das *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV) verursacht und kann weltweit zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die Infektion der Pflanzen erfolgt über verschiedene Blattlausarten als Vektoren: befallene Pflanzen weisen gelbliche Blätter und einen Zwergwuchs auf. Das Virus ist durch einen ELISA sicher in der Pflanze nachweisbar. Durch die zunehmend milde Witterung im Winter kann es zu einem verstärkten Auftreten von Blattläusen im Wintergerstenbestand kommen. So verursachte das warme, feuchte Klima im Winter 2006 im darauffolgenden Erntejahr 2007 in Deutschland Ertragseinbußen von bis zu 40 % (Wellie-Stephan, 2007). Eine Alternative zur chemischen Bekämpfung der Blattläuse kann die Entwicklung von resistenten Sorten darstellen.

In der Literatur sind bisher Gene und QTLs für BYDV Resistenz beschrieben, die aus dem primären Genpool der Gerste stammen (Suneson et al., 1955, Schaller et al., 1963, Scheurer et al., 2001, Niks et al. 2004). Die genetische Variabilität des primären Genpools der Gerste ist jedoch im Hinblick auf Krankheitsresistenzen beschränkt. Eine neue Quelle zur Verbesserung des Resistenzniveaus der Gerstensorten stellt der sekundäre Genpool der Gerste, *Hordeum bulbosum*, dar. In der Vergangenheit wurden beispielsweise zwei neue Resistenzgene gegenüber dem Gelbmosaikviruskomplex (BaMMV, BaYMV-1, -2) aus *H. bulbosum* markergestützt in die Kulturgerste übertragen (Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006). Interspezifische Kreuzungen zwischen der Kulturgerste *H. vulgare* cv. 'Igri' und *H. bulbosum* ermöglichen nun auch die Übertragung einer Resistenz gegenüber BYDV. Genetische Analysen an spaltenden Nachkommenschaften zeigten eine monogene, dominante Vererbung dieser neuen Resistenz. Das Resistenzgen *Ryd4^{Hb}* konnte durch molekulargenetische Techniken dem Gerstenchromosom 3HL zugeordnet werden.

Material und Methoden

Die Charakterisierung des Resistenzgens *Ryd4^{Hb}* erfolgte auf Basis von Kreuzungsnachkommenschaften, die durch eine interspezifische Kreuzung der Kulturgerste *H. vulgare* cv. 'Igri' (*Hv*) mit der resistenten Wildgerste *H. bulbosum* A17 (*Hb*, Abstammung: Botanischer Garten Montevideo, Uruguay) entstanden sind (Scholz et al., 2008). Durch Rückkreuzungen mit *Hv* und mehreren Selbstungsgenerationen sind die Populationen BC₂F₃-2 und 3 (N=37, bzw. N=43) und BC₂F₄ (Vollgeschwisterfamilie, N=143 Individuen) entwickelt worden, die auf dem Chromosom 3HL eine *Hb*-Introgression mit dem Gen *Ryd4^{Hb}* tragen (Scholz et al., 2009).

Die Phänotypisierung erfolgte durch Infektion der Einzelpflanzen mit Blattläusen (*Rhopalosiphum padi*), die das Virusisolat BYDV-PAV1 trugen. Nach sechs Wochen im Gewächshaus wurde der Virustiter der Pflanzen über ELISA bestimmt (Extinktionswerte < 0,1 = resistent, > 0,1 = anfällig).

Die Kartierung des Resistenzgens wurde an der BC₂F₄-Familie durchgeführt. Die Introgressionsgröße in den BC₂F₃-Familien wurde ebenfalls mit molekularen Markern bestimmt. Insgesamt wurden 31 EST-basierte 3HL-Gersten-SSR-Marker (Stein et al., 2007, Varshney et al., 2007), fünf STS-Marker (GrainGenes 2.0) sowie 51 TC-Marker aus dem orthologen Bereich des Reisgenoms (Stein et al., 2007) auf Marker-Polymorphismus zwischen *H. vulgare* und *H. bulbosum* gescreent. Die Kopplungsanalyse erfolgte mit der Software JoinMap® 4.0.

Ergebnisse

Die Aufspaltung der Resistenz ergab in der BC₂F₄-Familie ein 3:1-Verhältnis von resistenten und anfälligen Phänotypen. In den Familien BC₂F₃-2 und -3 hingegen wurde eine Aufspaltung von 1:1 beobachtet (Tabelle 1).

Tab. 1 Spaltungsverhältnisse der Resistenz

Familie	Individuen	Resistente Individuen	Anfällige Individuen	χ ² -Wert _(3:1)	χ ² -Wert _(1:1)
BC ₂ F ₃ -2	37	15	22	23,430	1,320
BC ₂ F ₃ -3	41	25	16	4,300	1,980
BC ₂ F ₄	143	104	39	0,397	-

Die Auswertung der ELISA-Werte zeigt eine deutliche bimodale Verteilung ().

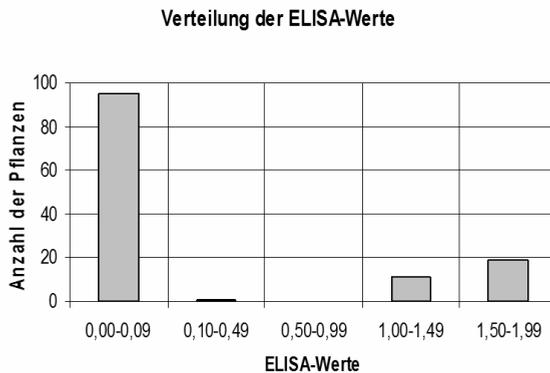


Abb. 1 Bimodale Verteilung der ELISA-Werte in der Familie BC₂F₄ (Abszisse: ELISA-Werte im Bereich von 0,00 bis 1,99; Ordinate: Anzahl der Pflanzen)

Die *H. bulbosum*-Introgression wurde bereits durch genomische In-situ-Hybridisierung (GISH) dem Gerstenchromosom 3HL zugeordnet (Scholz et al. 2009). Die Lokalisation der Introgression auf dem Chromosom 3HL konnte durch die enge Kopplung des Resistenzgens *Ryd4^{Hb}* mit den 3HL-SSR-Ankermarkern *GBM1050* und *GBM1059* sowie den STS-Markern *ABC161* und *MWG883* bestätigt werden. Aus der orthologen Region des Reisgenoms (R1) konnten vier TC-Marker entwickelt werden, die mit der Resistenz kosegregieren beziehungsweise eine kurze Distanz zum Resistenzlocus *Ryd4^{Hb}* zeigen (Tabelle 2, Abbildung 2a).

Tab. 2 Introgressionsgrößen der Familien BC₂F₃-2, -3 und BC₂F₄

Familie	Aufspaltung der Resistenz	ABC161	TC1	TC4	GBM1050	GBM1059	TC2	TC3	MWG883	GBM1046	TC5	TC6	TC134544
BC ₂ F ₃ -2	1:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						
BC ₂ F ₃ -3	1:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						
BC ₂ F ₄	3:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						

In den Familien BC₂F₃-2 und -3, die eine größere *H. bulbosum*-Introgression tragen, wurden drei zusätzliche TC-Marker (*TC134544*, *TC6* und *TC5*) und ein distal auf 3HL lokalisierter SSR-Marker (*GBM1046*) kartiert (Tabelle 2, Abbildung 2).

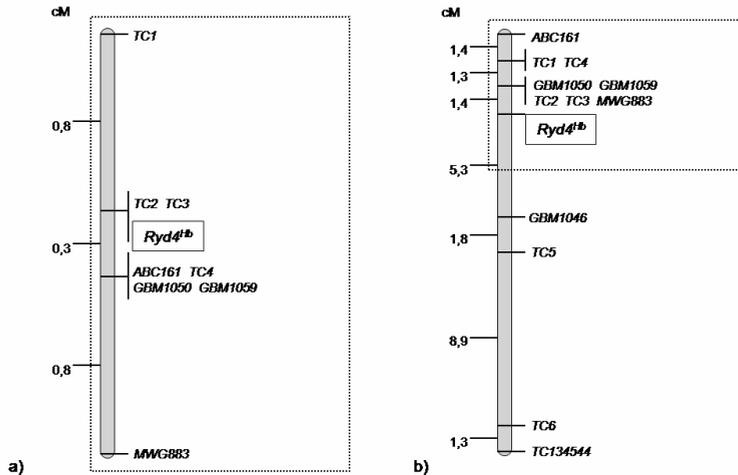


Abb. 2 Genetische Karten der Familien a) BC₂F₄ und b) BC₂F₃₋₂ (Abbildungen nicht maßstabsgerecht)

Diskussion

Von Scholz et al., 2009 wurde eine BYDV-Resistenz beschrieben, die aus der Wildgerste *Hordeum bulbosum* durch interspezifische Kreuzungen auf die Kulturgerste *Hordeum vulgare* übertragen wurde. Die genetische Analyse der BC₂F₄-Familie zeigte, dass die Resistenz monogen dominant vererbt wird. Die abweichende Aufspaltung in den Familien BC₂F₃₋₂ und -3 ist durch einen gameten-selektierenden Faktor (SDL, *segregation distorton locus*) zu erklären, der im distalen Bereich der Introgression lokalisiert ist. Dieses Segment konnte in der Familie BC₂F₄ bereits rekombinativ entfernt werden. In der Familie BC₂F₄ wurden insgesamt acht polymorphe Marker identifiziert, die um den Resistenzlocus kartieren. Die *Hb*-Introgression umfasst eine genetische Distanz von 1,9 cM. Die Höhe des *linkage drags*, wie er etwa im Falle des Gelbmosaikvirus-Resistenzgens *Rym14^{hb}* beschrieben wurden (Ruge et al., 2003) kann durch die Kartierung weiterer Anker-Marker bestimmt werden.

Es ist die bis heute einzige beschriebene 3HL-Introgression, so dass von einer geringen Rekombinationsrate zwischen *H. vulgare* und *H. bulbosum* im Bereich der homoeologen Chromosomenarme von 3HL auszugehen ist.

Unterschiede im Hinblick auf Reihenfolge und Distanz der in der BC₂F₄- und BC₂F₃-Familie kartierten Marker sind wie folgt zu begründen: (I) Unterschiedliche Aufspaltung der Resistenz (3:1 vs. 1:1), (II) unterschiedliche Anzahl Individuen/Kartierungsfamilie (Tabelle 1) und (III) unterschiedliche Anzahl an kartierten Markern (Abbildung 2).

Insgesamt stimmen die Reihenfolge der SSR-Marker in den experimentellen Familien mit den in der Literatur beschriebenen Abfolge der Marker auf 3HL gut überein (Stein et al., 2007, Varshney et al., 2007). Die genetische Anordnung der TC-Marker ist sehr gut mit den physischen Positionen auf dem Reischromosom R1 vergleichbar (nicht gezeigt). In der Familie der BC₂F₄ koregrieren die TC-Marker *TC2* und *TC3* mit dem Resistenzlocus *Ryd4^{hb}*. Diese können demzufolge gut für eine markergestützte Selektion resistenter Individuen genutzt werden. Beide Marker werden kodominant vererbt und sind als PCR-basierte Marker auf Agarose-Gelen kostengünstig und effizient darzustellen.

Für die züchterische Nutzung dieser neuen Resistenz muss zuvor ein Faktor, der die Ausbildung von vitalen, homozygot resistenten Pflanzen verhindert, rekombinativ eliminiert werden. Zurzeit werden Nachkommen der Familie BC₂F₄ auf Vitalität bonitiert, die laut molekularer Marker homozygot resistent sind.

Literatur

Ruge, B., Linz, A., Pickering, R., Proeseler, G., Greif, P., Wehling, P., 2003: Mapping of *Rym14^{hb}*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley, *Theor. Appl. Genet.* **107**, 965-971
 Ruge-Wehling, B., Linz, A., Habekuss, A., Wehling, P., 2006: Mapping of *Rym16^{hb}*, the second soil-born virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*, *Theor. Appl. Genet.* **113**, 867-873
 Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F., 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus, *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1536-1543
 Schaller, C.W., Rasmusson D.C., Qualsef C.O., 1963: Sources of resistance to the yellow-dwarf virus in barley, *Crop. Sci.* **3**, 342-344
 Scheurer, K.S., Friedt, W., Huth, W., Waugh, R., Ordon, F., 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1074-1083

- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuss, A., Pendinen, G., Schrader, O., Flath, K., Große, E., Wehling, P., 2008: The secondary gene pool of barley as gene donor for crop improvement In: Maxted N., Ford-Lloyd B.V., Kell S.P., Iriondo J., Dulloo E., Turok J. (Hrsg), Crop Wild Relative Conservation and Use, CABI Publishing, Wallingford, S. 549-555
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Schrader, O., Habekuss, A., Pendinen, G., Fischer, K., Wehling, P., 2009: *Ryd4th*, a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV), Theor. Appl. Genet. **119**, 837-849
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R.K., Perovic, D., Grosse, I., Graner, A., 2007: A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics, Theor. Appl. Genet. **114**, 823-839
- Suneson, C.A., 1955: Breeding for resistance to Yellow Dwarf Virus in barley, Agron. J. **47**, 283
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röde, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E., Graner, A., 2007: A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci, Theor. Appl. Genet. **114**, 1091-1103
- Wellie-Stephan, O., 2007: 2007 – Das Jahr des Gelbverzwergungsvirus, Innovation 3/2007, Deutsche Saatgutveredelung, Lippstadt, <http://www.dsv-saaten.de/content.php?f,10280/o,article,132/>

Lüpken, Thomas¹; Habekuss, Antje¹; Perovic, Dragan¹; Krämer, Ilona¹; Stein, Nils²; Ordon, Frank¹

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), ¹ Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg; ² Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben

Hochauflösende Kartierung der Virusresistenzgene *rym11* und *Ryd3* in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

High resolution mapping of resistance genes *rym11* and *Ryd3* in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Zusammenfassung

Zwei landwirtschaftlich bedeutende Resistenzgene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.), - *rym11*, welches Resistenz gegen die Gelbmosaikvirose [*Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)] bedingt, und *Ryd3*, das gegen die viröse Gelbverzwergung [*Barley yellow dwarf virus* (BYDV)] wirksam ist, sollen mittels hochauflösender Kartierungspopulationen von jeweils 5000 F₂-Pflanzen kartiert und isoliert werden. Zu diesem Zweck werden die aus den Kartierungspopulationen entstandenen und für das jeweilige Zielintervall genetisch fixierten segmental rekombinanten Inzuchtlinien (RIL) einer ausgiebigen Markeranalyse sowie einer wiederholten Virustestung sowohl im Gewächshaus als auch im Feld unterzogen. Für *rym11* sind 5102, für *Ryd3* 3213 der F₂-Pflanzen analysiert worden. Für beide Populationen liegen erste phänotypische Daten vor und mehrere mit dem jeweiligen Resistenzgen eng gekoppelte Marker konnten kartiert werden.

Stichwörter: Gerste, Resistenz, Gelbmosaikvirose, viröse Gelbverzwergung, *rym11*, *Ryd3*, RIL, Kartierung

Abstract

Two important resistance genes of barley (*Hordeum vulgare* L.) - *rym11*, which confers resistance against the Barley yellow mosaic virus complex [*Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)] and *Ryd3*, which is effective against Barley yellow dwarf [*Barley yellow dwarf virus* (BYDV)] - are to be mapped at high resolution by analyzing 5000 F₂-plants each as a prerequisite for isolating these genes via a map based cloning approach. For this purpose segmental recombinant inbred lines (RIL), originated from the mapping populations and genetically fixed for the respective target interval, undergo an extensive marker analysis as well as repeated virus testing both in the greenhouse and in the field. For *rym11* 5102 and for *Ryd3* 3213 F₂-plants have been analysed up to now. For both populations first phenotypic data is present and several closely linked markers could be mapped.

Keywords: Barley, resistance, Barley yellow mosaic virus complex, Barley yellow dwarf, *rym11*, *Ryd3*, RIL, mapping

Einleitung

Gerste ist nach Weizen die Kulturart mit der größten Bedeutung in Deutschland und nimmt auch global eine bedeutende Rolle vor allem als Viehfutter und Braugerste ein. Mit einer Genomgröße von etwa 5 Gbp besitzt Gerste das kleinste Genom unter den agronomisch genutzten Triticeae, und wurde deshalb gewählt, um die erste genomabdeckende physikalische Karte der Triticeae zu erstellen. Ziel dieses Projektes ist es, den Nutzen der entstehenden physikalischen Karte zu demonstrieren, indem zwei agronomisch bedeutende Resistenzgene mittels einer hochauflösenden Kartierungspopulation zunächst in einer genetischen Karte kartiert und nach anschließender Verankerung der genetischen Karte mit der physikalischen Karte isoliert werden. Dabei handelt es sich um das Resistenzgen *rym11*, das in der Nähe des Centromers von Chromosom 4H lokalisiert ist (Nissan-Azzouz et al., 2005), und welches als einziges aus *Hordeum vulgare* stammendes Resistenzgen gegen alle bisher in Europa bekannten Erreger der Gelbmosaikvirose (BaMMV; BaYMV) wirkt, und das Resistenzgen *Ryd 3*, welches auf Chromosom 6H ebenfalls in unmittelbarer Nähe zum Centromer kartiert werden konnte (Niks et al., 2004), und eine Toleranz gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) bedingt. Sowohl die Gelbmosaikvirose, die durch

einen bodenbürtigen Pilz übertragen wird, als auch die durch Blattläuse übertragene viröse Gelbverzwergung haben eine große Bedeutung für die Landwirtschaft und können zu Ertragsverlusten von bis zu 50 % führen. Da die Loci beider Resistenzgene sich in unmittelbarer Nähe des Centromers befinden, ist für diese Arbeit eine möglichst hohe genetische Auflösung notwendig. Aus diesem Grund ist eine Kartierungspopulation von jeweils 5000 F₂-Pflanzen vorgesehen, was einer genetischen Auflösung von 0,01 cM entspricht. Aus dieser Kartierungspopulation werden dann segmentale RILs entwickelt, die anschließend einer phänotypischen Testung sowie einer ausgiebigen Analyse mit genbasierten Markern unterzogen werden. Sobald ein Marker mit dem Resistenzgen co-segregiert oder maximal 0,01 Centimorgan (cM) entfernt ist, findet ein Screening von Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Bibliotheken und die anschließende Sequenzanalyse der BACs statt, die möglicherweise das jeweilige Resistenzgen tragen.

Material und Methoden

Für die Kartierung von *rym11* wurde eine F₂-Kartierungspopulation der Kreuzung zwischen den resistenten Eltern 'W 757/112' und 'W 757/612' (Nissan-Azzouz et al., 2005) mit der anfälligen Sorte 'Naturel' aufgebaut. Für *Ryd3* entstammt die F₂-Kartierungspopulation einer Kreuzung der resistenten äthiopischen Gerstenlinie 'L94' und dem anfälligen Elter 'L94-QTL3', einer nahisogenen Linie, bei der das Chromosom 6H-Fragment der anfälligen Sorte 'Vada' in die Linie 'L94' eingebracht wurde (Niks et al., 2004). Diese wurde von R. Niks, Wageningen zur Verfügung gestellt. Die F₂-Pflanzen der Populationen wurden in 96'er Quick-pot-platten angezogen und anschließend erfolgte im 2-3 Blattstadium die Entnahme von Blattproben. Die DNA-Extraktion erfolgte semiautomatisch nach Dorokhov und Klocke (1997). Für die Analyse der F₂-Pflanzen der *rym11*-Population wurden die das Resistenzgen flankierenden co-dominanten SSR-Marker HVM03 und HVM68 genutzt, für die Analyse der *Ryd3*-Population die das Resistenzgen flankierenden SSR-Marker GMS006 und GBM1063 (M. Thierry pers. Mitt.). Die Fragmentanalyse der Marker erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion auf einem CEQ 8000 (Beckman-Coulter).

Für beide Populationen wurden die teilheterozygot rekombinanten F₂-Pflanzen aus den 96'er Quick-pot-platten in größere Töpfe ausgetopft, im Gewächshaus mittels Crispac-Beuteln geselbstet und das entsprechende Saatgut geerntet. Pro teilheterozygot rekombinanter F₂-Pflanze wurden dann noch einmal 12 F₃-Nachkommen mit den genannten jeweiligen Markern analysiert, um segmental homozygote RILs zu identifizieren. Für die Pflanzen, die schon in der F₂-Generation als homozygot rekombinant identifiziert wurden, entfiel die Analyse der F₃-Nachkommenschaft. Von den identifizierten RILs wurde für die genotypische Analyse DNA nach der Miniprep-Methode von Stein et al. (2001) gewonnen, die anschließende Markeranalyse fand mit in dem Zielintervall liegenden Markern (Stein et al., 2007; Varshney et al., 2007; Sato et al., 2009) statt. Zudem wurden weitere Marker mittels Analyse der Gerste-Reis Syntenie entwickelt (Perovic et al., 2004). Für die Phänotypisierung wurden die RILs geselbstet und weitervermehrt, so dass genügend Saatgut für die Virustestung zur Verfügung stand. Für *rym11* erfolgte eine Virustestung sowohl für BaMMV als auch BaYMV.

An zwei verschiedenen Standorten (Schladen und Morgenrot) mit natürlichem Vorkommen der beiden Viren, wurden pro RIL maximal 20 Pflanzen in Doppelreihen zu je 10 Pflanzen in jeweils einer Wiederholung geprüft. Eine resistente Sorte diente hierbei als Negativkontrolle, eine anfällige Sorte als Positivkontrolle für den Virusnachweis. Zusätzlich fand eine weitere Virustestung auf BaMMV in der Klimakammer statt. Hierbei wurden pro RIL 10 Pflanzen getestet, mit einer anfälligen Sorte als Positivkontrolle. Die Inokulation erfolgte dabei im 2-3 Blattstadium von Hand, in der Art, dass infiziertes Pflanzenmaterial in K₂HPO₄ - Buffer homogenisiert und mit feinem Carborundum versetzt wurde, und dieses Gemisch dann in ein Blatt der zu prüfenden Pflanzen gerieben wurde (Habekuss et al., 2008). Der Virusnachweis erfolgt in beiden Fällen mit Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) nach der Methode von Clark und Adams (1977).

Für *Ryd3* erfolgte die Virustestung auf BYDV ausschließlich im Feldversuch. An einem Standort (Quedlinburg) wurden hierbei pro RIL jeweils 10 Pflanzen in der Kontrolle und in der infizierten Variante in zwei Wiederholungen geprüft. Die dafür erforderliche Virusinokulation der zu prüfenden Pflanzen erfolgte dabei vorab im Gewächshaus mittels BYDV-PAV-tragender Blattläuse, die im 1 Blattstadium auf die Pflanzen gebracht wurden. Die Blattläuse wurden mit einem Insektizid abgetötet und die infizierten Pflanzen wurden zusammen mit den Kontrollpflanzen im Feld ausgepflanzt. Danach erfolgte wiederholter Insektizideinsatz, um eine Spontaninfektion der Kontrollpflanzen zu verhindern. Eine Bonitur der Pflanzen anhand von Krankheitssymptomen erfolgte in der Kornfüllungsphase. Zusätzlich wird die Toleranz der einzelnen RILs durch einen Vergleich der infizierten Variante mit der Kontrollvariante bezüglich des Ertrages, der Ertragsparameter und der Wuchshöhe bestimmt werden.

Aus den genotypischen Daten der Markeranalyse und den phänotypischen Daten der Virustestung der jeweiligen Kartierungspopulationen konnte dann eine genetische Karte für das jeweilige Zielintervall erhalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

Für *rym11* wurden insgesamt 5102 F₂-Pflanzen mit den Markern HVM03 und HVM68 analysiert und ein Abstand von 10,711 cM zwischen den beiden Markern bestimmt. Für 85 RILs, die aus 1270 F₂-Pflanzen entstanden sind, ist eine Virustestung auf BaMMV in der Klimakammer vorgenommen worden, wobei die Aufspaltung mit 41 resistenten und 44 anfälligen RILs der Erwartung entspricht ($\chi^2=0,106$).

Für die Markerabsättigung des Zielintervalls konnte eine Reihe polymorpher Marker identifiziert und kartiert werden, wobei sich nach den Daten der Phänotypisierung das Resistenzgen *rym11* zwischen den beiden Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) – Markern CAPS 1 und CAPS 2 beziehungsweise CAPS 3 befindet (Abb.1), und damit eine Verkürzung des Zielintervalls von 10,711 cM auf 2,437 cM erreicht werden konnte. Sowohl CAPS 1 als auch CAPS 2 wurden mittels der Syntenie-basierten Markerabsättigung identifiziert. Die enge Kopplung zum Resistenzgen zeigt, dass diese Methode effektiv für eine Markerabsättigung eingesetzt werden kann.

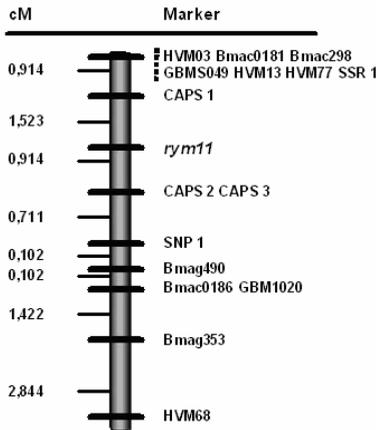


Abb. 1 Vorläufige Karte für *rym11*; basierend auf 85 RILs aus 1270 F₂-Pflanzen

Für *Ryd3* wurden insgesamt 3213 F₂-Pflanzen mit den Markern GMS006 und GBM1063 analysiert, der Abstand zwischen beiden Markern betrug dabei 6,987 cM. Aus diesen F₂-Pflanzen wurden 183 teilheterozygot rekombinante Pflanzen in RILs umgewandelt, für 215 teilheterozygot rekombinante Pflanzen ist noch die F₃-Generation zu analysieren. Eine erste BYDV-Virustestung für 80 RILs, die aus 743 F₂-Pflanzen zurückzuführen sind, zeigte eine sehr gute Unterscheidbarkeit und entspricht mit 42 toleranten und 38 anfälligen RILs der erwarteten 1:1 Aufspaltung ($\chi^2 = 0,113$). Zudem stehen die Ergebnisse der Phänotypisierung und Genotypisierung (siehe Karte in Abb. 2) im Einklang mit der Arbeit von Niks et al. (2004), bei der die SSR-Marker HVM14, HVM22, Bmac0018 und Bmag0009 in deren Kartierungspopulation ebenfalls mit dem Resistenzgen co-segregierten.

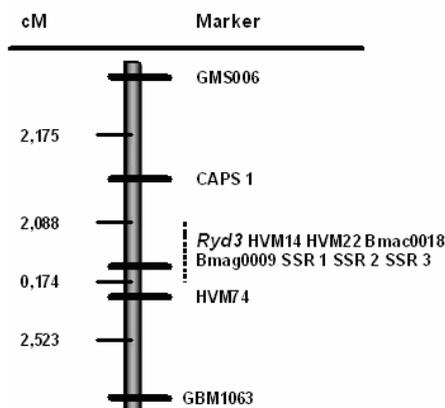


Abb. 2 Vorläufige Karte für *Ryd3*; basierend auf 80 RILs aus 743 F₂-Pflanzen

Der bei Niks et al. (2004) ebenfalls mit dem Resistenzgen co-segregierende Marker HVM74, zeigte allerdings in der vorliegenden Kartierungspopulation bei zwei RILs eine Rekombination zu dem Resistenzgen. Dies ist auf die höhere genetische Auflösung dieser Population zurückzuführen. Somit konnte mit HVM74 und dem nördlich von

dem Resistenzgen kartierten CAPS-Marker CAPS 1 eine Verkürzung des Zielintervalls auf 2,262 cM erreicht werden. Weiterhin konnten mit den Markern SSR 1, SSR 2, SSR 3 weitere Marker identifiziert werden, die mit dem Resistenzgen co-segregieren. Wie die zuvor genannten Marker, entstammen diese Marker allerdings genomischen Sequenzen, so dass kein Gen angesprochen werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass sich beide Gene in centromeren Bereich auf Chromosom 4H und Chromosom 6H befinden und in diesen Bereichen das Verhältnis von genetischer zu physikalischer Karte ungünstig für eine Isolation durch kartengestützte Klonierung ist (Künzel et al., 2000), ist eine weitere Erhöhung der genetischen Auflösung nötig. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass insbesondere in der Population für das Resistenzgen *Ryd3* eine Vielzahl von Markern co-segregieren. Dass auch im komplexen Genom der Gerste die Isolation von Resistenzgenen mittels kartengestützter Isolation möglich ist, konnte jedoch in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Stein und Graner, 2004).

Danksagung: Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit, welches ein Teilprojekt (Förderkennzeichen: 0314000D) des Verbundprojektes 'Exploring the Barley Genome (Barlex)' ist.

Literatur:

- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Dorokhov, D.B., Klocke, E. (1997). A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Gen.* **33**, 358-365.
- Habekuss, A., Kühne, T., Krämer, I., Rabenstein, F., Ehrig, F., Ruge-Wehling, B., Huth, W., Ordon, F. (2008). Identification of Barley mild mosaic virus isolates in Germany Breaking rym5 Resistance. *J. Phytopathology* **156**, 36-41.
- Künzel, G., Korzun, L., Meister, A. (2000). Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps of the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* **154**, 397-412.
- Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F. (2004). A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet* **109**, 1536-1543.
- Nissan-Azzouz, F., Graner, A., Friedt, W., Ordon, F. (2005). Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* **110**, 212-218.
- Perovic, D., Stein, N., Zhang, H., Dresche, A., Prasad, M., Kota, R., Kopahnke, D., Graner, A. (2004). An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the Rph16 resistance locus. *Funct. Integr. Genomics* **4**, 74-83.
- Sato, K., Nankaku, N., Takeda, K. (2009). A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* **103**, 110-117.
- Stein, N., Graner, A. (2004). Map based gene isolation in cereal genomes. In: *Cereal genomics*, eds. Gupta, P., Varshney, R., pp. 331-360. Kluwer Academic Publishers.
- Stein, N., Herren, G., Keller, B. (2001). A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, K., Perovic, D., Grosse, I., Graner, A. (2007). A 1000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* **114**, 823-839.
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E., Graner, A. (2007). A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* **114**, 1091-1103.

Riedel, Christine; Habekuss, Antje; Ordon, Frank

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

Verbesserung der BYDV-Toleranz der Gerste durch Pyramidisierung von Toleranzallelen

Improvement of BYDV-tolerance in barley by pyramiding of tolerance alleles

Zusammenfassung

Das durch Blattläuse übertragene Gerstengelbverzwergungsvirus (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) ist ein wichtiges Pathogen im Getreideanbau, dessen wirtschaftliche Bedeutung infolge der prognostizierten Klimaerwärmung in Mitteleuropa in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen wird. In der Praxis wird derzeit die Virusverbreitung hauptsächlich durch die chemische Bekämpfung der Vektoren und einen nicht zu frühen Aussaattermin der Herbstkultur beeinflusst. In der Gerstenzüchtung wurde bisher das Resistenzgen *Ryd2* genutzt. Inzwischen sind weitere toleranzbedingende Loci wie *Ryd3* und ein QTL (*Quantitative trait locus*) auf Chromosom 2H identifiziert worden. Ziel der Arbeiten ist es, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob durch eine markergestützte Kombination der Toleranzallele dieser Loci das Toleranzniveau der Gerste gegenüber BYDV erhöht werden kann. Hierzu wurden aus Kreuzungen von toleranten Elternlinien Populationen von doppelhaploiden (DH) Linien erstellt, die zunächst mit bekannten PCR-Markern für die entsprechenden Loci genotypisiert wurden. Nach Inokulation mit dem Virusisolat BYDV-PAV wurden die DH-Linien in Feldversuchen phänotypisch charakterisiert, d.h. deren

Virusbefall (DAS-ELISA), sowie Wuchs- und Ertragsparameter bestimmt. Die Kombination von *Ryd2* und *Ryd3* führte zu einer signifikanten Verringerung des Virusgehaltes in den Pflanzen im Vergleich zu den genotypisch anfälligen Linien (*ryd2/ryd3*) und solchen mit den entsprechenden einzelnen positiven Allelen. Ebenso konnte zum Teil für diese Kombination (*Ryd2/Ryd3*) im ersten Versuchsjahr eine höhere Leistung im relativen Körnertrag pro Pflanze gegenüber den anderen Genotypen nachgewiesen werden. Der QTL auf Chromosom 2H zeigte hingegen nur eine vergleichsweise geringe Toleranzwirkung.

Stichwörter: Gerstengelverzweigung, BYDV, Gerste, Toleranz, Resistenz, *Ryd2*, *Ryd3*, QTL, Pyramidisierung, molekulare Marker

Abstract

The aphid-transmitted *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) is an important pathogen in cereals. Due to the predicted global warming the importance of this virus will increase in the future. In cereal growing systems this virus is mainly combated by spraying insecticides and by a later sowing date in autumn. In barley breeding the gene *Ryd2* was mainly used, but in the meantime additional sources of tolerance were identified, like the gene *Ryd3* and a QTL on chromosome 2H. The aim of this work is the combination of the tolerance alleles of these three loci by marker assisted selection to improve the level of tolerance against BYDV in barley. To achieve this, doubled haploid (DH) lines out of a cross of tolerant parental lines were genotyped by specific PCR markers with regard to the above mentioned loci. Furthermore, DH lines were investigated in field tests after inoculation with BYDV-PAV to characterize virus attack, growth and yield parameters. The combination of *Ryd2* and *Ryd3* results in a significantly decreased virus attack compared to all other allele combinations. In spring barley this combination leads to a significantly increased relative grain yield.

Keywords: *Barley yellow dwarf virus*, barley, tolerance, resistance, pyramiding, molecular marker, aphid

Einleitung

Das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), gehört zur Gattung *Luteovirus*, Familie *Luteoviridae*, und besitzt ein ssRNA-Genom. Wirtspflanzen sind neben der Gerste alle weiteren Süßgräser (*Poaceae*). BYDV ist weltweit verbreitet und wird persistent durch verschiedene Blattlausarten übertragen, wobei das jeweilige Virusisolat nach dem Hauptvektor benannt ist. In Deutschland und Mitteleuropa ist BYDV-PAV mit den Hauptvektoren *Rhopalosiphum padi* und *Sitobion avenae* am bedeutendsten. Zu den Virussympptomen an der Gerste zählen neben der Verzweigung und Vergilbung der Pflanzen auch eine reduzierte Anzahl ährentragender Halme, ein verzögertes Ährenschieben, sowie eine reduzierte Winterfestigkeit. Durch das periodisch epidemische Auftreten können die genannten Symptome im Anbau zu erheblichen Ertragsverlusten von bis zu 40 % (Lister und Ranier, 1995) führen. Außerdem ist durch die prognostizierten milderen Herbst- und Wintertemperaturen mit einer steigenden Bedeutung zu rechnen, da sich dadurch die Aktivitätsperiode der Blattläuse verlängert. Im Moment stützt sich die Bekämpfung von BYDV in der Praxis hauptsächlich auf die chemische Blattlausbekämpfung, die aber ebenso wie ergänzende ackerbauliche Maßnahmen, wie die Vernichtung des Ausfallgetreides als mögliche Virusquellen und spätere Aussaattermine im Herbst, um einen hohen Infektionsdruck auf die Jungpflanze zu vermeiden, oft aus witterungstechnischen oder betriebswirtschaftlichen Gründen nicht immer erfolgreich durchzuführen sind. Eine Lösung wäre ein direkter Schutz der Pflanze vor dem Virus, wie er durch eine Resistenz bzw. Toleranz gegenüber BYDV gegeben wäre. Es sind mehrere Quellen für eine Toleranz gegen BYDV aus dem primären Genpool der Kulturgerste bekannt, allerdings wurde in der Züchtung bisher nur das Gen *Ryd2* in Gerstensorten eingelagert ('Vixen', 'Naturel'). *Ryd2* (Schaller et al. 1964) auf Chromosom 3H (Collins et al. 1996) stammt ebenso aus Äthiopien, wie das erst vor wenigen Jahren auf Chromosom 6H identifizierte Gen *Ryd3* (Niks et al. 2004). Des Weiteren wurde ein QTL (*Quantitative trait locus*) auf Chromosom 2H in der Akzession 'Post' identifiziert (Scheurer et al. 2001). Für alle drei Loci sind PCR-basierte molekulare Marker bekannt, wodurch eine markergestützte Selektion auf diese Toleranz möglich wird.

Ziel dieser Arbeiten ist die Frage zu klären, ob durch die Kombination der bekannten Toleranzallele *Ryd2*, *Ryd3*, QTL-2H in doppelhaploiden Gerstenlinien eine Erhöhung des Toleranzniveaus gegenüber BYDV erreicht wird, um damit aussichtsreiches Pflanzenmaterial als Grundlage für die Entwicklung toleranter Sorten zur Verfügung zu stellen.

Material und Methoden

Als tolerante Eltern zur Produktion von Wintergersten- bzw. Sommergersten-DH-Linien wurden die Linien 'RIL K4-56' (*Ryd3*) x 'DH136' (*Ryd2*, QTL-2H) und 'RIL K4-56' (*Ryd3*) x 'Coracle' (*Ryd2*) gekreuzt. Durch Mikrosporen- und Antherenkultur wurden anschließend durch die KWS-Lochow GmbH (Bergen) und die Saaten-Union Biotec GmbH (Leopoldshöhe) 474 Wintergersten DH-Linien und 295 Sommergersten DH-Linien *in vitro* erstellt. Die DNA der DH-Linien zur Genotypisierung wurde mit einer Miniprep-Methode nach Stein et al. (2002) extrahiert und für anschließende PCR-Reaktionen in aqua tridest auf 25ng/µl verdünnt. Zur Identifikation des Allels an den Loci *Ryd3* und QTL-2H wurden die SSR-Marker HVM74 (Niks et al. 2004) und HVCSG (Scheurer et al. 2001) verwendet. In beiden Fällen entsteht in der PCR beim Vorhandensein des Toleranzallels ein kürzeres Fragment, als beim Vorliegen des Anfälligkeitsallels (HVM74: 180 bzw. 188; HVCSG: 211 bzw. 219bp). Für den

Nachweis des *Ryd2*-Gens wurde der CAPS-Marker Ylp (Ford et al. 1998) verwendet, dessen PCR-Fragment (311bp) anschließend bei Vorliegen des Anfälligkeits-allels mit einem spezifischen Restriktionsenzym verdaut und somit um 58 Basen verkürzt wird.

Zur Phänotypisierung wurden von 200 DH-Linien je zehn Pflanzen beider Kreuzungen im Feld an vier Standorten in Deutschland (JKI, Quedlinburg; KWS-Lochow GmbH, Bernburg; Nordsaat, Gudow; Saatzucht Ackermann & Co, Irlbach), in zwei Wiederholungen und in zwei Vegetationsperioden (2007/2008, 2008/2009) nach Inokulation mit BYDV-PAV und parallel zum Vergleich als gesunde Kontrollpflanzen untersucht. Die Virusinokulation fand mit Hilfe von virustragenden *Rhopalosiphum padi* (ca. 10 Aphiden/Pflanze) statt, die im Gewächshaus auf die Keimpflanzen aufgebracht wurden. Nach fünf Tagen wurde mit dem Insektizid Confidor behandelt. Ausgepflanzt wurde entsprechend der Witterung an den Standorten Anfang bis Mitte Oktober (Wintergersten) bzw. Anfang April (Sommergersten). Zur Vermeidung von spontanen Virusinfektionen wurden die Feldversuche regelmäßig mit Insektizid behandelt.

Nach Abschluss der Bestockung wurden eine Symptombonitur (1: ohne Symptome, 9: abgestorben) und ein DAS-ELISA nach der Methode von Clark und Adams (1977) durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde die Wuchshöhe, der Termin für das Ährenschieben, sowie zur Ernte die Ährenzahl, der Kornertrag und das Tausendkorngewicht erfasst. Die Toleranz der einzelnen DH-Linien wurde als relative Leistung der infizierten Variante zur gesunden Kontrollvariante berechnet. Für den ELISA wurden 3 (2008) bzw. 10 (2009) Wintergersten DH-Linien und 6 (2008) bzw. 20 (2009) Sommergersten DH-Linien mit je 40 Pflanzen beprobt.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SAS 9.1 durchgeführt. Die Daten, mit Ausnahme der Boniturnoten, wurden mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Test ($\alpha=0,05$) analysiert. Die ordinal-skalierten Boniturnoten wurden mit einer Bootstrap-Methode nach Neuhäuser und Jöckel (2006) und anschließendem t-Test ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf das erste Jahr der Feldversuche (2007/2008), da die Auswertung des zweiten Jahres noch nicht abgeschlossen ist.

Ergebnisse und Diskussion

Die Genotypisierung aller vorhandenen DH-Linien für die untersuchten Loci ergab eine gleichmäßige Aufspaltung (χ^2 3,04) der Sommergersten-DH-Linien auf die vier möglichen Genotypklassen, wohingegen in den Wintergersten-DH-Linien eine deutliche Abweichung von einer Gleichverteilung festzustellen war (χ^2 74,61).

In der Symptombonitur zeigten die DH-Linien mit *Ryd2* und/oder *Ryd3* im Durchschnitt eine lediglich schwache bis starke Vergilbung (Boniturnoten 2-3). Im Gegensatz dazu führte die Virusinfektion bei DH-Linien ohne Toleranzallele und Linien mit nur dem QTL-2H zu einer deutlichen Verzweigung der Pflanzen (Abbildung 1). Bei der relativen Wuchshöhe, dem Tausendkorngewicht und im Termin des Ährenschiebens zeigte sich ebenfalls nur bei diesen anfälligen Linien ein deutlicher Einfluss der Virusinfektion. Wintergersten und Sommergersten DH-Linien ohne Toleranzallele wiesen im Mittel Ertragsseinbußen von etwa 70 % auf. Bei den Sommergersten ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen Allelkombinationen, wobei die Linien mit den beiden Toleranzallelen *Ryd2* und *Ryd3* den höchsten relativen Kornertrag zeigten, gefolgt von Linien mit nur *Ryd3* und jenen mit nur *Ryd2*. In den Wintergersten waren die Linien mit *Ryd2* und/oder *Ryd3* auf einem relativen Ertragsniveau von 90 bis 100 %, der QTL 2H zeigte hier einen deutlich geringeren Effekt (50 %). Die relative Ährenzahl pro Pflanze verhielt sich übereinstimmend mit dem relativen Ertrag.

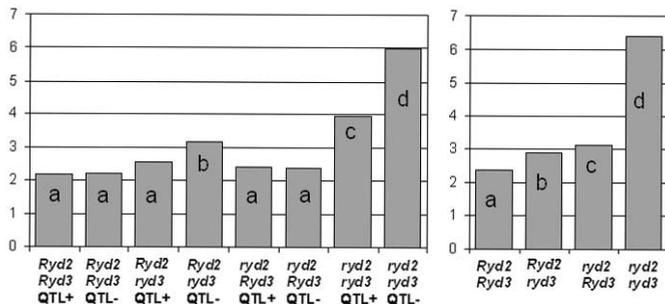


Abb. 1 Mittlere Boniturnote der Wintergersten (links) und der Sommergersten DH-Linien (rechts) für die Allelkombinationen; 1: ohne Symptome, 9: abgestorben

Im ELISA ergab sich in beiden Populationen und in beiden Versuchsjahren eine deutlich verringerte Virusextinktion bei den infizierten Pflanzen der Allelkombinationen mit *Ryd2* und *Ryd3*. Wintergersten mit dieser Kombination erreichten im Mittel lediglich 25 % der ELISA-Extinktion im Vergleich zu den Pflanzen der anderen Allelkombinationen, bei den Sommergersten waren es 50 %. Aufgrund der signifikant reduzierten Werte im ELISA für die DH-Linien mit *Ryd2* und *Ryd3* kann auf einen Einfluss dieser Kombination auf die Virusvermehrung in der

Pflanze geschlossen werden. Das heißt, durch diese Allelkombination wird eine „quantitative Resistenz“ gegenüber BYDV-PAV erzielt. Im Gegensatz dazu konnten Scholz et al. (2009) in *Hordeum bulbosum* ein Majorgen für eine absolute Resistenz identifizieren, das sie als *Ryd4^{thb}* bezeichnen. Im Vergleich zu *Ryd2* und *Ryd3*, die aus dem primären Genpool der Kulturgerste stammen, ist bei *Ryd4^{thb}* zur Beseitigung negativer Effekte aus *Hordeum bulbosum* weitere Züchtungsforschung notwendig, wie zum Beispiel zur Eliminierung eines aufgetretenen Letalfaktors, bis diese Resistenzquelle in der Sortenzüchtung genutzt werden kann.

Danksagung: Die dargestellten Arbeiten sind Teil eines Projektes (PGI-06.01-28-1-41.002-06), das im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), sowie die Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) finanziert wurde. Für diese finanzielle Unterstützung danken wir ebenso wie den kooperierenden Züchtungsunternehmen Dr. J. Ackermann & Co – Saatzucht Irlbach, KWS Lochow GmbH, Nordsaat Saatzuchtgesellschaft mbH und Saaten-Union Biotec GmbH für die Erstellung der DH-Linien bzw. Durchführung der Feldversuche.

Literatur

- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483
- Collins, N.C., Paltridge, N.G., Ford, C.M., Symons, R.H., 1996: The Yd2 gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 858-864
- Ford, C.M., Paltridge, N.G., Rathjen, J.P., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Symons, R.H., 1998: Rapid and informative assays for Yd2, the barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. *Molecular Breeding* **4**, 23-31
- Lister, M.R., Ranieri, R., 1995: Distribution and Economic Importance of Barley Yellow Dwarf. In: D'Arcy, C. J., Burnett, P. A. (eds.): *Barley Yellow Dwarf-40 Years of Progress*. APS Press, St. Paul, 29-53.
- Neuhäuser, M., Jöckel, K.-H., 2006: A Bootstrap Test for the Analysis of Microarray Experiments with a Very Small Number of Replications. *Applied Bioinformatics* **5**, 173-179
- Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F., 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1536-1543
- Schaller, Qualset, C.O., Rutger, J.N., 1964: Inheritance and linkage of the *Yd2* gene conditioning resistance to barley yellow dwarf virus disease in barley. *Crop Sci.* **4**, 544-548
- Scheurer, K.S., Friedt, W., Huth, W., Waugh, R., Ordon, F., 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1074-1083
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuss, A., Schrader, O., Pendinen, G., Fischer, K., Wehling, P., 2009: *Ryd4^{thb}*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* **119**, 837-849
- Stein, N., Herren, G., Keller, B., 2001: A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356

Purfürst, Stephanie; Habekuss, Antje; Kopahnke, Doris; Krämer, Ilona; Perovic, Dragan; Cöster, Hilmar; Ordon, Frank

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

Thinopyrum-Arten als Donoren von Resistenzen gegen wichtige Pathogene im Winterweizen (*Triticum aestivum* L.)

Thinopyrum species as donors of resistance against important pathogens in winter wheat (*Triticum aestivum* L.)

Zusammenfassung

In bekannten Kulturformen des Weizens (*Triticum aestivum* L.) werden immer seltener neue Resistenzen gegen wirtschaftlich bedeutende Krankheitserreger (*Oculimacula* spp, *Fusarium culmorum*, *Puccinia tritica* und *Barley yellow dwarf Virus*) identifiziert. Die Identifikation von Resistenzgenen aus der Wildtypform *Thinopyrum* spp. und deren anschließende Nutzung in der Weizenzüchtung ist somit Ziel dieses Projekts. Für ein markergestütztes Rückkreuzungsprogramm stehen zwei Translokationslinien PI583794 und PI611939, als Träger einer *Thinopyrum*-Introgression auf Chromosom 4D, sowie 3 Weizensorten (Boomer, Esket und Mirage) zur Verfügung. Für die phänotypische Charakterisierung wurden diese Linien auf ihre Resistenz gegen die genannten Erreger getestet. Parallel dazu erfolgte die genotypische Charakterisierung. Mit den spezifischen Primern STSJ15 und 2P1/2P2 konnte die Introgression nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Größe des Introgressionsfragments wurden ausgewählte Genotypen der BC₁F₁ und BC₂F₁ mit polymorphen SSRs analysiert, um auf diese Weise Genotypen zu identifizieren, welche ein möglichst kleines Introgressionsfragment aufweisen, jedoch resistent sind.

Stichwörter: Weizen (*Triticum aestivum* L.), *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia triticina*, Barley yellow dwarf Virus, PI583794, PI611939, STSJ15, 2P1/2P2

Abstract

In order to broaden the genetic base in *Triticum aestivum* against economically important pathogens (*Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia triticina* and *Barley yellow dwarf virus*) wheat translocation lines carrying a chromosomal segment derived from *Thinopyrum* spp are tested for resistance and analyzed by molecular techniques. Two introgression lines PI583794 and PI611939 as carriers of the *Thinopyrum*-fragment, as well as 3 wheat cultivars (Boomer, Esket and Mirage) are used for a marker-assisted back crossing program. For the phenotypic characterization, these lines were tested for resistance against these above mentioned pathogens. In addition to the genotypic characterization was carried out using *Thinopyrum* specific primers STSJ15 and 2P1/2P2 to identify the introgression.. To define the size of the introgressions-fragments selected genotypes of the BC₁F₁ and BC₂F₁ were tested with polymorphic microsatellites (SSRs) in order to identify those genotypes carrying only a small fragment of *Thinopyrum* spp. but still being resistant.

Keywords: wheat (*Triticum aestivum* L.), *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia triticina*, Barley yellow dwarf, PI583794; PI611939, STSJ15, 2P1/2P2

Danksagung: Die Autoren danken dem BMELV sowie RAGT 2n für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Rahmen der Innovationsförderung (28-1-43.010-07).

Bartelmann, Anne^{1,2}; Balko, Christiane²; Seddig, Sylvia²

¹FU-Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Berlin; ²Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Versuchsstation für Kartoffelforschung, OT Groß Lüsewitz, Sanitz

Evaluierung von Kartoffelgenotypen bezüglich Trockentoleranz

Evaluation of potato genotypes regarding drought tolerance

Zusammenfassung

Zur Identifizierung und Validierung von Kandidatengen für die Trockentoleranz in Kartoffeln wurden 40 *S. tuberosum*-Genotypen in einem Gefäßversuch unter einem Rain-out Shelter unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen evaluiert. Je Genotyp wurden 24 *in vitro*-Pflanzen in 51 Töpfen bis zum Beginn der Knollenbildung unter Kontrollbedingungen kultiviert. Danach wurden die Pflanzen Trockenstress (20 Tage kein Wasser) ausgesetzt bzw. als Kontrolle weiterhin optimal bewässert. Probenahmen von Blättern in den Stress- und Kontrollpflanzen ermöglichten die Bestimmung spezifischer Inhaltsstoffe zu sechs verschiedenen Zeitpunkten. Weiterhin wurden etwa 50 Kandidatengen-Primerpaare für eine Expressionsanalyse mittels Realtime RT-PCR entwickelt. Die nach Beendigung der Stressphase unter Kontrollbedingungen bis zur Ernte kultivierten Kartoffelgenotypen wurden hinsichtlich phänotypischer Merkmale evaluiert. Nach der Ernte erfolgte die Charakterisierung der Erträge, der Ertragsparameter sowie der Knollenqualität. Der Versuch zeigte eine große Variabilität der ausgewählten Sorten bezüglich ihrer Reaktion auf den Trockenstress. Die Kombination der phänotypischen mit den genotypischen Daten wird zur Entwicklung molekularer Marker beitragen, welche eine gezielte Selektion trockenintoleranter Kartoffelgenotypen ermöglichen.

Stichwörter: Trockentoleranz, Kartoffel, Realtime RT-PCR

Abstract

For the identification and validation of candidate genes for drought tolerance in potatoes, 40 *S. tuberosum* genotypes were evaluated in a pot experiment in a rainout shelter under control and drought stress conditions. Per genotype 24 *in vitro* plants were cultured in 51 pots under control conditions until the start of tuber formation. Thereafter, the plants were subjected to drought stress (20 days no water) or in case of the controls were optimally irrigated. Sampling of leaves in the stressed and control plants allowed the identification of specific components related to drought stress at six different times. Furthermore, about 30 primer pairs for candidate gene expression analysis using real time RT-PCR were developed. After termination of the stress phase the potato genotypes were cultured under control conditions until harvest and were evaluated with regard to phenotypic characteristics. After harvest, yield, yield parameters and tuber quality were characterized. The trial showed a great variation of the selected varieties with respect to their response to drought stress. The combination of the phenotypic and the genotypic data will contribute to the development of molecular markers which allow a targeted selection of drought-tolerant potato genotypes.

Keywords: drought tolerance, potato, realtime RT-PCR

Einleitung

Im Zuge des Klimawandels werden abiotische Stressfaktoren, wie Trockenheit, Hitze und Bodenversalzung, einen immer stärkeren Einfluss auf die Entwicklung von Nahrungspflanzen nehmen. Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), die zu den vier wichtigsten Nahrungspflanzen weltweit zählt, reagiert sehr sensibel auf diese Faktoren, wobei

neben Ertrag und Ertragsstabilität vor allem die Qualität der Knollen beeinflusst wird. Die Kartoffel verfügt über ein relativ schwaches Wurzelsystem und hat für die Ausbildung von Knollen einen sehr hohen Wasserbedarf (Gopal und Iwama, 2007; Watkinson et al. 2008). Eine gezielte züchterische Verbesserung der abiotischen Stresstoleranz bei Kartoffeln kann einen nachhaltigen Beitrag zur Stabilisierung des Anbaus unter ungünstigen klimatischen Bedingungen leisten und somit zur Sicherung des steigenden Nahrungsmittelbedarfs der wachsenden Weltbevölkerung beitragen. Voraussetzung für diese züchterische Arbeit sind Selektionsmethoden und –marker, die einen effizienten Züchtungsfortschritt ermöglichen. Die durch Trockenstress induzierten Änderungen in der Genexpression und den Stoffwechselfvorgängen sind sowohl vom physiologischen Zustand der Pflanze selbst, als auch von der Dauer und Intensität des Stresses abhängig (Lahlou et al. 2003). Daraus resultiert die Akkumulation von verschiedenen Metaboliten, wie z.B. Prolin, freien Aminosäuren, Abscisinsäure oder löslichen Zuckern (Seddig und Balko 1998, Doczi et al. 2005), die als Indikatoren für Trockentoleranz verwendet werden können.

Material und Methoden

Ein diverses Sortiment von 40 trockenoleranten und sensiblen Kartoffelsorten wurde hinsichtlich der Reaktion auf Trockenstress in einem Gefäßversuch evaluiert. Dazu wurden 24 Pflanzen je Sorte in einem Rain-out Shelter in 5l Töpfen mit einer Erde aus 95 % Weißtorf und 5 % Sand kultiviert. Mit Beginn der Knollenbildung (45 Tage nach Pflanzung) wurde durch das Einstellen der Wassergaben für 20 Tage Trockenstress appliziert, parallel dazu wurden Kontrollpflanzen weiterhin mit 70 % der maximalen Wasserkapazität bewässert. Nach Beendigung der Stressphase wurden die Pflanzen bis zur natürlichen Abreife weiter wie die Kontrollpflanzen bewässert (je nach Sorte 91 bis 140 Tage), um letztendlich die Erträge, Ertragsparameter und Knollenqualität zu vergleichen.

Die Evaluierung umfasste weiterhin die Dokumentation der Umweltbedingungen (Boden- und Lufttemperatur, Wasserverbrauch), die Beschreibung der Pflanzenentwicklung (Größe, Biomasse, Blühbeginn), die Bestimmung von spezifischen Inhaltsstoffen in den Blättern (Proteine, Aminosäuren, Prolin) sowie die Expressionsanalyse von Kandidatengenen für Trockentoleranz mittels Realtime RT-PCR. Für diese Bestimmungen wurden jeweils das erste und zweite voll entwickelte Fiederblatt von zwei Pflanzen je Variante zu verschiedenen Zeitpunkten während der Stressphase entnommen, insgesamt waren es sechs Probenahmen (eine vor -, vier während - und eine nach dem Stress). Die Prolinbestimmung erfolgte in Anlehnung an Bates et al. 1973 und die Proteingehalte bzw. Stickstofffraktionen (Seddig & Balko 1998) wurden nass-chemisch nach Kjeldahl bestimmt.

Für die Expressionsanalyse von Trockentoleranz-Kandidatengenen wurde zunächst Gesamt-RNA aus gefrorenen Blattproben ausgewählter Sorten zu zwei Stresszeitpunkten (9 und 19 Tage nach Stressbeginn) in Anlehnung an Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Nach DNaseI-Behandlung wurde cDNA mittels RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverser Transkriptase und Random Hexamer Primern synthetisiert. Genspezifische Primer wurden mittels Primer3 abgeleitet (Rozen & Skaletzky, 2000). Realtime RT-PCR wurde mit dem 7500 Fast System (Applied Biosystems) unter Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Morphologische und Physiologische Auswirkungen von Trockenstress: Der Versuch zeigte eine große Variation der ausgewählten Sorten in ihrer Reaktion auf den Trockenstress. Nach drei Wochen Stress und erneutem Wässern reichten die Phänotypen von komplett seneszenten bis hin zu vollständig regenerierten Pflanzen (Abbildung 1A-C).

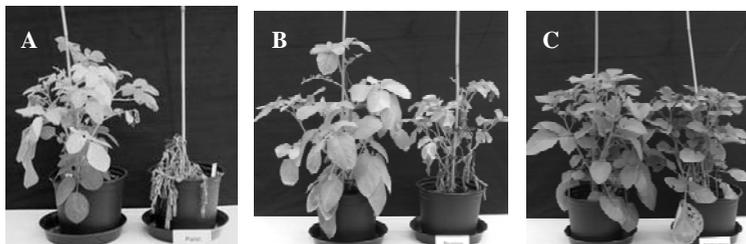


Abb. 1 Erscheinungsbild verschiedener Kartoffelsorten nach Trockenstress und erneutem Wässern

Auch die Ertragsdaten spiegeln die kontrastierenden Stressreaktionen wider, die Ertragsreduktionen reichten dabei von 10 bis 71 %. Die höchsten Erträge unter Stress zeigten die Sorten Aranyalma, Astrid und Arran Banner. Die beste Ertragsstabilität trat bei der Sorte Prof. Wohlmann auf, diese wies allerdings unter Kontrollbedingungen nur geringe Erträge auf (Abbildung 2). Neben den Ertragsreduktionen spielte auch die Änderung in der Verteilung der Knollengrößen eine Rolle. Auch bezüglich der Knollenqualität konnten deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Stressvarianten beobachtet werden. So kam es zur Reduktion in der Trockenmasse sowie zu Veränderungen in den Gehalten an Protein, freien Aminosäuren, Stärke und Chlorogensäure (nicht gezeigt).

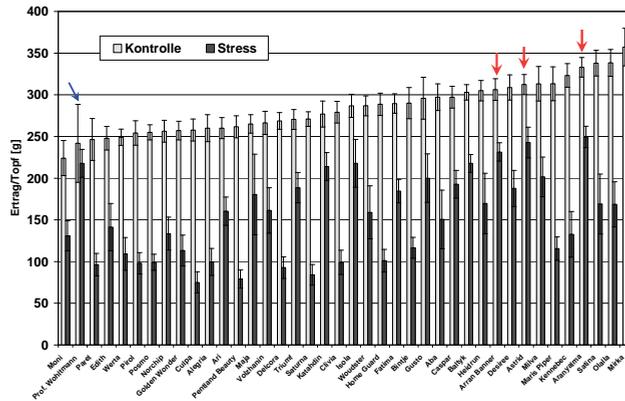


Abb. 2 Einfluss von Trockenstress auf die Knollerträge verschiedener Kartoffelsorten. Rote Pfeile: Sorten mit den besten Stress-Erträgen; blauer Pfeil: Sorte mit dem besten Relativertrag

Weiterhin veränderten sich die Konzentrationen verschiedener Inhaltsstoffe in den Blättern während der Stressphase deutlich. So war beispielsweise der „Stressmarker“ Prolin in Kontrollblättern kaum nachweisbar und in gestressten Blättern stark erhöht (Abbildung 3A). Auch die Konzentration spezifischer Stickstofffraktionen stieg unter Trockenstress an (Abbildung 3B), dabei zeigte sich eine Tendenz für höheren Stickstoffgehalt mit zunehmender Toleranz der Sorten (nicht gezeigt).

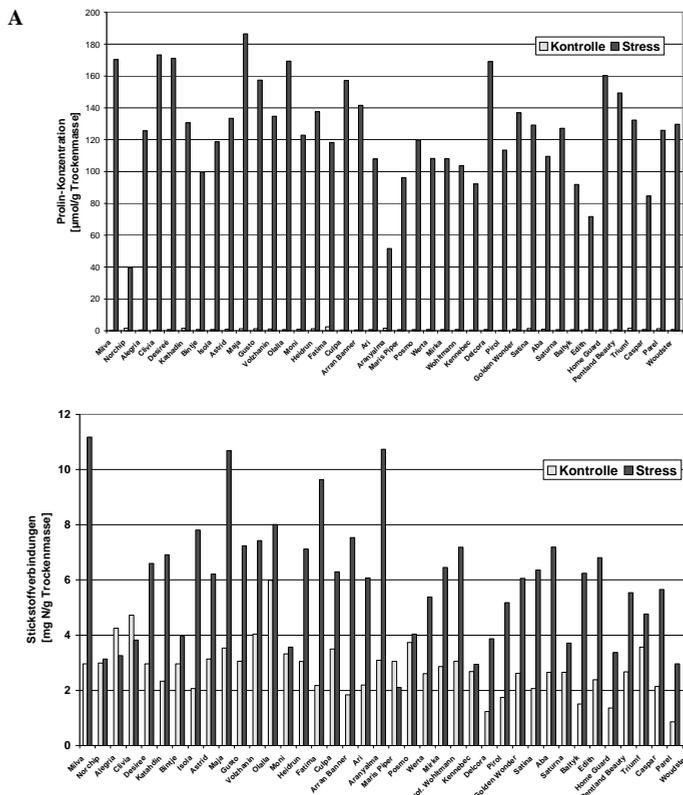


Abb. 3 Konzentration verschiedener Inhaltsstoffe in Blättern von Kontroll- und gestressten Pflanzen. A) Prolingehalt, bestimmt 13 Tage nach Stressbeginn; B) Gehalt spezifischer Stickstofffraktionen, bestimmt 19 Tage nach Stressbeginn

Die in diesem Versuch angewandten Trockenstressbedingungen und untersuchten Merkmale lassen eine gute Einteilung des Kartoffelsortiments in tolerante und sensible Sorten zu und stellen somit ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung von Trockenstress bei Kartoffeln dar.

Molekularbiologische Untersuchungen: Um die Expressionsänderungen verschiedener Kandidatengene für Trockentoleranz zu untersuchen, wurde zunächst eine Auswahl von Kandidatengenen auf Grundlage von Microarray-Experimenten an Kartoffeln (Rensink et al. 2005; Schafleitner et al. 2007) erstellt. Diese umfasst verschiedenste funktionelle Kategorien, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, ROS-Detoxifizierung oder Signalling. Bisher wurden etwa 50 Kandidatengen-Primerpaare für Realtime RT-PCR-Analysen entwickelt. Nach ersten Test-PCRs mit cDNA und genomischer DNA wurde eine Auswahl dieser Primer in Realtime RT-PCR Pilotexperimenten in der Sorte Desiree optimiert. Die Qualität der Primer wurde analysiert, indem Schmelzkurven und Verdünnungskurven für eine Bestimmung der PCR-Effizienz analog zu Schafleitner et al. (2007) erstellt wurden (Abbildung 4).

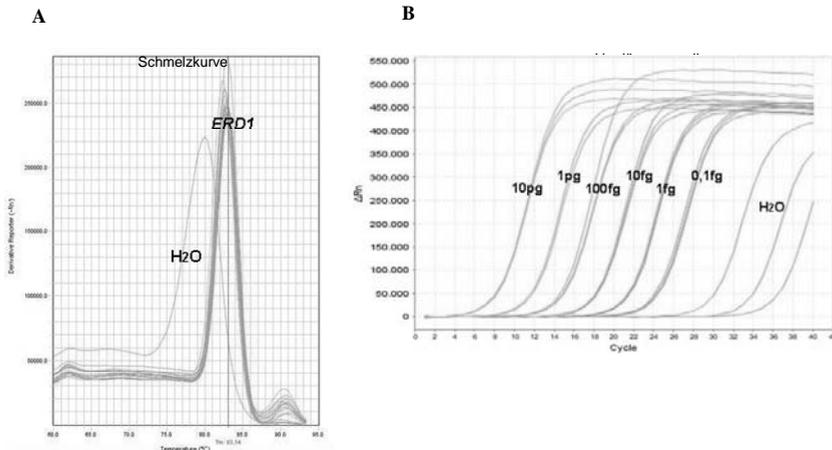


Abb. 4 Beispiele für die Realtime RT-PCR-Primeroptimierung für ein Kandidatengen aus der Kategorie „Signalling“, *ERD1* (*Early Response to Desiccation 1*). A) Schmelzkurven verschiedener PCR-; B) Verdünnungskurven eines exemplarischen aufgereinigten PCR-Fragmentes zur Ermittlung der Primereffizienz.

Für die Expressionsanalysen bei Kartoffeln konnte ein Set an mehr als 30 Primerpaaren etabliert und optimiert werden. Um unterschiedliche Effizienzen bei der cDNA-Synthese auszugleichen, ist die Normalisierung der Transkriptlevel in Kontroll- und Stresspflanzen mit Housekeeping-Genen, die keine bzw. nur geringste Expressionsänderungen zwischen verschiedenen Stressbehandlungen und Genotypen aufweisen, notwendig (Vandesompele et al., 2002). Hierfür wurden verschiedene Housekeeping-Gene getestet und mittels paarweisen Vergleichen nach ihrer Expressionsstabilität klassifiziert (geNorm; Vandesompele et al., 2002). Dabei zeigten sich *EF1a* (Elongationsfaktor 1a) und das cytoplasmatische ribosomale Protein *L2* als die stabilsten Housekeeping-Gene. Das entwickelte Set an Kandidatengenprimern wird nun für ein Screening der kontrastiersten Kartoffelgenotypen eingesetzt. Dabei zeigten sich bereits erste Unterschiede in der Expression zwischen trockenoleranten und sensiblen Sorten, die aber noch weiter untersucht und statistisch validiert werden müssen. Letztendlich wird nach der Untersuchung der Kandidatengene die Kombination der genotypischen mit den phänotypischen Daten zur Entwicklung molekularer Marker beitragen, welche eine gezielte Selektion trockenoleranter Kartoffelgenotypen ermöglichen um die Leistungsfähigkeit dieser wichtigen Nahrungspflanze unter ungünstigen klimatischen Bedingungen zu sichern.

Danksagung: Die vorliegende Arbeit wird angefertigt im Rahmen des GTZ-Projektes „Enhanced food and income security in Southwest and Central Asia (SWCA) through potato varieties with improved tolerance to abiotic stress“ (Projekt-Nr: 07.7860.5-001.00). Die 40 Kartoffelsorten wurden vom Groß Lüsewitzer Kartoffelsortiment der IPK-Genbank zur Verfügung gestellt. Besonderer Dank gilt Frau Schmidt, Frau Kiesel, Frau Weber, Frau Krohn und Frau Kempke für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und den technischen Arbeiten.

Literatur

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**:156–159.

- Doczi, R., Kondrak, M., Kovacs, G., Beczner, F., Banfalvi, Z. (2005): Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in solanaceous species. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**:269–276.
- Gopal, J., Iwama, K. (2007): In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep* **26**:693–700.
- Lahlou, O., Ouattar, S., Ledent, J.-F. (2003): The effect of drought and cultivar on growth parameters, yield and yield components of potato. *Agronomie* **23**:257–268.
- Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., Buell, C.R. (2005): Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* **48**:598–605.
- Rozen, S., Skaletzky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, NJ: Humana Press.
- Schafleitner, R., Rosales, R.O.G., Gaudin, A., Aliaga, C.A.A., Martinez, G.N., Marca, L.R.T., Bolivar, L.A., Delgado, F.M., Simon, R., Bonierbale, M. (2007): Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**:673–690.
- Seddig, S., Balko, C. (1998): N-metabolism in potatoes under drought stress – conditions and consequences. *Beiträge zur Züchtungsforschung*, **4**(2):175–176
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**(7):research0034.I-0034.II.
- Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Heath, L.S., Bohnert, H.J., Grene, R. (2008): Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:34–45.

Schwander, Florian; Eibach, Rudolf

Julius Kühn-Institut, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Neue molekulare Marker für die Rebenzüchtung zur gezielten Pyramidisierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*)

New molecular markers for downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance as a tool for pyramiding resistance genes in grapevine breeding

Zusammenfassung

Molekulare Marker eröffnen neue Möglichkeiten für eine effiziente, zielgerichtete und beschleunigte Züchtung neuer Rebsorten. Von besonderem Interesse sind sie beispielsweise im Hinblick auf die gezielte Kombination verschiedener Abwehrmechanismen in einer Pflanze (Pyramidisierung) zur Etablierung einer hohen und dauerhaften Resistenz. Zu diesem Zweck sollen neue Molekulare Marker für die aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* stammenden *Plasmopara*-Resistenzmechanismen entwickelt und für die Züchtung nutzbar gemacht werden.

Stichwörter: *Plasmopara viticola*; Resistenzzüchtung; Molekulare Marker; Blattscheibentest

Abstract

Molecular markers are a superior tool to make grapevine breeding more efficient and faster. A matter of particular interest is to identify the combination of different defence mechanisms in one plant to select durable highly resistant plants. For this case we are developing new molecular markers to detect the resistance mechanisms out of the Asian wild type *Vitis amurensis* against downy mildew (*Plasmopara viticola*) to use them in our marker based breeding program.

Keywords: *Plasmopara viticola*; resistance breeding; molecular marker; leaf disc test

Einleitung

Resistenz gegen *Plasmopara viticola*: *Plasmopara viticola*, der Erreger des Falschen Mehltaus an der Rebe, ist eines der Hauptpathogene im europäischen Weinbau. Der pilzliche Erreger aus der Klasse der Oomyceten wurde 1878 von Amerika nach Europa eingeschleppt und nur intensive Pflanzenschutzmaßnahmen können bei den europäischen Rebsorten der Art *Vitis vinifera* hohe Ertrags- und Qualitätseinbußen verhindern. Zwischenzeitlich wurden im Rahmen der Resistenzzüchtung bei Reben neue Sorten mit guten Resistenzeigenschaften gegenüber *P. viticola* entwickelt, die eine deutliche Reduktion der Pilzbekämpfungsmaßnahmen erlauben.

Die Resistenz lässt sich in den meisten Fällen, wie beispielsweise auch bei der neuen Rebsorte 'Regent', auf die Nutzung amerikanischer Wildarten als Resistenzquelle zurückführen. Aus Untersuchungen an einer Kreuzungspopulation zwischen 'Regent' x 'Lemberger' konnten, für die auf diese Resistenzquelle zurückzuführende *Plasmopara*-Resistenz, bereits ein Haupt-QTL (quantitative trait locus) und mehrere resistenzkorrelierende Mikrosatelliten-Marker (SSR-Marker) identifiziert werden (Fischer et al. 2004, Welter et al. 2007, Zyprian et al. 2004).

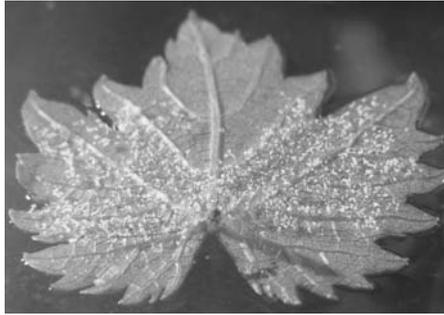


Abb. 1 Stark mit *Plasmopara viticola* infizierte Blattunterseite. *P. viticola* konnte durch die Spaltöffnungen (Stomata) in das Blatt eindringen, es infizieren und Sporangienträger ausbilden. Diese dienen der Verbreitung des Parasiten und sind auf dem Bild als weißer Pilzrasen zu erkennen

Es gibt jedoch auch Sorten wie beispielsweise 'Solaris', deren Resistenzeigenschaften aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* stammen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass 'Solaris' die bereits bekannten molekularen Marker der amerikanischen Resistenzen nicht besitzt, hier also offensichtlich andere Resistenzgene für die Abwehr von *P. viticola* verantwortlich sind. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass 'Solaris' bei einem Kontakt mit dem Pathogen die Spaltöffnungen (Stomata) durch Callose-Ablagerungen verschließt und *P. viticola* somit am Eindringen hindert (Gindro et al., 2003). Außerdem ist beschrieben, dass die Infektion mit *P. viticola* in Solaris zu einer Bildung der für diesen Parasiten toxischen Stilbene ϵ - und δ -Viniferin führt (Pezet et al. 2004, Pezet et al. 2004b).

Markerunterstützte Selektion in der Züchtung: Die Kreuzung von pathogenresistenten und zugleich qualitativ hochwertigen Rebsorten erfordert im Rahmen der konventionellen Züchtung 25 bis 30 Jahre. Es ist zu erwarten, dass sich diese Zeitspanne mit Hilfe von molekularen Markern zukünftig um etwa 10 Jahren verkürzen lässt. Die markergestützte Selektion ermöglicht darüber hinaus eine gezielte Kombination verschiedener Resistenzmechanismen in einer neuen Sorte (Pyramidisierung), was zu einer stabileren Resistenz führt (Eibach et al. 2007). Darum sollen molekulare Marker für die aus *Vitis amurensis* stammenden Resistenzeigenschaften gegen *P. viticola* identifiziert und für die Züchtung nutzbar gemacht werden.

Material & Methoden

Kreuzungspopulation: Für die Untersuchungen wird die F1- Generation aus der Kreuzung Gf.Ga-52-42 x 'Solaris' verwendet. Die Population umfasst aktuell 273 Individuen. Der Zuchtstamm Gf.Ga-52-42 ('Bacchus' x 'Villard blanc') ist aus der Resistenzzüchtung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof hervorgegangen und besitzt die bekannten resistenzkorrelierten *Plasmopara*-Marker, die auch die Sorte 'Regent' trägt. Somit kann in der bearbeiteten Kreuzungspopulation von einer unabhängigen Segregation sowohl der auf asiatische als auch auf amerikanische Quellen zurückzuführenden Resistenzeigenschaften ausgegangen werden. Es sind in der Kreuzungspopulation Individuen zu erwarten, die eine Kombination beider Resistenzen aufweisen, deren Resistenzen also pyramidiert sind.

Gf. Ga-52-42



Solaris



x

Bild: JKI, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof

Bild: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg

Abb. 2 Trauben der beiden Kreuzungseltern

Ermittlung der *Plasmopara*-Resistenz: Die phänotypische Bewertung der *Plasmopara*-Resistenz aller Individuen der Kreuzungspopulation erfolgte anhand von Blattscheibentests. Dazu wurden je Individuum vier Blattscheiben mit einem Korkbohrer ($\varnothing = 17$ mm) ausgestanzt und mit der Blattoberseite auf 0,8%igen Wasser-Agar gelegt. Die Infektion erfolgte mit einem 40 μ l-Tropfen einer *Plasmopara*-Sporensuspension (20000 Sporangiosporen/ml) mit einer anschließenden Inkubation im Dunkeln bei 25°C. Nach 16 h wurde der Suspensionstropfen abgesaugt und die Blätter für 6 weitere Tage bei Tageslicht inkubiert. Die Infektionen wurden unter dem Binokular mit 10facher Vergrößerung betrachtet und nach dem Schema Nr. 452 der OIV (International Organisation of Vine and Wine) von 1 (sehr geringe) bis 9 (sehr hohe oder totale Resistenz) bewertet. Um die Bewertung auf die mikroskopische Ebene anzupassen, wurden die Boniturnoten an der Anzahl gebildeter Sporangienträgern (ST) festgemacht (Boniturnote 1=dichter ST-Teppich; 3=über 20 ST; 5=6-20 ST; 7=1-5 ST; 9=kein ST).

Ergebnisse

Ermittlung der *Plasmopara*-Resistenz in der Kreuzungsnachkommenschaft: Gute phänotypische Daten sind eine wichtige Voraussetzung um die Resistenzgene gegen *Plasmopara* lokalisieren zu können. Blattscheibentests haben sich als eine gute Methode erwiesen, um die Ausprägung der *Plasmopara*-Resistenz zu ermitteln. Diese Methode erlaubt eine Evaluation vieler Individuen unter standardisierten Bedingungen, ohne dass dabei die Pflanzen selbst dem Stress einer Infektion ausgesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse von Infektionsversuchen an Blattscheiben, abgetrennten Blättern und ganzen Pflanzen eine hohe Korrelation aufweisen (Boso et al. 2008), was die Aussagekraft des Blattscheibentests bestätigt. Im Jahr 2009 wurden drei Bonituren mit jeweils vier Blattscheiben von allen Individuen der Kreuzungs-population durchgeführt.

Die Abbildung 3 zeigt, dass das Merkmal der *Plasmopara*-Resistenz in der bearbeiteten Population aufspaltet. Es befinden sich darunter sowohl hoch anfällige, als auch resistente Individuen und eine große Anzahl, die eine mittlere Resistenz aufweist. Nach Abschluss der zurzeit laufenden Arbeiten zur Erstellung einer genetischen Karte für diese Kreuzungspopulation werden die gewonnenen phänotypischen Daten einer Analyse hinsichtlich des Auftretens von QTLs für die *Plasmopara*-Resistenz unterzogen.

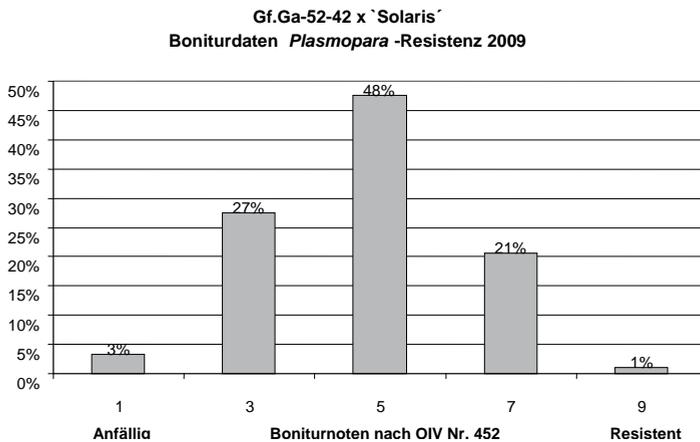


Abb. 3 Verteilung der Nachkommenschaft Gf.Ga-52-42 x `Solaris` (n=273) in die Klassen der Anfälligkeit gegen *Plasmopara viticola*. Ergebnisse aus den Boniturdaten 2009.

Die Boniturdaten sollen im nächsten Jahr durch weitere Blattscheibentests und eventuell auftretenden natürlichen Befall der Individuen nach dem Auspendeln ins Freiland verifiziert werden.

Diskussion und Ausblick

Möglichst exakte und fundierte phänotypische Daten sind eine Grundvoraussetzung um deren Loci auf genomischer Ebene bestimmen zu können. Die Ermittlung der Resistenz stellt dabei den ersten Schritt dar. Es ist geplant noch weitere phänotypische Resistenzmerkmale wie die Bildung von Stilbenen als Reaktion der Pflanze auf eine Infektion zu untersuchen. Die genetische Karte der Kreuzungspopulation wird unter der Verwendung von fluoreszenzmarkierten SSR-Markern erstellt, die, um Zeit und Ressourcen zu sparen, in einem Multiplex-Verfahren eingesetzt werden. Dies bedeutet, dass mehrere SSR-Marker mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen in einem PCR-Ansatz kombiniert eingesetzt und im „Genetic Analyzer“ parallel detektiert werden. Die vorhandene Technik erlaubt dabei den Einsatz von fünf verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen, wobei eine Markierung für den Größenmarker benötigt wird. Bei einer Abdeckung von etwa vier bis fünf Markern auf jedem der 19 Chromosomen ist eine erste grobe Verrechnung der Datensätze vorgesehen. Auf den Chromosomen auf denen QTL

identifiziert werden können, lässt sich anschließend durch eine gezielte Feinkartierung der Resistenzlocus näher eingrenzen und ein für die Züchtung geeigneter Marker ableiten.

Literatur

- Boso, S., Kassemeyer, H.H., 2008: Different Susceptibility Of European Grapevine Cultivars For Downy Mildew. *Vitis* **47** (1), 39-49.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R., 2007: The Use Of Molecular Markers For Pyramiding Resistance Genes In Grapevine Breeding. *Vitis* **46** (3), 120-124.
- Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., 2004: Quantitative Trait Locus Analysis Of Fungal Disease Resistance Factors On A Molecular Map Of Grapevine. *Theoretical And Applied Genetics* **108** (3), 501-515.
- Gindro, K., Pezet, R., Viret, O., 2003: Histological Study Of The Responses Of Two *Vitis Vinifera* Cultivars (Resistant And Susceptible) To *Plasmopara Viticola* Infections. *Plant Physiology And Biochemistry* **41** (9), 846-853.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004a: Effects Of Resveratrol, Viniferins And Pterostilbene On *Plasmopara Viticola* Zoospore Mobility And Disease Development. *Vitis* **43** (3), 145-148.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Spring, J.L., 2004b: Glycosylation And Oxidative Dimerization Of Resveratrol Are Respectively Associated To Sensitivity And Resistance Of Grapevine Cultivars To Downy Mildew. *Physiological And Molecular Plant Pathology* **65** (6), 297-303.
- Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M., 2007: Genetic Mapping And Localization Of Quantitative Trait Loci Affecting Fungal Disease Resistance And Leaf Morphology In Grapevine (*Vitis Vinifera* L). *Molecular Breeding* **20** (4), 359-374.
- Zyprian, E.M., Eibach, R., Töpfer, R., 2004: Die Genetische Karte Von 'Regent'. *Deutsches Weinbau Jahrbuch* 2004, 150-157.

Herzog, Katja¹; Flachowsky, Henryk¹; Deising, Holger²; Hanke, Magda-Viola¹

¹ Julius Kühn-Institut, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Dresden; ² Martin-Luther-University, Faculty of Natural Sciences III, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Phytopathology and Plant Protection, Halle (Saale)

Ergebnisse zur Etablierung alternativer Strategien zur Erzeugung markergen-freier Apfelpflanzen mit erhöhter Resistenz

Preliminary results to generate marker-free apples (*Malus domestica* BORKH.) with increased fungal resistance

Abstract

The production of genetically modified (gm)-plants without selectable marker genes is one of the most important goals of genetic engineering in apple. Therefore, we started the development and establishment of an effective transformation system to generate marker-free apple plants. The system is based on a site-specific recombination of the selectable marker gene *npII* controlled by a heatshock-inducible promoter. We tested the system using a monitoring vector which combines the inducible site-specific recombinase for the precise elimination of *npIII* and a GUS encoding gene (*gusA*) to realize a histochemical monitoring of recombination events. Partial marker-free apple plants were obtained after heat shock and fully marker-free plants were generated following a second regeneration strategy. The oral presentation focused on this part of the project. Apple powdery mildew *Podosphaera leucotricha* (Ell. Et Ev) SALM. belongs to the economical important fungal pathogens in apple production and causes decreased yield as well as reduced fruit quality. To increase resistance against *Podosphaera leucotricha* we transformed apple plants with a specific construct. Transgenic plants were selected, characterized by molecular techniques and tested for their resistance to powdery mildew. Four of the five tested transgenic lines showed significantly reduced symptoms of disease compared to control plants.

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

Admassu, Belayneh; Friedt, Wolfgang; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (RS), Quedlinburg

Diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Population in Ethiopia and Stem Rust Resistance Genes in Wheat

Abstract

Ethiopia is the second largest wheat producer in sub-Saharan Africa next to South Africa. It is an important food grain cultivated on ca. 1.4 million ha. The national average productivity is estimated at 1.7 tons/ha. The low productivity is attributed to a number of factors including diseases like stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*). As a result of a recent spread of a new and highly virulent race called Ug99, stem rust is becoming a serious threat to wheat production in Ethiopia and other east African countries. Durable stem rust control in wheat requires detailed knowledge on virulence spectrum and genetic diversity of *Pgt*. Molecular markers were proven to be easier and more efficient than the conventional method in variety development for disease resistance. Hence, this project studied the virulence and genetic structure of *Pgt* populations in Ethiopia, and developed a genetic map of a

stem rust resistance gene (*Sr13*) that is effective against Ug99. A total of 152 isolates was analyzed and 22 races were identified. Races TTKSR, TTHSR and RRTR were predominant with frequencies of 26.6, 17.7 and 11.1%, respectively. These races were also detected in all regions. It turned out that the highly virulent race designated as Ug99 was present throughout the country and dominated in all regions except Northwest Ethiopia. Four stem rust resistance genes (*Sr13*, *Sr30*, *Sr36* and *SrTmp*) were found to confer resistance to most of the races prevalent in Ethiopia. With the exception of *Sr30*, which is not effective to Ug99, the other three genes can be used in breeding for resistance to stem rust in Ethiopia. The genetic structure of selected *Pgt* isolates was investigated using 20 SSRs. The assays showed a high level of genetic diversity within *Pgt* populations in Ethiopia. Tests for population subdivision revealed the absence of genetic differentiation among the populations on the basis of geographic separation. This study shows that the pathogen population of Ethiopia is characterized by a high genetic diversity, but absence of differentiation based on geographic origin. *Sr13* is one of the few resistance genes that are effective against wide ranging *Pgt* races, including the pestilent race Ug99. Its effectiveness to Ug99 makes it a valuable source for resistance to stem rust. Based on SSR analyses of F₂ individuals derived from a cross of a susceptible and resistant parents, the *Sr13* locus was mapped on chromosome 6A of wheat. Five SSR markers were also found linked to the *Sr13* gene.

Keywords: Wheat, stem rust, Sr resistance gene, Ethiopia, SSR markers

König, J.; Perovic, D.; Kopahnke, D.; Przulj, N.; Romeis, T.; Ordon, F.

Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (RS), Quedlinburg

Kartierung der Zwergrostresistenz der Gerste MBR1012

Genetic mapping of leaf rust resistance in barley accession MBR1012

Zusammenfassung

Der Zwergrost gehört zu den wichtigsten Krankheitserregern der Gerste und kann im gemäßigten Klima Ertragsverluste von über 60 % verursachen. Auf der Suche nach neuen Resistenzquellen wurde in der aus Serbien Montenegro stammenden Landrasse MBR1012 eine wirksame Resistenz gegenüber Zwergrost identifiziert. Um die Vererbung der Resistenz dieser Landrasse aufzuklären, wurden 76 DH-Linien aus der Kreuzung der resistenten Landrasse MBR1012 mit der anfälligen Sorte Scarlett mit der hochvirulenten Zwergroststamme I80 künstlich inokuliert. Die Spaltung der DH-Population nach der Inokulation mit I80 zeigte, dass die Resistenz monogenetisch vererbt wird. Basierend auf den Ergebnissen der bulked segregant analysis konnte die Resistenz dem Chromosom 1H zugeordnet werden und eng gekoppelte molekulare Marker entwickelt werden, welche eine beschleunigte Übertragung dieser Resistenz in adaptierte Sorten erlauben. Die Suche nach neuen Resistenzen gegen *Puccinia hordei* ist von besonderer Bedeutung, da die Rostpilze durch Mutation und Rekombination zahlreiche physiologische Rassen bilden, wodurch Resistenzen relativ schnell überwunden werden können.

Stichwörter: Gerste (*Hordeum vulgare* L.), Zwergrost (*Puccinia hordei* Oth), Resistenz, bulked segregant analysis (BSA), DH-Linien (doubled-haploid).

Abstract

Leaf rust (*Puccinia hordei* Oth) is an economically important disease of barley in temperate regions, causing considerable yield losses up to about 60 %. Resistance to leaf rust has been detected in a landrace derived from Serbia Montenegro (MBR1012). To obtain information on the genetics of resistance of MBR1012 to leaf rust, 76 DH-lines derived from a cross of MBR1012 to the susceptible cv. Scarlett were inoculated using the highly virulent leaf rust isolate I80. It turned out that resistance is inherited in a monogenic manner and by bulked segregant analysis resistance was assigned to chromosome 1H. Next closely linked molecular markers were developed facilitating an efficient introgression into adapted cultivars. Broadening the genetic base of resistance to leaf rust is of special importance as this pathogen is able to overcome resistances quickly due to mutation and recombination.

Keywords: Barley (*Hordeum vulgare* L.), leaf rust (*Puccinia hordei* Oth), resistance, bulked segregant analysis (BSA), DH-lines (doubled-haploid)

Einleitung

Der Pilz *Puccinia hordei* Oth ist der Erreger des Zwergrosts der Gerste (*Hordeum vulgare*) und gehört zu den obligaten Parasiten. Der Wirtswechsel erfolgt beim Zwergrost zwischen *Hordeum* und *Ornithogalum* Arten. Der Schaderreger *P. hordei* ist ein wirtschaftlich wichtiges Gerstenpathogen, das in gemäßigten Breiten bei anfälligen Kulturen Ertragseinbußen von bis zu 60 % verursachen kann (Cotterill et al 1992). Aus wirtschaftlichen und ökologischen Gründen ist der Einsatz von Fungiziden nach Möglichkeit zu beschränken, so dass resistente Sorten die beste Alternative für einen gesunden Bestand sind. Doch gestaltet sich die Züchtung dauerhaft rostresistenter Sorten schwierig, da bei den Rosten eine große Zahl morphologisch meist nicht unterscheidbarer physiologischer Rassen auftritt, die durch Mutation und Neukombination entstehen (Bresinsky et al 2008). Aus diesem Grund ist die Identifikation neuer Resistenzträger und deren genetische Analyse von besonderer Bedeutung. In diesem

Zusammenhang untersuchten wir die Landrasse MBR1012 in der eine Resistenz gegenüber Zwergrost identifiziert werden konnte (Perovic et al. 2003).

Material und Methoden

Pflanzen- und Pilzmaterial: Um die Zwergrostresistenz auf genetischer Ebene beschreiben zu können, wurde die resistente Landrasse MBR1012 mit der anfälligen Sorte Scarlett gekreuzt und aus den Nachkommen DH-Linien erzeugt. Hiervon wurden insgesamt 76 DH-Linien mit dem Zwergrost-Isolate I80 getestet und phänotypisch beschrieben. Als Pathogen wurde das hochvirulente Isolat I80 des Zwergrosterregers *Puccinia hordei* ausgewählt, dessen Reaktion in einem Differenzialsortiment nach Afanasenko et al. (1995) charakterisiert wurde. Für die Bonitur wurden 5-10 Blätter pro DH-Linie im Sämlingsalter infiziert (Ivandić et al. 1998). Die Bonitur der Zwergrostsymptome erfolgte 10-12 Tage nach der Infektion anhand des Schemas von Levine and Cherewick (1952). Die Linien mit den Boniturnoten von 2+– 4 wurden als anfällig eingestuft und die Linien mit einer Boniturnote 0 – 2- in der Gruppe der resistenten Linien zusammengefasst. Für die statistische Auswertung der Aufspaltung der DH-Population wurde ein Chi²-Test (Strickberger 1988) durchgeführt.

Genetische Kartierung: Für eine effektive Suche nach mit der Resistenz gekoppelten Markern wurde die bulked segregant Analyse (BSA) nach Michelmore et al. (1991) angewandt. Basierend auf den phänotypischen Daten wurden jeweils 10 anfällige bzw. resistente DH-Linien in einer Mischprobe zusammengefasst. Für die Kartierung der Zwergrostresistenz wurden 192 SSR (simple sequence repeats) Marker und 102 SNP (single nucleotide polymorphism) basierte Marker verwendet. Zur Errechnung der Rekombinationen zwischen den einzelnen Markern und somit zur Erstellung der genetischen Karte wurde das Computerprogramm Joinmap 3.0 (Stam 1993) verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Spaltungsanalyse der DH-Linien sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Spaltungsanalyse ergibt wie in Abbildung 1 zu sehen ist eine eindeutige 1s:1r –Segregation der DH-Linien. Dies wird auch durch den Chi²-Test ($\chi^2 = 0,013$) bestätigt, wodurch eine monogene Vererbung der Zwergrostresistenz nachgewiesen werden konnte.

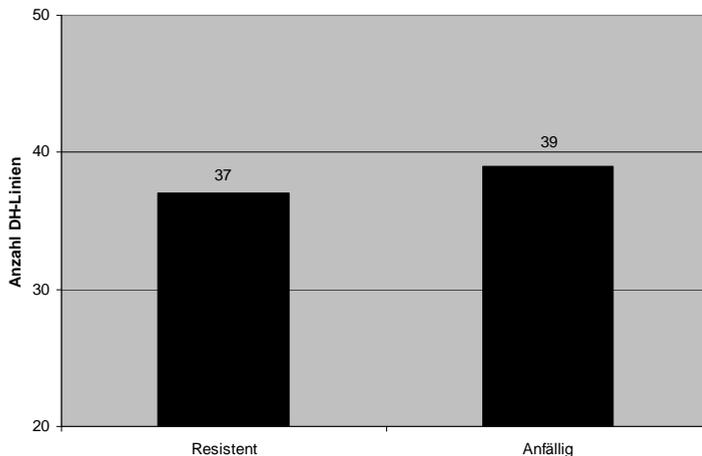


Abb. 1 Aufspaltung der DH-Linien in anfällige und resistente Phänotypen nach der Inokulation mit dem Isolat I80

Für das Screening nach Polymorphismen zwischen den Eltern und dem anfälligen und resistenten *bulks* wurden 192 SSR- und 102 SNP basierte Marker verwendet, von denen insgesamt 120 Marker polymorph waren. Basierend auf den Ergebnissen der BSA konnte die Resistenz auf Chromosom 1H lokalisiert werden. Daraufhin war es möglich mit den 22 polymorphen Markern auf 1H eine genetische Karte zu erstellen, die in Abbildung 2 dargestellt ist. Die Marker mit der engsten Kopplung flankieren die Zwergrostresistenz in einem Abstand von 3,2 bzw. 4,6 cM.

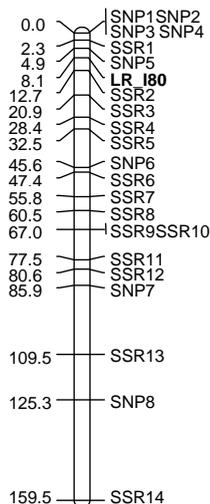


Abb. 2 Genetische Karte des Chromosoms 1H der Kreuzung MBR1012 x Scarlett mit der Zwergrostresistenz gegenüber dem Isolat I80

Mit dem Zwergrostisolat I80, das für die Tests verwendet wurde, wurden bereits Untersuchungen von Kicherer et al. (2000) durchgeführt, die in der DH-Population HOR1063 x Krona einen QTL für Zwergrostresistenz auf dem Chromosom 2H identifizierten. Die Resistenz gegen das Isolat I80 in MBR1012 beruht jedoch auf einem Hauptgen und nicht auf einem QTL. Wie in der genetischen Karte in Abbildung 2 zu erkennen ist, liegt die Resistenz gegen das Zwergrostisolat I80 im telomeren Bereich des Chromosoms 1HS. Das einzige ebenfalls in der Gerste auf dem Chromosom 1H kartierte Zwergrost-resistenzgen ist *Rph4* (Park et al. 2003). Um zu bestätigen, dass es sich bei der in MBR1012 identifizierten Resistenz um ein neues Resistenzgen handelt, sind Alleltestungen vorgesehen, ebenso wie eine weitere Markerabsättigung zur Identifikation enger gekoppelter Marker.

Literatur

- Afanasenکو, O., Hartleb, H., Guseva, N., Minarikova, V., Janosheva, M. (1995). A Set of Differentials to Characterize Populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for International use. *Journal of Phytopathology* 143, 501-507.
- Bresinsky, A., Körner, Ch., Kadereit, J.W., Neuhaus, G., Sonnwald, U. (2008). *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2008 36. Auflage, 678 – 701, 537 – 553.
- Cotterill, P.J., Rees, R.G., Platz, G.J. Dill-Macky, R. (1992). Effects of leaf rust on selected Australian barley. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 32 (6), 747-751.
- Ivancic, V., Walther, U., Graner, A. (1998). Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth). *Theoretical and Applied Genetics*. 97, 1235 – 1239.
- Kicherer, S., Backes, G., Walther, U., Jahoor, A. (2000). Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100, 881 – 888.
- Levine, M.N., Cherewick, W.J. (1952). Studies on dwarf leaf rust of barley. *US Department of Agriculture Technical Bulletin* 1056, 1 – 17.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease – resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics* Vol. 88, 9828 – 9832.
- Park, R.F., Poulsen, D., Barr, A.R., Cakir, M., Moody, D.B., Raman, H., Read, B.J. (2003). Mapping genes for resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Australian Journal of Agricultural Research* 54, 1323-1333.
- Perovic, D., Stein, N., Zhang, H., Drescher, A., Prasad, M., Kota, R., Kopahnke, D., Graner, A. (2003). An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Functional & Integrative Genomics*, 1-10.
- Stam, P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a computer package: JOINMAP. *Plant Journal* 3, 739 – 744.
- Strickberger, M.W. (1988). *Genetik*. Carl Hanser Verlag München Wien Übersetzung der 3., amerikanischen Auflage, 126 – 140.

Dowideit, Kerstin; Hüskens, Alexandra

Julius Kühn-Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen, Braunschweig

Kleistogamer Raps – Eine innovative Confinement-Strategie?

Cleistogamous Oilseed Rape – An innovative confinement strategy?

Zusammenfassung

Raps (*Brassica napus* L.) besitzt ein hohes Auskreuzungspotential, da Raps-Pollen durch Wind und Insekten über weite Strecken transportiert werden können. Beim Anbau von gentechnisch verändertem Raps könnten so auch neu eingeführte Gene verbreitet werden. Um den ungewollten Pollenfluss bei Raps zu unterbinden und eine Auskreuzung während des Anbaus von transgenem Raps einzuschränken, soll die Eigenschaft der Kleistogamie (Selbstbestäubung in geschlossenen Blüten) als mögliche biologische Confinement-Strategie beim Raps untersucht werden. Ziel des Projektes ist es, Informationen über die Merkmalsstabilität kleistogamer Rapslinien in unterschiedlichen Umwelten und die Zuverlässigkeit kleistogamer Rapslinien als biologische Confinement-Methode zu gewinnen. In mehrjährigen und mehrortigen Feldversuchen werden Rapspflanzen aus unterschiedlichen Entfernungen zum Pollendonator (kleistogame Rapslinie, *Clg1*) geerntet, um das Auskreuzungspotential kleistogamer Linien mittels real time PCR zu quantifizieren. Zunächst sollen *Clg1*-spezifische Primer für eine real-time PCR entwickelt und etabliert werden, mit denen die Auskreuzungsraten kleistogamer Linien in konventionelle nicht-kleistogame Sorten quantifiziert werden können. Hierfür wurden bislang zwei verschiedene Zielgene ausgewählt, die als Markergene in Frage kommen: das *fae1*-Gen und das Kleistogamie-Gen. Mutationen in den genannten Genen bedingen unterschiedliche Erucasäuregehalte in den Rapssamen (*fae1*-Gen; Cullen et al., 2008) bzw. die Ausbildung des kleistogamen Phänotyps (Kleistogamie-Gen; Genoplant, Patent FR 2923839). Die DNA-Sequenzen der ausgewählten Gene aus der kleistogamen Linie (*Clg1*; Niedrigerucasäure-Raps;) sowie von einer konventionellen Rapssorte Marcant (Hoherucasäure-Raps) wurden mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Anhand von Unterschieden in den DNA-Sequenzen von *Clg1* und Marcant werden verschiedene spezifische Primer für das *fae1.2*- und Kleistogamie-Gen entwickelt und auf ihre Spezifität hin getestet, um das Potential kleistogamer Linien als biologische Confinement-Strategie testen zu können.

Abstract

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) has a high potential for out-crossing because pollen can be transported over wide distances by wind and insects. By growing genetically modified oilseed rape new introduced genes can be distributed in the environment. One simple way to restrict this unintended pollen-mediated gene flow is to ensure that the flowers do not open (cleistogamous flowers). The aim of the project is to gain information about the stability and reliability of the cleistogamous trait as a biological confinement method in oilseed rape. In perennial ring experiments at different locations in Germany oilseed rape plants grown in different distances to the pollen donor (cleistogamous line, *Clg1*) will be harvested to quantify the out-crossing potential of cleistogamous lines via real time PCR. Initially, *Clg1*-specific primer will be created and established for real-time PCR. So far, two different target genes were chosen as marker genes, the *fae1*-gene and the cleistogamy-gene. Mutations within these genes are responsible for different erucic acid contents in the seeds (*fae1*-gene; Cullen et al., 2008) or for the formation of the cleistogamous phenotype (cleistogamy-gene; Genoplant, Patent FR 2923839). The DNA-sequences of genes from the cleistogamous line (*Clg1*; low erucic acid rapeseed) as well as from the conventional oilseed rape cultivar Marcant (high erucic acid oilseed rape) were amplified via PCR, cloned and sequenced. Based on differences between DNA-sequences of *Clg1* and Marcant different specific primers for the *fae1.2*- and cleistogamous genes will be designed and tested on specificity by PCR, in order to evaluate the potential of cleistogamous oilseed rape used as a biological confinement method.

Schulz-Witte, Jonathan¹; Schulz, Hartwig¹; Ulrich, Detlef¹; Kammerer, Dietmar R.²; Carle, Reinhold², Nothnagel, Thomas³

¹ Julius Kühn-Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Quedlinburg; ² Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Lehrstuhl für Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, Stuttgart; ³ Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Quedlinburg

Evaluation genetischer Ressourcen von *Daucus carota* L. als Quelle gesundheitsfördernder InhaltsstoffeEvaluation of *Daucus carota* L. genetic resources as a source of health promoting compounds**Zusammenfassung**

DFG-/MNiSW-Forschungsprojekt: Ziel des internationalen DFG-/MNiSW-Forschungsprojektes ist die Evaluation der genetischen Variabilität von *Daucus carota* L. im Hinblick auf gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe. Hierzu werden von den Projektpartnern in Krakow und in Quedlinburg verschiedenfarbige Möhren, bei denen hohe Gehalte an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen zu erwarten sind, produziert und das Inhaltsstoffspektrum

analysiert. Zusätzlich werden in einer weiteren Studie *Daucus*-Wildtypen angebaut und auf die bitteren Polyacetylene untersucht. Den Polyacetylenen werden insbesondere im Bereich der Krebsprävention positive Wirkungen zugeschrieben. Bei der Analyse auf wertgebende Inhaltsstoffe wird vor allem der Gehalt von Carotinoiden, Polyacetylenen, Anthocyanen sowie flüchtigen Inhaltsstoffen und das antioxidative Potential untersucht. Zur Komplettierung der erhobenen Daten sowie zur Erstellung einer genetischen Karte von *Daucus carota* L. entwickeln die polnischen Projektpartner molekulare Marker, durch deren Verwendung ein besseres Verständnis der Polyacetylen-Biosynthese sowie deren Regulation erreicht werden soll. Die technologischen Möglichkeiten bei der Extraktion und Aufkonzentration von Polyacetylenen aus *Daucus carota* L. erforscht die Universität Hohenheim durch Extraktionsversuche im Pilotmaßstab. Die Versuche sollen Aufschluss darüber geben, ob die extractive Abreicherung von Polyacetylenen bei Lebensmitteln auf der einen Seite und die Aufkonzentration von Polyacetylenen für Verwendung in der Pharmaindustrie auf der anderen Seite wirtschaftlich realisierbar sind. Zum Projektende sollen die Ergebnisse der agronomischen Versuchen, die auf Basis molekularer Marker-Techniken erhalten wurden, mit den Ergebnissen aus der chemischen Inhaltsstoffanalytik korreliert werden. Auf diese Weise sollen zum einen neuere Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit eine kommerzielle Nutzung unterschiedlicher *Daucus*-Typen als neuartige Rohstoffe für die Gewinnung von gesundheitsfördernden Pflanzenextrakten (besonders Polyacetylenen) infrage kommen. Zum anderen sollen speziell diejenigen *Daucus*-Typen gefunden werden, die sich am besten für die Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie eignen.

Abstract

DFG-/MNiSW-project: The aim of the international DFG-/MNiSW-project is the evaluation of the genetic variability of carrots with special focus on their profile of valuable compounds especially health promoting substances. Therefore, cultivated carrot genotypes adapted to cultivation conditions in Europe with various root colours and high amounts of health-beneficial compounds such as carotene, lutein, lycopene, anthocyanins, and various volatile compounds will be selected by the project partners in Krakow and Quedlinburg. Furthermore, wild carrot genotypes, accumulating polyacetylenes known for their anticancer properties will be cultivated in Quedlinburg for subsequent chemical characterisation. All carrot samples will be analysed for the individual carotenoid and polyacetylene profile and in addition selected genotypes will be analysed for their anthocyanin content by HPLC and HPLC-MS. Volatile substances will be measured by using GC-MS method. In order to complete the existing genetic map of *Daucus carota* L. and to get a better understanding of the biosynthesis pathways the Polish partners will identify molecular markers for most of the carrot genotypes. To create economical methods for the adsorptive recovery of these pharmacologically active compounds the University of Hohenheim will perform adsorption trials in their pilot plant. These processes may be also applied for the debittering of carrot-derived products, such as juice and purée. Adsorptive binding of the bitter principles (polyacetylenes) lead to minimal economic losses for the carrot processors. Another scope is to extract the health promoting compounds for possible applications in the pharmaceutical industry. The results of agronomical trials combined with chemical analyses and molecular markers will be evaluated statistically to provide necessary information about the suitability of *Daucus* resources as a novel source for health promoting compounds under the cultivation conditions in Central Europe.

Themen zum Pflanzenschutz/Phytopathologie

Moderation: Tim Hirschfeld, Stephanie Nehrlich

Joachimsmeier, Ina¹; Schenke, Detlef²; Pistorius, Jens¹; Heimbach, Udo¹

Julius Kühn-Institut, ¹ Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig; ² Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Berlin

Guttation – Nicht alles was glänzt ist Tau - ein „neuer“ Expositionsweg von systemischen Pflanzenschutzmitteln auf Honigbienen?

Guttation – A „new“ way of exposition from systemic plant protection products for honeybees?

Zusammenfassung

Der Begriff Guttation (lat. gutta= Tropfen) beschreibt ein Ereignis, bei welchem Xylemflüssigkeit aus dem Pflanzeninneren an den Spitzen und Blatträndern der Pflanze abgesondert wird (Bresinsky et al., 2001). Guttation wurde bereits 1925 durch Lippmann bei mehreren Pflanzenfamilien beschrieben. Allgemein gilt, dass die Guttation bei gesunden Pflanzen unter Bedingungen verringerter oder eingestellter Transpiration auftritt z. B. wenn die relative Luftfeuchte über 75 % liegt (Frey-Wyssling, 1949). Die Ausscheidung der Guttationsflüssigkeit erfolgt über die so genannten Hydathode (gr. hydor = Wasser, hodos = Weg) welche mannigfaltig im anatomischen Bau sein können (Haberlandt, 1924). Es werden zwei Hauptgruppen von Hydathoden unterschieden. Bei den so genannten aktiven Hydathoden wird die Flüssigkeit durch drüsig gebaute Hydathodenzellen ausgeschieden. Passive Hydathoden arbeiten über den Wurzelndruck der Pflanze (Haberlandt, 1924). Die stoffliche Zusammensetzung des Guttationsaftes kann abhängig vom Entwicklungs-zustand der Pflanzen und des Blattes sein (Stein-Dönecke, 1993). Der Gehalt an xylemtypischen, pflanzen-eigenen Substanzen liegt bei aktiven Hydathoden 41 % und bei passiven Hydathoden 77 % unter dem Gehalt des Blutungssaftes der Pflanze welcher bei Verletzungen austritt (Ehrhardt, 1978). Wie Untersuchungen an Maispflanzen aus Deutschland (Wallner, 2009) und Italien (Girolami et al., 2009) zeigten, können durch Guttation auch systemische Wirkstoffe, wie z. B. Neonicotinoide, aus Saatgutbeizen ausgeschieden werden. Die Konzentration dieser Stoffe im Guttationswasser lag hier zwischen 0,1 und 100 mg/l. Bisher ist nicht geklärt, ob Honigbienen auch Guttationstropfen als Wasserquelle nutzen. Mit Hilfe von Gewächshaus- und Freilandbeobachtungen soll untersucht werden, ob und in welchem Umfang Guttation an ökonomisch wichtigen Kulturpflanzen auftritt und durch Honigbienen genutzt wird. Durch chemische Analysen von Guttationswasserproben erfolgte die Bestimmung der Konzentration der mit der Saatgutbeizung aufgetragenen Pflanzenschutzmittelwirkstoffe. Mittels biologischer Studien wird die Wirkung der Guttationsflüssigkeit auf einzelne Honigbienen, die Relevanz von Guttation für die Wasserversorgung des Bienenvolkes sowie die mögliche Gefährdung von Bienenvölkern unter praxisnahen Bedingungen untersucht.

Stichwörter: Guttation, Honigbiene, Tau, Neonicotinoide

Abstract

The term guttation (lat. gutta= drop) describes the excretion of droplets of xylem-liquid at the tips or edges of the leafs in vascular plants (Bresinsky et al., 2001). Guttation was first described for several plant families by Lippmann (1925). Generally guttation occurs when transpiration is inhibited e.g. if the relative humidity lies over 75 % (Frey-Wyssling, 1949). The xylem-liquid is excreted via hydathodes (gr. hydor = water, hodos = way) which vary in their anatomical set up (Haberlandt, 1924). Plants display two basic forms of hydathodes: active and passiv. Active hydathodes operate with special epithem cells, whereas in passive hydathodes guttation is a result of root pressure (Haberlandt, 1924). The composition of the guttation liquid depends on the growth stadium of the plant and leafs (Stein-Dönecke, 1993). In most cases the observed concentration of dissolved substances was lower in the guttation liquid than in the bleeding juice of the plants (Ehrhardt, 1978). Recent studies on corn plants in Germany (Wallner, 2009) and Italy (Girolami et al., 2009) showed that active systemic substances such as neonicotinoides that were used as seedcoating can be found in guttation-droplets. The observed concentration of these active ingredients was between 0,1 and 100 mg per liter. To date it is not clear if guttation-droplets are used as a water source by honeybee colonies. Therefore we carry out observations in the greenhouse and open land to gain insight about the occurrence of guttation in common cultivated plants such as rye and corn and a possible uptake by bees. Chemical analyses will be used for detection of pesticides in guttation droplets. By means of biological studies the effects on honey bees, the relevance of guttation as a potential water source for bees and the potential hazard of guttation for honey bee colonies will be determined.

Keywords: guttation, honeybee, dew, neonicotinoid

Literatur

- Bresinsky, A., Neuhaus, G., Kömer, C., Sonnewald, U., Kadereit, J.W., 2001: Strassburger - Lehrbuch der Botanik. – Spektrum Akademischer Verlag, S. 310ff.
 Ehrhardt, J.F., 1978: Untersuchungen über Hydathoden. Institut für Botanik und Mikrobiologie, Dissertation
 Frey-Wyssling, A., 1949: Stoffwechsel der Pflanzen. Büchergilde Gutenberg, Zürich S. 133f, 216ff.

- Girolami, V., 2009: Translocation of Neonicotinoid Insecticides from Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology* 102(5), S.1808ff.
- Haberlandt, O., 1924: II. Die Sekretionsorgane. Bau und Anordnung der Hydathoden. *Physiologische Pflanzenanatomie*, Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig, S. 455-467.
- Lippmann, E., 1925: Über das Vorkommen der verschiedenen Arten der Guttation und einige physiologische und ökologische Beziehungen. *Bot. Archiv* 11, S. 361.
- Stein-Dönecke, U., 1993: Beizhofausbildung, Aufnahme, Translokation und Wirkung von [14C] Imidacloprid bei Winterweizen und Zuckerrüben nach Saatgutbehandlung und unter dem Einfluss verschiedener Bodenfeuchten. Bonn, Univ., Dissertation.
- Wallner, K., 2009: Guttationswasser, eine mögliche Gefahr für Bienen? *Adiz* 2, Februar Jahrgang: 2009.

Schwabe, Kristin; Heimbach, Udo

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

Forschungsprogramm des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz zum Westlichen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*)

German *Diabrotica* research program of the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection

Zusammenfassung

Weltweit gesehen zählt der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), der seit 2007 erstmalig im Süden Deutschlands aufgetreten ist, zu den wirtschaftlich bedeutendsten Maisschädlingen im intensiven Maisanbau. Er ist als Quarantäneschädling eingestuft und unterliegt somit Quarantänemaßnahmen (Meldepflicht, Ausrottungs- bzw. Eingrenzungsmaßnahmen). In den angrenzenden Nachbarländern Deutschlands, in denen sich *Diabrotica* bereits etabliert hat, breitet sich der zur Familie der Blattkäfer (*Chrysomelidae*) gehörende Schädling immer weiter aus. Vor dem Hintergrund zunehmender Einschleppungen und der Etablierung der *Diabrotica*-Populationen in Deutschland werden zunehmend wirksame Maßnahmen benötigt, die eine weitere Ausbreitung verhindern und den Maisanbau in den betroffenen Gebieten ferner ermöglichen. Diesen Forderungen zugrundeliegend wurde 2008 ein umfangreiches Forschungsprogramm des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) (Federführung JKI) in Absprache und in Co-Finanzierung mit dem Freistaat Bayern (Federführung LfL Bayern) ausgearbeitet, mit dem Ziel vertiefende Kenntnisse zur nachhaltigen Bekämpfung von *Diabrotica* zu gewinnen und wissenschaftliche Empfehlungen hinsichtlich erforderlicher Eingrenzungsmaßnahmen zu erarbeiten. In den vom BMELV geförderten *Diabrotica*-Projekten, die vom JKI koordiniert werden, werden u.a. Fragestellungen zur Biologie des Schädling, zu integrierten Bekämpfungsmaßnahmen (z.B. Insektizideinsatz bei adulten Käfern) sowie zu ökonomischen und ackerbaulichen Aspekten erörtert. Ein Großteil der Projekte, die auch von Projektpartnern im Ausland (Österreich, USA) bearbeitet werden, hat bereits im Frühjahr dieses Jahres begonnen.

In Kooperation des JKI mit der LfL Bayern wurde eine neue Internetseite zum Forschungsprogramm eingerichtet. Unter <http://diabrotica.jki.bund.de> werden zum einen detailliert die einzelnen Forschungsprojekte vorgestellt, zum anderen erfährt der Nutzer auch Wissenswertes über *Diabrotica* wie z.B. über seine Biologie, sein Schadpotential und Maßnahmen zur Eingrenzung.

Stichwörter: Maiswurzelbohrer, *Diabrotica*, BMELV *Diabrotica*-Forschungsprojekte



Abb. 1 *Diabrotica* – adulter Käfer (Quelle: K. Schwabe, JKI)

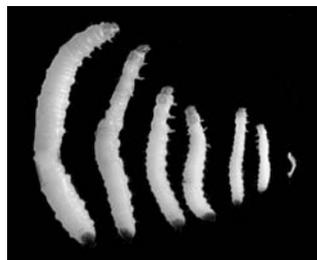


Abb. 2 Larven von *Diabrotica* (Quelle: K. Gloyna, BTL)

Abstract

The Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) is economically the most important corn pest world wide. Its first appearance in Southern Germany in 2007 was followed by further infestations in additional locations in the following years. Germany neighbours countries in which *Diabrotica* is established and repeated introduction of the beetles is expected. Control measures on *Diabrotica* being a quarantine pest in Europe

are carried out in Germany. In order to improve and adapt control measures for *Diabrotica* including chemical and non chemical options for German conditions two substantial research programs were generated in cooperation of the German agricultural ministry (responsibility JKI) with the Free State of Bavaria (responsibility LfL). The objective of this program is to achieve profound knowledge of economic impact of *Diabrotica* establishment and quarantine measures, of sustainable chemical and non chemical control of *Diabrotica* and finally to draft an expert report for quarantine and containment strategies. Most of the Federal projects have already started in spring 2009 in collaboration with project partners in Austria and USA. Research on *Diabrotica* issues like biology, chemical treatments, integrated measures and economic impact of measures are carried out.

The individual projects are presented on a joint German-English *Diabrotica*-Homepage of the LfL and the JKI, which is available on (<http://diabrotica.jki.bund.de>).

Keywords: Western Corn Rootworm, *Diabrotica*, German Federal Research Projects

Krügner, Silke

Julius Kühn-Institut, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Kleinmachnow

Ausbreitungsszenarien zum Westlichen Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera*

Models of Western Corn Rootworm Spread (*Diabrotica virgifera virgifera*)

Zusammenfassung:

Der Westliche Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera* ist der bedeutendste Schädling im Maisanbau weltweit und in Nordamerika heimisch. Dort verursacht er jährlich Ertragsverluste und Kosten durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in Höhe von einer Milliarde US-Dollar. Im Jahr 1992 wurde *Diabrotica virgifera virgifera* erstmals in Europa am Belgrader Flughafen entdeckt und breitet sich seitdem zunehmend auf natürlichem Wege in Europa aus. Im Jahr 2007 wurden zum ersten Mal auch Käfer in Deutschland - in Bayern und Baden-Württemberg - festgestellt. Aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung ist der Westliche Maiswurzelbohrer seit 1998 in der Europäischen Union als Quarantäneschädling eingestuft und es müssen seit 2003 bei einer Befallsfeststellung in bisher befallsfreien Gebieten Sofortmaßnahmen zur Ausrottung gemäß der EU-Entscheidung 2003/766/EG durchgeführt werden. Ist eine Ausrottung aufgrund einer hohen Abundanz nicht mehr möglich, werden Eingrenzungsmaßnahmen eingeleitet, um die Ausbreitungsgeschwindigkeit von *Diabrotica virgifera virgifera* zu verringern. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung hängt hierbei von einer Vielzahl von Faktoren, wie beispielsweise dem Maisanteil in der Fruchtfolge, ab. Im Rahmen des Projektes soll mittels dieser Faktoren ein dynamisches Ausbreitungsmodell entwickelt werden mit dem Ziel, die weitere Ausbreitung des Westlichen Maiswurzelbohrers in Bayern und Baden-Württemberg sowie mögliche Ausbreitungen bei Neueinschleppungen direkt prognostizieren zu können. Weiterhin sollen mit Hilfe des Modells Ausbreitungsszenarien erstellt werden, die einerseits Voraussagen über die Ausbreitungsgeschwindigkeit bei einer natürlichen Ausbreitung ermöglichen als auch unter Berücksichtigung verschiedener Eingrenzungsmaßnahmen. Auf diese Weise wird es möglich, den Effekt von verschiedenen Eingrenzungsmaßnahmen auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von *Diabrotica virgifera virgifera* unmittelbar mit der natürlichen Ausbreitung zu vergleichen und deren Effizienz aufzuzeigen.

Stichwörter: *Diabrotica virgifera virgifera*, dynamisches Ausbreitungsmodell

Abstract

The Western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* is the most important pest on maize in the world and native to North America. The pest causes costs of one billion US dollar in North America each year. In 1992, the Western corn rootworm was first detected in Europe close to the airport of Belgrade. Since then *Diabrotica virgifera virgifera* has actively spread through Europe. In 2007, first beetles were found in Germany (Bavaria and Baden-Württemberg). As it is of huge economic significance, the Western corn rootworm is a quarantine pest in the EU, i. e. in case of an outbreak eradication measures have to be taken immediately (according to Commission Decision 2003/766/EC). If eradication is not possible, containment measures have to be taken to reduce the rate of spread. The rate of spread depends on many factors such as the proportion of maize in crop rotation. These factors will be integrated in a dynamic model of WCR spread to predict its spread in Bavaria and Baden-Württemberg as well as introductions. In addition, the project aims to simulate different models calculating the rate of spread of *Diabrotica virgifera virgifera* when either no measures or when various containment measures are taken. As a result, the rate of spread under containment measures can be directly compared to the natural rate of spread and the efficiency of the measures can be demonstrated.

Keywords: *Diabrotica virgifera virgifera*, dynamic spread model

Georgiadis, P.-Th.; Pistorius, J.; Heimbach, Udo

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

Vom Winde verweht – Abdrift von Beizstäuben - ein Risiko für Honigbienen (*Apis mellifera* L.)?

Gone with the wind – drift of abrasive dust from seed treatments - a risk for honey bees (*Apis mellifera* L.)?

Zusammenfassung

Ende April 2008 kam es in der Oberrheinebene/Baden – Württemberg zur größten Bienenvergiftung in Deutschland seit 30 Jahren. Über 11500 Bienenvölkern von 700 Imkern zeigten Symptome einer Vergiftung durch Pflanzenschutzmittel (Pistorius et. al., 2009). Gestützt auf chemischen Analysen wurde schnell der Verdacht bestätigt, dass die Abdrift von Beizstäuben bei der Aussaat von Clothianidin-behandeltem Maissaatgut die Schadensursache war. Clothianidin, ein insektizider Wirkstoff mit breitem Wirkungsspektrum aus der Gruppe der Neonicotinoide, wirkt als Agonist an den nikotinischen Acetylcholinrezeptoren. Unter Anderem findet es Anwendung in der Saatgutbeizung von Mais (Saatgutbehandlungsmittel Poncho Pro®) zur Bekämpfung des Larvenstadiums des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Angesichts dieser Problematik werden seit Anfang 2009 in der Abteilung für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland des Julius Kühn-Institut Versuche zur Untersuchung der Auswirkung von Beizstaubbdrift auf Bienenvölker durchgeführt. Beim Drillen von Clothianidin-behandeltem Rapssaatgut auf Versuchsflächen bei Wendhausen, Braunschweig wurden dazu vier verschiedene Methoden getestet. In Freiland- und Halbfreiland-versuchen wurden Bienenvölker an den Rand von kontaminierten Bienenweiden gestellt. Für zwei weitere Versuchsansätze wurden in Abständen von 1, 3, 5, 10 und 20 m zur Versuchsfläche mit Bienen bestückte kleine Holzkäfige und mit Zuckerwasser bestrichene Senfblätter in Petrischalen aufgestellt. Dabei wurden die Holzkäfige (0m = Boden und 1,35m) sowie die Petrischalen (0m und 1,5m) auf zwei Ebenen platziert. Während des Drillvorgangs waren die Bienen in den Käfigen dem insektizidbelasteten Beizstaub direkt ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Käfige nach 1, 4, 24 und 48 Stunden auf verendete Bienen bonitiert. Auf den mit Zuckerwasser bestrichenen Blättern waren Partikel des abgedrifteten Beizstaubes haften geblieben. Mit diesem kontaminierten Material wurde im Labor ein Belaufest mit Bienen vorgenommen, welche 2, 24 und 48 Stunden nach dem Einzählen ebenfalls auf verendete Bienen bonitiert wurden. Der auftretende Totenfall an Honigbienen aus jedem Versuch wurde bei jeder Erhebung separat dokumentiert und für analytische Untersuchungen gelagert. Im Weiteren sind Versuche zur Entwicklung einer Methode zur nicht-invasiven Fraktionierung von Beizstäuben sowie zur Untersuchung der Resorptionswege von Beizstäuben verschiedener Korngrößen-fractionen in Bienen und der Bienenbrut geplant.

Stichwörter: Honigbiene (*Apis mellifera* L.), Bienenvergiftung, Clothianidin, Beizstaub, Abdrift, Methodenentwicklung

Abstract

At the end of April 2008 the highest number of bee poisoning incidents in Germany for approximately 30 years appeared at the Upper Rhine-valley / Baden-Wuerttemberg. More than 11,500 honey bee colonies from about 700 beekeepers (Pistorius et. al. 2009) showed symptoms of poisoning by plant protection agents. Supported by chemical analyses the reason for the bee poisoning incidents was the drift of dust particles abraded from maize seeds treated with Clothianidin during the seeding process. Clothianidin, an insecticidal active substance from the group of neonicotinoids, works as agonist at the nicotinic acetylcholine receptors with broad spectrum of efficacy. Clothianidin is used as a seed dressing of maize (agent for seed treatment "Poncho Pro®") for the control of the larval stage of the Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Facing this problem the division of plant protection in agriculture and grassland of the Julius Kühn – Institut has performed tests to examine the effects of dust drift on bee colonies since the beginning of 2009. By drilling of Clothianidin treated rape seeds on test areas close to Wendhausen/Braunschweig four different methods to assess the effects on bees were tested. In field and tent tests bee colonies were placed at the edge of contaminated flowering area of arable land. For two further experiments small wooden cages equipped with honeybees and petri dishes containing mustard leaves brushed with sugared water were set up in distances of 1, 3, 5, 10 and 20 m to the test area. The wood cages (0m = ground and 1,35m) as well as the petri dishes (0m and 1,5m) were placed on two different levels. During the drilling procedure the bees in the cages were directly exposed to the drift of insecticide-loaded dust particles. Mortality of the bees was assessed after 1, 4, 24 and 48 hours. Additionally drifted dust particles which stuck to the mustard leaves brushed with sugared water in the petri dishes were used for feeding tests with bees at the laboratory. Here mortality of the bees was assessed after 2, 24 and 48 hours. Dead honey bees from each test were counted separately with each collection and stored for analytic investigations. Furthermore, experiments are planned for the development of a method of non-invasive fractionation of seed treatment dust as well as for studies of resorption by dust of different grain size in bees and their brood.

Keywords: honeybee (*Apis mellifera* L.), bee poisoning, Clothianidin, abrasion dust, drift, method development

Literatur

Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U., 2009: „Bienenvergiftung durch Wirkstoffabrieb von Saatgutbehandlungsmitteln während der Maisaussaat im Frühjahr 2008“, Journal für Kulturpflanzen, 61 (1): S.9-14.

Jacobs, Alexandra¹; Bischoff, Gabriela¹; Büttner, Carmen²; Pestemer, Wilfried²

Julius Kühn-Institut, ¹ Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Berlin; ² Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbau, Fachgebiet Phytomedizin, Berlin

Rückstandsverhalten von ausgewählten Pflanzenschutzmitteln in/auf Kartoffelpflanzen und Bienen

Zusammenfassung

Im Kartoffelanbau kann bei einem Massenbefall mit Blattläusen so viel Honigtau produziert werden, dass dieser besonders in Trachtlücken von Bienen gesammelt wird. Werden solche Pflanzenbestände mit einem bienengefährlichen Mittel behandelt, kann das Sammeln des Honigtaus zu Bienenvergiftungen führen. In Käfigversuchen mit Bienenvölkern sollen Fragen zur Wirkung, zum Rückstandsverhalten und zur Lagerstabilität von ausgewählten Pflanzenschutzmitteln auf verschiedenen Kulturen und Bienen beantwortet werden. Die Versuche wurden im Gewächshaus in 1 m x 2 m x 1 m großen Käfigen mit vierfacher Wiederholung je Variante (behandelt/unbehandelt) durchgeführt. In jeden Käfig wurden jeweils 30 Kartoffelpflanzen in Töpfen gestellt. Die Bienen (etwa 1000 Individuen) befanden sich in Minibeuten außerhalb der Käfige und konnten über Plexiglasröhren nur die Käfige befliegen. Der Honigtau wurde mit Zuckerlösung (50%ig) simuliert, die vor der Applikation auf die Pflanzen gespritzt und durch tägliches Befeuchten den Bienen zugänglich gehalten wurde. Es gab zwei Versuchsvarianten. Für die erste Variante wurden die Bienen nach viertägiger Adaptionszeit mit frisch applizierten Kartoffelpflanzen konfrontiert. In einem zweiten Versuch wurden Pflanzen in die Käfige gestellt, deren Behandlung 7 Tage zurückliegt. In den Versuchen des Jahres 2008 wurde das Präparat Dantop® (Wirkstoff Clothianidin) verwendet. Im Jahr 2009 erfolgte aufgrund erster Ergebnisse der chemischen Analyse eine Verfeinerung des Versuchsaufbaus. Außerdem wurde in einem weiteren Versuch das Präparat Plenum 50WG® verwendet. Die Bienenverluste wurden einmal täglich während der gesamten Versuchszeit (einschließlich Adaption) erfasst. Alle Bienen werden rückstandsanalytisch auf Clothianidin bzw. Pymetrozin untersucht. Das gleiche gilt für die Waben. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden allen Käfigen frische Kartoffelpflanzen für die Rückstandsanalysen entnommen. Frisch behandelte Pflanzen wurden direkt nach Applikation geerntet und wie auch vergiftete Bienen für einen zuvor definierten Zeitraum im Freien gelagert (nass bzw. trocken), um die Stabilität der Wirkstoffe unter diesen Bedingungen zu ermitteln. Während der Adaptionszeit wurde in beiden Varianten (Kontrolle/Behandlung) ein täglicher Verlust von 11-13 Bienen pro Volk beobachtet. Nach Kontakt mit den frisch behandelten Kartoffelpflanzen stiegen die Verluste am Tag nach Applikation auf durchschnittlich 123 Bienen pro Volk an. Die Verluste in den Kontrollvölkern blieben über den Versuchszeitraum gleich. Die chemische Analyse der Versuche in denen Clothianidin verwendet wurde, zeigte eine durchgehend hohe Lagerstabilität dieses Wirkstoffes.

Krengel, Sandra; Freier, Bernd

Julius Kühn-Institut, Institut für Strategien und Folgenabschätzung im Pflanzenschutz, Kleinmachnow

Die Temperatur - Eine bedeutende Driving variable in Populationen der Marienkäfer *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis*

The temperature - an important driving variable in populations of *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis*

Zusammenfassung

Marienkäfer stellen eine der wichtigsten Gruppen natürlicher Gegenspieler von Blattläusen in Getreide dar. Derzeit sind in Winterweizenbeständen vorwiegend die beiden einheimischen Arten *Coccinella septempunctata* und *Propylea quatuordecimpunctata* sowie die seit einigen Jahren invasive Art *Harmonia axyridis* vertreten. Es gibt Hinweise, dass sich im Rahmen einer erwarteten globalen Erwärmung das prädatorische Potential und die interspezifischen Beziehungen dieser Arten zueinander verändern werden. Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der genaueren Analyse des derzeit vorhandenen Wissens zu dieser Thematik und der Identifikation existierender Wissenslücken bezüglich des Einflusses der Temperaturveränderungen auf die Coccinelliden und ihre regulativen Effekte. Dabei wurde der kybernetische Ansatz des Compartmentnetzes verwendet. Das heißt, die Populationen der Marienkäfer wurden in Compartments eingeteilt und ihnen die wichtigsten Prozesse (State variables) zugeordnet. Da jeder Prozess unterschiedlich durch die Temperatur als „Driving variable“ beeinflusst wird, ist es notwendig, diesen Zusammenhang für jeden einzelnen Prozess zu ermitteln. Die bisherigen Untersuchungen und Literaturrecherchen ergaben dabei erste Anzeichen einer relativen Ähnlichkeit der Reaktionen der Arten *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* auf eine Erhöhung der Temperatur. Jedoch ist unser Wissen hierzu noch sehr lückenhaft. Es mangelt vor allem an vergleichenden Untersuchungen. Voneinander abweichende Versuchsbedingungen, wie beispielsweise verwendete Temperaturregime, Nahrungsqualität und -quantität sowie Versuchsdauer, erschweren zudem die Sekundärauswertung der Literatur. Ein weiterführendes Versuchsprogramm wird durchgeführt.

Stichwörter: *Coccinella septempunctata*, *Harmonia axyridis*, natürliche Gegenspieler, prädatorisches Potential, globale Erwärmung

Abstract

Ladybirds are one of the most important groups of natural enemies of aphids in cereals. Currently, the endemic species *Coccinella septempunctata* and *Propylea quatuordecimpunctata* as well as the since a couple of years invasive *Harmonia axyridis* colonize wheat fields. There is indication that the expected global warming will change the predatory potential and the intraguild relationships of these species. The present study deals with the analysis of currently existing knowledge on this topic and identification of existing knowledge gaps concerning the influence of elevated temperatures on coccinellids and their regulatory effects. The compartment network approach was used. That means, the population of each coccinellid was divided into different compartments and the most important state variables were determined for each compartment. Because the effect of temperature on each state variable varies, the determination of these relationships is necessary for each state variable separately. Previous investigations and collected data from literature showed indications of a relative similarity of the reactions of the two species *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* to elevated temperature. However, our knowledge about that influence is still very incomplete. In particular, there is a deficiency of comparative investigations. In addition divergent investigation conditions such as temperature regime used, nutrition quality and quantity as well as duration of investigation complicate the secondary analysis of data from literature. A further investigation program is implemented.

Keywords: *Coccinella septempunctata*, *Harmonia axyridis*, natural enemies, predatory potential, global warming

Einleitung

Die Temperatur ist eine bedeutende Einflussgröße (Driving variable) für populationsdynamische Prozesse von Coccinelliden, die bei Blattläusen an Getreide sehr wichtige natürliche Gegenspieler darstellen. Ziel der vorliegenden Studie war es, mithilfe der Aufbereitung existierender Daten aus Publikationen und bisherigen Untersuchungen den derzeitigen Wissenstand zur Wirkung der Temperatur als Driving variable in den Populationen der einheimischen Art *Coccinella septempunctata* und der invasiven Art *Harmonia axyridis* auf steigende Temperaturen zu beleuchten und Wissenslücken, die einem weiteren Forschungsbedarf unterliegen, aufzuzeigen. Die Planung und Durchführung weiterer, auf die Fragestellung und aufeinander abgestimmter, Untersuchungen soll es anschließend ermöglichen, diese Lücken zu schließen. Besondere Beachtung sollen dabei die vergleichenden Betrachtungen der Reaktionen dieser beider Arten bekommen.

Material und Methoden

Als geeigneter methodischer Ansatz, um dieser Fragestellung nachzugehen, erschien der systemanalytische Ansatz. Dieser kybernetische Ansatz findet beispielsweise auch bei der Erstellung von Simulationsmodellen Anwendung (Gosselke et al. 2001). Dazu muss das System, in diesem Falle die Coccinellidenpopulation, zunächst als Compartmentnetz strukturiert werden (Abbildung 1).

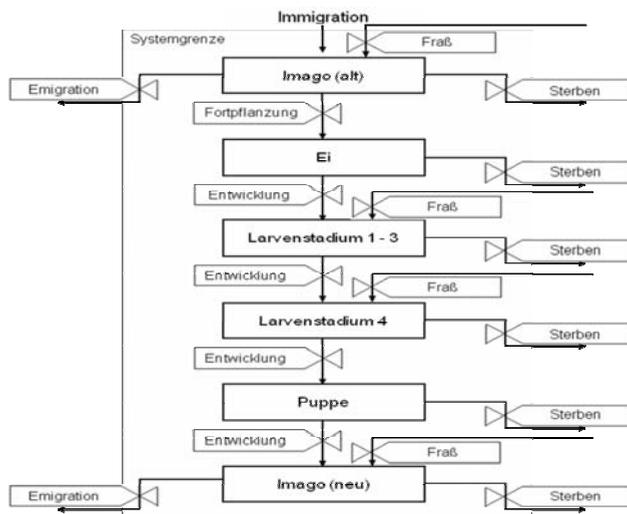


Abb. 1 Compartmentnetz einer univoltinen Coccinellidenpopulation

Dieses Netz besteht in den kleinsten Einheiten aus den Compartments. Das sind Elemente dieses Systems mit einer bestimmten ökologischen Funktion und biotischen Präsenz (Freier & Rossberg 2001). Individuen eines Compartments müssen also eine relative Ähnlichkeit zueinander besitzen. In einer Coccinellidenpopulation lassen sich die Compartments wie folgt einteilen: Imagines (alte und neue), Eier, Larven des ersten bis dritten Entwicklungsstadiums, Larven des vierten Stadiums und Puppen.

In den meisten Fällen ist eine weitere Unterteilung der Compartments in Altersklassen notwendig. Jedes Compartment unterliegt laufenden Zustandsänderungen, die in Raten angegeben werden. Diese State variables werden in ihrer Ausprägung von Einflussgrößen, den Driving variables, bestimmt. Wichtige State variables sind unter anderem die Immigration, das Überleben, die Entwicklung, der Fraß und die Reproduktion. Wobei zu beachten ist, dass jedem Compartment bestimmte Prozesse zugeordnet werden müssen. Die Temperatur stellt eine der maßgeblichen Einflussgrößen dieser Prozesse dar.

Ergebnisse und Diskussion

Mithilfe dieses Compartmentnetzes und der dadurch entstandenen Struktur konnten nun existierende Daten zum Einfluss der Temperatur auf Prozesse innerhalb von Coccinellidenpopulationen aus Publikationen und vergangenen Untersuchungen systematisch aufbereitet werden.

Die Immigration beispielsweise beginnt erst ab einer bestimmten Temperatursumme über einer für die Aktivität der Käfer notwendigen Temperatur, die nach der Winterruhe der Käfer erreicht werden muss. Diese Temperatur liegt für *Coccinella septempunctata* circa bei 9 °C und ab etwa 60 Taggraden über diesem Nullpunkt beginnen die adulten Käfer dieser Art nach Freier (1983) mit der Immigration in neue Habitate. Die Entwicklung von Eiern und Larven ist ebenso von einem Entwicklungsnullpunkt abhängig, der je nach Art verschieden sein kann. Für den Nullpunkt der präimaginalen Entwicklung von *Coccinella septempunctata* findet man beispielsweise folgende Angaben: 10,7 °C (Katsarou et al. 2004) und 11,9 °C (Obrycki & Tauber 1981). Nach LaMana & Miller (1998) liegt dieser für *Harmonia axyridis* mit 11,2 °C und nach Schanderl et al. (1985) mit 10,5 °C in sehr ähnlichen Bereichen. Es bedarf einer bestimmten Temperatursumme, um die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Käfer abzuschließen. Diese liegt für *Coccinella septempunctata* nach Katsarou et al. (2005) bei 281,5 Taggraden und nach Obrycki & Tauber (1981) bei 269 Taggraden. Im Vergleich benötigt *Harmonia axyridis* nach LaMana & Miller (1998) 267,3 Taggrade und nach Schanderl et al. (1985) 231,3 Taggrade, um die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Käfer abzuschließen.

Die Mortalität der Coccinelliden hängt ebenso maßgeblich von Umweltvariablen (Driving variables) ab. Langfristige Temperaturen oberhalb von 40 °C und unterhalb von 9 °C wirken beispielsweise auf *Coccinella septempunctata* letal (Freier 1983). Wohingegen Temperaturen etwa zwischen 21 °C und 24 °C für *Coccinella septempunctata* den optimalen Temperaturbereich für das Überleben darstellen und die geringsten Sterberaten (zwischen 8,09 % und 8,86 %) hervorrufen. In den Jahren 2008/09 wurden am Julius Kühn-Institut Kleinmachnow vergleichende Laboruntersuchungen zur Mortalität der beiden Arten *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* in verschiedenen Temperaturstufen durchgeführt. Dabei deuteten sich Unterschiede zwischen den beiden Arten an, die derzeit durch erneute Untersuchungen überprüft werden.

Auch der Fraßbedarf dieser beiden Arten in Abhängigkeit zur Temperatur wurde in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Untersuchungen näher betrachtet (Asgari 1966, Hukusima & Kamei 1970, Wetzal et al. 1981, Ghanim et al. 1984, Wetzal 1995, Lucas et al. 1997, Yasuda & Ishikawa 1999, Lucas et al. 2002, Lee & Kang 2004, Soares et al. 2005, Tsaganou et al. 2004, Katsarou et al. 2005, Labrie et al. 2006, Agarwala et al. 2008, Kregel & Freier 2009 u.a.). Der Vergleich dieser Untersuchungen gestaltet sich jedoch schwierig, da die Versuchsbedingungen teilweise erheblich, zum Beispiel durch die Verwendung verschiedener Blattlausarten als Futter und Temperaturregime, voneinander abweichen. Der Sättigungsstatus, die Nahrungsqualität und das Geschlecht der Käfer beeinflussen die verzehrte Menge an Nahrung zudem erheblich. Der Fraßbedarf von *Coccinella septempunctata*-Männchen entspricht zum Beispiel etwa 89 % des Fraßbedarfes der Weibchen dieser Art. Haben die Weibchen entsprechend viele Blattläuse zur Verfügung, legen sie in Perioden je nach Art, Individuum und Temperatur unterschiedliche Mengen an Eiern ab. Nach Literaturangaben (Hukusima & Kamei 1970; Srivastava & Omkar 2003; HongPing et al. 2009) liegen die maximalen, abgelegten Eimengen pro Weibchen für *Coccinella septempunctata* bei 1312,4 Eiern (30 °C) und für *Harmonia axyridis* bei 2310,1 Eiern (25 °C). Die Dauer der Eiablageperiode ist nach Srivastava & Omkar (2003) bei *Coccinella septempunctata* und Temperaturen um 30 °C mit knapp 50 Tagen am längsten.

Die bisherigen Untersuchungen und Literaturrecherchen ergaben erste Anzeichen einer relativen Ähnlichkeit in einigen wichtigen Reaktionen der Arten *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* auf eine Erhöhung der Temperatur gegenüber den derzeit normalen Temperaturen. Andere Prozesse, wie beispielsweise die Eiablage unterscheiden sich hingegen erheblich. Jedoch ist das Wissen hierzu noch sehr lückenhaft. Es mangelt vor allem an vergleichenden Untersuchungen. Voneinander abweichende Versuchsbedingungen, zum Beispiel verwendete Temperaturregime, Nahrungsqualität und -quantität sowie die Versuchsdauer, erschweren zudem die Sekundärauswertung der Literatur.

Am Julius Kühn-Institut Kleinmachnow sind weiterführende Versuchsprogramme konzipiert, die aufeinander abgestimmt sind und vergleichend mit mehreren Arten durchgeführt werden, um zu eindeutigeren Aussagen bezüglich der artspezifischen Unterschiede in den Reaktionen der Coccinelliden auf die Temperatur als Driving variable zu gelangen.

Literatur

- Agarwala, B.K.; Yasuda, A.; Sato, S. (2008): Life history of a predatory ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) to food stress. *Applied Entomology and Zoology* 43 (2): 183-189.
- Asgari, A. (1966): Untersuchungen über die im Raum Stuttgart – Hohenheim als wichtigste Prädatoren der Grünen Apfelblattlaus (*Aphidula pomi* DEG.) auftretenden Arthropoden. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 93: 51 – 60.
- Freier, B. (1983): Untersuchungen zur Struktur von Populationen und zum Massenwechsel von Schadinsekten des Getreides als Grundlage für ihre Überwachung, Prognose und gezielten Bekämpfung sowie für die Entwicklung von Simulationsmodellen. Dissertationsschrift. Halle: Martin-Luther-Universität.
- Freier, B.; Rossberg, D. (2001): Simulationsmodelle als Erkenntnismittel in der Agrarökologie. *IANUS* 1/2001.
- Ghanim, A.E.-B., B. Freier, Wetzel, T. (1984): Zur Nahrungsaufnahme und Eiablage von *Coccinella septempunctata* L. bei unterschiedlichem Angebot von Aphiden der Arten *Macrosiphum avenae* (Fabr.) und *Rhopalosiphum padi* (L.). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 20: 117–125.
- Gosselke, U.; Triltsch, H.; Rossberg, D.; Freier, B. (2001): Getlaus01—the latest version of a model simulating aphid population dynamics in dependence on antagonists in wheat. *Ecological Modelling* 145:143-157.
- Hukushima, S., Kamei, M. (1970): Effects of various species of aphids as food on development, fecundity and longevity of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University* 29: 53–66.
- HongPing, W.; ShuKai, J.; WenBo, Z. (2009): Effect of temperature on survival, development and fecundity of *Harmonia axyridis*. *Chinese Bulletin of Entomology* 46 (3): 449-452.
- Katsarou, I, Margaritopoulos, J.T., Tsitsipis, J.A., Perdakis, D.Ch., Zarpas, K.D. (2005): Effect of temperature on development, growth and feeding of *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens* reared on the tobacco aphid, *Myzus persicae nicotianae*. *BioControl* 50:565–588.
- Koch, R. L. (2003): The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts.- *Journal of Insect Science*, 3 (32): 1-16. [online] URL: <http://insectscience.org/3.32/>.
- Krengel, S.; Freier, B. (2009): Effekte einer Temperaturerhöhung auf die natürliche Regulation durch die Marienkäfer *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis* bei Blattläusen an Weizen. *Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut* 419: 47-51.
- Labrie, G.; Lucas, E.; Coderre, D. (2006): Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? *Biological Invasions* (2006) 8, S.743 – 754.
- LaMana, M.L., Miller, J.C. (1998): Temperature-Dependent Development in an Oregon Population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 27(4): 1001-1005.
- Lee, J-H.; Kang, T-J. (2004): Functional response of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) in the laboratory. *Biological Control* 31 (3): 306-310.
- Lucas, E.; Coderre, D.; Brodeur, J. (1998): Intraguild predation among aphid predators: Characterization and Influence of extraguild prey density. *Ecology* 79 (3):1084-1092.
- Lucas, E.; Gagne, I.; Coderre, D. (2002): Impact of the arrival of *Harmonia axyridis* on adults of *Coccinella septempunctata* and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology* 99: 457-463.
- Obrycki, 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.
- Omkar and Srivastava, S. (2003): Influence of six aphid prey species on development and reproduction of a ladybird beetle, *Coccinella septempunctat*. *BioControl* 48: 379–393.
- Schanderl, H., Ferran, A., Larroque, M.-M. (1985): Les besoins trophiques et thermiques des larves de la coccinelle *Harmonia axyridis* Pallas. *Agronomie* 5 (5): 417-421.
- Soares, A.O.; Coderre, D.; Schanderl, H. (2005): Influence of prey quality on the fitness of two phenotypes of *Harmonia axyridis* adults. *Entomologica Experimentalis et Applicata* 114 (3): 227-232.
- Tsaganou, F.C.; Hodgson, C.J.; Athanassiou, C.G.; Kavallieratos, N.G.; Tomanovic, Z. (2004): Effect of *Aphis gossypii* Glover, *Brevicoryne brassicae* (L.), and *Megoura viciae* Buckton (Hemiptera: Aphidoidea) on the development of the predator *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 31:138–144.
- Wetzel, T. (1995): Getreideblattläuse im Pflanzenschutz und im Agroökosystem (Übersichtsbeitrag). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 29: 437-469.
- Wetzel, T.; Ghanim, A.E.-B., Freier, B. (1981): Zur Bedeutung von Prädatoren und Parasiten für die Überwachung von Blattläusen in Getreide. *Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes* 35: 239-244.
- Yasuda, H., Ishikawa, H. (1999): Effects of prey density and spatial distribution on prey consumption of the adult predatory ladybird beetle. *Journal of Applied Entomology* 123: 585-589.

Reim, Stefanie

Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden

Erhaltung von *Malus sylvestris* unter *In-situ*-Bedingungen im Osterzgebirge

In situ Management of *Malus sylvestris* in the Ore Mountains

Zusammenfassung

Ziel des Projekts ist die langfristige Erhaltung und Nutzung der einzigen, in Deutschland heimischen Wildapfelart *Malus sylvestris* (L.) Mill. an seinem natürlichen Standort (*,in-situ'*). Das Osterzgebirge ist eines der wenigen Gebiete in denen der Wildapfel noch in größerer Zahl vorkommt. Dennoch ist *Malus sylvestris* in seiner Existenz gefährdet. Vor allem durch die Intensivlandwirtschaft werden die Wildapfelbestände dezimiert. Zudem kommt es oftmals zu einer Hybridisierung mit dem Kulturapfel, so dass neben ‚echten‘ Wildapfelbäumen auch ‚Hybride‘ verbreitet sind.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die vorhandenen Wildapfelbäume zunächst durch umfangreiche Kartierungsarbeiten im Osterzgebirge mittels GPS erfasst. Weiterhin wurde eine Reihe von morphologischen Merkmalen bonitiert, die zur Charakterisierung des Wildapfels beitragen sollen. Ausgewählte Bäume wurden zusätzlich genetisch analysiert, um eine eindeutige Einstufung in ‚echte‘ oder ‚Hybride‘ vorzunehmen.

Stichwörter: Wildapfel, *Malus sylvestris*, *in-situ*-Erhaltung, biologische Vielfalt

Abstract

The aim of the project is the long-term preservation and utilisation of the only indigenous wild apple species (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) of Germany in its natural environment (*'in situ'*). The East Ore Mountains are one of the few areas with a bigger population of the crab apple. Nevertheless, the existence of *Malus sylvestris* is endangered. Particularly the intensive agriculture decimates the crab apple population more and more. Furthermore, often hybridisation occurs with the domesticated apple, therefore ‚hybrids‘ are widespread in addition to the ‚pure‘ wild apple trees.

The crab apple trees in the East Ore Mountains were mapped with GPS using the Gauß-Krueger coordinates. Evaluation descriptors with a scoring scale were defined to differentiate ‚crab apple‘ or ‚hybrid‘. In addition genetic investigations were carried out with selected trees to classify the trees unambiguously as ‚pure‘ or ‚hybrid‘.

Keywords: crab apple, *Malus sylvestris*, *in situ*-preservation, biodiversity

Einleitung

Der europäische Wildapfel *Malus sylvestris* (L.) Mill. ist von Vorderasien bis Europa verbreitet. In Europa kommt er im Norden bis Großbritannien, Mittelnorwegen und Mittelschweden vor. Im Osten reicht die Verbreitung bis zur Wolga und im Westen bis zur Iberischen Halbinsel. Im Süden ist *Malus sylvestris* bis zum Mittelmeer verbreitet. Obwohl das Verbreitungsgebiet relativ groß erscheint, kommt *Malus sylvestris* nur sehr zerstreut und vorwiegend in Einzelexemplaren vor. Innerhalb seines Verbreitungsareals wächst *Malus sylvestris* vorzugsweise im Bereich der Nässegrenze, wie Flussauen oder Auenwäldern. Auch bevorzugt der Wildapfel als lichtliebendes Gehölz Standorte in lichten Wäldern, Steinrücken, Hecken und Gebüsch. Geeignete Standorte für den Wildapfel gehen durch menschliche Einflussnahme, wie der Intensivierung der Landwirtschaft und Forstwirtschaft immer mehr verloren. Sind die Wildapfelvorkommen auf wenige Einzelindividuen oder Kleinstgruppen beschränkt, kommt es zu einer genetischen Verarmung und das Aussterberisiko dieser isolierten Populationen steigt (Rosenthal 2003). Zusätzlich ist durch die Reduzierung geeigneter Kreuzungspartner die Wahrscheinlichkeit einer Hybridisierung mit dem Kulturapfel erhöht, so dass bei einer natürlichen Regeneration mit einer Introgression des Kulturapfels gerechnet werden muss (Kleinschmidt und Stephan 1997; Tabel et al. 2000). Größere *Malus sylvestris* Populationen finden sich in Deutschland nur noch selten. Nennenswerte Vorkommen gibt es beispielsweise im Biosphärenreservat ‚Mittlere Elbe‘ und dem Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin, aber auch im Osterzgebirge.

Das Osterzgebirge wurde erst spät besiedelt und aufgrund der ungünstigen klimatischen Bedingungen wurde erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts der Kulturapfel auf Streuobstwiesen angebaut. Daher ist davon auszugehen, dass eine Hybridisierung zwischen *Malus sylvestris* und dem Kulturapfel nur in einem geringen Maße stattgefunden hat. Weiterhin bietet die räumliche Struktur mit dem stetigen Wechsel zwischen Offenland, Wald und Steinrücken beste Standortbedingungen für den Wildapfel.

Ziel dieser Arbeit ist, die Erhaltung und nachhaltige Nutzung des Wildapfels *Malus sylvestris* im Osterzgebirge zu sichern. Gleichzeitig hat das Projekt Modellcharakter für das Management des Wildapfel und soll auf andere Gebiete Deutschlands und andere Wildobstarten übertragbar sein.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: 795 vorhandene Wildapfelbäume wurden mittels GPS im Projektgebiet erfasst und ihre Gauß-Krüger Koordinaten in einer Karte aufgezeichnet. Für die genetischen Analysen wurden 220 Wildapfel-Akzessionen aus dem Osterzgebirge anhand der Boniturdaten zur Morphologie des Blattes und der Blüte sowie der Fruchtgröße ausgewählt. Zum Vergleich der genetischen und morphologischen Merkmale wurden 10 alte

sächsische Apfelsorten und die Sorten ‚Pinova‘ und ‚Elstar‘ in die Analyse einbezogen. Weiterhin wurden sechs Apfelnentypen in den Untersuchungen berücksichtigt, die vom European Cooperative Programme for Plant Genetic Resource (ECPGR) als Standards festgelegt wurden. Es handelt sich dabei um die Apfelsorten ‚Delicious‘, ‚Fiesta‘, ‚Prima‘, ‚Worcester Permain‘, die Unterlagensorte ‚Malling 9‘ und die zwei Wildapfel-Genotypen ‚*Malus floribunda* 821‘ und ‚*Malus robusta* 5‘ (Govan et al. unveröffentlicht).

Morphologische Merkmale: Für die Charakterisierung des Wildapfels wurde ein Boniturbogen mit insgesamt 30 Einzelmerkmalen erarbeitet. Dabei wurden unter anderem Merkmale zum Standort, zum Habitus, zur Morphologie des Blattes und der Blüte sowie zu Fruchteigenschaften festgehalten. Alle Bonituren erfolgten *in-situ*.

Probennahme und DNA Isolierung: Die Sammlung der Blattproben erfolgte unter Verwendung von Silicakügelchen modifiziert nach einem Protokoll von (Slotta et al. 2008). Die getrockneten Blattproben wurden anschließend für 3 Minuten mit einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan) bei 25 Schlägen/Sekunde zermahlen. Die DNA Isolierung wurde nach einem Protokoll des Plant DNeasy mini Kits (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt und anschließend auf 10 ng/µl verdünnt.

SSR-Analyse: Für die SSR-Analyse wurden 12 verschiedene SSR-Marker verwendet, die vom ECPGR als Standardmarker festgelegt wurden: CH01h10, CH04C07, CH01h01, Hi2c07, CH01f03b, GD147, CH02d08, CH04e05, CH02c11, CH01f02, CH02c09, GD12. Die PCR wurde unter Verwendung des ‚Type-it Microsatellite PCR Kits‘ der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend des Protokolls durchgeführt. Die Auftrennung und Analyse der SSR-Fragmente erfolgte mittels Beckman Coulter CEQ 8800 (Fa. Beckman Coulter, Krefeld).

Datenanalyse: Die genetischen und morphologischen Daten wurden in eine binäre Matrix umgewandelt, wobei 0 und 1 die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein des Merkmals kennzeichnen. Unter Verwendung des DICE-Koeffizienten wurde mittels Softwareprogramms NTSYS 2.0 eine Prognose der Ähnlichkeit zwischen den Akzessionen vorgenommen. Die Ähnlichkeitsmatrix wurde mit der Clusteranalyse-Methode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) verrechnet und ein Dendrogramm erstellt.

Ergebnisse

Morphologische Merkmalerfassung: Insgesamt wurden 220 Akzessionen aus dem Osterzgebirge anhand ihrer morphologischen Merkmale charakterisiert. Als die wichtigsten Merkmale für die Klassifizierung des echten Wildapfels gelten die fehlende Behaarung an Blättern und Blüten sowie Fruchtgrößen unter 35 mm und die fehlende Deckfarbe der Früchte. Ein Großteil der untersuchten Akzessionen zeigten weder eine Behaarung an den Blättern (73 % der Akzessionen) noch eine Behaarung an der Blüte (84 % der Akzessionen). Bei 84 % der untersuchten Akzessionen waren die Früchte kleiner als 35 mm und 90 % der Akzessionen zeigten keine Deckfarbe oder nur einen roten Hauch als Deckfarbe. Als Ergebnis der morphologischen Bonitur wurden 114 Akzessionen als ‚echte‘ Wildapfelbäume eingeordnet. Da die Boniturnote mindestens eines der oben beschriebenen Merkmale auf einen Kultureinfluss hindeutete wurden 106 Akzessionen als ‚Hybrid‘ eingestuft.

Genetische Merkmalerfassung: Für eine eindeutige Gruppierung in ‚echt‘ oder ‚Hybrid‘ wurden die 220 Akzessionen mit 12 SSR-Markern untersucht. Alle Akzessionen zeigten ein auswertbares Ergebnis und mit jedem SSR-Marker wurde je Akzession mindestens ein Fragment detektiert. Die Anzahl der unterschiedlichen Allele variierte je SSR-Marker zwischen 13 und 23, die Allelfrequenzen lagen bei mindestens 0,0021 und maximal 0,8761. Insgesamt wurden mit den 12 SSR-Markern 191 verschiedene SSR-Allele detektiert.

Clusteranalyse: Auf Basis der 191 detektierten Allele und der morphologischen Daten wurde eine binäre Matrix erstellt und mit Hilfe des Softwareprogramms NTSYS 2.0 verrechnet. Das resultierende Dendrogramm zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen der 238 Akzessionen zueinander. Dabei konnte der Stammbaum in vier Hauptcluster gegliedert werden. In der ersten Gruppe sind die Wildapfelarten *Malus floribunda* 821 und *Malus robusta* 5 vertreten. In der zweiten Gruppe sind alle Kulturapfelsorten, wie beispielsweise ‚Elstar‘ oder ‚Pinova‘ vorhanden. Die dritte Gruppe zeigte einen gemeinsamen Ursprung mit der Gruppe der Kulturapfelsorten, so dass alle Akzessionen in dieser Gruppe als Hybride eingestuft wurden. Insgesamt waren 57 Akzessionen aus dem Osterzgebirge dieser Gruppe zu zuordnen. Bei der vierten Gruppe handelt es sich um das Cluster mit den ‚echten‘ *Malus sylvestris* Akzessionen. In diese Gruppe wurden 154 von insgesamt 220 Akzessionen aus dem Osterzgebirge eingeordnet. Bei den verbleibenden 9 Akzessionen war die Eingliederung in ein Cluster des Dendrogramms nicht eindeutig, so dass eine klare Einteilung in ‚Hybrid‘ oder ‚echt‘ nicht möglich war.

Diskussion

Von den insgesamt 30 aufgenommenen Merkmalen erfolgte die Artzuordnung anhand einiger ausgewählter Merkmale. In der Literatur gelten vor allem die Blatt- und Blütenbehaarung sowie die Fruchtgröße und Fruchtdeckfarbe als sehr gute Deskriptoren zur Differenzierung von *Malus sylvestris* und *Malus x domestica* (Wagner 1996). Anhand dieser ausgewählten Merkmale wurde zunächst eine augenscheinliche Einstufung der ausgewählten Akzessionen vorgenommen. Bei der Blattbehaarung wird eine mittlere bis starke Behaarung an Blattunterseite und Blattstiel als deutliches Indiz für einen Einfluss des Kulturapfels angesehen (Wagner 1996). Dasselbe gilt für die Behaarung der Blüte. Bei der Fruchtgröße wird eine maximale Fruchtgröße von 3,5 mm als Grenze zum Kulturapfel angesehen (Fellenberg 2001; Jacques et al. 2009; Remmy und Gruber 1993; Tabel et al.

2000; Wagner 1996). Ein großer Nachteil der Klassifizierung anhand von morphologischen Merkmalen ist, dass sie einer mehr oder weniger starken Variation unterliegen, so dass eine falsche Einordnung nicht immer auszuschließen ist (Remmy und Gruber 1993). Die zusätzliche Überprüfung mit molekularen Markern ist zwar arbeits- und kostenaufwändig, schließt aber umweltbedingte Schwankungen bei der Einstufung in echte und hybridisierte Wildapfel-Formen aus. Weiterhin können die einzelnen morphologischen Merkmale hinsichtlich ihrer Aussagekraft für die Klassifizierung der Wildapfel-Akzessionen überprüft werden (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009; Larsen et al. 2006). Beispielsweise zeigten Vergleiche mit molekularen Markern, dass der Grad der Blattbehaarung nicht immer ein eindeutiges Zeichen für den Wildapfel ist (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009).

Von den 220, in dieser Arbeit analysierten, Akzessionen wurden nach Verrechnung der genetischen und morphologischen Daten 57 Individuen als Hybrid und 154 als ‚echt‘ eingestuft. Diese Einstufung war abweichend von der augenscheinlichen Beurteilung, die anhand der morphologischen Merkmale durchgeführt wurde, wobei 106 Individuen als Hybrid und 114 als ‚echte‘ *Malus sylvestris* Akzessionen eingruppiert wurden. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Larsen et al. (2006), nach der genetischen Analyse wurde ein Großteil der augenscheinlichen Hybriden in die Gruppe der echten Individuen eingeordnet. Diese unterschiedliche Festlegung kann mit einer höheren bisher unbekanntem phänotypischen Variation innerhalb der Art *Malus sylvestris* begründet werden. Zusätzlich vermuten Larsen et al. (2006), dass die morphologischen Merkmale nicht miteinander gekoppelt sind und einem einfachen Erbgang folgen. Auch in einer Reihe weiterer Arbeiten wurde beobachtet, dass die morphologischen Merkmale nicht immer mit den genetischen Daten korrespondieren (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009; Rieseberg und Ellstrand 1993; Watano et al. 2004).

Literatur

- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M. J., Wagner, I., Van, B. E., Van, H. J. und Roldan-Ruiz, I., 2003: Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **12**, 845-857.
- Fellenberg, U., 2001: Beurteilung von Wildobst- Voraussetzung für geeignetes Vermehrungsgut zur Erhaltung von Waldgenressourcen. *Forst und Holz* **56**, 50-54.
- Jacques, D., Van der mijnsbrugge, K., Lemaire, S., Antofie, A. und Lateur, M., 2009: Natural distribution and variability of wild apple (*Malus sylvestris*) in Belgium. *Belgian Journal of Botany* **142**, 39-49.
- Kleinschmidt, J. und Stephan, R., 1997: Wild fruit trees. EUFORGEN Noble Hardwoods, Network, Reports, 51-59.
- Larsen, A., Asmussen, C., Coart, E., Orlík, D. und Kjær, E., 2006: Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple. *Journal of Tree Genetics and Genomes*, **2**, 86-97.
- Remmy, K. und Gruber, F., 1993: Untersuchung zur Verbreitung und Morphologie des Wild-Apfel (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Mitteilung Deutsche Dendrologische Gesellschaft* **81**, 71-94.
- Rieseberg, L. H. und Ellstrand, N. C., 1993: What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 213-241.
- Rosenthal, G., 2003: Bedeutung evolutionsbiologischer Prozesse für Landschaftsplanung und Naturschutz. *Natur und Landschaft*, **78**, 497-506.
- Slota, T. A. B., Brady, L. und Chao, S., 2008: High throughput tissue preparation for large-scale genotyping experiments. *Molecular Ecology Resources* **8**, 83-87.
- Tabel, U., Maurer, W. D. und Remmy, K., 2000: Wildapfel und Wildbirne. Taxation der "Wildformnähe" in Klonsamenplantagen. *AFZ/ Der Wald* **16**.
- Wagner, I., 1996: Zusammenstellung morphologischer Merkmale und ihrer Ausprägung zur Unterscheidung von Wild- und Kulturformen des Apfels (*Malus*) und des Birnbaumes (*Pyrus*). *Mitteilung Deutsche Dendrologische Gesellschaft*, **82**, 87-108.
- Watano, Y., Kanai, I. und Tani, N., 2004: Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *Pentaphylla* (*Pinaceae*) revealed by molecular hybrid index analysis. *American Journal of Botany*, **91**, 65-72.

Bisutti, Isabella Linda

Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

Einfluss der Fermentation auf gefriergetrocknete Zellen des antagonistischen Bakteriums *Pseudomonas fluorescens*, Stamm Pf153

Influence of the different fermentation parameters on freeze-dried cells the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153

Zusammenfassung

Pseudomonas fluorescens ist ein effektiver Antagonist zur Kontrolle verschiedener Pflanzenkrankheiten. Um dieses als wirksames Pflanzenschutz- oder Pflanzenstärkungsmittel zu entwickeln, müssen sowohl Produktion, Formulierung als auch Anwendungstechnik optimiert werden. Die Gefrier Trocknung ist eine wichtige Konservierungsmethode für Mikroorganismen. Stamm Pf153 wurde als Modellorganismus verwendet, um den Einfluss der Fermentation auf das Überleben und die Wirksamkeit von *P. fluorescens* nach Gefrier Trocknung zu

untersuchen. Stamm Pf153 wurde unter verschiedenen Bedingungen (unterschiedliche Fermentationszeiten, Inkubationstemperaturen, Medienzusammensetzung und Anwendung von Temperatur-schocks) fermentiert und anschließend unter optimierten Bedingungen gefriergetrocknet. Das Überleben der Zellen wurde vor und nach der Gefrierdrying mit Hilfe der „Most Probable Number“ Methode (MPN) bestimmt. Die Wirksamkeit wurde mittels einem *Botrytis cinerea* / *Vicia faba* Biotestsystem geprüft. Die Resultate zeigen, dass das Überleben von Fermentationszeiten, Inkubationstemperaturen und der Medienzusammensetzung beeinflusst wird, während die Anwendung eines Temperaturschocks die Überlebensfähigkeit nicht beeinflusste. Nur die Experimente mit unterschiedlichen Inkubationstemperaturen zeigten Unterschiede in der Wirksamkeit von Pf153 gegen *B. cinerea*.

Stichwörter: *Pseudomonas fluorescens*, Fermentation, Gefrierdrying, Lebensfähigkeit, *Botrytis cinerea*

Abstract

Pseudomonas fluorescens is an effective antagonist to control several plant diseases. To develop it as a biocontrol agent (BCA) production, formulation and application method have to be optimized. Freeze-drying is an important preserve method for micro-organisms. Strain Pf153 was used as a model to investigate how the fermentation process influences the viability and efficacy of *P. fluorescens* after freeze-drying. *P. fluorescens* strain Pf153 was grown under different conditions (varying the fermentation times, growth temperatures, media composition and applying a heat shock) and afterwards freeze-dried with an optimized procedure. The viability of the cells was determined before and after freeze-drying by the most probable number method (MPN). The efficacy was tested on a *Botrytis cinerea* / *Vicia faba* (broad bean) system. The results indicate that fermentation times, growth temperatures and media composition influenced viability but a heat shock did not. Only a different growth temperature had an influence on the efficacy of Pf153 against *B. cinerea*.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, fermentation, freeze drying, viability, *Botrytis cinerea*

Haas, Sabrina; Perovic, Dragan; Schliephake, Edgar; Ordon, Frank

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

Erste Ergebnisse zur Kartierung der Resistenz des Weizens (*Triticum aestivum*) gegen die Orange Weizengallmücke (*Sitodiplosis mosellana*)

First results on mapping the resistance of wheat (*Triticum aestivum*) against the Orange wheat blossom midge (*Sitodiplosis mosellana*)

Zusammenfassung

Die orange Weizengallmücke (*Sitodiplosis mosellana*) ist ein Schädling in allen Weizenanbaugebieten der nördlichen Hemisphäre, die neben Weizen auch Roggen und Gerste befällt und in den vergangenen Jahren in Deutschland sowie in Großbritannien verstärkt aufgetreten ist. Um den Einsatz von umweltbelastenden Insektiziden, die zur Minimierung von Ertrags- und Qualitätsverlusten eingesetzt werden, zu reduzieren, ist die Nutzung von resistenten Sorten eine effektive und ökologisch sinnvolle Methode. Für die Übertragung dieser Resistenz in Winterweizensorten sollen molekulare Marker entwickelt werden, um eine effektivere Selektion auf Resistenz zu ermöglichen. Mit ersten phäno- und genotypischen Daten konnte das bereits bekannte Resistenzgen (*Sm1*) in einer doppelhaploiden Population (DH) kartiert werden. Die DH-Linien (DHs) wurden phänotypisch im Milchreifstadium auf Larvenbefall untersucht. Ab einem Befall von zwei Larven in 10 untersuchten Ähren wurde eine Linie als anfällig eingestuft. Die genotypische Untersuchung wurde mit 20 auf dem Chromosom 2BS lokalisierten Mikrosatelliten-Markern durchgeführt. Die Kartierung des *Sm1*-Gens erfolgte mit neun Mikrosatelliten von denen zwei das Gen im Abstand von 2 und 6 cM flankieren. Diese ersten Ergebnisse sind die Grundlage für eine weitere Entwicklung von eng gekoppelten und diagnostischen Markern.

Stichwörter: Weizen (*Triticum aestivum*), Orange Weizengallmücke (*Sitodiplosis mosellana*), Resistenz, DH-Linien, molekulare Marker

Abstract

The Orange Wheat Blossom Midge (*Sitodiplosis mosellana*) is a pest in all wheat growing areas of the northern hemisphere, which infects besides wheat also rye and barley. In recent years, the midge frequently occurred in Germany and in the UK. To reduce the application of environmentally harmful insecticides, which are used to minimize yield and quality losses, the utilization of resistant varieties is an effective and ecological friendly approach. Therefore, the project aims at developing molecular markers for the efficient breeding for resistance against the Orange blossom midge. Based on first phenotypic and genotypic data, the already known resistance gene (*Sm1*) could be mapped in a doubled-haploid population (DH). The DH-lines (DHs) were phenotypically analyzed in the milk stage on larval infestation. At an infestation of two larvae in 10 examined ears a DH-line was classified as susceptible. Genotypic analysis was performed with 20 SSRs localized on chromosome 2BS. The mapping of the *Sm1* gene was carried out using nine polymorphic microsatellite markers. Two markers flanking the gene at a distance of 2 and 6 cM were identified. These first results are the base for the development of closely linked and diagnostic markers in the future.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum*), Orange Wheat blossom midge (*Sitodiplosis mosellana*), resistance, double-haploids, molecular marker

Danksagung: Die Autoren danken dem Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und der Gesellschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP) für die finanzielle Unterstützung des Projektes: „Untersuchungen zur Resistenz des Weizens (*Triticum aestivum*) gegen die Orange (*Sitodiplosis mosellana*) und Gelbe (*Contarinia tritici*) Weizengallmücke“ (Projekt-Nr.: 28-1-43.025-07).

Waßmuth, Birte; Verschwele, Arnd

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

Herbizidwirkung von Mesotrione, Thifensulfuron, Mecoprop-P und Pelargonsäure auf *Ambrosia artemisiifolia* bei früher und später Applikation

Effects of mesotrione, thifensulfuron, mecoprop-p and pelargonic acid on *Ambrosia artemisiifolia* at early and late herbicide application

Zusammenfassung

In zwei Experimenten wurde die Wirkung verschiedener Wirkstoffe (Mesotrione, Thifensulfuron, Mecoprop-P und Pelargonsäure) auf die invasive Pflanzenart *Ambrosia artemisiifolia* untersucht. Es wurden unterschiedliche Aufwandmengen (30 %, 60 % und 90 %, Experiment 1) und Teilapplikationen (0:100 %, 25:75 %, 50:50 %, 75:25 % und 100:0 %, Experiment 2) jeweils zu einem frühen (4-Blatt-Stadium) und einem späten (8-Blatt-Stadium) Behandlungstermin getestet. Erhoben wurden die Frischmasse und der Schädigungsgrad drei Wochen nach der Herbizidbehandlung. Die frühe Behandlung war unabhängig von Wirkstoff und Aufwandmenge erfolgreicher, geringere Frischmasse und ein höherer Schädigungsgrad wurden erreicht. Daher sollte *A. artemisiifolia* bereits im frühen Entwicklungsstadium behandelt werden um den bestmöglichen Bekämpfungserfolg zu erreichen.

Süchwörter: *Ambrosia artemisiifolia*, beifußblättrige Ambrosie, Behandlungszeitpunkt, invasive Art, Unkrautbekämpfung.

Abstract

We conducted two experiments on the effects of different active substances (mesotrione, thifensulfuron, mecoprop-p, and pelargonic acid) on the invasive species *Ambrosia artemisiifolia*. We tested different herbicide doses (30 %, 60 %, and 90 %, experiment 1) and dose splitting (0:100 %, 25:75 %, 50:50 %, 75:25 %, and 100:0 %, experiment 2) applied at an early (4 leaf stage) and at a late (8 leaf stage) application time. Fresh weight and percentage of damage were measured three weeks after application. In summary, an early application was by far more successful independent of active ingredient and dosage. Fresh weight was reduced as well as the percentage of damage was higher. Hence, *A. artemisiifolia* should be treated in an early stage to gain the highest possible weed control effect.

Keywords: *Ambrosia artemisiifolia*, application time, invasive species, ragweed, weed control.

Einleitung

Ambrosia artemisiifolia, die beifußblättrige Ambrosie, ist eine invasive Pflanzenart, die in den letzten Jahren verstärkt auch in Deutschland aufgetreten ist (Alberterst et al., 2006). *A. artemisiifolia* ist eine einjährige Art, die auf die regelmäßige Aussamung angewiesen ist, um zu überleben und eine Population aufbauen zu können. Dieser Lebenszyklus muss durch Bekämpfungsmaßnahmen unterbrochen werden, um die weitere Ausbreitung zu verhindern (Bohren et al., 2008). Die Pollen dieser Pflanze können starke allergische Reaktionen (z.B. Heuschnupfen) beim Menschen hervorrufen, zudem tritt sie als Unkraut auf landwirtschaftlichen Flächen und auf Nichtkulturland auf (Starfinger, 2008). Einzelpflanzen in Gärten oder an Wegrändern können am besten durch Ausreißen bekämpft werden, tritt Ambrosia jedoch in größerer Anzahl auf, ist eine chemische oder mechanische Bekämpfung die einzige praktikable Lösung. Da bisher nur wenige Herbizide explizit auf ihre Wirkung auf *A. artemisiifolia* untersucht worden sind und auch der optimale Bekämpfungstermin nicht feststeht, sollen in diesem Artikel zwei Experimente dazu vorgestellt werden.

Material und Methoden

In zwei Klimakammerversuchen wurde die Wirkung vier verschiedener Herbizide untersucht. Die Herbizidapplikation erfolgte an zwei verschiedenen Zeitpunkten (Entwicklungsstadium der Ambrosia). *A. artemisiifolia*-Samen wurden vor Beginn der Experimente für vier Wochen dunkel, auf feuchtem Sand im Kühlraum (4 °C, Dunkelheit) gelagert, um ihre Dormanz zu brechen. Zur Keimung wurden die Samen in ein Erde/Sand-Gemisch übertragen und vier Tage bei 20 °C (16/8 h Tag/Nacht) gelagert. Die Ambrosiapflanzen wurden im Keimblattstadium in Töpfe (6x6 cm) pikiert. Abgestorbene oder geschädigte Pflanzen wurden bis zum Beginn der Experimente ersetzt. Jede Behandlung wurde viermal wiederholt.

Die Töpfe standen vollständig randomisiert im Klimaschrank bzw. Klimaraum bei 20 °C und wurden nach Bedarf gewässert. Eine Düngung erfolgte nicht.

Experiment 1: Es wurden verschiedene Aufwandmengen der Herbizide Callisto (100 g/L Mesotrione) und Harmony LX (480,6 g/kg Thifensulfuron) untersucht. Spritzlösungen wurden mit 30 %, 60 % und 90 % der zugelassenen Aufwandmenge angesetzt und appliziert (Tabelle 1). Die Ambrosiapflanzen wurden im 4-Blatt-Stadium (= frühe Behandlung) oder im 8-Blatt-Stadium (= späte Behandlung) in behandelt. Drei Wochen nach der Applikation wurden die Schädigung bonitiert und die Frischmasse erhoben.

Tab. 1 Aufwandmengen der unterschiedlichen Herbizidbehandlungen

g/ha	Mesotrione			Thifensulfuron		
	30 %	60 %	90 %	30 %	60 %	90 %
	45	90	135	4,5	9	13,5

Experiment 2: In diesem Experiment wurde der Effekt von früher und später Teilbehandlung untersucht. Es wurden fünf Kombinationen von Teilbehandlungen (dose-splitting) getestet. Pflanzen wurden zum ersten Termin mit 0 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 % der zugelassenen Aufwandmenge behandelt und erhielten am zweiten Termin entsprechend 100 %, 75 %, 50 %, 25 % oder 0 % so dass insgesamt dieselbe Aufwandmenge appliziert wurde (Tabelle 2). Untersucht wurde die Wirkung der Herbizide Callisto (100 g/L Mesotrione), Duplosan KV (600 g/L Mecoprop-P) und Finalsan (186,7 g/L Pelargonsäure). Die Auswahl der Herbizide erfolgte aufgrund ihrer Anwendungsbereiche: Callisto wurde als Beispiel für die Behandlung von Maisflächen, Duplosan KV als Referenz für Getreideflächen und Finalsan für die Anwendung auf Plätzen und Wegen ausgesucht. Die erste Behandlung erfolgte im 4-Blatt- (T1) bzw. im 8-Blatt-Stadium (T2), die zweite Applikation erfolgte zehn Tage später. Schädigung und Frischmasse der Ambrosiapflanzen wurde drei Wochen nach der letzten Behandlung erhoben.

Tab. 2 Zugelassene Aufwandmenge der unterschiedlichen Herbizidbehandlungen

	Callisto (Mesotrione)	Duplosan KV (Mecoprop-P)	Finalsan (Pelargonsäure)
Zugelassene Aufwandmenge (=100 %) g/ha	150	1200	30992,2

Die Daten wurden anhand von ANOVA-Prozeduren mit dem Statistikprogramm R (<http://www.r-project.org/>) analysiert. Die Korrelation zwischen Biomasse und Schädigungsgrad wurde nach Spearman berechnet.

Ergebnisse

Experiment 1: Sowohl Dosis, Zeitpunkt der Herbizidapplikation als auch die Interaktion dieser beiden Faktoren hatten einen signifikanten Einfluss auf die Frischmasse und den Schädigungsgrad der Ambrosiapflanzen. Während die Frischmasse über beide Behandlungstermine betrachtet nur zwischen unbehandelt und behandelt variierte (Abbildung 1), war die Frischmasse bei Behandlung mit Mesotrione im 4-Blatt-Stadium unabhängig von der Dosis jeweils niedriger als bei der entsprechenden Behandlung im 8-Blatt-Stadium. Bei einer Behandlung mit Thifensulfuron war dies nicht der Fall.

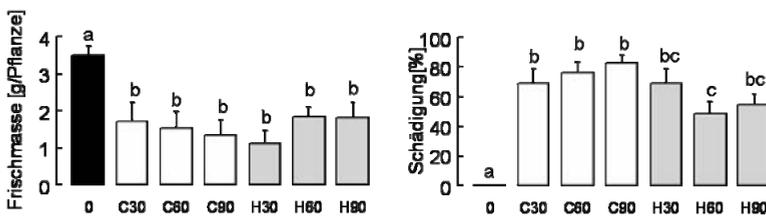


Abb. 1 Frischmasse und Schädigungsgrad von *A. artemisiifolia* drei Wochen nach der Behandlung mit 30 %, 60 % und 90 % der zugelassenen Aufwandmenge der Herbizide Callisto (C, Wirkstoff Mesotrione) und Harmony LX (H, Wirkstoff Thifensulfuron), Mittelwerte über beide Behandlungstermine ± Standardfehler, signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet

Die Frischgewichte waren bei später Behandlung um ein vielfaches höher, obwohl nur eine Woche zwischen den Terminen lag. Zum späten Behandlungstermin traten keine signifikanten Unterschiede in der Frischmasse zwischen den Behandlungen und der unbehandelten Kontrolle auf. Die Biomasse korrelierte jedoch sehr stark negativ mit dem Schädigungsgrad ($p < 0,001$). Kontrollpflanzen produzierten im Mittel eine Frischmasse von 3,5 g/Pfl., während die Frischmasse bei einer Schädigung von 100 % bei 0,23 g/Pfl. lag. Der mittlere Schädigungsgrad war mit 76 % bei Mesotrione-Applikation höher als bei der Behandlung mit Thifensulfuron (58 % Schädigung). Betrachtet man die Schädigung nach Aufwandmengen getrennt, besteht nur noch zwischen den drei Mesotrione-Behandlungen und der 60%igen Aufwandmenge mit Thifensulfuron ein Unterschied (Abbildung 1). Wurde

Mesotrione im 4-Blatt-Stadium appliziert konnte ein Schädigungsgrad von 96-99 % erreicht werden, während er bei der späten Behandlung nur bei 43-66 % lag.

Experiment 2: Die Frischmasse der Ambrosiapflanzen wurde am stärksten durch die Anwendung von Pelargonsäure reduziert (1,56 g/Pfl.). Pflanzen die mit Mesotrione oder Thifensulfuron behandelt wurden, wogen bei der Ernte 2,13 bzw. 2,11 g/Pfl. und waren damit um die Hälfte leichter als die unbehandelten Kontrollpflanzen (4,1 g/Pfl.) (Abbildung 2). In Bezug auf den Schädigungsgrad waren sowohl Pelargonsäure und also auch Thifensulfuron erfolgreicher als Mesotrione (Abbildung 2).

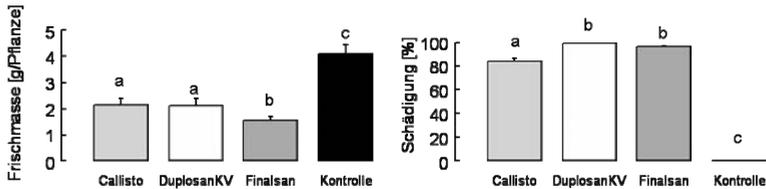


Abb. 2 Frischmasse und Schädigungsgrad von *A. artemisiifolia* drei Wochen nach der Behandlung mit den Herbiziden Callisto (Mesotrione), Duplosan KV (Mecoprop-P) und Finalsan (Pelargonsäure), Mittelwerte über alle Behandlungen ± Standardfehler, signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet

Aufgeteilt nach den unterschiedlichen Behandlungen (dose-splitting) und dem Behandlungstermin, ist zu sehen, dass die Wirkung aller Herbizide unabhängig von der Dosis bei einem frühen Behandlungstermin stärker ist (Abbildung 3). Wurde im 4-Blatt-Stadium bei der ersten Teilapplikation 75 % oder 100 % der zugelassenen Aufwandmenge Pelargonsäure ausgebracht, war die Frischmasse am stärksten reduziert. Je höher die Dosis bei der ersten Teilapplikation war, desto höher war auch der Bekämpfungserfolg.

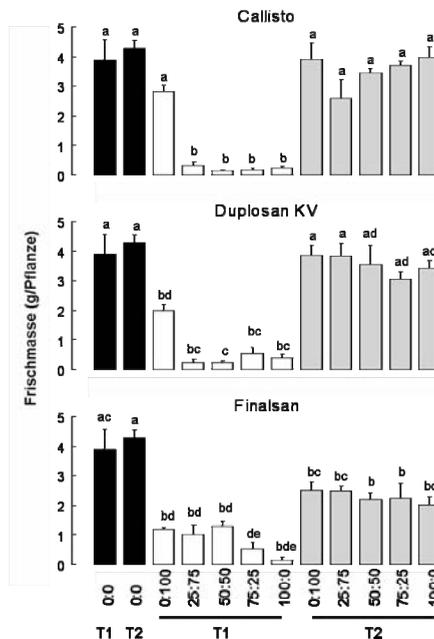


Abb. 3 Frischmasse von *A. artemisiifolia* drei Wochen nach der Behandlung mit den Herbiziden Callisto (Mesotrione), Duplosan KV (Mecoprop-P) und Finalsan (Pelargonsäure) bei früher (T1) und später (T2) Behandlung, schwarze Balken = unbehandelte Kontrolle; Mittelwerte ± Standardfehler, signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Generell war die Behandlung mit Pelargonsäure in Bezug auf die reduzierte Frischmasse am erfolgreichsten. Im Gegensatz zu den beiden anderen Herbiziden zeigte sich hier auch eine Frischmasseabnahme bei später Behandlung (8-Blatt-Stadium). Dagegen lagen die Schädigungsgrade der Pelargonsäure und von Mecoprop-P ähnlich hoch (96-99 %), nur Mesotrione war mit Schädigungsgraden von 90 % und 78 % bei früher bzw. später Behandlung signifikant schlechter.

Diskussion

A. artemisiifolia konnte in beiden Experimenten erfolgreich bekämpft werden. Der Schädigungsgrad lag meist bei über 95 %. Allerdings spielte der Behandlungszeitpunkt eine wichtige Rolle. Die frühe Behandlung im 4-Blatt-Stadium war bei weitem erfolgreicher, die Wirkung trat unabhängig vom Herbizid und der Aufwandmenge auf. Bei späterer Behandlung waren mitunter keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle sichtbar (Experiment 1).

Die Symptome der Wirkstoffe waren unterschiedlich. Während Pelargonsäure innerhalb weniger Stunden zum Absterben der benetzten Blätter (Nekrosen) führte, wurden die durch Mesotrione hervorgerufenen Chlorosen der jüngsten Blätter erst nach einigen Tagen sichtbar. Ebenso trat die Wirkung von Thifensulfuron erst später auf, das Wachstum kam zum Erliegen und die Pflanze starb ab. Mecoprop-P rief ein starkes, verkrümmtes Wachstum hervor, bevor die Pflanzen abstarben.

Wichtigstes Ziel der Bekämpfung ist es, die Pollenproduktion, die Blüte und die Samenbildung zu verhindern. Bei einer Schädigung von 95 % kann zusätzlich auch die Konkurrenzwirkung von *A. artemisiifolia* auf die Kulturpflanzen ausgeschlossen werden.

Die Teilapplikationen in Experiment 2 hatten, anders als erwartet, nur vereinzelt signifikante Unterschiede in der Frischmasse zur Folge. Eine Aufteilung in zwei Teilapplikationen ist somit unnötiger Aufwand und nicht sinnvoll für die Bekämpfung von *A. artemisiifolia*, da kein zusätzlicher Bekämpfungserfolg gewonnen wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die Applikation von 0:100 % vermieden werden muss, da sie einer späten Behandlung gleich kommt und keine ausreichende Wirkung auf *A. artemisiifolia* hat.

Literatur

- Alberternst, B, Nawrath, S., Klingenstein, F., 2006: Biologie, Verbreitung und Einschleppungswege von *Ambrosia artemisiifolia* in Deutschland und Bewertung aus Naturschutzsicht. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutz Dienst **58** (11), 279-285.
- Bohren, C., Delabays, N., Mermillod, G., Baker, A., Vertenten, J., 2008: *Ambrosia artemisiifolia* L.: Optimieren des Schnittregimes. AgrarForschung 15 (7), 308-313.
- Starfinger, U., 2008: Zum Stand des Aktionsprogramms Ambrosia. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutz Dienst **60** (9), 201-204.

Nehrlich, Stephanie

Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Quedlinburg

Untersuchungen zur Ausbreitung von *Colletotrichum gloeosporioides* in *Gaultheria*

Investigations of distribution of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Gaultheria*

Zusammenfassung

Gaultheria procumbens ist eine niederliegende, mehrjährige und winterharte Ericaceae. In den vergangenen Jahren kam es insbesondere in Jungpflanzenbetrieben zu enormen Pflanzenverlusten bis hin zu Totalausfällen der *Gaultheria*-Kultur. Verursacher ist der pilzliche Erreger *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Neben Stängelläsionen am unteren Trieb und teilweise braunen Blattflecken induziert der latent in der Pflanze vorkommende Ascomycet ein Absterben von Trieben und Zweigen. Die zunehmende Expansion dieses Krankheitserregers und der Mangel an wirkungsvollen Fungiziden erfordern neue genetische Quellen für die Resistenzzüchtung. Ein Jungpflanzenzest kann schon in einem frühen Entwicklungsstadium über mögliche Resistenzen einer Art Aufschluss geben. 20, von verschiedenen *Gaultheria*-Herkünften gewonnene Einsporisolate, wurden hinsichtlich ihrer Virulenz an 20 Wochen alten *G. procumbens*-Sämlingen charakterisiert. Dabei konnten die Isolate in 3 Gruppen eingeteilt werden: schwach virulent (6), virulent (6) und hoch virulent (8). Mit einem Testzeitraum von 6 Wochen war es somit möglich die Isolate auf ihre Virulenz zu untersuchen. In nachfolgenden Resistenztestungen mit Sämlingen verschiedener *Gaultheria*-Arten werden je ein schwach virulentes und ein hoch virulentes Isolat zur Resistenzbewertung verwendet. *Gaultheria*-Arten, die in der Evaluierung eine Toleranz oder Resistenz zeigen, finden Eingang in ein Kreuzungsprogramm mit der Kulturform *G. procumbens*. Weiterhin wurde die Ausbreitung des Pathogens von visuell gesund erscheinenden Trieben, die von befallenen Pflanzen entnommenen worden sind, untersucht. Ziel war es zu überprüfen, ob züchterisch wertvolle und vegetativ über Triebspitzen vermehrte Genotypen, pathogenfrei zu erhalten sind. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass sich der Erreger vor allem im Wurzelbereich konzentriert (70% der Triebe) und auch im oberen Sprossbereich nachweisbar war (max. 10%).

Die Untersuchungen machen deutlich, dass der Befallsgradient von der Wurzel bis zu den Blättern abnimmt und eine Vermehrung über Stecklinge nur unter Einhaltung strenger Hygienemaßnahmen möglich ist. Ob eine Neuinfektion auch über den Boden bzw. Substrat erfolgen könnte, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Stichwörter: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gaultheria procumbens*, Resistenz, Jungpflanzenzest

Abstract

Gaultheria procumbens L. is an ericaceous perennial and hardy shrub. Over the last years, German plant growers have suffered from enormous losses up to collapses of the whole crop due to the appearance of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Several disease symptoms like lesions on stems and partially on leaves, shoot wilting and dieback were observed. Increasing expansion of this pathogen and lack of effective fungicides require new genetic sources for resistance breeding. A plant seedling assay gives information about the resistance behaviour to the fungus in an early growth stage. Twenty monoconidial isolates from *Gaultheria* species were surveyed for their growth, morphological diversity and virulence spectrum on *G. procumbens* in order to select representative isolates for resistance screening. The isolates differed in growth rate and virulence variability. Three types of virulence were obtained: weakly virulent, virulent and highly virulent. Within a testing period of only 6 weeks it was possible to realise a selection of pathogenic isolates. Furthermore the proliferation of the pathogen in *G. procumbens* was observed. Young and symptomless shoots were collected from infected plants and evaluated for the existence of the pathogen in shoots. This could be important for the maintenance and propagation of valuable breeding plant material. *C. gloeosporioides* was found in 70% of the investigated roots and in 10% of the upper stem area. This demonstrates that the proliferation of the fungus eases off from roots upwards to shoot-tips.

Furthermore, the presented study probably exhibits the existence of *C. gloeosporioides* in soil and substrate, which has to be verified.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gaultheria procumbens*, resistance, seedling test

Hirschfeld, T.; Ellner, F.; Buschhaus, H.; Goßmann, M.; Büttner, C.

Julius Kühn-Institut, Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Berlin

Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende *Fusarium* spp.

Influence of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin producing *Fusarium* spp.

Zusammenfassung

Bei der Untersuchung des Einflusses von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende Arten von *Fusarium* spp. konnte beobachtet werden, dass Thiophanat-Methyl einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Biosynthese der Mykotoxine als auf das Wachstum der Pilze aufwies und die Respiration von *Fusarium* spp. im Flüssigmedium unabhängig vom Myzelwachstum gehemmt wurde. Die Ergebnisse weisen somit auf einen zusätzlichen Wirkungsmechanismus von Thiophanat-Methyl in *Fusarium* spp. hin.

Abstract

Investigations into the effect of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin-producing species of *Fusarium* spp. showed that the influence on the biosynthesis of mycotoxins was more distinct than on the growth of the fungi. Moreover *Fusarium* spp. showed a reduced respiration at certain levels of TM that was not associated with an inhibited growth. The data indicate that there may be a mechanism of thiophanate-methyl by which the mycotoxinformation of *Fusarium* spp. could be inhibited independent from the growth of the mycelium.

Keywords: *Fusarium* spp., thiophanate-methyl, carbendazim, mycotoxinproduction

Einleitung

Thiophanat-Methyl (TM) ist ein fungizider Wirkstoff aus der Wirkstoffgruppe der Benzimidazole, der über 30 Jahre gegen eine Vielzahl phytopathogener Pilze in der Landwirtschaft eingesetzt wurde. TM ist in Deutschland derzeit für die Indikationen Lagerfäulen an Kernobst, Weißstängeligkeit im Raps sowie Ährenfusariosen in Weizen und Triticale zugelassen. Die Primärwirkung von TM besteht in einer Störung der Zellteilung während der Mitose, ausgelöst durch den Metaboliten Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) durch Bindung an das pilzliche Tubulin wodurch der Aufbau des Spindelapparates zur Trennung der homologen Chromosomen verhindert wird. Eine Sekundärwirkung wurde in *Rhizoctonia solani* sowie *Sacharomyces graminis* nachgewiesen und liegt in der Hemmung der Cytochrom C Oxidase als eines der Schlüsselenzyme der Respiration. Zur Wirkung von TM auf Pilze der Gattung *Fusarium* gibt es bislang nur wenige Untersuchungen.

In Freilandversuchen von Buschhaus und Ellner (2007) an Weizen, der mit *Fusarium graminearum* inokuliert wurde, führte die Applikation von TM zur Blüte zu deutlich reduzierten Mykotoxinkonzentrationen im Erntegut, obwohl der Effekt auf den Anteil *F. graminearum* infizierter Körner nicht so ausgeprägt war wie in den

Vergleichsvarianten mit Azolfungiziden. Sie postulierten daher, dass eine durch TM ausgelöste Hemmung der Respiration in Folge des entstehenden Energiemangels die Mykotoxinbildung von *F. graminearum* einschränkt, da Mykotoxine energiereiche Sekundärstoffwechselprodukte darstellen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde der Einfluss von TM und MBC auf das Wachstum, die Mykotoxinbildung und die Respiration einiger im Getreideanbau relevanter *Fusarium*-Arten *in vitro* untersucht.

Material und Methoden

Untersuchung des Wachstums und der Mykotoxinbildung: Die Anzucht von *Fusarium* spp. erfolgte für jeden Untersuchungsansatz immer neu aus Erdkultur, um Degenerierungen der Isolate zu vermeiden. Nach 5-7 Tagen Inkubation auf Slight-Nutrient-Agar (SNA) wurden Stücke des bewachsenen SNA mit einem definierten Durchmesser von 5 mm ausgestochen und mittig auf den Nährmedien platziert, die TM in Konzentrationen zwischen 0 und 10mg/l oder MBC-Konzentrationen bis 1mg/l enthielten. Die Trichothecene-bildenden *Fusarium*-Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* inkubierten auf einem Weizenmehl-Agar (WMA), die Fumonisin-bildenden Arten *F. verticillioides* und *F. globosum* auf einem Maisextrakt-Agar (MA). Innerhalb der ersten 6-10 Tage wurde durch die tägliche Messung des radialen Myzelwachstums die Zuwachsrates bestimmt. Begleitend wurden morphologische Veränderungen der Isolate durch mikroskopische bzw. makroskopische Bonituren festgehalten. Nach drei Wochen Inkubation wurde der Agar aufbereitet und der Mykotoxin- sowie Ergosterolgehalt mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) analysiert.

Untersuchung der Respiration:Die Isolate von *Fusarium* spp. wurden zunächst aus Erdkultur auf SNA rekultiviert und inkubierten anschließend drei Tage im Bilay's Flüssigmedium, aus dem eine Sporensuspension mit 100000 Konidien/ml hergestellt wurde. Schließlich wurde 1 ml der Sporensuspension je Variante und Wiederholung in das auf bestimmte TM-Konzentrationen eingestellte Bilay's Medium transferiert und während der 5-tägigen Inkubation die Respiration mit dem Sensomat-System von Aqua Lytic gemessen.

Ergebnisse

Einfluss von TM und MBC auf Wachstum und Mykotoxinbildung

Fumonisin-bildende *Fusarium* spp.: Der Einfluss von TM auf die Fumonisinbildung von *F. verticillioides* war stärker ausgeprägt als auf das Myzelwachstum. Das Wachstum ging bei einer Aufwandmenge von 1 mg/l TM um 40 % zurück, die Produktion von Fumonisin B₁ (FB₁) und Fumonisin B₂ (FB₂) dagegen um 94 % (Abbildung 1). Ab einer Aufwandmenge von 5 mg/l war das Myzelwachstum nahezu komplett gehemmt und keine Fumonisine mehr nachweisbar.

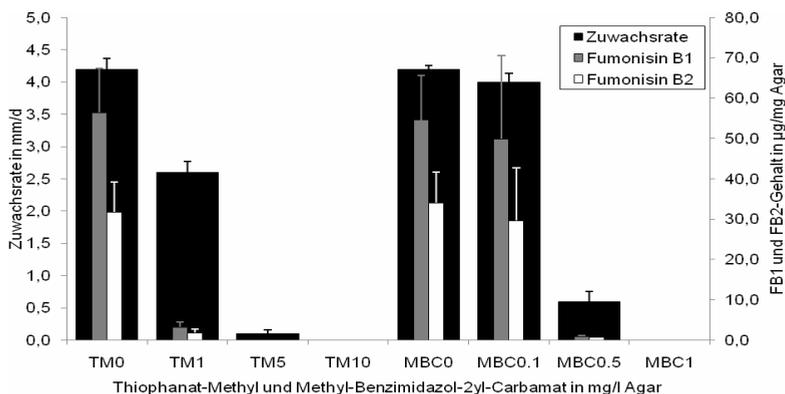


Abb. 1 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an TM und MBC auf Wachstum und Fumonisinbildung von *F. verticillioides*

Im Gegensatz dazu wurden das Wachstum sowie die Fumonisinproduktion von *F. verticillioides* durch MBC in einem verhältnismäßig ähnlichen Ausmaß reduziert. Bei Aufwandmengen von 0,1 mg/l MBC bzw. 0,5 mg/l MBC wurde das Myzelwachstum um 5 % bzw. knapp 90% gehemmt und die Bildung von FB₁ und FB₂ um 9-13% bzw. 98 % limitiert. Ein ähnlicher Einfluss von TM und MBC auf das Myzelwachstum und die Synthese von FB₁ und FB₂ war auch in *F. globosum* nachweisbar.

Trichothecene-bildende *Fusarium* spp.: Bei *F. culmorum* und *F. graminearum* wurde die Toxinproduktion ebenfalls deutlich stärker durch TM beeinflusst als das Wachstum. *F. culmorum* reagierte auf Konzentrationen von 1 mg/l bzw. 2,5 mg/l TM mit einem eher marginalen Rückgang des Myzelwachstums wohingegen die Produktion der Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und Acetyl-Deoxynivalenol (AcDON) um 30-50 % bzw. 70-75 %

eingeschränkt wurde (Abbildung 2). Ab einer Aufwandmenge von 5mg/l TM konnten keine Trichothecene mehr nachgewiesen werden. Das Myzelwachstum war im Vergleich dazu nur um 30-60 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (UK) gehemmt. Im Gegensatz zu den fumonisinbildenden *Fusarium*-Arten zeigte MBC einen ähnlich ausgeprägten Effekt auf die Trichothecenproduktion von *F. culmorum* wie TM.

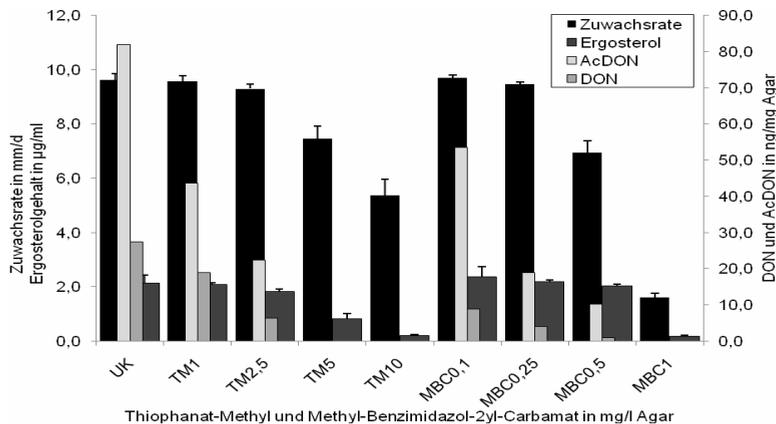


Abb. 2 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an TM und MBC auf Wachstum und Trichothecen-Bildung von *F. culmorum*

Darüber hinaus korrelierten der Ergosterolgehalt und die Zuwachsrate des Myzels von *F. culmorum* nach Pearson in 82 % aller gemessenen Einzelwerte, wodurch der Parameter Zuwachsrate als Maß für die gebildete Myzelmenge bestätigt wird. Die Wirkung von TM und MBC auf *F. graminearum* war adäquat.

Einfluss von TM auf die Respiration von *Fusarium* spp.: Wir postulieren, dass der Pilz nur im Bereich des linearen Anstiegs der Respirationskurve über optimale Wachstumsbedingungen verfügt und das Wachstum am Ende der logarithmischen Phase entweder durch einen Mangel an Sauerstoff in der Gasphase oder an Nährstoffen im Medium limitiert wird. Daher sehen wir den Wendepunkt der Respirationskurve der unbehandelten Kontrolle (UK) als das Ende der logarithmischen Wachstumsphase an, das wir zur Evaluierung der Unterschiede in der Respiration der untersuchten Varianten heranziehen. *F. verticillioides* setzte in der unbehandelten Kontrolle nach 41 Stunden Inkubation ein Maximum von 33 mg/l CO₂ je Stunde und im Durchschnitt der 5 tägigen Inkubation insgesamt 770 mg/l CO₂ frei (Abbildung 3+4). Unter dem Einfluss von TM wurde die Menge an stündlich freigesetztem CO₂ um 40-65 % reduziert und die Gesamtrespiration ging um 20-40 % zurück. Die Ergebnisse der Ergosterol-Untersuchungen zeigen, dass der Rückgang der Respiration nicht auf einer Hemmung des Myzelwachstums basierte, da die UK mit 14,05 µg/ml den geringsten Ergosterol-Gehalt im Flüssigmedium aufwies, wohingegen in den Varianten, die TM enthielten Ergosterolgehalte zwischen 15,97-16,82 µg/ml nachgewiesen wurden.

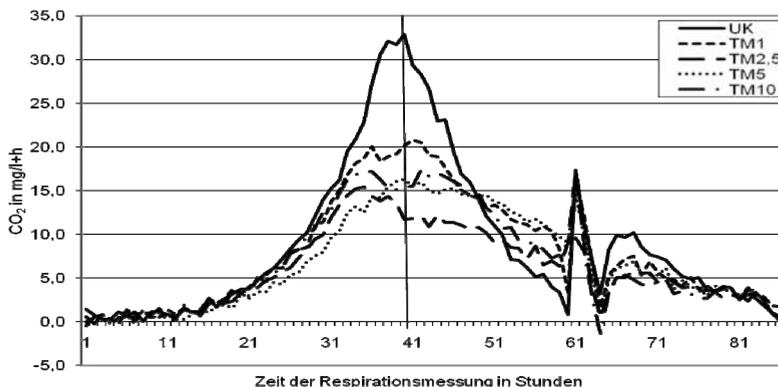


Abb. 3 Stündlich freigesetzte Menge an CO₂ von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an TM über einen Zeitraum von 5 Tagen

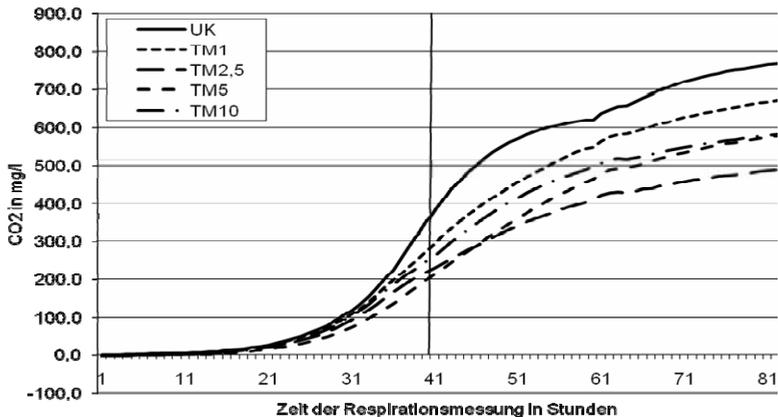


Abb. 4 Gesamtrespiration von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an Thiophanat-Methyl über einen Zeitraum von 5 Tagen

F. culmorum erreichte 39 Stunden nach der Inkubation mit 26,2 mg/l das Maximum an stündlich freigesetztem CO₂ in der UK und zeigte eine Gesamtrespiration von 253,5 mg/l CO₂. Die Menge an stündlich freigesetztem CO₂ wurde durch TM in Konzentrationen von 1-10 mg/l um 30-80 % reduziert und die Gesamtrespiration ging um 20-70 % zurück. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung von *F. graminearum* erzielt werden.

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

¹ Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; ² NAGREF, Plant Protection Institute of Patras, Patras, Griechenland

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Extraktfraktionen aus *Glycyrrhiza glabra* gegen den Falschen Mehltau an der Gurke

Investigations on the efficacy of extract fractions of *Glycyrrhiza glabra* against downy mildew of cucumber

Zusammenfassung

Infektionen mit Falschem Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) verursachen im ökologischen Anbau an Gurken große Probleme. Seit Präparate mit Kupfer nur noch für die Freilandproduktion zugelassen sind, stehen für die Erzeuger von Gewächshausgurken keine zuverlässigen Mittel zum Schutz ihrer Kulturen zur Verfügung. Wie bereits in Biotests und auch in Praxisversuchen nachgewiesen, zeigt ein ethanolischer Extrakt aus *Glycyrrhiza glabra* (Süßholz; P1) gute Wirkung gegen diesen Erreger. Zur Aufklärung der wirksamen Inhaltsstoffe und der Wirkweise wurde der Extrakt in sechs Fraktionen aufgetrennt, die definierten Stoffklassen zuzuordnen sind. Es gibt Anhaltspunkte für die Beteiligung Induzierter Resistenz am Wirkmechanismus.

Stichwörter: Biologischer Pflanzenschutz, Pflanzenextrakte, Induzierte Resistenz

Abstract

Infections with downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) cause major problems in organic cucumber production. Since copper preparations are only allowed for open field production, effective products for protection of cucumbers in greenhouse production are missing. As shown in bioassays and commercial trials there is a good protection against downy mildew by an ethanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice; P1). In order to elucidate the active ingredients and the mode of action, the extract was fractionated into 6 fractions of defined substance classes. There is evidence that induced resistance plays a role in the mode of action.

Keywords: Biological control, plant extracts, induced resistance

Schuster, C.¹; Nowak, A.¹; Marx, P.²; Gärber, U.²; Konstantinidou-Doltsinis, S.³; Seddon, B.⁴; Schmitt, A.¹
 Julius Kühn-Institut, ¹Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; ²Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Kleinmachnow; ³NAGREF, Plant Protection Institute of Patras, Griechenland; ⁴University of Aberdeen, Großbritannien

Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) im Praxisversuch

Biological control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumbers in commercial trials

Zusammenfassung

Der Falsche Mehltau an Gurken (*Pseudoperonospora cubensis*) ist eine der bedeutendsten Krankheiten im ökologischen Gemüseanbau. Im Rahmen eines Projektes im Bundesprogramm Ökologischer Landbau wurden im Jahr 2009 weiterführende Praxisversuche im Folien- und Glasgewächshaus, sowie im Freiland zur Untersuchung der Wirksamkeit zweier Pflanzenextrakte aus Salbei (*Salvia officinalis*) und Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*), sowie eines Bakterienpräparates (*Aneurinibacillus migulanus*) durchgeführt. Als Vergleichspräparat wurde das Pflanzenstärkungsmittel ElotVis genutzt. In den Versuchen unter Glas und Folie zeigte sich, dass eine Anwendung der Pflanzenextrakte eine signifikante Befallsverminderung an den Pflanzen hervorrief, welche stärker war, als die nach Behandlung mit ElotVis. Das Bakterienpräparat führte ebenfalls zu einer signifikanten, mit ElotVis vergleichbaren Wirkung. Eine Anwendung im Freiland bewirkte bei allen Präparaten eine Verzögerung des Befalls an den Pflanzen, wobei die Anwendung des Extraktes aus *G. glabra* zum besten Ergebnis führte. Der Extrakt aus *S. officinalis* und das Bakterienpräparat waren etwas weniger effektiv, aber genauso wirksam wie ElotVis.

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

Abstract

Downy mildew on cucumber plants (*Pseudoperonospora cubensis*) plays an important role in organic cucumber production. In 2009 within the framework of a project funded by the "Bundesprogramm Ökologischer Landbau" commercial trials in green houses and under open field conditions were conducted. In these trials the effectiveness of two plant extracts, from sage (*Salvia officinalis*) and liquorice (*Glycyrrhiza glabra*), as well as cultures of a bacterium (*Aneurinibacillus migulanus*) was investigated. For comparison the plant strengthener ElotVis was used. In trials in the green house the application of the plant extracts led to a significant decrease of disease severity, which was stronger than that of ElotVis. The application of the bacterial preparation also gave significant reduction similar to those after use of ElotVis. Under open field conditions a retardation of the disease progress could be seen for all treatments. Here the application of the extract of *G. glabra* showed the best results. The extract from *S. officinalis* and the bacteria were a bit less effective but comparable to ElotVis.

Keywords: Organic cucumber production, biological control, plant extracts, antagonistic microorganisms

Serfling, Albrecht; Ordon, Frank

Julius Kühn Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz Quedlinburg

Untersuchungen zur Adaptation pilzlicher Pathogene an Azolwirkstoffe

Analyses of adaptation of fungal pathogens to azole fungicides

Zusammenfassung

Der Einsatz von Einzelpräparaten auf Basis von Azolen findet im Agrarbereich Anwendung gegen ein breites Spektrum pilzlicher Pathogene. Zu diesen zählt auch *Fusarium culmorum*. Die Bekämpfung erfolgt gezielt oder bei gleichzeitiger Behandlung anderer Erreger durch Azolwirkstoffe wie Prochloraz, Prothioconazol, Metconazol, Tebuconazol, Flusilazol, Propiconazol und weiteren. Dabei besteht die Gefahr der Ausbildung von Resistenzen. In unseren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass *Fusarium culmorum* nach kurzer Zeit an hohe Dosen des Fungizides Tebuconazol adaptiert werden kann und danach eine quantitative Kreuzresistenz gegen alle untersuchten Azolfungizide entwickelt. Dies lässt sich an Hand von Assays auf Agarplatten mit unterschiedlichen Azolkonzentrationen signifikant nachweisen und konnte durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. In diesen wurde beobachtet, dass es unter Einfluss von Tebuconazol aber auch von Prochloraz zur Veränderung des Hyphenwachstums kommt, die sich durch Anschwellen der Hyphenspitzen ausprägt. In Vitalfärbungen mit Fluoreszeindiazetat konnte die geringere Empfindlichkeit qualitativ nachgewiesen werden. Da *F. culmorum* humanpathogen ist, besteht durch quantitative Kreuzresistenz die Gefahr, dass im medizinischen Bereich Antimykotika auf Azolbasis ebenfalls eingeschränkt wirken.

Stichwörter: Azole, Fungizidresistenz, *Fusarium culmorum*

Abstract

Azole fungicides are used against a broad spectrum of fungal pathogens in agriculture. Among others, these treatments comprise direct or indirect application of Prochloraz, Prothioconazole, Metconazole, Tebuconazole, Flusilazole, Propiconazole and other azole agents on *Fusarium culmorum*. These treatments are related to the occurrence of resistance against azole fungicides. In our investigations we observed adaptation of *Fusarium culmorum* to high doses of Tebuconazole and detected a quantitative cross resistance to all determined azole compounds. In agar plate assays colony diameters were measured microscopically and significant differences between the tebuconazole adapted and non adapted *F. culmorum* strains were observed. Pictures after fluorescence staining with calcofluor white showed alterations in hyphal growth and swelled hyphal tips. Vital stains by fluoresceine diacetate showed semi quantitatively a lower sensitivity. *F. culmorum* is a human as well as plant pathogen that is treated in agriculture and in human medicine by azole single compound fungicides/ antimycotica. Hence, quantitative cross resistance leads to restricted effectiveness of azole fungicides against *Fusarium culmorum*.

Keywords: azole, fungicide resistance, *Fusarium culmorum*

Einleitung

Sowohl im Agrar- als auch im medizinischen Bereich werden zahlreiche Fungizide auf der Basis von Azolwirkstoffen angewendet, die zum Teil in Kombination aber auch als Solopräparate zur Verfügung stehen (<https://portal.bvl.bund.de/psm/jsp/>). Mit der intensiven Anwendung dieser Wirkstoffe kommt es zur Ausbildung von Resistenzen zahlreicher pilzlicher Pathogene im Agrarbereich. Beschrieben sind Resistenzen bei *Blumeria graminis* (Brown & Wolfe, 1991), *Tapesia yallundae* und *Tapesia acuformis* (Leroux & Gredt, 1997), *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopoulos et al., 2003), *Fusarium spec.* (Maldonado et al., 2005; Yin et al., 2009).

Azole sind strukturell unterschiedlich aufgebaut und lassen sich chemisch in Triazole wie beispielsweise Metconazol, Prothioconazol, Tebuconazol, Flusilazol und Imidazole wie Prochloraz, einteilen (Merk & Mukhtar, 1989). Der Wirkmechanismus, die Hemmung der Sterolbiosynthese der Pilze, ist gleich, so dass Kreuzresistenzen auftreten, die insbesondere im medizinischen Bereich negative Auswirkungen auf Behandlungsmöglichkeiten von Mykosen haben (Yoshida & Aoyama, 1991; Yoshida, 1988; Müller et al., 2007). Punktmutationen des für das Protein *CYP51* (entsprechend *ERG11p*) kodierende *erg11* Gen führen zu qualitativem Wirkverlust von Azolwirkstoffen und sind im Agrarbereich (Cools et al., 2006) und aus der Medizin beschrieben (Coste et al., 2007; Akins, 2005). Weitere resistenzauslösende Mechanismen wie die Überexpression des *erg11* Gens (Heilmann et al., 2009), die Mutation weiterer Gene der Ergosterol-biosynthese (Ghannoum & Rice, 1999) und die zusätzliche Bildung und Aktivität von Efflux-Transport-proteinen (Cannon et al., 2009) können ebenfalls Resistenzen bedingen.

Fusarium culmorum ist als toxinbildendes Pathogen in Getreide von großer Bedeutung (Edwards, 2009; Miller, 2002) aber auch in der Humanmedizin relevant (Nagano et al., 2009). Die Bekämpfung von *Fusarium culmorum* erfolgt mit Azolen wie Tebuconazol (Kang et al., 2001; Gareis et al., 2001) in Getreide und mit Voriconazol, Fluconazol, Itraconazol und anderen in der Medizin (Bueno et al., 2009). Auch von *Tapesia yallundae* sind mit Azolwirkstoffen nur schwer bekämpfbare Isolate bekannt, die sich durch Selektion nach massivem Einsatz dieser Fungizide durchsetzten (Albertini et al., 2003). Unklar ist bisher, wie sich eine Behandlung mit nicht lethalen Dosen auf die weitere Empfindlichkeit von Erregern wie *Fusarium culmorum* auswirken.

Material und Methoden

Alle verwendeten Fungizide und Farbstoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, über Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen, für Nährmedien benötigte Chemikalien über die Firma Carl Roth (Karlsruhe).

Kultivierung und Adaptation von *Fusarium culmorum*: Das verwendete *Fusarium culmorum* Isolat Fc46 ist ein Einzelsporisolat, das aus einer Probe der Universität Wageningen, Centre for Plant Breeding Research (C. H. A. Snijder, 1987) entnommen wurde. Es war seit der Entnahme aus dem Feld keiner Fungizidbehandlung ausgesetzt. Die Kultivierung erfolgte auf Kartoffelglukoseagar. Für die Adaptation von *Fusarium culmorum* wurde Kompletmedium verwendet.

Zunächst wurden aus den Kolonien auf Agarplatten mit einem Korkbohrer (4,5 mm Durchmesser) runde mit Myzel vollständig bedeckte Stücke entnommen und mit der Myzeloseite auf mit Fungizid behandelte Platten aufgetragen. Bei einer maximalen Tebuconazolkonzentration, bei der Koloniewachstum auf den Platten feststellbar war, wurde das *F. culmorum* Isolat 30 d bei 21 °C unter Schwarzlicht inkubiert, um so eine Adaptation an Tebuconazol herbeizuführen. Als Kontrolle wurde *F. culmorum* unter entsprechenden Bedingungen ohne Fungizid inkubiert.

Durchführung des Agarplattenassays: Nach dem Adaptationsversuch gegen Tebuconazol wurden die unter Fungizidstress wachsende Kultur und eine zeitgleich ohne Fungizid wachsende Kultur Tebuconazol und weiteren Azolfungiziden ausgesetzt. Der Kolonieradius der Kulturen wurde 6 Tage nach dem Aufbringen auf Agarplatten mit unterschiedlichen Fungizidkonzentrationen gemessen. Diese umfassten 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 und 100 mg l⁻¹. Für Färbungen wurden diese Konzentrationen in Flüssigmedium angewendet.

Alle Kulturen wurden adaptiert und nicht adaptiert bei jeder Konzentration dreifach wiederholt auf Platten aufgebracht oder bei Raumtemperatur in Flüssigkultur inkubiert.

Formulierung der Fungizide, Farbstofflösungen und des Nährmediums: Für die Messungen wurden Tebuconazol, Prochloraz, Prothioconazol, Metconazol, Flusilazol und Propiconazol verwendet. Um die vollständige Löslichkeit der Fungizide sicherzustellen, wurden die Wirkstoffe in eine Formulierung aus 12 % (v/v) Cremophor EL und Wasser gegeben. Die entstandene Stammlösung mit 1 g l^{-1} Wirkstoff wurde daraufhin durch einen Filter mit einer Porengröße von $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Düren) steril filtriert und in 50 ml Röhrchen überführt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ um eine Degradation der Wirksamkeit zu vermeiden. Kompletmedium bestehend aus 10 g Glukose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat, 10 ml Stammlösung A ($100 \text{ g l}^{-1} \text{ CaNO}_2$ in H_2O) und 10 ml Stammlösung B ($20 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $25 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $5,4 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$ in H_2O) wurde mit 1,5% w/v Agar versetzt, mit H_2O auf 900 ml aufgefüllt und 20 min bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druck von 2 bar autoklaviert.

Das flüssige Nährmedium wurde aliquotiert, so dass 90 ml Nährlösung für jede Konzentrationsstufe zur Verfügung standen und mit der Wirkstofflösung durch einen Magnetrührer vermischt. Für die höchste Konzentration wurden 10 ml der Wirkstoff- Stammlösung hinzugegeben. Für niedrigere Konzentrationen wurde der entsprechend geringere Anteil der Wirkstofflösung, der danach mit der Formulierung aus 12 % Cremophor EL auf 10 ml aufgefüllt wurde, verwendet, um eine konstante Konzentration des Cremophors bei allen Fungizidkonzentrationen zu erreichen. Calcofluor white wurde als 0,2%ige Lösung in PBS (*Phosphate balanced salt solution*) gelöst und lichtgeschützt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Färbung: Für Färbungen wurde Kompletmedium ohne Agar verwendet. Alle obengenannten Konzentrationen, Kulturen und Wiederholungen wurden in 50 ml Flüssigkultur ebenfalls 6 Tage in einem Schüttler bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und das entstandene Myzel danach für Färbungen mit Calcofluor white und Fluoresceindiacetat verwendet.

Zur Färbung mit Calcofluor white wurde mit einer Pinzette ein etwa $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ großes Stück des gebildeten Myzels aus der Flüssigkultur entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in je 1 ml der folgenden Lösungen gegeben. Zunächst erfolgte eine Inkubation in einer Mischung aus Lactophenol/ Ethanol (1/2 v/v) für 2 h. Die Proben wurden nach 5minütigem Sieden jeweils 15 min in Ethanol/ H_2O (1/2 v/v), 0,05M NaOH und danach sterilem Wasser geschüttelt und danach 2 h in 0,1M Tris-HCl inkubiert. Die Färbung erfolgte für 5 min in der beschriebenen Calcofluor white Lösung. Nach viermaligem Spülen und 20minütiger Inkubationszeit in sterilem H_2O wurden die Proben auf einem Objektträger in Glycerin eingebettet und für mikroskopische Beobachtungen verwendet.

Mikroskopie: Für mikroskopische Untersuchungen wurde ein Axioscope 50 Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena) genutzt. Bilder wurden mit einer Axiocam MR colour camera (Carl Zeiss GmbH, Jena) aufgenommen und mit der Software MR Grab ver. 1.0.0.4 (Carl Zeiss GmbH, Jena) digital bearbeitet. Für die Beobachtung Calcofluor white gefärbter Proben wurde eine stabilisierte 100 W Quecksilberhochdrucklampe HBO 100 (Osram GmbH, München) mit Filtersatz 5 (Carl Zeiss GmbH) mit einer Anregung von 365 nm dem Strahlteiler FT395 und einer Emission von LP 420 genutzt.

Mathematische Berechnungen und Statistik: ED_{50} - und ED_{90} (ED_x = effektive Dosis zur Hemmung des Wachstums von x %) Werte wurden durch logit Transformation der aus der Messung des Koloniedurchmessers erhaltenen Werte nach Reimann und Deising (2005) und Kunz (1997) berechnet. Die für jede der drei Wiederholungen der Versuche berechneten Werte wurden varianzanalytisch ausgewertet und bei einem signifikanten Einfluss der Adaptation auf die Varianz der Tukey-Test (α , 0,05) zum Vergleich der Mittelwerte angewandt. Signifikante Unterschiede auf Grund der Grenzdifferenz werden in Diagrammen durch Sternchen dargestellt.

Ergebnisse

Fusarium culmorum ließ sich schrittweise an Tebuconazol adaptieren. Nach einer Konzentrationsreihe konnte zunächst Wachstum von *F. culmorum* nach 6 d auf einer Konzentration von 1 mg l^{-1} Tebuconazol beobachtet werden (Abbildung 1a bis f). Wurden die Kulturen für 30 d unter Fungizidstress von 10 mg l^{-1} inkubiert, konnte Wachstum bis zu 50 mg l^{-1} Tebuconazol beobachtet werden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 d bei dieser Konzentration konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Toleranz gegenüber Tebuconazol im Vergleich zur ohne Fungizidstress wachsenden Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 1 g bis l, Tabelle 1).

Die aus der Logit Transformation errechnete ED_{50} für die nicht adaptierte Kultur betrug $0,399 \pm 0,013 \text{ mg l}^{-1}$, für die tebuconazoladaptierte $0,522 \pm 0,096 \text{ mg l}^{-1}$. Für die ED_{90} wurde eine Tebuconazolkonzentration von $8,40 \pm 4,690$ (nicht adaptiert) und $47,17 \pm 4,690$ (tebuconazoladaptiert) festgestellt.

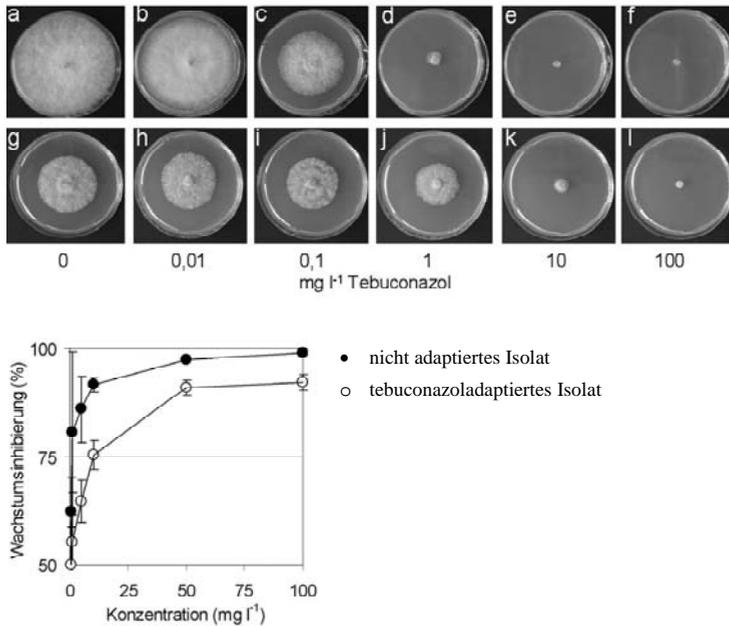


Abb. 1 Darstellung der an Tebuconazol nicht adaptierten Kultur (a bis f und m) und der an Tebuconazol adaptierten Kultur (g bis l und m). Mittelwerte der prozentualen Wachstumsinhibierung sind im Diagramm dargestellt (m).

Tab. 1 ED₅₀ und ED₉₀ Werte von nicht an Tebuconazol adaptierten und Tebuconazoladaptierten *F. culmorum* Kolonieradien in Plattenassays. Sternchen (*) bezeichnen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kolonieradien, ermittelt durch Tukey-Testverfahren, $\alpha=0,05$.

	nicht tebuconazoladaptiert		tebuconazoladaptiert	
	ED ₅₀	ED ₉₀	ED ₅₀	ED ₉₀
Tebuconazol	0,399 ± 0,013	8,400 ± 3,440	0,520 ± 0,096 *	47,170 ± 4,690 *
Prochloraz	0,010 ± 0,001	0,159 ± 0,062	0,364 ± 0,098 *	24,000 ± 4,900 *
Metconazol	0,041 ± 0,008	0,098 ± 0,007	0,087 ± 0,009 *	0,460 ± 0,011 *
Propiconazol	0,140 ± 0,033	1,267 ± 0,388	0,281 ± 0,033 *	103,750 ± 1,624 *
Flusilazol	0,203 ± 0,034	2,099 ± 0,385	1,034 ± 0,414 *	84,637 ± 28,91 *

Die Untersuchung weiterer Azolwirkstoffe ergab besseres Wachstum der an Tebuconazol adaptierten Kultur im Vergleich mit der ohne Fungizidstress wachsenden gegenüber Prochloraz um den Faktor 36,4 (ED₅₀) und 150,9 (ED₉₀), Metconazol 2,2 (ED₅₀) und 4,7 (ED₉₀), Propiconazol 2,0 (ED₅₀) und 81,9 (ED₉₀), und Flusilazol 5,1 (ED₅₀) und 40,3 (ED₉₀). Die Veränderungen der ED₅₀ und ED₉₀ dieser Azolwirkstoffe nach Adaptation von *F. culmorum* an Tebuconazol sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Diese Daten wurden auch nach Assays in Flüssigkultur durch Fluoreszenzmikroskopie und Färbung mit Calcofluor white für Tebuconazol und Prochloraz bestätigt. Dabei ließen sich die Auswirkungen steigender Fungizidkonzentrationen auf die Morphologie pilzlicher Hyphen darstellen und die Bildung von Blasen am Hyphenende durch Beobachtung des Flächeninhaltes bestätigen. Dabei traten ebenfalls Unterschiede zwischen an tebuconazoladaptierten und nicht adaptierten Kulturen auf (Abbildung 2).

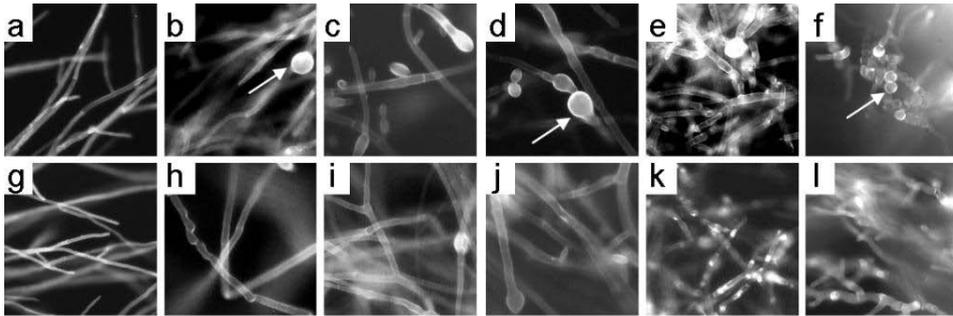


Abb. 2 Hyphenanomalien (Pfeil) in Abhängigkeit steigender Tebuconazol-konzentration bei der nicht adaptierten Kultur und bei der tebuconazoladaptierten Kultur

Diskussion

Fusarium culmorum als Erreger der Taubährigkeit ist insbesondere auf Grund der Toxinbildung von phytopathologischer Relevanz. Die Bekämpfung erfolgt mit Azolwirkstoffen wie Tebuconazol, Prochloraz, Metconazol, Prothioconazol und weiteren (BVL Pflanzenschutzmittelliste, 2009; Pirgozliev et al., 2003) die teilweise als Monopräparate eingesetzt werden. Zudem ist *F. culmorum* bei der Behandlung anderer Pathogene Azolwirkstoffen ausgesetzt. Azolresistente Isolate sind im Agrarbereich beschrieben und sind weder in Wachstum noch in der Bildung von Toxinen wie DON (Deoxinivalenol) eingeschränkt (D' Mello et al., 1998; Meier et al., 2000). Auch bei optimiertem Einsatz von Fungiziden in Feldversuchen kann keine vollständige Toxinfreiheit von Ernteprodukten gewährleistet werden (Matthies et al., 2000; Gareis & Ceynowa, 1994). Unsere Untersuchungen hinsichtlich der Azolsensitivität von *F. culmorum* zeigten, dass die Wirkung von Fungiziden auf Azolbasis eingeschränkt ist, wenn *F. culmorum* geringen Konzentrationen Tebuconazol ausgesetzt war. Quantitative Resistenz von *F. culmorum* gegen Azolwirkstoffe ist bisher nicht beschrieben, jedoch liegen vor allem aus dem medizinischen Bereich, in dem ebenfalls Azole als Monopräparate verwendet werden, Angaben über quantitative Wirkverluste vor (Morschhäuser et al., 2009; Torelli et al., 2008). In diesem Zusammenhang sind Transportproteine beschrieben, deren Gene unter Azolfungizidstress zusätzlicher Expression unterliegen. So konnten Liu et al. (2009) eine um das fünffache erhöhte Expression eines ABC Transporters (FGSG_09697) in *Fusarium graminearum* nach Einwirkung von Tebuconazol ermitteln. Als weitere Ursachen für die Ausbildung quantitativer Resistenz ist die Überexpression der dem Enzym 14-alpha-Demethylase zugrunde liegenden Gene (Heilmann et al., 2009; Akins 2005) und Mutationen dieser genannt (Xu et al., 2008; Coste et al., 2007). Die Ursachen der quantitativen Resistenz von *F. culmorum* in unseren Experimenten bleibt spekulativ, auf Grund des meist qualitativen Charakters der Azolresistenz nach Mutationen der 14-alpha-Demethylase ist Überexpression von Transportproteinen und Enzymen der Ergosterolbiosynthese zu vermuten. Die zahlreichen Mechanismen, die zu Resistenz führen und das gewaltige Vermehrungspotential pilzlicher Erreger sind Anlass, Alternativen wie beispielsweise fusariumresistente Weizensorten zu entwickeln und somit strategisch die Wirksamkeit insbesondere von im Agrarbereich und in der Medizin gemeinsam genutzten Wirkstoffen zu erhalten. Moderne Pflanzenzüchtung kann solche Alternativen bereits heute zur Verfügung stellen, so dass quantitativ resistente Sorten mit der Benotung 3, wobei 1 als vollständig resistent und 9 vollständig anfällig definiert ist, in der beschreibenden Sortenliste aufgeführt sind (<http://www.bundessortenamt.de>).

Danksagung: Dank gilt zuerst den Mitarbeitern, die das Projekt mit bearbeiteten: N. Pastor Käppner und J. Mangelsdorf. Für das Zurverfügungstellen des *F. culmorum* Isolates FC46 danken wir D. Kopahnke.

Literatur

- Akins, R.A., (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* **43** (4), 285-318.
- Albertini, C., Gredt, M., Leroux, P., (2003): Polymorphism of 14 α -demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. *European J. Plant Pathol.* **109**, 117-128.
- Brown, J.K.M., Wolfe, W.S., (1991): Levels of resistance of *Erysiphe graminis* f. sp. to the systemic fungicide triadimenol. *Neth. J. Pl. Path.* **97**, 251-263.
- Bueno, J.G., Martinez, C., Zapata, B., Sanclemente, G., Gallego, M., Mesa, A.C., (2009): In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* Ahead of print.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B.C., (2009): Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** (2), 291-321.
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., Kim, S.H., Lucas J.A. (2006): Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochem. Soc. Trans.* **34** (6), 1219-1222.

- Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M.E., d'Enfert, C., Berman, J., Sanglard, D., (2007): Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell.* **6** (10),1889-1904.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Dijkmsa, W. T. P., (1998): 3-Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide insensitive strain of *Fusarium culmorum*. *Mycotoxin Res.* **14** (1), 9-18.
- Edwards, S.G., (2009): *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food. Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **26** (4), 496-506.
- Gareis, M., Ceynowa, J., (1994): Effect of the fungicide matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198** (3), 244-248.
- Ghannoum, M.A., Rice, L.B., (1999): Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (4), 501-517.
- Hans, F., Merk, M.D., and Hasan Mukhtar. P.D. (1989): Azole antifungals. *Clinics Dermat.* **7** (3), 121-127.
- Heilmann, C.J., Schneider, S., Barker, K.S., Rogers, P.D., Morschhäuser, J., (2009): An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* Ahead of print
- Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnik, A., Buchenauer, H., (2001): Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. *Pest. Manag. Sci.* **57** (6), 491-500.
- Kunz, S., Deising, H., Mengden, K., (1997): Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology.* **87**, 1272-1278.
- Leroux, P., Gredt, M., (1997): Evolution of fungicide resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yellundae* and *Tapesia acuformis* in France. *Pestic. Sci.* **51**, 321-327.
- Liu, X., Jiang, J., Shao, J., Yin, Y., Ma, Z., (2009): Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole. *Appl. Microbiol. Biotech.* Ahead of print
- Maldonado, M.C., Santa Runco, R., Navarro, A.R., (2005): Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **22** (1), 57-59.
- Matthies, A., Flatter, A., Semar, M., Bleiholder, S., Oppitz, K., (2000): *Fusarium* in wheat: importance and toxin production in the field - possibilities and limits of fungicide treatments. *Mycotoxin Res.*, **16** (1), 6-10.
- Meier, A., Birzele, B., Oerke, E.C., Dehne, H.W., (2000): Impact of growth conditions on the occurrence of *Fusarium* spp. and the mycotoxin content of wheat *Mycotoxin Res.* **16** (1), 12-15.
- Miller J.D., (2002): Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **504**, 19-27.
- Morschhäuser, J., (2009): Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* Ahead of print
- Müller, F.C., Staudigel, A., Salvenmoser, S., Tredup, A., Miltenberger, R., Herrmann, J.V., (2007): Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental bavarian vine grapes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51** (8), 3014-3016.
- Nagano, Y., Elborn, J.S., Millar, B.C., Walker, J.M., Goldsmith, C.E., Rendall, J., Moore, J.E., (2009): Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol.* **11**, 1-12.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C. Jenkinson, P., (2003): Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European J. Plant Pathol.* **109** (7), 731-742.
- Reimann, S., Deising, H.B., (2005): Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (6), 3269-3275.
- Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J.G., Kema, G.H., De Waard, M.A. 2003: Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci.* **59** (12), 1333-1343.
- Torelli, R., Posteraro, B., Ferrari, S., La Sorda, M., Fadda, G., Sanglard, D., Sanguinetti, M., (2008): The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol.* **68** (1), 186-201.
- Xu, Y., Chen, L., Li, C., (2008): Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* **61** (4), 798-804.
- Yin, Y., Liu, X., Li, B., Ma, Z., (2009): Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology.* **99** (5), 487-497.
- Yoshida, Y., Aoyama Y. (1991): Sterol 14 alpha-demethylase and its inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* **19** (3), 778-782.
- Yoshida, Y. (1988): Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. *Curr Top Med Mycol.* **2**, 388-418.

Wunderle, J.U.; Koch, E.

Julius Kühn Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

Künstliche Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Flugbranderreger (*Ustilago nuda*) und Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten

Artificial inoculation of barley with the loose smut (*Ustilago nuda*) and mode of infection on the ovary

Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Prüfung künstlicher Inokulationsverfahren von Gerstenpflanzen mit dem Flugbranderreger (*Ustilago nuda*) und das Erlangen von Erkenntnissen zum genauen Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten. Diese Versuche sollten die Basis sein, um zukünftig hoch befällenes Saatgut in ausreichender Menge herstellen zu können, was für Folgeexperimente von großer Wichtigkeit wäre. Hierzu wurden drei Inokulationsmethoden – Inokulation mit der Spritze, Vakuuminfiltration und Besprühen mit Sporensuspension – hinsichtlich der erhaltenen Befallsraten und ihrem Einfluss auf die Keimfähigkeit miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Position des inokulierten Blütchens an der Ähre einen Einfluss auf den späteren Befall des daraus hervorgehenden Korns hat. Zu diesem Zweck wurden die Ähren zunächst per Spritze inokuliert und anschließend beim Ernten in jeweils drei Teile zerlegt und gesondert über einen Embryotest ausgewertet. Als aussichtsreichste Inokulationsmethode kristallisierte sich die Inokulation mit der Spritze heraus. Ein Einfluss der Ährenregion auf den späteren Befall konnte nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die zu einem besseren Verständnis des Infektionsverlaufes auf dem Fruchtknoten führen sollten. Hierfür wurde ein lactophenolbasierendes Autoklavieranfärbeverfahren verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion des Fruchtknotens nicht zwingend über die Narbe stattfinden muss, und dass der Pilz bei einer erfolgreichen Infektion die obersten Zellschichten der Fruchtknotenwand intrazellulär mit einer Infektionshyphye penetriert.

Stichwörter: Brandkrankheiten, Flugbrandbefall, Blüteninokulation

Abstract

The aim of this study was the examination of artificial inoculation techniques of barley with the pathogen (*Ustilago nuda*) and to obtain detailed new findings on the mode of infection on the ovary. These tests were designed to be the base to produce a sufficient amount of highly infected seeds, which would be of great importance for further experiments. Three inoculation techniques - by injection, vacuum infiltration or spraying with spore suspension - were compared with respect to the resulting infection rates and their influence on the germination rate. Moreover, it was evaluated, if the position of the inoculated floret on the ear has any influence on subsequent infection of the developing grain. Therefore the ears were inoculated by injection and, after harvesting, divided in three parts and separately evaluated with an embryo test. The most promising inoculation technique turned out to be inoculation by injection. An influence of the ear area on subsequent infection was not detected. In addition, microscopic analyses were carried out, which should provide a better understanding of the mode of infection on the ovary. A lactophenol-based autoclave staining technique was applied. The analysis showed that an infection of the ovary does not necessarily originate from the stigma, and that in case of an effective infection the fungus penetrates the uppermost cell layers of the ovary intracellularly with an infection hypha.

Keywords: smuts, loose smut, flower inoculation

Einleitung

Für Arbeiten mit samenbürtigen Pilzen ist es wichtig, über Saatgut mit möglichst hohen Befallsraten zu verfügen. Für den Flugbrand ist diese Anforderung nur sehr schwer zu erfüllen, da natürlich infizierte Saatgutchargen nur selten zu mehr als 10% befallen und die Methoden zur künstlichen Inokulation sehr arbeitsaufwendig sind. Eine mögliche Inokulationsmethode stellt die Einzelblüteninokulation per Hand mit einer Spritze dar (Poehlmann, 1945). Bei dieser Inokulationsmethode wird eine wässrige Sporensuspension mit Hilfe einer Injektionspritze in die Blütchen eingebracht. Jones und Dhitaphichit (1991) griffen diese Methode auf und erweiterten sie um die Bedingung, dass nur Einzelblüten inokuliert werden, die sich zu diesem Zeitpunkt in der Anthese befinden, alle anderen werden abpräpariert. Für die hier unternommenen Untersuchungen wurden, ähnlich wie von Jones und Dhitaphichit beschrieben, nur Ähren inokuliert, bei denen sich die Einzelblüten im Bereich der Ährenmitte in der Anthese befanden.

Ein weiteres Verfahren für die Inokulation ist die erstmals von Moore (1936) beschriebene Vakuum-infiltration. Hierbei wird durch Anlegen eines Vakuums gewährleistet, dass sich keine Luft unter den Deckspezeln befindet, so dass nach Abbrechen des Vakuums das Inokulum ungehindert in die Einzelblüten einströmen kann.

Weiterhin muss für eine erfolgreiche Infektion die Keimfähigkeit der verwendeten Brandsporen beachtet werden. In Untersuchungen von Tapke (1953) nahm die Keimfähigkeit von bei Zimmertemperatur gelagerten Brandsporen bereits nach wenigen Monaten stark ab. Bei Temperaturen von 0-2 °C hingegen konnte auch ein ¼ Jahr nach der Ernte der Brandähren noch eine Keimfähigkeit von 50 % und mehr erreicht werden.

Für ein besseres Verständnis der Biologie des Erregers *U. nuda* wurden des Weiteren lichtmikroskopische Aufnahmen des Infektionsverlaufes auf dem Fruchtknoten angefertigt. In der Literatur sind verschiedene Färbemethoden beschrieben, die je nach Entwicklungszeitpunkt mehr oder weniger gut geeignet sind, den Pilz in der Pflanze sichtbar zu machen. Die wichtigste Methode zur Anfärbung von *U. nuda* dient der Bestimmung des Saatgutbefalls und wird als Embryotest (Morton, 1961 und 1967) bezeichnet. Der Pilz wird bei diesem Verfahren mit Lactophenol-Trypanblau dunkelblau eingefärbt. Zum Darstellen von *U. nuda* in auswachsenden Pflanzengewebe wie Internodien und Vegetationspunkten ist eine Anfärbung mit Baumwollblau (Popp, 1951) möglich, die von der Handhabung in vielen Punkten mit der Durchführung des Embryotestes nach Morton übereinstimmt. Eine weitere Möglichkeit, *U. nuda* im Gewebe mit herkömmlichen Farbstoffen und lichtmikroskopischen Methoden sichtbar zu machen, ist die Anfärbung über ein Autoklavierverfahren (Kavanagh und Mumford, 1960, Kollmorgen und Ballinger, 1987). Die eigentliche Anfärbung erfolgt hierbei durch Autoklavieren der Proben in einer Lösung aus Milchsäure und Eisessig mit Trypanblau (0,1 %). Kollmorgen und Ballinger benutzten dieses Verfahren allerdings zur Detektion von *Tilletia laevis* und *Tilletia tritici* in Weizensämlingen und nicht zum Nachweis von *U. nuda* in Gerstenpflanzen (*Hordeum sativum* L.).

Material und Methoden

Das Pflanzenmaterial wurde im Freiland angezogen. Hierzu wurde Sommergerste der Sorte Danuta von Hand in insgesamt 10 Doppelreihen (bestehend aus je 2 Einzelreihen im Abstand von 20 cm; Abstand zwischen den Doppelreihen 80 cm) à 7 m ausgesät. Nach dem Auflaufen wurden die Pflanzen mit Kalkammonsalpeter (28 % N) gedüngt und bei Bedarf bewässert.

Als Inokulationszeitpunkt wurde der Zeitraum vom Beginn des Antherenschiebens (EC 59-62; Zadoks et al., 1974) bis 5 Tage danach ausgewählt. Das Sporenmaterial stammte von frisch gebildeten Brandähren, die wenige Tage zuvor gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt worden waren. Die Sporensuspensionen wurden hergestellt, indem jeweils 15 Brandähren in ca. 500 ml H₂O (+ 0,01 % Tween 20) geschüttelt wurden, so dass sich die Sporen ablösten. Die so erhaltene Suspension wurde dann durch ein grobes Sieb gegeben und auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Für die Inokulation nach Poehlmann (1945) wurde mit Hilfe einer Injektionsspritze (Kanüle: 20 G x 1 ½“) die Deckspelze durchstoßen und die Sporensuspension (etwa 100 µl pro Einzelblüte) direkt auf den Fruchtknoten aufgetragen. In einem zusätzlichen Versuch wurden mit der Spritze inokulierte Ähren nach der Ernte mit einer Schere in drei Abschnitte zerteilt: „Oben“ (nur die oberen 4 Spindelstufen), „Mitte“ (die mittleren 5 Ährenspindeln) und „Unten“ (die unteren 4 Spindelstufen). Die Abschnitte wurden getrennt gedroschen und anschließend über einen Embryotest (Morton, 1961 und 1967) auf ihren Befall untersucht. Die Inokulation mittels Vakuuminfiltration (Moore, 1936) wurde mit einer Apparatur aus der hauseigenen Werkstatt durchgeführt. Hierzu wurden die zu inokulierenden Ähren möglichst luftdicht in die Inokulationskammer eingespannt, die dann über eine manuelle Vakuumpumpe evakuiert wurde. Anschließend wurde der Vakuumschlauch zur Pumpe verschlossen und der Zufuhrschlauch, der mit einem Behälter mit Sporensuspension in Verbindung stand, geöffnet. Durch den anliegenden Unterdruck wurde das Inokulum in die Inokulationskammer gesogen, so dass die zu inokulierende Ähre umströmt wurde. Für die Inokulation durch Besprühen wurden die Versuchspflanzen dreimal täglich mit der Sporensuspension eingesprüht. Wegen der Variabilität im Blühzeitpunkt der Ähren wurden die Sprühinokulationen über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Es wurden jeweils ca. 1 l Sporensuspension pro Doppelreihe mit einer Handsprühflasche der Marke Gloria (floredda-combi, Feinsprüher 1 Liter) ausgebracht.

Die Embryotests wurden standardmäßig nach Morton (1961 und 1967) durchgeführt. Hierzu wurde das Saatgut für eine Mazeration der Körner in 5-10 % NaOH-Lösung über Nacht eingeweicht. Anschließend wurden die Embryonen von Endosperm, Schalengewebe und Spelzen befreit. Die Embryonen wurden in eine Lactoglyzerin-Trypanblau-Lösung (Glyzerin : Milchsäure (90 %) : Aqua dest.; 1:2:5; + 0,01 % Trypanblau) überführt und eine Minute aufgekocht. Die anfangs gelblich-braunen Embryonen werden hell und die Pilzhypen tiefblau eingefärbt. In einem nächsten Schritt wurde der überschüssige Farbstoff durch mehrmaliges (einminütiges) Aufkochen in Lactoglyzerin (Glyzerin : Milchsäure (90 %) : Aqua dest.; 1:2:5) entfärbt. Abschließend wurden die Embryonen unter dem Binokular auf Befall mit *U. nuda* untersucht. Das Originalprotokoll von Morton (1967) wurde somit minimal abgewandelt, indem auf die Verwendung des sehr giftigen Lösungsmittels Phenol verzichtet wurde, d.h. anstatt Lactophenol wurde Lactoglyzerin verwendet.

Weiterhin sollte der Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten genauer untersucht werden. Hierfür wurden infizierte Fruchtknoten über ein Autoklavierverfahren (Kollmorgen und Ballinger, 1987) angefärbt. Zunächst wurden die Fruchtknoten unter dem Binokular abpräpariert. Anschließend wurden sie in ein Gemisch (1:1 v/v) aus 24 % Ethanol und 30 % NaOH überführt und 45 Minuten autoklaviert. Es folgte ein Waschschrift in Aqua dest. (2-3mal). Danach wurden die Proben in ein Gemisch aus Ethanol (abs.) und Eisessig (3:1 v/v) überführt und erneut autoklaviert. Dies führt zu einer weiteren Aufhellung des Gewebes. Im anschließenden Färbeschritt wurde das Material in ein Gemisch aus 45 % Milchsäure und 45 % Eisessig + 0,1 % Trypanblau (2:1 v/v) übertragen und ein letztes Mal autoklaviert.

Ergebnisse

Da bei Versuchen mit *U. nuda* für die allermeisten Fragestellungen hoch infiziertes Saatgut benötigt wird und der natürliche Befall in der Regel deutlich unter 10 % liegt, sollten verschiedene Verfahren zur künstlichen Inokulation im Hinblick auf den Infektionserfolg geprüft werden (Tabelle 1). Die Inokulation mit der Spritze ergab einen mittleren Befall von 52 %. Der für die Vakuuminkokulation festgestellte Wert lag deutlich darunter (16 %). Das schwächste Ergebnis brachte die Inokulation durch Besprühen.

Tab. 1 Befall der Körner mit *U. nuda* (ermittelt im Embryotest) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen Verfahren

	Inokulationsmethode								
	Spritze			Vakuum			Sprühen		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Befall (absolut) ¹	28/49	13/30	22/42	7/42	5/53	11/48	2/51	2/62	2/67
Summe	63/121			23/143			6/180		
Befall [%]	57,1	43,3	52,4	16,7	9,4	22,9	3,9	3,2	3,0
Mittelwert	52,1			16,1			3,3		

¹ Anzahl befallener Embryos/ Anzahl untersuchter Embryos

Da bekannt war, dass der Befall von *U. nuda* die Vitalität des Kornes beeinflussen kann, sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Inokulationsmethoden die Keimrate beeinflussen. Die Keimfähigkeit nahm in der Reihenfolge Sprühen – Vakuum – Spritze ab (Tabelle 2). Damit ist offensichtlich, dass der Befall und die Keimrate negativ korreliert waren (vergl. Tabelle 1). Mit 54 % lag die Keimrate der aus der Inokulation mit der Spritze hervorgegangenen Körner um ca. 40 % niedriger als bei der Kontrolle.

Tab. 2 Einfluss des Inokulationsverfahrens auf die Keimfähigkeit der Körner

	Inokulationsmethode			Nicht inokulierte Kontrolle
	Spritze	Vakuum	Sprühen	
Gekeimte Pflanzen ¹	54/100	67/100	89/100	91/100
Keimung [%]	54	67	89	91

¹ Anzahl gekeimter Pflanzen/ Anzahl ausgesäter Körner

Um abschließend zu testen, ob der Infektionserfolg von der Position der jeweiligen Blüten innerhalb der Ähre abhängt, wurden die Ähren von Pflanzen, die mit der Spritze inokuliert worden waren, nach der Ernte in drei Abschnitte aufgeteilt. Die Körner aus diesen Teilstücken wurden dann getrennt dem Embryotest unterzogen (Tabelle 3). Es ist ersichtlich, dass der Befall der Körner nicht von der Position der Blüten, aus denen diese Körner hervorgegangen sind, abhängig ist.

Tab. 3. Befall der Körner mit *U. nuda* (ermittelt im Embryotest) aus verschiedenen Ährenabschnitten

	Ährenabschnitt		
	„Oben“ ¹	„Mitte“ ²	„Unten“ ³
Befall (absolut) ⁴	20/46	25/58	25/62
Befall [%]	43,5	43,1	40,3

¹ Körner aus den oberen vier Spindelstufen; ² Körner aus den mittleren fünf Spindelstufen; ³ Körner aus den unteren vier Spindelstufen; ⁴ Anzahl befallener Körner/ Anzahl untersuchter Körner

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung zum Infektionsverlauf auf dem Fruchtknoten sind zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt. In Abbildung 1 A sind zwei Eindringungsstellen auf der äußersten Zellschicht des Fruchtknotens sichtbar. Das ist der Startpunkt der Infektion durch *U. nuda*. Die folgenden Abbildungen B-D zeigen Infektionshyphen, mit denen *U. nuda* in die oberste Zellschicht der Fruchtknotenwand eindringt. Der Pilz wächst hier also intrazellulär. Die Zellkerne der infizierten Wirtszellen befanden sich bei fast allen untersuchten Präparaten stets in der Nähe der Infektionsstelle. In Abbildung 1 E-H sind zwei Infektionsstellen und die sich daraus entwickelnden Hyphen sichtbar. *U. nuda* konnte bei diesem Präparat bis in die zweite Zellschicht des Fruchtknotens intrazellulär nachgewiesen werden.

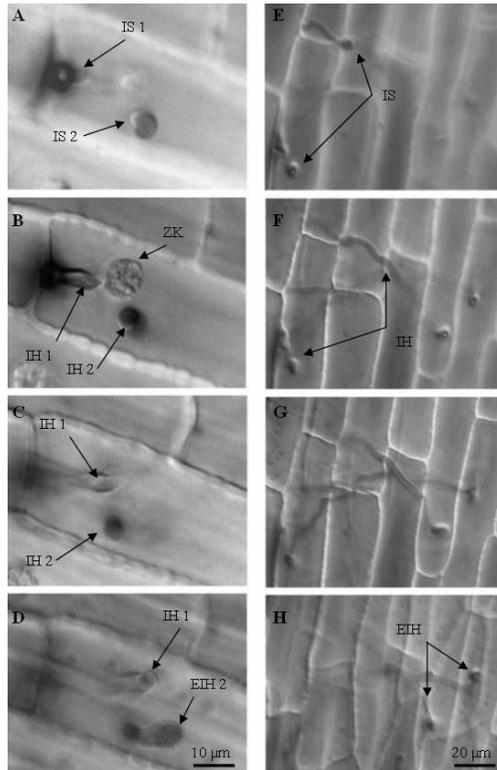


Abb. 1 Eindringen zweier Infektionshyphen (A-D) bzw. mehrerer Infektionshyphen (E-H) in die obersten Zellschichten der Fruchtknotenwand. Um einen räumlichen Eindruck zu vermitteln, ist jeweils ein Bildverlauf dargestellt, wobei in Abb. 1A bzw. E auf die Oberfläche der äußeren Gewebeschicht fokussiert wurde. Die Bilder B-D bzw. F-H zeigen die tiefer liegenden Gewebeschichten. (IS): Infektionsstelle; (ZK): Zellkern; (IH): Infektionshyphen; (EIH): Ende der Infektionshyphen.

Bei allen beobachteten Eindringungsstellen war eine Verbindung zu pilzlichen Strukturen auf der Oberfläche nicht vorhanden, weil sich diese offensichtlich durch die Präparation abgelöst hatten. Es ist daher nicht bekannt, ob die Eindringung direkt aus keimenden Sporen, oberflächlichen Hyphen oder appressorienartigen Strukturen erfolgte.

Diskussion

Mit einem mittleren Befall von 52 % ergab die Inokulation der Blüten mit der Spritze den höchsten Befallswert, gefolgt von der Vakuuminfiltration mit 16 % und der Inokulation durch Besprühen mit lediglich 3 % (Tabelle 1). In Untersuchungen von Panday und Gautam (1989) war die Vakuuminfiltration mit über 80 % Infektionserfolg das zuverlässigste Inokulationsverfahren. Auch Cherewick und Popp (1950) sowie Shands und Schaller (1946) sprechen sich für die Inokulation mittels Vakuuminfiltration aus, da diese in ihren Versuchen im Vergleich zur Inokulation mit der Spritze effektiver und praktikabler war. In Bezug auf die Praktikabilität konnte diese Einschätzung im Rahmen der eigenen Versuche nicht bestätigt werden, denn mit beiden Methoden konnten nahezu identische Stückzahlen an Ähren pro Stunde inokuliert werden. Für die Inokulationsmethode mit der Spritze wurden jedoch viel höhere Befallsraten ermittelt. Sehr wahrscheinlich waren die niedrigen Befallsraten der Methode Vakuuminfiltration darauf zurückzuführen, dass die Abdichtung zwischen Halm und Kammer oft ungenügend war, so dass nur ein Teilvakuum entstand. Für weitere Versuche müsste die Konstruktion der Apparatur daher noch verbessert werden. Der geringe Infektionserfolg, der selbst nach 30fachem Besprühen mit einer Sporensuspension in Wasser erreicht wurde zeigt eindrücklich, dass dieses Verfahren für die Erzeugung von hoch infiziertem Saatgut nicht geeignet ist. Für die Inokulation durch Besprühen mit einer Sporensuspension liegen unseres Wissens in der Literatur keine Vergleichsdaten vor.

Erwartungsgemäß wurde die Keimfähigkeit der Körner durch den Pilzbefall vermindert. Besonders nach der Inokulation mit der Spritze traten Kümmerkorn und teilweise schwarz verfärbte, ganz offensichtlich nicht mehr keimfähige Körner auf. Dies stimmt gut mit den von Oertel (1955) ermittelten Daten überein, in dessen Versuchen der Anteil an Kümmerkorn bei dem mit der Spritze inokulierten Saatgut im Mittel um 23 % höher war als nach

Vakuuminfiltration. Hierin spiegelt sich die Tatsache wider, dass es sich bei der Spritzeninokulation um ein invasives Verfahren handelt, bei dem die Deckspelze durchstoßen wird und Sporen in unnatürlich hohen Konzentrationen direkt auf den Fruchtknoten gelangen und somit schnell zu einer Überinfektion führen können.

Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass es keinen Einfluss der ausgewählten Ährenregion auf den Infektionserfolg zu geben scheint (Tabelle 3). Das war unerwartet, da aus der Literatur bekannt ist, dass eine erfolgreiche Infektion in engem Zusammenhang mit dem Blühzeitpunkt steht (optimal: Beginn der Anthese+5 Tage danach), und dieser sich für Einzelblüten bestimmter Ährenregionen stark unterscheiden kann (Jones und Dhitaphichit, 1991).

Aus dem oben Gesagten lässt sich folgern, dass das Aussprühen von Sporensuspensionen zur Erzielung eines hohen Infektionsgrades nicht geeignet ist. Dagegen ist die Blütcheninokulation mit der Injektionsspritze ein praktikables und effektives Verfahren, welches jedoch hinsichtlich der erzielten Keimraten noch weiter optimiert werden müsste. Erste Untersuchungen in dieser Richtung weisen darauf hin, dass ein Verdünnen des Inokulums zu einer deutlichen Verbesserung der Keimrate führen kann, ohne dabei die Infektionsrate herabzusetzen. Eine abschließende Bewertung der Vakuuminokulation ist aufgrund der genannten Probleme mit der Apparatur nicht möglich. Zumindest konnte bezüglich des Zeitaufwandes ein deutlicher Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Inokulation mit der Injektionsspritze nicht festgestellt werden.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen zum Infektionsverlauf konnte gezeigt werden, dass die Infektion über die Fruchtknotenwand stattfindet (Abbildung 1 A-D). Dies steht im Gegensatz zur Darstellung von Agrios (2005) im Lehrbuch „Plant Pathology“, wonach der Pilz über die Narben infiziert. Diese Darstellung geht offensichtlich auf Lang zurück, nach dem die Infektion sowohl durch die Fruchtknotenwand als auch über die Narbe erfolgen kann (zitiert bei Pedersen (1957)). Im letzteren Fall soll der Pilz den Weg des Pollenschlauches nehmen. Diese Art der Infektion konnte von Pedersen allerdings nicht bestätigt werden, obwohl er häufig auskeimende Sporen auf den Narbenästen beobachtete. In den eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass sich die Brandsporen in großer Zahl an Griffeln und Narben ansammelten. Auch Malik und Batts (1960) beschreiben nur die Infektion über die Fruchtknotenwand. Wie auch bei Pedersen (1957) und Malik und Batts (1960) wuchsen die in die Fruchtknotenwand eindringenden Hyphen stets intrazellulär.

Literatur

- Agrios, G.N., 2005: Plant Pathology. Academic Press, London (UK).
- Cherewick, W.J.; Popp, W., 1950: A modification of Moore's method of inoculating wheat and barley with loose smut. *Phytopathology* **40**, 1054-1056.
- Jones, P., Dhitaphichit, P., 1991: Comparison of responses to floret and seedling inoculation in wheat-*Ustilago tritici* and barley-*U. nuda* combinations. *Plant Pathology* **40** (2), 268-277.
- Kavanagh, T., Mumford, D.L., 1960: Modification and adaption of Popp's technique to routine detection of *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. in barley embryos. *Plant Disease Reporter* **44**, 591.
- Kollmorgen, J.F., Ballinger, J., 1987: Detection and morphology of hyphae of common bunt fungi (*Tilletia laevis* and *T. tritici*) in wheat seedling. *Transactions of the British Mycological Society* **88** (4), 555-559.
- Malik, M.M.S., Batts, C.C.V., 1960: The infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society* **43**, 117-125.
- Moore, M.B., 1936: A method for inoculating wheat and barley with loose smut. *Phytopathology* **26**, 397-400.
- Morton, D.J., 1961: Trypan blue and boiling lactophenol for staining and clearing barley tissues infected with *Ustilago nuda*. *Phytopathology* **51**, 27-29.
- Morton, D.J., 1967: Method for the detection of *Ustilago nuda* mycelium in barley kernels. In: *The American Phytopathological Society (Hrsg.): Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology*. Freeman, W.H. and Company, San Francisco (USA).
- Oertel, C., 1955: Untersuchungen zur Biologie des Gerstenflugbrandes (*Ustilago nuda* (JENS.) Kellerm. et SW.). Dissertation, Landwirtschaftl. Fak. Halle.
- Panday, D.K., Gautam, P.L., 1989: Comparison of inoculation techniques for loose smut of wheat. *Plant disease research* **4** (2), 167-169.
- Pedersen, P.N., 1957: Infection of barley by loose smut, *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.. *Friesia* **5**, 341-348.
- Poehlmann, J.M., 1945: A simple method of inoculating barley with loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Popp, W., 1951: Infection in seeds and seedling of wheat and barley in relation to development of loose smut. *Phytopathology* **35**, 640-644.
- Shands, H.L., Schaller, C.W., 1946: Response of spring barley varieties to floral loose smut inoculations. *Phytopathology* **36**, 534-548.
- Tapke, V.F., 1931: Influence of humidity on floral infection of wheat and barley by loose smut. *Journal of agricultural Research* **43**, 503-516.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974: A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

Grineva, Aksana

Schimmelpilze in gelagertem Triticale und Einfluss des Insektenbefalls auf das Wachstum von Schimmelpilzen

Zusammenfassung

Triticale ist ein Futtergetreide mit hohem Potenzial im europäischen Raum. Biotische Faktoren, wie Pilze und Insekten, spielen eine große Rolle in der Qualitätsminderung gelagerten Triticales. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mykologische Untersuchungen von Triticale-Proben aus Weißrussland durchgeführt und zwei von siebzehn isolierten Pilzarten, *Aspergillus flavus* und *Penicillium griseofulvum*, in dem Testprogramm verwendet. Außerdem wurde in Laborversuchen bei 25 °C und 65 % relativer Feuchte getestet, inwieweit zwei häufig vorkommende Getreideschädlinge, der Kornkäfer *Sitophilus granarius* und der Getreideplattkäfer *Oryzaephilus surinamensis*, zur Wachstum von o.g. Schimmelpilzen in befallenen Triticale beitragen. Die Versuche dauerten ca. 8 Wochen und erfassten Varianten mit und ohne Käfer sowie mit und ohne Pilz-Inokulation. Die Präsenz von Käfern führte zur Steigerung der relativen Feuchte sowie zur Temperaturerhöhung in den Versuchskolben. Schimmelspuren waren ausschließlich in Versuchsgefäßen mit Insektenbesatz sichtbar.

Ullrich, Christian; Freier, Bernd

Julius Kühn-Institut, Institut für Strategien und Folgenabschätzung im Pflanzenschutz, Kleinmachnow

Auswertung einer deutschlandweiten Studie zur Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Obstbaubetrieben

Analyses of a German study on pesticide use in apple growing farms

Zusammenfassung

Im Jahre 2007 wurde das Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz etabliert, in das auch Obstbaubetriebe mit Tafelapfelproduktion einbezogen wurden. Ziel einer speziellen Untersuchung war es, die insgesamt 1.645 Pflanzenschutzmittel-Anwendungen in den 15 Vergleichsbetrieben mit Tafelapfelproduktion umfassend zu analysieren. Im Mittelpunkt standen die Analyse der Häufigkeiten und Intensitäten der Pflanzenschutzmittel-Anwendungen (Behandlungsindex), der Reduzierung der Aufwandmengen und der Kosten für den Pflanzenschutz. Die Reduktionspotentiale bei der Anwendung der Pflanzenschutzmittel wurden identifiziert und ökonomisch determiniert. Die Betriebe gaben für die Pflanzenschutzmittel 1.278 €/ha bzw. für die Pflanzenschutzmaßnahmen 1.706 €/ha, d. h. 28 €/ha für Pflanzenschutzmittel pro Maßnahme bzw. 40 €/ha für eine Pflanzenschutzmaßnahme/ha aus. Erstmals konnten die Kosten für einen Behandlungsindex von 1,0 (53,33 €) im Apfelanbau ermittelt werden. Schließlich wurde untersucht, ob Beziehungen zwischen dem Pflanzenschutzaufwand und den Erträgen bzw. Erlösen bestanden. Dabei wurde die Hypothese widerlegt, dass höhere Aufwendungen für Pflanzenschutz im Zusammenhang mit einem höheren Ertrag stehen.

Stichwörter: Pflanzenschutzmittel, Behandlungsindex, Ökonomie, Tafelapfel

Abstract

The Plant Protection Reference Farms Network was established in the year 2007. It also includes farms with apple production. The aim of this study was to analyse 1.645 pesticide applications in 15 reference farms with dessert apple production. In particular the frequency and intensity of pesticide uses (Treatment Frequency Index), the use of reduced dosage and the costs of plant protection measures were investigated. The reduction potential in pesticide use was determined and economically calculated. The farms expended 1.278 €/ha for pesticides and 1.706 €/ha for plant protection which corresponded with 28 €/ha for pesticides per one use and 40 €/ha for one treatment. The costs per Treatment Frequency Index = 1.0 (53,33 €) could be calculated for the first time in apple growing. Finally, relationships between pesticide uses on the one hand and yields and profits on the other hand were investigated. The hypothesis that higher pesticide use correlates with higher yields was negated in this study.

Keywords: pesticide, treatment index, economy, dessert apple

Einleitung

Ziel des nationalen Aktionsplanes zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln ist, die Risiken, die durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln entstehen können, weiter zu reduzieren (Anonym, 2008). Insbesondere ist die Anwendung von chemischen Pflanzenschutzmitteln auf das notwendige Maß zu begrenzen, damit unnötige Anwendungen dieser Pflanzenschutzmittel unterlassen und die Anwendung nichtchemischer Pflanzenschutzmaßnahmen vorangetrieben werden. Zum nationalen Aktionsplan gehört auch die Etablierung eines Netzes von Vergleichsbetrieben Pflanzenschutz. Das Netz von Vergleichsbetrieben soll dazu dienen jährlich Daten zur Intensität der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Kulturen und Regionen zu gewinnen und diese fachlich zu bewerten. Die Daten geben somit eine Orientierung für das notwendige Maß in einer Kultur im jeweiligen Jahr und tragen zur Identifizierung von eventuellen Reduktionspotentialen bei. Sie leisten zudem einen entscheidenden Beitrag zur Transparenz im Pflanzenschutz (Freier et al., 2008).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Ergebnisse aus dem Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz im ersten Erhebungsjahr 2007 am Beispiel des Tafelapfels zu analysieren. Der Tafelapfel ist dahingehend besonders interessant, da in Deutschland in der Regel nach Richtlinien der kontrollierten integrierten Produktion von Kernobst gearbeitet wird, diese Kultur allerdings die höchste Anwendung von Pflanzenschutzmitteln aufweist. Dies zeigen die sogenannten NEPTUN-Erhebungen in den Jahren 2001, 2004 und 2007 (Roßberg, 2003, 2006, 2009). In der vorliegenden Untersuchung wurden die Pflanzenschutzmaßnahmen im Hinblick auf Kategorie, Anzahl, Intensität und eventuelle Reduktions-potentiale analysiert. Des Weiteren galt es, den Pflanzenschutz in der Tafelapfelproduktion als Kostenfaktor zu determinieren, so dass Aussagen und Zuordnungen ökonomischer Größen zu den Reduktionspotentialen sowie zu den für eine wirtschaftliche Apfelproduktion notwendigen Aufwendungen ermöglicht wurden.

Material und Methoden

Im Obstbau (Tafelapfel) beteiligten sich im Jahre 2007 15 Betriebe mit insgesamt 37 Anlagen aus allen wichtigen Anbauregionen Deutschlands. Die Verteilung der Betriebe auf die Erhebungsregionen ist in Ullrich (2009) beschrieben. Experten der Pflanzenschutzdienste der Länder dokumentierten die Pflanzenschutzmaßnahmen und weitere Angaben sowie ihre Bewertungen im Hinblick auf das notwendige Maß in speziellen Schlagkarteien. Diese wurden im JKI Kleinmachnow in eine Oracle-Datenbank überführt. Weiterhin wurden die Behandlungsindices für Herbizide, Fungizide, Insektizide und Wachstumsregler für jede Bewirtschaftungseinheit berechnet (Freier et al. 2008). Mit Hilfe von programmierten Berechnungsroutinen erfolgten dann die speziellen Datenanalysen. Insgesamt wurden 1645 Pflanzenschutzmittel-Anwendungen ausgewertet. Akarizide wurden in den statistischen Analysen zur Vereinfachung den Insektiziden zugeordnet. Rodentizide wurden wegen ungenauer Datenlage nicht berücksichtigt.

Die Kostenanalysen der Pflanzenschutzmaßnahmen beinhalteten die Preise aller 62 eingesetzten Pflanzenschutzmittel und die Überfahrtskosten. Für die Berechnung der Überfahrtskosten wurden sowohl die Maschinenbetriebskosten, mit den Faktoren Kraft-/ Schmierstoffverbrauch und Reparaturkosten veranschlagt, als auch die Arbeitskosten.

Ergebnisse und Diskussion

Im Durchschnitt aller Vergleichsbetriebe wurde in den Jahren 2007 in der Summe aller chemischen und biologischen/biotechnischen Pflanzenschutzmaßnahmen ein Behandlungsindex von 33,3 ermittelt (Tabelle 1). Der hohe Behandlungsindex wurde insbesondere durch die Fungizidanwendungen bestimmt. Die Tabelle zeigt auch die enormen Unterschiede der Pflanzenschutzintensität zwischen den Regionen, Betrieben bzw. Anlagen. Im Jahre 2007 erfolgte im Apfelanbau auch eine NEPTUN-Aufnahme (Roßberg, 2008). Der dort berechnete Gesamtbehandlungsindex von 29,9 (ohne Wachstumsregler) korrespondierte gut mit dem Mittelwert der Vergleichsbetriebe.

Tab. 1 Behandlungsindices (und Standardabweichungen) in den Vergleichsbetrieben im Obstbau (Tafelapfel) in den Anbaugebieten und in Deutschland (DE) im Jahre 2007

Anbaugebiet	H	F	I	W	BI	sBI
1	1,2 (0,3)	27,6 (6,9)	8,7 (1,4)	0,5 (0,7)	38,0	8,1
2	2,1 (1,3)	14,6 (1,7)	7,1 (1,6)	0,5 (0,5)	24,2	1,7
6	1,2 (0,5)	25,7 (5,8)	8,7 (0,7)	0,4 (0,6)	35,9	6,0
7	0,4 (0,4)	24,6 (1,7)	5,7 (1,9)	0,2 (0,3)	30,9	4,0
8	0,9 (0,3)	28,9 (1,4)	6,9 (1,6)	0,0 (0,0)	36,7	2,0
11	2,2 (1,1)	20,0 (8,5)	10,6 (2,5)	0,0 (0,0)	32,8	5,0
13	0,0 (0,0)	26,7 (2,5)	5,5 (3,4)	0,0 (0,0)	32,1	5,9
14	0,0 (0,0)	26,4 (0,0)	19,0 (0,0)	0,0 (0,0)	45,4	0
DE	1,0 (0,9)	24,4 (6,2)	7,7 (2,9)	0,2 (0,5)	33,3	6,8

H=Herbizide, F=Fungizide, I=Insektizide/Akarizide, W=Wachstumsregler, BI=Behandlungsindex insgesamt, sBI=Standardabweichung Behandlungsindex

Herbizide wurden auf ca. 80 % aller Anlagenflächen angewendet und erfolgten dort entweder ganzflächig (ca. 25 % aller Herbizidanwendungen) oder nur in den Baumstreifen (ca. 75 %). Wachstumsregler kamen lediglich auf ca. 12 % der Flächen zum Einsatz. Erwartungsgemäß war die Intensität der Fungizidanwendungen mit einem mittleren Behandlungsindex von 24,4 am höchsten (NEPTUN 2007; 21,8). Die Intensitäten der Fungizid-Anwendungen waren im Jahre 2007 relativ einheitlich, was auf ähnliche Reaktionsmuster bei der Abwehr der Schadpilze an allen Standorten verweist. Bei der Betrachtung der Behandlungsindices für Insektizide/Akarizide (Behandlungsindex (DE gesamt); 7,7) ist zu beachten, dass alle biologischen Maßnahmen einschließlich Pheromonanwendungen (Verwirrungsmethode) berücksichtigt wurden. Der Anteil biologischer und biotechnischer Bekämpfungsmaßnahmen an den Insektizid- und Akarizidanwendungen betrug 37 %.

Die Betriebe wendeten Herbizide in den Apfelanlagen, wie schon erwähnt, entweder ganzflächig oder nur in den Baumstreifen, d. h. auf ca. 1/3 der Anlagenfläche, an. Auf den Applikationsflächen wurde nur begrenzt mit reduzierten Aufwandmengen gearbeitet (Tabelle 2). Bei den Fungiziden wurde die Dosierung kaum reduziert, im Durchschnitt lag die Ausschöpfung der zugelassenen Aufwandmenge bei 88 %. Dagegen wurden Insektizide in größerem Maße mit reduzierten Aufwandmengen appliziert, im Durchschnitt um 37 %. Hierbei wurden die Pheromonanwendungen, bei denen die vorgeschlagenen Anzahl Dispenser pro Hektar selten reduziert wurde, nicht berücksichtigt. Die wenigen Wachstumsregleranwendungen erfolgten mit deutlich reduzierten Aufwandmengen.

Tab. 2 Ausschöpfung der zugelassenen Aufwandmengen in den Vergleichsbetrieben im Obstbau (Tafelapfel) in Deutschland im Jahre 2007

Herbizide	86 %
Fungizide	88 %
Insektizide ¹	63 %
Akarizide	98 %
Wachstumsregler	50 %

¹ohne Pheromonanwendungen

Die Pflanzenschutzdienste der Länder bewerteten mit 94,5 % einen hohen Anteil der chemischen und biologischen/biotechnischen Pflanzenschutzmaßnahmen in den Apfel-Vergleichsbetrieben als „notwendiges Maß“. Das heißt es gab nur wenige kritische Hinweise auf zeitlich unplatzierte bzw. unnötige Maßnahmen oder zu hohe Dosierungen. Zu bedenken ist: die Bewertungen erfolgten stets aus der Position des unmittelbaren Entscheidungszeitpunktes und unter Beachtung der realen Möglichkeiten des Praktikers und nicht retrospektiv mit dem Wissen danach.

Die hohe Intensität der Fungizidanwendungen konzentrierte sich auf den Apfelschorf (*Venturia inaequalis*), der im Jahre 2007 gebietsweise unterschiedlich stark auftrat. Die intensiven Fungizid-anwendungen erklären sich auch aus der Minderwirkung einiger Fungizide. Aufgrund der verstärkten Resistenzbildung bei Anilinopyrimidinen und Azolen wurden verstärkt protektive Fungizide angewendet. Diese vorbeugende Strategie erforderte in einigen Regionen nach mehrmaligen Starknieder-schlägen umgehende Wiederholungs-behandlungen. Regional, vor allem in stärker kontinental geprägten Anbaugebieten Ostdeutschlands, entwickelte sich der Apfelmehltau (*Podospaera leucotricha*) zum Problemschadpilz, worauf die Betriebe u. a. mit erhöhter Anwendung von Netzschwefel-Präparaten reagierten.

Insektizide wurden in den Apfelanlagen besonders häufig gegen den Apfelwickler (*Cydia pomonella*) angewendet, er wurde 282mal als Indikation genannt. Bemerkenswert waren die oft deutlich reduzierten Aufwandmengen der Insektizide, die jedoch vor allem im Zusammenhang mit der Anwendung von Granulosevirus-Präparaten standen. Dies betraf immerhin 36 % aller Maßnahmen der Kategorie Insektizide/Akarizide. Oftmals wurden diese Präparate bewusst mit stark reduzierten Aufwandmengen (z. B. 1/10 der zugelassenen Aufwandmenge) bei gleichzeitig häufiger Anwendung appliziert. Die Strategie häufiger, aber reduzierter Anwendungen von Granulosevirus-Präparaten sowie die anderen Insektizid- und Akarizidanwendungen fanden die Zustimmung der bewertenden Experten.

Die ökonomischen Auswertungen belegen, dass in den Vergleichsbetrieben für den Pflanzenschutz hohe finanzielle Aufwendungen geleistet wurden. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte der Pflanzenschutzmittel-Kosten und die Pflanzenschutz-Gesamtkosten jeweils pro ha sowie pro Anwendung und ha im Jahre 2007. Die Vergleichsbetriebe gaben im Jahre 2007 im Durchschnitt 1.287 € für Pflanzenschutzmittel aus. Dabei machten die Fungizid-anwendungen mit 50 % und die Insektizid-/Akarizidanwendungen mit ca. 35 % den größten Teil aus. Betrachtet man die Pflanzenschutzmittel-Kosten pro Anwendung, so fallen allerdings die relativ geringen Kosten bei den Fungiziden und die hohen Kosten bei den Wachstumsreglern auf.

Tab. 3 Pflanzenschutzmittel-Kosten insgesamt und pro Anwendung in den Vergleichsbetrieben Obstbau (Tafelapfel) in Deutschland im Jahre 2007

Kategorie	Durchschnittliche Pflanzenschutzmittel-Kosten pro ha in €	Durchschnittliche Pflanzenschutzmittel-Kosten pro Anwendung und ha in €
Herbizide	49,02	34,94
Fungizide	629,98	20,94
Insektizide/Akarizide	474,87	40,33
Wachstumsregler	124,38	93,72
	1.278,26	28 ¹

¹nicht Gesamtsumme sondern Durchschnitt

Da noch je nach Tankmischung und bei Einzelanwendung unterschiedlich hohe Überfahrkosten anfallen, erhöhte sich der Aufwand pro ha noch, so dass im Durchschnitt aller Vergleichsbetriebe 1.706 € pro ha für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln ausgegeben wurden (Tabelle 4). Somit machten die Kosten der Pflanzenschutzmittel

68 % der Gesamtkosten für den Pflanzenschutz in den Vergleichsbetrieben aus. Die Gesamtkosten für den Pflanzenschutz variierten, wie schon die Behandlungsindices, zwischen den Betrieben enorm. So lagen die geringsten und höchsten Aufwendungen in je einem Betrieb bei 1.231 € und bei 2.435 € pro ha. Bezüglich des Anteils der Pflanzenschutzmittel-Kosten an den Gesamtkosten für Pflanzenschutz ergaben sich zwischen den Betrieben Unterschiede von bis zu 15 %. In Verbindung mit den ermittelten durchschnittlichen Gesamt-Behandlungskosten pro Anwendung und Hektar von 39,99 € lassen sich daraus die Kosten einer hypothetischen Maßnahme mit dem Behandlungsindex 1,0 ableiten. Die durchschnittliche Pflanzenschutzmittelanwendung in den Vergleichsbetrieben hätte im Jahr 2007 mit einem Behandlungsindex von 1,0 insgesamt 53,33 € gekostet.

Tab. 4 Behandlungskosten insgesamt und pro Anwendung in den Vergleichsbetrieben Obstbau (Tafelapfel) in Deutschland im Jahre 2007

Erhebungsregion/Betriebs ID	Durchschnittliche Behandlungskosten und ha in €	Durchschnittskosten/Anwendung und ha in €
Betrieb 01BW1	2.434,55	36,86
Betrieb 01BW2	1.732,48	32,59
Region 1	1.943,91	34,95
Betrieb 02BW1	1.656,77	54,88
Betrieb 02BW2	2.151,17	58,83
Region 2	1.805,09	57,05
Betrieb HH1	1.998,30	30,47
Betrieb NI1	1.469,67	44,34
Region 6	1.857,66	35,09
Betrieb MV1	1.593,12	49,81
Betrieb MV2	1.7440,7	46,14
Region 7	1.621,66	47,77
Betrieb BB1	1.736,62	37,51
Betrieb BB2	1.562,09	31,73
Region 8	1.635,11	34,52
Betrieb NW1	1.701,06	42,53
Betrieb NW2	1.863,69	56,48
Region 11	1.818,15	48,83
Betrieb ST1	1.231,13	38,41
Betrieb ST2	1.880,42	31,34
Region 13	1.505,71	35,69
Betrieb HE1/ Region 14	2.214,94	36,31
DE Gesamt	1.705,97	39,99

Die Auswertung der Erträge in drei Betrieben ergab keinen direkten Zusammenhang zwischen der Intensität der Pflanzenschutzmittel-Anwendung bzw. den finanziellen Aufwendungen für den Pflanzenschutz auf der einen Seite und dem Ertrag auf der anderen Seite, so dass zumindest auf dieser Grundlage die Hypothese widerlegt wurde: Höhere Aufwendungen für Pflanzenschutz stehen im Zusammenhang mit höheren Erträgen. Die geringe Anzahl von 15 an dieser Studie beteiligten Betrieben ließ selbstverständlich keine statistisch repräsentativen Ergebnisse zu oder ermöglichte gar allgemeingültige Schlussfolgerungen. Diese konnten somit auch nicht Ziel dieser Arbeit sein. Jedoch ermöglichten die Ergebnisse eine Vielzahl genauer Aussagen über die Pflanzenschutzpraxis in den Vergleichsbetrieben als Beispiel für die Grundgesamtheit an Tafeläpfel produzierenden Betrieben in Deutschland. Somit entstand eine Momentaufnahme über die Pflanzenschutz-situation und die dabei entstehenden Kosten in intensiv wirtschaftenden Betrieben der Apfelproduktion, die Tendenzen erkennen lässt und Schlussfolgerungen für weitere Untersuchungen erlaubt.

Literatur

- Anonym, 2008: Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. BMELV 1-31.
- Freier, B., Pallutt, B., Jahn, M., Sellmann, J., Gutsche, V., Zornbach, W., Moll, E., 2009: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz Jahresbericht 2008. Berichte Julius Kühn-Institut **149**, 1-64.
- Roßberg, D., 2003: NEPTUN 2001 – Erhebung von Daten zum tatsächlichen Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel im Obstbau, im Hopfen und in Erdbeeren. Berichte BBA **122**, 1-23.
- Roßberg, D. 2006: NEPTUN 2004 – Obstbau Erhebung von Daten zur Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel. Berichte BBA **129**, 1-29.
- Roßberg, D., 2009: NEPTUN 2007 – Obstbau. Berichte Julius Kühn-Institut **147**, 1-20.
- Ullrich, C., 2009: Auswertung einer deutschlandweiten Studie zur Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Obstbaubetrieben. B.Sc.-Arbeit, HU Berlin, 1-51.

Lorenz, S.; Adler, C.; Reichmuth, Ch.

Julius Kühn-Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz (ÖPV), Berlin

***Holepyris sylvanidis*, ein natürlicher Gegenspieler des Amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum*; Untersuchungen zur Eindringfähigkeit des Parasitoiden in das Nahrungssubstrat seines Wirtes**

Holepyris sylvanidis, a biological antagonist of the confused flour beetle *Tribolium confusum*; Investigations on the ability of the parasitoid to penetrate into the feeding substrate of its host

Zusammenfassung

Das Ameisenwespenchen *Holepyris sylvanidis* (Brèthes, 1913) (Hymenoptera, Bethyilidae) ist ein natürlicher Gegenspieler des Amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum* Jacquelin du Val, 1868 (Coleoptera, Tenebrionidae). *T. confusum* gilt als bedeutender Schädling in der Nahrungsmittel-industrie sowie in gelagerten Getreideprodukten und tritt in Zentraleuropa vorwiegend in Mühlen und Bäckereien auf. Als Ektoparasitoid der *T. confusum*-Larven muss *H. sylvanidis* seine Wirte aufspüren, welche sich in ihren Nahrungssubstraten, wie Mehl und Schrot, in unterschiedlicher Tiefe aufhalten können. Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Fragestellung, ob der Erfolg von *H. sylvanidis* bei der Wirtssuche von der Lagetiefe der Wirtslarven im Substrat sowie der Art des Substrates abhängig ist. In Laborversuchen wurde jeweils eine mit 10 *T. confusum*-Larven bestückte, nicht vollständig geschlossene Petrischale auf dem Boden eines Versuchsglases platziert und mit einer 1, 2, 4 oder 8 cm hohen Schicht feinem oder grobem Weizenvollkornschrot bedeckt (überwiegende Partikelgröße: feiner Schrot < 0,2 mm; grober Schrot 1,4 - 3,0 mm). An der Substratoberfläche wurden jeweils 10 *H. sylvanidis*-Weibchen und 2 Männchen freigelassen. Je Schrotart und Testtiefe erfolgten 15 Versuchswiederholungen. Die *T. confusum*-Larven waren nicht in der Lage, die Petrischale zu verlassen, konnten aber von den Wespenweibchen heraus transportiert werden. Das Verschleppen der Wirtslarven ist ein für *H. sylvanidis* typisches Verhalten, das der eigentlichen Parasitierung vorausgeht. Zwei Wochen nach Versuchsbeginn wurde die Anzahl der verschleppten Käferlarven ermittelt, um den Wirtsfindungserfolg der Wespen bestimmen zu können. In beiden Schrotarten nahm der Anteil der von *H. sylvanidis* gefundenen Wirtslarven mit zunehmender Tiefe ab. In feinem Schrot fanden die Wespenweibchen ihre Wirtslarven bis zu einer Tiefe von 4 cm, in 8 cm Tiefe platzierte Larven wurden nicht mehr gefunden. Im Gegensatz dazu fanden die Parasitoide in grobem Schrot auch die in 8 cm Tiefe ausgebrachten Wirtslarven. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine geringe Partikelgröße des Substrates den Wirtsfindungserfolg von *H. sylvanidis* verringert. In grobem Schrot sowie in dünnen Schichten eines feinen Substrates erscheint die biologische Bekämpfung von *T. confusum* mit *H. sylvanidis* dagegen vielversprechend.

Stichwörter: *Holepyris sylvanidis*, *Tribolium confusum*, Biologische Bekämpfung, Parasitoid, Eindring-fähigkeit, Wirtsfindung

Abstract

The bethylid wasp *Holepyris sylvanidis* (Brèthes, 1913) (Hymenoptera: Bethyilidae) is an antagonist of the confused flour beetle *Tribolium confusum* Jacquelin du Val, 1868 (Coleoptera: Tenebrionidae). *T. confusum* is a severe pest in the food processing industry and in grain products, in Central Europe primarily in flour mills and bakeries. Females of the larval ectoparasitoid *H. sylvanidis* face the problem to detect hosts that feed in different depths inside a stored product like flour or grist. The study addressed the question whether successful host finding by *H. sylvanidis* is dependent on the location of host larvae inside the substrate. Furthermore, it was studied whether the type of substrate affects host finding. In laboratory experiments, 10 *T. confusum* larvae were placed in a Petri dish accessible to the wasps at a depth of 1, 2, 4 or 8 cm inside either fine or coarse ground wholemeal grist of wheat (main particle size: fine grist < 0.2 mm; coarse grist 1.4 - 3.0 mm). 15 replicates per substrate and depth were performed. 10 female and 2 male parasitoids were released on the surface of the substrate. Host larvae were not able to leave the Petri dish, however, they could be pulled outside the dish by female *H. sylvanidis*. Within the behavioural sequence of parasitisation, pulling away of host larvae is the behaviour typically preceding oviposition. In order to determine the host finding rate by the parasitoid, the number of missing host larvae was counted two weeks after experiments started. In both types of substrates, host finding decreased with increasing depth. In fine grist, larvae were removed from the Petri dish down to 4 cm depth, however, larvae placed at 8 cm depth were not found anymore. In contrast, in coarse grist host larvae were still parasitised at 8 cm depth. The results suggest that decreasing substrate particle size reduces the host finding capability by *H. sylvanidis*. Nevertheless, *H. sylvanidis* may be considered a promising candidate for biological control of *T. confusum* larvae feeding in coarse ground grist and in thin layers of fine ground grist.

Keywords: *Holepyris sylvanidis*, *Tribolium confusum*, biological control, parasitoid, penetration ability, host finding

Einleitung

Die Akzeptanz synthetischer, nicht natürlich vorkommender chemischer Stoffe zur Schädlings-bekämpfung nimmt ab. Das Interesse an sogenannten Bio-Lebensmitteln steigt. Daher gewinnt auch die biologische Schädlings-

bekämpfung im Vorratsschutz an Bedeutung. *Holepyris sylvanidis* ist ein Ektoparasitoid an den Larven des in der Getreideverarbeitung häufigen Amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum*. *H. sylvanidis* wurde in seiner Biologie von verschiedenen Autoren beschrieben und kann seit einiger Zeit auch im Labor gezüchtet werden (Abdella 1985, Ahmed & islam 1988, Ahmed et al. 1997). Für die Anwendung des Parasitoiden gegen den Amerikanischen Reismehlkäfer wäre es wünschenswert, dass Schädlinglarven auch in tieferen Schichten von Mahlgut parasitiert werden. Ziel dieser Untersuchungen war es daher zu ermitteln, inwieweit eiablagebereite *H. sylvanidis*-Weibchen in der Lage sind, in Schrote unterschiedlicher Körnungen (Vermahlungsgrad) einzudringen und die darin verborgenen *T. confusum* Larven zu parasitieren.

Material & Methoden

Insekten: Die Versuchstiere entstammten laboreigenen Zuchten, in denen *T. confusum* in feinem Weizenvollkornschrot und *H. sylvanidis* auf *T. confusum*-Larven in hohlen Weizenkörnern (ausgehöhlt von *Sitophilus* spp.) gezogen wurde. Die in den Tests eingesetzten Wirtslarven befanden sich ca. im 4. Larvenstadium, da *H. sylvanidis* bevorzugt Larven dieses Stadiums parasitiert (Ahmed et al. 1997). Die Parasitoide waren zu Versuchsbeginn maximal 10 Tage alt und bereits verpaart.

Versuchsaufbau: Die Untersuchungen erfolgten anhand von Weizenvollkornschrot unterschiedlicher Körnungen – feinem Schrot (Mahlstufe 1) und grobem Schrot (Mahlstufe 7) (Tabelle 1). Der verwendete Weizenvollkornschrot enthielt sämtliche Bestandteile des Korns und wurde jeweils vor Versuchsbeginn mit einer Schrotmühle (Billy 200, hawo's Kornmühlen GmbH) frisch gemahlen. Zur Abtötung aller möglicherweise enthaltenen Arthropoden wurde das benötigte Getreide vorher mindestens zehn Tage bei -18 °C gelagert und nach dem Auftauen durch Zugabe von Wasser auf eine Kornfeuchte von 14 ± 1 % eingestellt.

Tab. 1 Mahlstufen (Körnungen) und entsprechende Zusammensetzung der für die Versuche verwendeten Schrote (Mahlstufen durch Schrotmühle vorgegeben)

Mahlstufe	prozentualer Anteil an Teilchen der Größe				maximale Partikelgröße [µm]
	≤ 200 µm	201 - 710 µm	711 - 1400 µm	> 1400 µm	
1	64,0	31,7	4,3	0	1400
7	9,4	9,5	17,1	64,0	2800 – 3000

Mit beiden Schrotarten wurde untersucht, ob *H. sylvanidis* in der Lage ist 1, 2, 4 bzw. 8 cm tief in das Wirtssubstrat vorzudringen. Jede Tiefe wurde dabei in einem separaten 2-Liter-Versuchsglas getestet. Auf dem Boden jedes Versuchsglases wurde mittig eine Petrischale mit jeweils zehn *T. confusum*-Larven ausgebracht, die zur Versorgung der Larven 1 g feinen Weizenvollkornschrot enthielt. Das Petrischalen-unterteil (Ø 3,5 cm) wurde mit einem etwas größeren Oberteil (Ø 5,5 cm) bedeckt, das durch ein waagrecht darin platziertes, V-förmig abgeknicktes Holzstäbchen von 3 mm Dicke um diese Höhe angehoben wurde. Durch diesen Spalt hatten die *H. sylvanidis*-Weibchen Zugang zu den Käferlarven. Die Wirtslarven selbst waren nicht in der Lage die Petrischale zu verlassen. Die Petrischale wurde anschließend mit einer 1, 2, 4 oder 8 cm hohen Schicht Schrot bedeckt. Durch vorsichtiges Einrütteln des Schrotes sollte eine möglichst einheitliche Verdichtung erreicht und ein nachträgliches Absinken der Schrotpartikel sowie die damit verbundene Veränderung der Füllhöhe vermieden werden. Auf der Substratoberfläche wurden 10 *H. sylvanidis*-Weibchen und 2 Männchen freigelassen. Die Eignung des gesamten Versuchsaufbaus wurde innerhalb eines Vorversuches geprüft. Als Nahrung für *H. sylvanidis* befand sich an der Wand jedes Versuchsglases oberhalb des Schrotes ein Tropfen Honig. Die mit einem Stück Baumwollstoff und Gummibändern verschlossenen Gläser wurden 14 Tage bei 25 ± 1 °C, 57 ± 5 % r.Lf. und kontinuierlicher Dunkelheit in der Klimakammer aufbewahrt. Die Versuche umfassten je Schrotart und Testtiefe (=Lagetiefe der Wirtslarven) 15 Wiederholungen.

Registrierte Daten: 14 Tage nach Versuchsbeginn erfolgte die Entnahme des Schrotes sowie der Petrischale, in der die 10 *T. confusum*-Larven ausgebracht worden waren. Wenn *H. sylvanidis*-Weibchen eine Wirtslarve finden, paralisieren sie diese und transportieren sie stets vom Fundort zu einem potentiellen Versteck, bevor sie ein Ei an der Larve ablegen (Abdella et al. 1985, Ahmed et al. 1997). Dieses Verhalten wurde in Vorversuchen überprüft und bestätigt. Folglich wurde die Anzahl der in der Petrischale fehlenden Wirtslarven registriert und als Anzahl vom Parasitoiden gefundener Larven gewertet. Zur weiteren Überprüfung erfolgte stichprobenartig die Durchsicht des umliegenden Substrates auf verschleppte und parasitierte Wirtslarven.

Versuchsauswertung: Für jede Testtiefe und Schrotart wurde der prozentuale Anteil der von *H. sylvanidis* aus der Petrischale verschleppten Wirtslarven im Verhältnis zur Gesamtanzahl angebotener Larven (10 pro Versuchsglas bzw. 150 pro Versuchsreihe) berechnet. Um die Art der Abhängigkeit der Anzahl gefundener Wirtslarven (y) von deren Lagetiefe (x) zu abzuschätzen, erfolgte eine Regressionsanalyse. Hierfür wurde angenommen, dass bei einer Platzierung der *T. confusum*-Larven auf der Substratoberfläche (Lagetiefe = 0 cm), die *H. sylvanidis*-Weibchen alle angebotenen Wirtslarven (100 %) finden würden. Dieser Wert wurde als Referenz mit in die Analyse aufgenommen.

Ergebnisse

Bei beiden Schrotarten war deutlich die Tendenz erkennbar, dass der Anteil der von *H. sylvanidis* gefundenen Wirtslarven mit zunehmender Lagetiefe der Larven abnahm. Im Vergleich aller Testtiefen war dabei der Anteil der gefundenen Wirtslarven im groben Schrot höher als im feinen Schrot. Während die *H. sylvanidis*-Weibchen im feinen Schrot in 8 cm Tiefe keine Wirtslarven mehr fanden, lag der Anteil gefundener Larven im groben Schrot in dieser Tiefe noch bei fast 40 % (Abbildung 1).

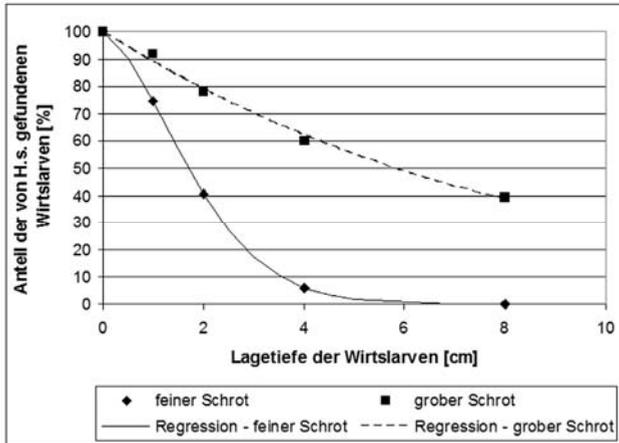


Abb. 1 Prozentualer Anteil der von den *H. sylvanidis*-Weibchen (H.s.) gefundenen *T. confusum*-Larven an der Gesamtanzahl angebotener Wirtslarven (= 150, bei 10 Larven und 15 Wiederholungen je Tiefe und Schrotart); untersuchte Lagetiefen der Wirtslarven: 1, 2, 4 bzw. 8 cm; untersuchte Schrotarten: fein (Mahlstufe 1) bzw. grob (Mahlstufe 7); Regressionsgleichungen: feiner Schrot: $y = a / ((1 + d * ((x - b) / c)^2)) * \text{EXP}(((1 - d) / 2) * (((x - b) / c)^2))$, mit $a = 101,65514$; $b = -0,29416235$; $c = 1,8547399$ und $d = 0,30759403$; grober Schrot: $y = 100,21e^{-0,1191x}$, Versuchsdauer: 14 Tage; äußere Bedingungen: $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $57 \pm 5\%$ r.Lf., kontinuierliche Dunkelheit

Wiederholte Beobachtungen der einzelnen Versuchsansätze zeigten, dass *H. sylvanidis*-Weibchen in der Lage waren, Gänge in das verwendete Substrat zu graben, welche sie auch wiederholt benutzten. Besonders auffällig war dies in feinem Weizenvollkornschrot. An den Wänden der Versuchsgläser zeichneten sich regelrechte Gangsysteme ab (Abbildung 2).

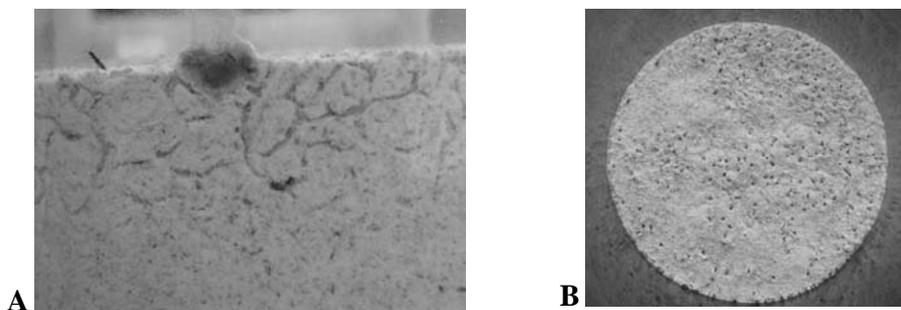


Abb. 2 Von *H. sylvanidis* gegrabene Gänge in feinem Weizenvollkornschrot (Mahlstufe 1), (A) Seitenansicht, (B) Ansicht von oben

Diskussion

Bei der biologischen Bekämpfung von *T. confusum* ist die Fähigkeit eines geeigneten Gegenspielers, in das Nahrungssubstrat des Schädlings einzudringen, ein wichtiger Teilaspekt für die Bestimmung des optimalen Einsatzbereiches. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Parasitoidenweibchen in der Lage waren, sowohl in feinen als auch in groben Weizenvollkornschrot einzudringen und die darin verborgenen *T. confusum*-Larven zu finden. Dabei wurde der Erfolg der *H. sylvanidis*-Weibchen bei der Wirtssuche sowohl von der Lagetiefe der ausgebrachten Wirtslarven als auch von der Art des Substrates beeinflusst. Wie ist der Einfluss der Substratstruktur auf das Vordringen von *H. sylvanidis* in das Substrat zu erklären? Ein grobes Material scheint den Wespen ein tieferes Vordringen zu ermöglichen als ein feinkörniges. Erklärbar ist dies anhand der Partikelgröße. Zwischen größeren Partikeln verbleiben größere Hohlräume und das Material ist nicht so stark verdichtet wie ein feinkörniges.

Die überwiegende Partikelgröße des im Versuch verwendeten groben Schrotetes betrug 1,4 mm-3,0 mm (Tabelle 1). *H. sylvanidis*-Weibchen weisen eine Körperlänge von $2,96 \pm 0,27$ mm auf (Frielitz, Berlin, persönliche Mitteilung). Aufgrund ihrer geringen Größe konnten die Wespen kleine Spalten und Hohlräume nutzen, um sich im Schrot fortzubewegen. Es ist anzunehmen, dass *H. sylvanidis* in groben Schrot noch wesentlich tiefer als 8 cm vordringen kann. Um genaue Aussagen über die maximale Eindringtiefe der Wespen ins Substrat treffen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Die Abnahme der Wirtsfindung durch die Parasitoidenweibchen bei zunehmender Lagetiefe der Wirtslarven lag vermutlich auch darin begründet, dass eine längere Wegstrecke einen erhöhten körperlichen Einsatz der Wespen erforderte. Außerdem ist anzunehmen, dass es für die Parasitoide umso schwieriger war, die Wirtslarven wahrzunehmen, je tiefer diese im Schrot lagen. Wie auch Versuche zur olfaktorischen Orientierung von *H. sylvanidis* bei der Wirtssuche zeigten (unveröffentlichte Daten), nutzen die Wespenweibchen dafür offenbar flüchtige Substanzen aus dem Kot der *T. confusum*-Larven. Diese Duftstoffe verteilten sich vermutlich über die Hohlräume im Schrot und konnten nach einer gewissen Zeit von den Wespen an der Substratoberfläche bzw. in den oberen Schichten wahrgenommen werden. Je tiefer die Larven im Substrat platziert waren und je feinkörniger das Material war, umso schwieriger war es offenbar für die Parasitoide, die Duftquelle zu orten. Möglicherweise wird die Schwächung der Geruchsorientierung durch Sorption der flüchtigen Substanzen verstärkt, die an feinem Schrot aufgrund der größeren Oberfläche in höherem Maße erfolgt.

Die Eindringfähigkeit anderer parasitoider Wespen in das Nahrungssubstrat ihrer vorratsschädlichen Wirte zeigt eine große Bandbreite. Laborexperimente von Schöller et al. (1996) ergaben, dass *Trichogramma embryophagum* und *T. evanescens* 1, 2 bzw. 5 cm tief in geschüttetem Weizen ausgebrachte Eier von *Ephestia* spp. erreichen und parasitieren. *T. evanescens* parasitierte sogar Wirtseier in 55 cm Tiefe (Schöller et al. 1994). Schöller (2000) ermittelte für *Habrobracon hebetor* eine maximale Eindringtiefe von 30 cm in geschütteten Roggen. Al-Kirshi et al. (1997) untersuchte die Eindringfähigkeit von *Laelius pedatus* in geschütteten Weizen. Diese Wespen fanden und parasitierten die Larven von *Trogoderma granarium* noch in 90 cm Tiefe. Unter Bedingungen, wie sie in Getreidelagern herrschen sowie mit praxisentsprechenden Mengen konnten Steidle & Schöller (2000) zeigen, dass *Lariophagus distinguendus* in der Lage ist, Larven von *Sitophilus granarius* in einer Tiefe von 4 m zu parasitieren. Im Vergleich dazu wurde für *H. sylvanidis* im Rahmen dieser Arbeit eine wesentlich geringere Eindringfähigkeit nachgewiesen. Allerdings ist der bevorzugte Wirt dieser Wespe, *T. confusum*, überwiegend ein Schädling in verarbeiteten Getreideprodukten (Reichmuth et al. 2007), wie z.B. Mehl und Schrot. Diese sind aufgrund ihrer feineren und dichteren Struktur schwerer zu durchdringen als ganze Körner. Die Fähigkeit, bis zu einer gewissen Tiefe in Schrot oder ähnliche Materialien einzudringen sowie Gänge in feine Materialien zu graben, ist für die *H. sylvanidis*-Weibchen von Bedeutung, da sich ihre Wirte in der Regel nicht an der Substratoberfläche, sondern im Material verborgen aufhalten. Zur Aufenthaltstiefe der *T. confusum*-Larven im Substrat wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, unter anderem von Ghent (1966), Wool (1969) und Bond (1961, zit. in Sokoloff 1974).

In Mühlen und Bäckereien sammeln sich oft Mehlereste in kleinen Spalten und Nischen, Abzugssystemen, in oder unter Maschinen, Silos oder anderen schwierig zu reinigenden Bereichen an. Dort kann sich *T. confusum* entwickeln und ausgehend von diesen Befallsherden immer wieder in frische Produkte einwandern. Am Beispiel der beiden untersuchten Weizenvollkornschrote konnte gezeigt werden, dass *H. sylvanidis* in der Lage ist, in derartige Substrate einzudringen, ihre Wirtslarven zu finden und zu parasitieren. Somit ist in Bezug auf diesen Aspekt ein Einsatz in der biologischen Bekämpfung von *T. confusum* denkbar, wobei die Wespe besonders für Bereiche dünner Substratschichten geeignet scheint.

Zur Überlebensstrategie der beschriebenen Wespe gehört ihre nun erstmals nachgewiesene Fähigkeit, Wirtslarven aktiv aufzusuchen, dabei auch in tiefere Schichten befallenen Mahlgutes einzudringen und darin verborgene Schädlinglarven aufzuspüren.

Literatur

- Abdella, M.M.H., Tawfik, M.F.S., Awadallah, K.T., 1985: Biological studies on the bethylid parasitism *Holepyris sylvanidis* Brèthes. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor* **23**, 1355-1363.
- Ahmed, K.N., Islam, W., 1988: A new record of the parasite *Rhabdopyris zaeae* Waterston (Hymenoptera: Bethyilidae) from Bangladesh and some aspects of its biology. – *Bangladesh Journal of Zoology* **16** (2): 137-141.
- Ahmed, K.N., Khatun, M., Nargis, A., Dey, N.C., 1997: Mating, egg-laying and host feeding behaviour of *Rhabdopyris zaeae* Waterston (Hymenoptera: Bethyilidae) parasitizing *Tribolium confusum* larvae. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* **4**, 633-637.
- Al-Kirshi, A.G., Reichmuth, Ch., Bochow, H., 1997: Eignung des Larvalparasitoiden *Laelius pedatus* (Say) (Hymenoptera, Bethyilidae) zur Bekämpfung des Khaprakäfers *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae) in Getreide. – *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* **11**: 367-372.
- Ghent, A.W., 1966: Studies of behavior of *Tribolium* flour beetles 2. Distributions in depth of *T. castaneum* and *T. confusum* in fractionable shell vials. – *Ecology* **47** (3): 355-367.
- Reichmuth, Ch., Schöller, M., Ulrichs, C., 2007: *Stored Product Pests in Grain: Morphology - Biology - Damage - Control*. AgroConcept Verlagsgesellschaft, Bonn: 170 Seiten.
- Schöller, M., 2000: Forager in the rye: biological control of *Ephestia elutella* in bulk grain. – In: Adler, C. & Schöller, M. (Hrsg.), *Integrated Protection of Stored Products*, IOBC-WPRS Bulletin **23** (10), 149-159.
- Schöller, M., Hassan, S.A., Reichmuth, Ch., 1996: Efficacy assessment of *Trichogramma evanescens* and *T. embryophagum* (Hym.: Trichogrammatidae) for control of stored products moth pests in bulk wheat. – *Entomophaga* **41** (1), 125-132.
- Schöller, M., Reichmuth, Ch., Hassan, S.A., 1994: Studies on biological control of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) with *Trichogramma evanescens* Westwood (Hym.: Trichogrammatidae) - host-finding ability in wheat under laboratory conditions. – *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*, 17-23 April 1994, Canberra, Australia, Vol. **2**, 1142-1146.
- Sokoloff, A. 1972/1974: *The Biology of Tribolium*, with Special Emphasis on Genetic Aspects. – Oxford University Press, London, Volume 1/2, 300/610 S.
- Steidle, J., Schöller, M., 2000: Host finding of the granary weevil parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) in a storage environment. – *Integrated Protection of Stored Products*, IOBC-WPRS Bulletin **23** (10), 135-141.
- Wool, D., 1969: Depth distribution of adults and immatures of two *Tribolium castaneum* strains in pure and mixed cultures. – *Researches on Population Ecology* **11**, 137-149.

Hassoun, Rula; Schnug, Ewald

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

A statistical evaluation of the contribution of mineral and tap water to the dietary intake of AS, B, Cu, Li, Mo, Ni, Pb, U and Zn by humans

Abstract

Agriculture is a main contributor to environmental loads of nearly all elements of the periodic table. Mineral fertilizers, especially mineral phosphorus fertilizers, contain significant amounts of elements which affect the environment. The annual average loads of the elements arsenic (As), boron (B), copper (Cu), lithium (Li), molybdenum (Mo), nickel (Ni), lead (Pb), uranium (U) and zinc (Zn) to the entire agricultural land in Germany by the application of phosphorus fertilizers correspond to 38, 1575, 170, 10, 71, 50, 14, 239 and 604 tons, respectively. Some of these elements are essential for plants and higher organisms, for example B, Cu and Mo; others show a significant toxicity for life processes such as As, Pb and U. However, also essential elements such as Cu and Zn are toxic in higher concentrations. There are two major pathways by which elements enter the food chain: either by the uptake into food and forage plants or by leaching in potable ground and surface water bodies. As data on the contribution of drinking water to the total daily intake of these elements are scarce a study was conducted to evaluate the relative significance of mineral and tap waters to the total daily intake of the elements As, B, Cu, Li, Mo, Ni, Pb, U and Zn by humans. Preliminary results of this study are presented.

Themen zum Pflanzenbau/Bodenkunde und weitere Themen

Moderation: Dr. Maik Kleinwächter

Kleinwächter, Maik; Selmar, Dirk; Schnug, Ewald

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig, Braunschweig

Impact of drought and salt stress on the accumulation of secondary plant products

Abstract

It is well known that spices derived from plants grown in semi-arid regions are much more aroma intensive than those obtained from equivalent plants, but cultivated in moderate climates. Analogous quality differences are observed with regard to medicinal plants, in which the content of relevant secondary plant products in general is enhanced, when they grew in semi-arid regions. Based on reasonable plant physiological considerations this phenomenon could be explained intelligibly: in semi arid regions - due to limited water supply and much higher light intensities - the plants are exposed to a higher level of drought stress than the plants grown in Central Europe. Unfortunately, in the literature only limited data on these coherences are available. Yet, when these analyses are compiled, it becomes clear that in most cases the content of secondary plant products indeed is higher in plants that suffer drought stress than in those cultivated under optimal conditions. Under stress conditions a massive oversupply of reduction equivalents is generated. To prevent damage by oxygen radicals, excessive NADPH + H⁺ is reoxidized by photorespiration or xanthophyll cycle. Nevertheless, the high reduction power will push metabolic reactions towards the synthesis of highly reduced compounds, like isoprenoids, phenols or alkaloids. In a first attempt the impact of drought stress on the accumulation of terpenes in *Salvia officinalis* was investigated. The experiment revealed that the content of terpenes is significantly increased by drought stress. Unfortunately, these coherences have not been considered adequately in plant biology, albeit these insights reveal high relevance for any attempts in quality improvement by increasing the concentration of secondary compounds in deliberately applying drought stress.

Knolle, Friedhart

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

Neue Befunde zur Herkunft von Uran in Grund- und Leitungswässern aus Phosphatdüngern

New findings on uranium in ground and tap water originating from phosphorous fertilizers

Zusammenfassung

Um einen bundesweiten Überblick zu Vorkommen und Herkunft des toxischen Schwermetalls Uran (U) in deutschen Heil-, Mineral- und Tafelwässern (summarisch Mineralwässer) sowie Leitungswässern zu gewinnen, wurden die Gehalte von U und weiteren 65 chemischen Elementen sowie die Radioaktivität in 307 Mineralwasser-Marken und 476 Leitungswasserproben deutscher Herkunft ausgewertet. Der mittlere U-Gehalt der Mineralwässer betrug 3,08 µg/L U, derjenige der Leitungswässer 0,43 µg/L U. Der Median lag in beiden Wassergruppen gleichermaßen bei 0,13 µg/L U und in beiden Wässern wiesen 82 % der Proben Gehalte < 2 µg/L U auf. Die Mineral- und Leitungswässer mit Gehalten von > 2 µg/L U konnten überwiegend geogenen Ursachen zugeordnet werden. Die Mineralwässer mit Gehalten > 2 µg/L U befinden sich fast vollständig innerhalb bzw. am unmittelbaren Verbreitungsrand von permotriassischen Sedimentkomplexen. Die wichtigsten Lieferaquifere sind Gesteine des Buntsandsteins und Keupers, nur untergeordnet permische und Kristallin-Aquifere. Anthropogene U-Einträge sind in den untersuchten Mineralwässern bisher ohne Bedeutung. Für die untersuchten Leitungswässer sind sie jedoch bereits ein realer Belastungsfaktor, der prioritär über mineralische Phosphatdünger in oberflächennahe Grundwässer und Trinkwässer gelangen kann. Ein Indiz dafür liefert der mit 19 % hohe Beitrag der B-Gehalte in einer multiplen Regressionsrechnung von 15 Elementen in Leitungswässern auf den U-Gehalt, denn in der Landwirtschaft eingesetzte mineralische Phosphordünger tragen neben U auch B in signifikanten Mengen in Ökosysteme ein und B weist wie U eine hohe Mobilität im Boden auf. Ein ähnliches Verhalten zeigen in der multiplen Regressionsrechnung K und Mg.

Stichwörter: Phosphatdünger, Grundwasser, Mineralwasser, Leitungswasser, Uran, Geologie

Abstract

The exposure of humans to U is mainly determined through uptake by drinking waters. The objective of the research was to contribute to the knowledge on distribution and origin of U in German mineral and tap waters. U and the content of 65 other chemical elements, radioactivity in 307 mineral water brands and 476 tap water samples of German origin were evaluated at the former FAL-PB, recently JKI-PB in Braunschweig. The mineral water brands (natural spa, mineral and table waters) were collected between 2000 and 2007, the tap waters were sampled in 2006. The mean U content in mineral waters was 3.08 µg/L U, in tap waters 0.43 µg/L U. The median was 0.13 µg/L U in both groups. 82 % of all samples had U concentrations < 2 µg/L U. The lowest U values were found quaternary pore groundwaters. The U concentration of all mineral and tap waters with a content of > 2 µg/L U

could be explained with high probability by geogenetic factors. The German mineral waters containing U in concentrations $> 2 \mu\text{g/L}$ U are nearly completely related to the permotriassic sediment complexes of Hessonina, Lower Saxony, Saxony-Anhalt and Southwestern Germany. Most important U bearing rocks are Buntsandstein and Keuper strata, only secondarily crystalline and Permian aquifers. Until now anthropogenic loads are not significant for the U concentrations in mineral waters. The results indicate however, that especially U from mineral phosphorous fertilizers is already a threat for the quality of tap waters. This hypothesis is corroborated by the high value (19 %) of B in a multiple regression of concentrations of 15 elements in tap waters on the U concentration. Like U, B is applied in agriculture in significant amounts with mineral phosphorous fertilizers and like U, B has a high mobility in the soil matrix. The elements K and Mg show a similar behaviour in the multiple regression.

Keywords: Phosphorous fertilization, ground water, mineral water, tap water, uranium, geology

Einleitung

Uran ist ein ubiquitär vorkommendes chemo- und radiotoxisches Schwermetall. Die Höhe der Belastung des Menschen mit U wird vorwiegend durch dessen Aufnahme über das Trinkwasser bestimmt (De Kok & Schnug, 2008). Um einen bundesweiten Überblick zu Vorkommen und Herkunft von U in deutschen Heil-, Mineral- und Tafelwässern (summarisch Mineralwässer) sowie Leitungswässern zu gewinnen, wurden am seinerzeitigen FAL-Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde in Braunschweig, heute JKI-PB, U und Gehalte an weiteren 65 chemischen Elementen sowie die Radioaktivität in Mineral- und Leitungswasser-proben deutscher Herkunft ausgewertet.

Material und Methoden

Die zur Verfügung stehende Analysendatenbank umfasste zum Zeitpunkt der Auswertung 1068 unterschiedliche Mineralwassermarken, von denen 307 aus in der Bundesrepublik Deutschland gelegenen Quellen stammen. Die von FAL-PB analysierten Proben sind im Zeitraum von 2000 bis 2007 kommerziell erworben worden. Zusätzlich wurden veröffentlichte Analysedaten einbezogen. Über die Mineralwasseranalysen hinaus wurde von August bis November 2006 eine Probenahmeaktion von Leitungswässern in Deutschland durchgeführt. In die Vorauswahl wurden zunächst Städte mit mehr als 50.000 Einwohnern einbezogen. Insgesamt wurden 476 Proben aus der öffentlichen Wasserversorgung an 383 unterschiedlichen Standorten von 206 Probenehmern gezogen. Der U-Gehalt der untersuchten Wässer (U-238) wurde im Labor von FAL-PB mittels ICP-QMS analysiert. Zu weiteren Details der Probenahme und Analytik siehe Knolle (2009).

Zur Überprüfung der Qualität der U-Analysen wurden insgesamt 206 Kontrollanalysen an Mustern mit Gehalten $< 20 \mu\text{g/L}$ U durchgeführt. Die Ergebnisse des Labors von FAL-PB korrelierten mit $r = 0,947$ sehr eng mit den berichteten Werten. Bedenkt man, dass der Datensatz Ergebnisse von zwei grundsätzlich verschiedenen Messmethoden (Alphaspektrometrie und Massenspektrometrie) beinhaltet und Muster, zwischen deren Probenahme bis zu 40 Jahre Zeitunterschied lagen, so bestätigt dieses Ergebnis nicht nur die hohe Qualität der U-Bestimmung, sondern auch die hohe Konstanz der U-Gehalte in den Mineralwässern. Im Mittel aller 206 Ergebnisse lagen die Messungen des Labors von FAL-PB um $0,12 \mu\text{g/L}$ unter den Referenzwerten und damit deutlich im Bereich des 95 %-Konfidenzintervalls.

Für die Zuordnung der hydrogeologischen Parameter zu den Mineralwässern wurde eine güteklassierte Geokodierung der Brunnen durchgeführt. Um die Brunnenstandorte mit den geologischen, hydrogeologischen und hydrogeochemischen Karten zusammenführen zu können, wurden alle Daten mittels des World Geodetic System 1984 (WGS84) auf ein einheitliches Koordinatensystem konvertiert. Die Koordinatentransformationen und Kartenaufbereitungen wurden mit ArcGIS durchgeführt. Für die statistischen Rechnungen und Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 eingesetzt.

Ergebnisse

Der mittlere U-Gehalt der Mineralwässer betrug $3,08 \mu\text{g/L}$ U, derjenige der Leitungswässer $0,43 \mu\text{g/L}$ U. Der Median lag in beiden Gruppen bei $0,13 \mu\text{g/L}$ U. In beiden Gruppen wiesen 82 % der Proben Gehalte $< 2 \mu\text{g/L}$ U auf. Die niedrigsten U-Gehalte (unterhalb der Nachweisgrenze der ICP-QMS von $0,015 \mu\text{g/L}$ U) fanden sich in quartären Porengrundwasserleitern. Bei den Mineralwässern wiesen die höchsten U-Gehalte das Heilwasser der Nürtinger Heinrichsquelle in Nürtingen, Baden-Württemberg ($474 \mu\text{g/L}$ U), das Wasser Purio Aqua Römer Mainhard der Römerquelle in Mainhardt-Baad, Baden-Württemberg ($27,4 \mu\text{g/L}$ U) und das Wasser der Alwa Bonalwa-Quelle in Bad Peterstal-Griesbach, Baden-Württemberg ($24,5 \mu\text{g/L}$ U) auf. Der höchste in Leitungswasser gemessene U-Gehalt fand sich in Gunzenhausen und Kulmbach mit $8,5 \mu\text{g/L}$ U, gefolgt von Darmstadt und Jena mit $5,8 \mu\text{g/L}$ U.

Im Vergleich der Gehalte von 66 Elementen sowie HCO_3 und Dosisleistung der untersuchten Mineral- und Leitungswässer wurde der jeweils mit Abstand höchste Variationskoeffizient für U festgestellt: 820 % für Mineral- sowie 208 % für Leitungswässer. In den untersuchten Mineralwässern korrelierten folgende 30 von insgesamt 65 Elementen schwach aber signifikant ($p < 0,05$) mit U: As, B, Be, Ca, Ce, Cl, Cu, Dy, Er, F, Fe, Ge, Gd, Ho, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Mo, Nb, S, Se, Ta, Ti, V, W, Y und Zn sowie die Dosisleistung und der Gesamtlösungsinhalt. Auch mit der Konzentration an Ra-226 und Th korreliert U in den Mineralwässern nur schwach. In den

Leitungswässern waren es die Elemente B, Ca, Ce, Co, Cu, K, Mg, Mn, Mo, S und Sr, die wiederum nur schwach, aber signifikant ($p < 0,05$) mit U korrelierten. Hauptkomponenten- und multiple Regressionsanalysen erbrachten im Ergebnis, dass der U-Gehalt der Mineral- und Leitungswässer nur in bedingtem Zusammenhang mit dem Gehalt an anderen chemischen Elementen steht.

Regionale Verteilung

Die U-Gehalte der untersuchten deutschen Mineralwässer mit $> 2 \mu\text{g/L}$ U können folgenden regionalen Brunnenclustern zugeordnet werden (von Nord nach Süd): Fulda - Oberweser, Südwestharzvorland, Nordostharzvorland (östliches Subhercyn), Saale-Unstrut, Thüringer Wald und Vorländer, Rhön, Bad Kissingen, Süddeutscher Keuper und Nordschwarzwald (Abbildung 1).

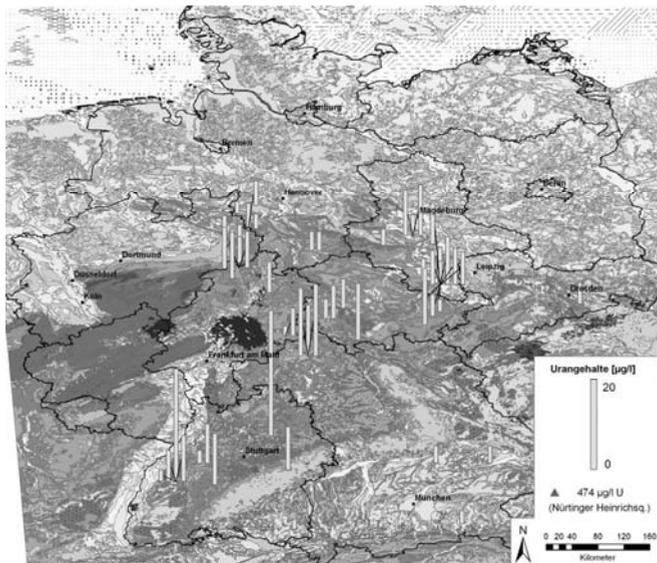


Abb. 1 Übersicht der Mineralwässer mit Analyseergebnissen von über $2 \mu\text{g/L}$ U in der Geologischen Karte Deutschlands, Maßstab 1:1.000.000 (Knolle, 2009)

Im Rahmen der bundesweiten regionalgeologischen und hydrogenetischen Übersichtsbetrachtung konnten sämtliche Mineral- und Leitungswässer mit Gehalten von $> 2 \mu\text{g/L}$ U überwiegend geogenen Ursachen zugeordnet werden. Die Mineralwässer mit Gehalten $> 2 \mu\text{g/L}$ U befinden sich fast vollständig innerhalb bzw. am unmittelbaren Verbreitungsrand der permotriassischen Sedimentkomplexe Hessens, Niedersachsens und Sachsen-Anhalts sowie der Südwestdeutschen Schichtstufenlandschaft. Die wichtigsten Lieferaquifere sind Gesteine des Buntsandsteins und Keupers, nur untergeordnet permische und Kristallin-Aquifere:

- Keuper: Norddeutschland: Steinmergel- bzw. Gipskeuper (Extal); Süddeutschland:
- Burgsandstein bzw. Stubensandstein (Bad Überkingen, Mainhardt-Baad und Nürtingen)
- Buntsandstein, primär Mittlerer Buntsandstein, z.T. Oberer Buntsandstein (Bad
- Driburg, Bad Pyrmont, Fuldata, Hecklingen-Gaensefurth, Katlenburg, Hessberg,
- Hessische Rhön, Saale-Unstrut/Leisslingen, Steinheim-Vinsebeck, Volkmarshausen und
- Warburg)
- Perm (Bad Kissingen, Friedrichroda, Hecklingen-Gaensefurth, Saale-Unstrut/Leisslingen und Schmalkalden)
- Paragneise des Rensch-Gebietes, Schwarzwald (Bad Peterstal-Griesbach).

Diskussion

Die untersuchten Mineralwässer weisen z.T. erhebliche geogen bedingte U-Gehalte auf. Einzelne Brunnenbetriebe haben bereits gegengesteuert und die Gehalte in den Flaschenwässern gesenkt. Anthropogene U-Einträge sind in den untersuchten Mineralwässern bisher ohne Bedeutung. Für die untersuchten Leitungswässer sind sie jedoch bereits ein möglicher Belastungsfaktor, der prioritär über mineralische Phosphatdünger in oberflächennahe Grundwässer und Trinkwässer gelangen kann. Ein Indiz dafür liefert der mit 19 % hohe Beitrag der B-Gehalte in

einer multiplen Regressionsrechnung von 15 Elementen in Leitungswässern auf den U-Gehalt, denn in der Landwirtschaft eingesetzte mineralische Phosphordünger tragen neben U auch B in signifikanten Mengen in Ökosysteme ein und B weist wie U eine hohe Mobilität im Boden auf. Ein ähnliches Verhalten zeigen in der multiplen Regressionsrechnung K und Mg (Tabelle 1).

Tab. 1 Prozentualer Anteil einzelner Elemente an der durch die multiple Regressionsfunktion erklärten Variabilität der U-Gehalte deutscher Mineral- und Leitungswässer; große Ziffern: prozentualer Anteil > 10 (Knolle, 2009)

	As	B	Ca	Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	S	Zn
Mineralwässer	18	3	7	12	7	2	4	1	1	22	7	3	10	2
Leitungswässer	21	19	3	11	3	2	15	15	4	2	3	0	2	0

Es ist aus hydrogeologischer Sicht nur eine Frage der Zeit, bis der Grundwasserkreislauf für die düngerbürtigen Einträge geschlossen ist. In Einzelfällen ist dieser Zusammenhang bereits nachgewiesen (Schäf et al., 2007). Jüngste Untersuchungen der Regressionsbeziehungen zwischen U und NO₃⁻ in bayerischen Grundwässern untermauern diesen Trend.

Die durchgeführte Studie ist als eine geochemische Momentaufnahme zu sehen, die weitere und vertiefende Untersuchungen der Infiltrationspassage insbesondere hinsichtlich der anthropogenen U-Belastung von Wässern auf dem Düngerpfad (Schnug & Haneklaus, 2008) postuliert. Ein besonderes Augenmerk sollte auf den zusammenhängenden Zonen von mit > 2 µg/L U befruchteten Oberflächen-gewässern liegen, die z.T. offenbar durch langjährige Düngung verursacht wurden (Birke et al., 2009).

Literatur

Birke, M., Rauch, U., Lorenz, H., 2009: Uranium in stream and mineral water of the Federal Republic of Germany. *Environ. Geochem. Health* 31(6), 693-706

De Kok, L.J., Schnug, E., 2008: Loads and fate of fertilizer derived uranium. Backhuys, Leiden, The Netherlands, 229 S.

Knolle, F., 2009: Ein Beitrag zu Vorkommen und Herkunft von Uran in deutschen Mineral- und Leitungswässern. Diss. Fak. f. Lebenswissenschaften TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Digitale Bibliothek Braunschweig <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00027200>

Knolle, F., Haneklaus, S., Schnug, E., 2009: Indications for Contamination of Water Bodies with Uranium through Fertilization. In: *Plant Nutrient Management Under Stress Conditions. Proc. 17th International Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers (CIEC), November 24 – 27, 2008, Cairo, Egypt, pp. 311 - 318*

Knolle, F., Schnug, E., 2009: Vorkommen und Herkunft von Uran in deutschen Mineral- und Trinkwässern. *bbr Fachmagazin für Brunnen- und Leitungsbau* 60(11), 56-59

Schäf, M., Daumann, L., Erdinger, L., 2007: Uran in Trinkwasserproben im Rhein-Neckar Gebiet. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 12 (5), 315

Schnug, E., Haneklaus, S., 2008: Dispersion of uranium in the environment by fertilization. In: *Merkel, B.J., Hasche-Berger, A.: Uranium, Mining and Hydrogeology, Springer, Berlin, 958 S.*

Sipos, Marianna

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig, Braunschweig

Contamination of agricultural soils by mineral fertilization

Abstract

Soil is a non- renewable resource that is connected to air and water and which is essential for the production of foodstuff. Considering its vital significance and reflecting the natural and anthropogenic pollution in the past centuries, we have to strengthen efforts for its preservation. Many studies revealed that top-soils that received regular phosphorous (P) fertilization contain higher uranium (U) concentrations, than unfertilized soils. P-fertilizers may contain high amounts of U (< 10 to > 360 mg kg⁻¹), which depends on the raw material. Phosphate rock is the raw material used for industrial mineral P-fertilizer production. 87 % of the phosphate rocks used for fertilizer production are of marine-sedimentary origin. Typical U contents of soils range from < 1 mg to > 10 mg U kg⁻¹. Sedimentary deposits, primarily those from USA, Morocco and the Middle East, contain higher concentrations (>100 mg U kg⁻¹) than those from igneous sources. Since U is a trace element, which is known for its radiological

and chemical toxicity, it is important to evaluate the extent to which U applied by mineral P fertilization will accumulate in soils over time. The risks arising from the biochemical toxicity of U are generally considered to outweigh the risks from its radioactivity. The effective increment for a typical agricultural soil, containing around 2 mg kg⁻¹ U, would be minor if calculated on an annual basis, but regular applications over many years will increase the U inventory in the soil significantly. In contrast to other heavy metals, U is mobile on agricultural soils and translocated to ground-water. The extent of these losses is closely related to soil characteristics and fertilizer practices.

In this presentation a short introduction based on a literature review is given.

Imholt, Christian¹; Esther, Alexandra¹; Perner, Jörg²; Volk, Thomas³; Jacob, Jens¹

¹ Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Wirbeltierforschung, Münster; ² Umwelt- und Agrarstudien GmbH (U.A.S.), Jena; ³ proPlant Gesellschaft für Agrar- und Umweltinformatik mbH, Münster

Mäuse als Schädlinge in der Landwirtschaft: Entwicklung eines Prognosemodells zur Vorhersage von Massenvermehrungen der Feldmaus (*Microtus arvalis*)

Voles as pests in agriculture: Development of a forecast model for outbreaks of common voles (*Microtus arvalis*)

Zusammenfassung

Massenvermehrungen von Feldmäusen führen zu hohen wirtschaftlichen Verlusten in der Land- und Forstwirtschaft. In Jahren mit extremen Populationsstärken steigt die Anzahl der Mäuse oft synchron über hunderte Kilometer auf mehrere Tausend Individuen pro Hektar. In den Jahren 2004 bis 2006 führte das regional zu Ertragsausfällen von bis zu 20 %. Der Gesamtschaden durch die Massenvermehrung 2007 wurde auf 700 Mio. € geschätzt (Lauenstein, Landw. Wochenblatt Westf.-Lippe 2008(5):26-27). Neben den direkten Fraßschäden gelangt bei hohen Befallsdichten aufgeworfene Erde in Silagen, so dass Fehlgärungen auftreten und Landwirtschaftsfahrzeuge wegen der ausgedehnten Gangsysteme einsinken können und dadurch beschädigt werden. Daneben besteht ein erhöhtes Krankheitsrisiko für Mensch und Tier, da *Microtus arvalis* Träger von Leptospiren u.a. Pathogenen ist. Üblicherweise werden Maßnahmen erst ergriffen, wenn der Schaden schon deutlich sichtbar ist. Erfolgversprechender wäre es, früher in die Bestandsentwicklung einzugreifen. Obwohl die Biologie und die Habitatnutzung der Feldmaus gut erforscht sind, existiert bisher noch keine praktikable Methode, Massenvermehrungen der Feldmaus in Deutschland vorherzusagen.

Ziel des Projektes ist deshalb, die Entwicklung eines Modells zur Vorhersage einer Massenvermehrung von *Microtus arvalis*. Es soll den Landwirten als Entscheidungshilfe dienen und ihnen die Möglichkeit geben, rechtzeitig räumlich und zeitlich gezielte bestands-regulierende Maßnahmen einzuleiten. Damit könnte der Einsatz von Rodentiziden reduziert werden, was auch zu einer Verringerung der Risiken für Nicht-Zielarten in Agrarökosystemen führen würde. Zunächst wurden vorhandene Datensätze zur Populationsentwicklung von Feldmäusen aus Archiven verschiedener Institutionen geborgen und digitalisiert. Die Mehrzahl der Datensätze gibt die Feldmausdichten nicht direkt, sondern als Anzahl an wiedergeöffneten Löchern (WgL) wieder. Bisher war es unbekannt, ob sich die Anzahl der WgL zur Beschreibung der Bestandsdichte eignet. Durch Kalibrierungsfänge mit standardisierten Fang-Wiederfang-Methoden konnte im Projekt nun nachgewiesen werden, dass die Anzahl an WgL die Feldmausabundanz gut widerspiegelt ($R^2=0.83$). Fluktuationen von Mäusepopulationen können mit globalen wie auch regionalen Wetterparameter korreliert sein. Mit Hilfe von „classification and regression tree“ (CART)-Analysen konnten wir bisher aus einer Vielzahl geprüfter regionaler wie auch globaler Wetterparameter relevante Prediktoren und deren Schwellenwerte identifizieren. Generell konnten durch die CART-Analysen Wetterkonstellationen identifiziert werden, bei denen Feldmaus-Massenvermehrungen sehr unwahrscheinlich sind.

Weiterer Forschungsbedarf besteht u.a. noch zur Klärung des Phänomens, dass niedrige Abundanzen auftreten können, obwohl für Massenvermehrungen günstige Wetterkonstellationen vorliegen. Mit der aktuellen Version des Modells lässt sich in etwa 70 % der Fälle der vergangenen Jahre korrekt vorhersagen, ob es zu einer Massenvermehrung kommt. Aktuell werden die Prognosen für diesen Herbst im Feld überprüft. Um den Prognoseerfolg zu erhöhen, sollen im nächsten Schritt weitere potentielle Einflussfaktoren wie Feldmausdichten der Vorjahre und einzelne Extrem-Wetterereignisse in die Analysen einbezogen werden. Bei gutem Prognoseerfolg sollen die Ergebnisse in bestehende Entscheidungssysteme integriert werden und den Landwirten als Werkzeug zur Verfügung stehen.

Keywords: Feldmaus, Populationsdynamik, Prognosemodell, Landwirtschaft

Abstract

Population outbreaks of common voles can result in high damage to agriculture and forestry. In years with extreme population densities, the abundance of voles often increases simultaneously over hundreds of kilometres up to several thousand individuals per hectare. In 2004 to 2006 these regional outbreaks were responsible for up to 20 % crop failure and 2007 the vole related damage was estimated to about 700 Mio. € (Lauenstein, Landw. Wochenbl. Westf.-Lippe 2008(5):26-27). Such extreme outbreaks can not only cause damage to plants due to the gnawing of voles. Excavated soil contaminates cut grass leading to low silage quality. If there are extensive burrow systems farm vehicles can sink in, which may cause structural damage. Additionally, there is an increased health risk for humans because *Microtus arvalis* are vectors for *Leptospira* and other pathogens. Measures to combat vole outbreaks are usually taken when the damage is already clearly visible. A more promising approach would be the development of a decision support system that allows early intervention. Although the biology and habitat use of common voles is well known, no reliable method is established to predict such population outbreaks.

The aim of this project is to develop a predictive model for the population dynamics of common voles. Ultimately, this will be integrated in a decision support system for farmers by providing information about the probability of common vole outbreaks in the near future. This way, farmers will be timely enabled to decide whether, where and when to take preventative measures to minimise the adverse effects of vole outbreaks. This will optimize the use of rodenticides in space in time and ultimately reduce the total amount used. A targeted and reduced use of rodenticides will also lead to a reduction in the risk of adverse effects for non-target species. At first, existing datasets on population dynamics in common voles were located and digitalized from the archives of various institutions. The majority of the historic datasets represent an indirect measure of vole density, using the number of reopened burrows in a specific area. Up until now it was unknown if this method can give an accurate account of the population density. To investigate this, we calibrated the reopened burrows index with a standardized mark-and-recapture method. The results demonstrate that this index can be used to measure vole density ($R^2=0.83$). As fluctuations in vole population density can be associated with global as well as regional weather parameters, classification and regression tree (CART) analyses were used to isolate various weather parameters to identify possible predictors and their thresholds. Generally, the CART analyses identified weather conditions where vole outbreaks are unlikely.

Further research is needed to clarify why low densities are observed during weather conditions believed to be favourable for high vole abundance. The present version of the model can successfully predict 70 % of all historic outbreaks in the time series considered. At the moment the model is validated using the predictions for the autumn of 2009 and verifying them in field trials. To improve the predictive power other parameters such as vole densities of previous years as well as single extreme weather phenomena during the period of interest will be included in the model. The final version of the model will be integrated in already existing decision support platforms.

Keywords: Common vole, population dynamics, forecast model, agriculture

Leukers, A.^{1,2}; Jacob, J.²

¹ Institut für Landschaftsökologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; ² Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung, Münster

Ausbreitungsmuster von Feldmäusen (*Microtus arvalis*)

Dispersion patterns of common vole populations (*Microtus arvalis*)

Zusammenfassung

Feldmäuse (*Microtus arvalis*) können sich von Refugien (z.B. Ackerrandstreifen) auf Ackerflächen ausbreiten und dadurch vor allem bei Massenvermehrungen Schäden an Kulturpflanzen verursachen. Es ist weitgehend unbekannt, wie die Ausbreitungsprozesse bei dieser Source-Sink-Dynamik gesteuert werden. Wenn es gelingt, die Einwanderung der Tiere von Refugien in Ackerflächen hinein zu mindern, könnten massiver Befall und resultierende Pflanzenschäden verhindert werden. Bekämpfungsmaßnahmen könnten räumlich und zeitlich gezielter und damit ökologisch und ökonomisch effektiver durchgeführt werden, wenn lediglich auf die Gründerpopulation in Refugien abgezielt wird. Fundierte Kenntnisse der zugrunde liegenden Prozesse sind eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung und Erprobung einfacher, praxisgerechter und umweltschonender Gegenmaßnahmen. Die Regulierung von Nagetierpopulationen erfolgt meist durch chemische Rodentizide. Diese können ein Risiko für Nicht-Ziel-Arten sein und bei ihrer Anwendung werden freie Habitate geschaffen, die schnell wieder besiedelt werden. Alternativen zur Anwendung von Rodentiziden können mit Naturschutzinteressen kollidieren, wie z.B. kurze Vegetation an Ackerrändern oder tiefgründige Bodenbearbeitung. Das Ziel des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Projektes ist deshalb die Entwicklung geeigneter Alternativen zum Management von Feldmäusen mit Rodentiziden. Dies soll auf Grundlage der Erkenntnisse zur Ausbreitungsdynamik durch Analysen der räumlich-zeitlichen Populationsdynamik geschehen. Es sollen praktikable Managementmethoden getestet werden, die einfach und mit wenig Kosten- und Zeitaufwand vom Landwirt eingesetzt werden können. Die Anwendung umweltschonender Managementmethoden wäre ein

Meilenstein für die Weiterentwicklung des Populationsmanagements von Nagetieren mit großem Potenzial für Pflanzen-, Natur- und Gesundheitsschutz. Räumlich gezielte Gegenmaßnahmen statt auf vielen Zehntausend Hektar umfassenden Flächen würden eine Material-, Kosten- und Zeitersparnis bedeuten. Durch die Einsparung chemischer Rodentizide kann die Nachhaltigkeit und Natürlichkeit in Agro-Ökosystemen erheblich gefördert werden. Die Untersuchungen finden auf Feldern zwischen Magdeburg und Halle statt, wo regelmäßig starker Feldmausbefall auftritt. Als experimentelles, reproduzierbares Untersuchungsdesign dienen die kreisförmigen Grünlandflächen um Windkraftanlagen, die an die Ackerflächen grenzen. Zunächst wird der Dispersionsdruck vom Refugium auf den Acker ermittelt und durch Lebendfänge abgeschätzt, wann der Dispersionsdruck migrierender Feldmäuse aus den Refugien zur Besiedlung angrenzender Ackerflächen führt und welche Umweltparameter damit in Verbindung stehen. Hauptziel dieser Arbeiten ist es, den ungefähren Zeitpunkt der Besiedlung der Ackerflächen durch Feldmäuse basierend auf Umweltfaktoren zu prognostizieren, so dass geeignete Maßnahmen rechtzeitig ergriffen werden können. Zur Aufklärung der Ausbreitungsdynamik von Feldmäusen von den Refugien auf die Ackerflächen werden standardisierte Luftbildaufnahmen angefertigt und Telemetriearbeiten durchgeführt. Die räumliche Ausbreitung der Feldmäuse wird hinsichtlich der Lage (Abstand zum Refugium) und Verteilung (gleichverteilt, geklumpt) in ArcGIS untersucht. DNA-Analysen von Gewebeproben der Mäuse erlauben Rückschlüsse auf den Verwandtschaftsgrad zwischen den verschiedenen Refugiums-populationen und den Befallspopulationen auf den Äckern. Damit soll geklärt werden, ob die Besiedlung der Ackerflächen allmählich vom Rand des Refugiums aus erfolgt oder ob die Tiere schon zu Beginn der Besiedlung weit in den Acker vordringen und die Lücken zwischen neu etablierten Bauen räumlich gleichmäßig „auffüllen“.

Auf Grundlage dieser Daten werden im dritten Schritt geeignete Managementmethoden (Barrierezäune, Barriererefurchen, Fangwannen) getestet, um die Ausbreitung der Feldmäuse aus den Refugien zu minimieren und so möglicherweise die Befalldichte auf landwirtschaftlichen Nutzflächen zu reduzieren. Die Erfolgskontrolle erfolgt durch Schadbonituren und die Bestimmung der Feldmaus-abundanz.

Stichwörter: Feldmaus, *Microtus arvalis*, Ausbreitungsmuster, Dispersionsdruck, Rodentizide, Nachhaltigkeit, Managementmethoden

Abstract

Common voles (*Microtus arvalis*) are an integral part of the domestic fauna, but at high abundances, they can cause significant losses in agriculture and forestry. To regulate rodent populations, chemical rodenticides are often applied. These not only pose a major threat to non-target species but also produce vacant vole habitats, which can be recolonised by new populations. Alternatives to the usage of rodenticides (e.g. short vegetation at field edges or deep tillage) may collide with conservation interests. Although the fast recolonisation of vacant habitat by common voles is important for developing effective counter measures the factors controlling dispersion processes during these source-sink-dynamics are largely unknown. Effectively preventing voles from dispersion would enable us to restrict management to very small areas like refuges or field boundaries. If it is possible to minimise dispersal of common voles from retreats onto the field, massive infestations and crop damage could be reduced. Management actions could be conducted more targeted in space and time and would be ecologically and economically more effective. Therefore, this study, funded by the German Federal Environmental Foundation, aims to show which distribution patterns of voles occur at field-refuge-boundaries and to identify the key environmental factors triggering the dispersion pressure.

Based on these findings appropriate methods for a more sustainable vole management will be tested. Field sites for this study are located between Magdeburg and Halle in Saxony-Anhalt, Germany. The circular grassland areas below wind energy plants, from which common voles invade fields, are used as replicated experimental refuges. Dispersion pressure from these refuges to the fields is measured (capture-mark-release, collection of environmental parameters) as well as dispersal dynamics (aerophotos, ArcGIS, telemetry, DNA-analysis). Based on these data, appropriate management methods (barrier fences and -furrows, pit fall traps) will be tested.

Keywords: common vole, *Microtus arvalis*, distribution patterns, dispersion pressure, rodenticides, sustainability, management methods

Fischer, D.¹; Jacob, J.¹; Prokop, A.²; Wink, M.³; Mattes, H.⁴

Julius Kühn-Institut, ¹ Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung, Münster; ² W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal; ³ Universität Heidelberg, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Biologie, Heidelberg; ⁴ Wilhelms-Universität Münster, Institut für Landschaftsökologie, AG Bioökologie, Münster

Nachhaltige Maßnahmen gegen Schermäuse: Der vergrämende Effekt sekundärer Pflanzenmetabolite auf *Arvicola amphibius*.

Sustainable measures against Water voles: The repelling effect of secondary plant compounds against *Arvicola amphibius*

Zusammenfassung

Schermäuse sind in großen Teilen Deutschlands weit verbreitet und können enorme Schädigungen an den Wurzeln diverser Pflanzen verursachen. Dabei stellen sie ein erhebliches Pflanzenschutzproblem im Obst- und Gartenbau aber auch in der Landwirtschaft dar. Auf dieser Sachlage basierend soll in einem BLE-finanzierten Gemeinschaftsprojekt des Julius Kühn-Instituts (JKI), der Firma Neudorff GmbH KG und dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg ein integriertes Pflanzenschutzverfahren entwickelt und zur Praxisreife gebracht werden. Hierfür sollen zur Abwehr und Vertreibung der Schermäuse von Kulturlächen Repellentien auf Basis sekundärer Pflanzen-metabolite entwickelt werden. Das fertige Produkt muss anwenderfreundlich, umweltschonend und toxikologisch unbedenklich sein. Zudem sollen die Ausgangspflanzen zur Gewinnung der Substanzen problemlos erhaltlich und kostengünstig sein. Ein wirkungsvolles Vergrämungsmittel könnte in der Zukunft nicht nur Schäden reduzieren, sondern auch den Einsatz von Schlagfallen und Rodentiziden deutlich minimieren. Die Risiken für Nichtzielorganismen könnten gleichzeitig verringert werden. Im Projekt werden Schermäuse mit verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen konfrontiert, um deren Effekt auf die Tiere zu ermitteln. Zum Einsatz kommen Substanzen, die geschmacklich und geruchlich abschreckend auf die Schermäuse wirken sollen. Um geeignete Geschmacksrepellentien zu finden, wurden den Tieren in einem systematischen Screening verschiedene pflanzliche Stoffe präsentiert. Die Substanzen wurden auf Apfelreiser (größengenormte Apfelzweige) aufgebracht und den Schermäusen im Laborversuch angeboten. Der Grad der Benagung der behandelten Reiser wurde mit unbehandelten Kontrollreisern verglichen. Es wurden zwei Stoffe gefunden, die eine abschreckende Wirkung zeigen. Diese konnten hinsichtlich ihrer Konzentration optimiert werden. Derzeit werden verschiedene Applikationsformen überprüft, um die Witterungsbeständigkeit der Behandlung zu verbessern. Die Analyse von Geruchsstoffen wurde mit Hilfe eines T-Labyrinthes (zweikammerige Versuchsapparatur) durchgeführt. Dabei konnten die Mäuse jeweils zwischen einer mit einem Pflanzenstoff „bedufteten“ Testbox und einer „unbedufteten“ wählen. Substanzen galten als repellent, wenn die Testbox gemieden wurde. In dieser Versuchsreihe wurden fünf repellent wirkende pflanzliche Stoffe gefunden, deren Wirksamkeit aktuell in Freilandversuchen aber auch in gemischter Form erneut in Labyrinthversuchen getestet wird.

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

Abstract

Water voles (*Arvicola amphibius*) are widespread in most parts of Germany and known to cause enormous damage to the roots of various plants, thus posing a major threat to harvests in fruit- and horticulture as well as agriculture. Based on the need for sustainable measures to combat vole damage a cooperative project (Julius Kühn-Institute, Neudorff GmbH KG, Institute for Pharmacy and Molecular Biotechnology of the University of Heidelberg) funded by BLE aims to develop a new and environmental friendly water vole repellent on the basis of secondary plant metabolites. The product must be environmentally sustainable, user-friendly and toxicological harmless. Additionally, the plant species required for obtaining the active substance 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 but also minimise the use of kill traps and rodenticides. Both techniques are potentially harmful to other organisms. In this project water voles are exposed to various secondary plant metabolites to study their repulsive effect on the animals. The experimental design targets the taste as well as the olfactory sense of the voles. In order to find suitable taste repellents the water voles were confronted with different substances. The extracts were applied to size-standardised twigs of apple trees and offered to the animals in a cage experiment. The degree of gnawing at the treated branches was compared to untreated control branches. Two potentially repelling substances were isolated and optimized regarding their concentration. Currently, various application methods are tested to improve the weatherability of the final product. The effect of volatile substances on voles was tested in 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 odour. The extracts were considered to be a potential repellent, if the “test box” was avoided. In these tests five potential repellents were isolated, which are currently

tested in field trials. Additionally, different combinations of these substances are again tested in the T-maze to optimise effectiveness.

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

Congyanghui, Wu

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig, Braunschweig

Sulfur supply reduces cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.)

Abstract

Cadmium (Cd) is one of the most toxic heavy metals to human health. Since rice represents a common staple food, which is consumed to high extent, Cd-polluted rice would result in an enhanced uptake of this toxic heavy metal. The iron plaque, representing coating deposits on the root surface, which is relevant for the uptake of nutrients, also is a key factor for the uptake of cadmium. The corresponding incorporation of heavy metals strongly is influenced by the sulfur present in the soil. In order to investigate the effect of sulfur supply on cadmium uptake by rice seedlings, firstly, a combined soil-sand culture experiment was carried out. For the analysis, a new method of ascorbic-citrate-acetic (ACA) technique and the SEM- EDAX technology were applied to quantify the accumulation of cadmium in iron plaque of the rhizosphere of rice. Secondly, a pot culture experiment was conducted to study the influence of sulfur supply on iron plaque formation and cadmium accumulation in each organ of rice. The experiments revealed that enhanced sulfur supply significantly reduced cadmium uptake in brown rice. Possible mechanisms are proposed.

Thöle, Heinrich

Julius Kühn-Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen (SG), Braunschweig

Statistische Analyseansätze für On-Farm-Versuche mit räumlichen Daten

Approaches for statistical analysis of on-farm trials with spatial data

Zusammenfassung

Eine effiziente Stickstoffdüngung (N) ist im Getreidebau von zentraler Bedeutung für eine umweltschonende und wirtschaftliche Landwirtschaft. Limaux et al. (1999) nennen sehr geringe N-Ausnutzungsraten von 19 bis 55 %. Dadurch steht die Anwendung mineralischer N-Dünger im engen Zusammenhang mit N-Verlagerungen in Trinkwasserreservoirs und klimarelevanten Lachgasemissionen (N₂O). Düngerpreisteigerungen in der jüngsten Vergangenheit erhöhen zusätzlich die Direktkosten der Getreideproduktion. Shanahan et al. (2008) sehen eine wesentliche Ursache für zu geringe N-Ausnutzung in der schlagbezogenen Unterstellung mittlerer Bedingungen für die einheitliche Ausbringung mineralischer N-Dünger, was laut Gesetzgeber als „gute landwirtschaftliche Praxis“ definiert ist. Zur Steigerung der N-Effizienz können Precision Farming Technologien eingesetzt werden. Dabei bildet die schlagspezifische Variabilität bestimmter Größen die Grundlage für eine angepasste teilflächenorientierte N-Düngung. Positive Effekte müssen gegenüber dem einheitlichen Verfahren auf experimenteller Basis nachgewiesen werden. In On-Farm-Versuchen wurden dazu Vergleiche zwischen praxisüblichen, konstanten und teilschlagbezogenen Düngungsverfahren durchgeführt. Die teilflächenspezifische N-Düngung erfolgte mit dem Pendelsensor „Crop-Meter“, der in Getreidebeständen indirekt die Heterogenität der oberirdischen Pflanzenmasse messen kann. Die On-Farm-Versuche wurden auf Ackerschlägen angelegt, die über entsprechend heterogene Pflanzenbestände verfügten, um den Sensoreinsatz zu rechtfertigen. Jedoch war aufgrund der erwünschten hohen Variabilität der Getreidebestände zu erwarten, dass keine identischen experimentellen Ausgangsbedingungen zwischen den Prüfliegern geschaffen wurden. N-Applikations- und Ertragsdaten erhielten zudem durch GPS einen räumlichen Bezug. Damit mussten ggf. räumliche Autokorrelationen und/oder Trends berücksichtigt werden. Die Ignorierung von Autokorrelationen kann veränderte Hypothesentests und daraus fehlgeleitete statistische Rückschlüsse liefern.

Annahmen einer klassischen Varianzanalyse (ANOVA) (Varianzhomogenität, stochastische Unabhängigkeit der Residuen) waren möglicherweise unhaltbar, so dass alternativ Annahmeerweiterungen getroffen wurden. Die SAS-Prozedur *MIXED* erlaubt Annahmeerweiterungen, indem durch Einführung von Kovariablen räumliche Trends und durch Kovarianzmodelle für die Residuen Autokorrelationen überprüft wurden. Im gleichen Zuge wurden Varianzhomogenität und der Bezug von Trends bzw. Kovarianzmodellen auf Ebene des Versuchsmittels und prüfmitgliedbezogen untersucht. Als Ergebnis wurde an einem Beispielversuch der Einfluss verschiedener Annahmeerweiterungen auf die Schätzung von Ertragsdifferenzen, die Präzision der Schätzer und auf die statistischen Rückschlüsse bestätigt. Für On-Farm-Versuche, in denen raumbezogene Daten gewonnen wurden, empfiehlt daher sich die individuelle Überprüfung der klassischen ANOVA-Annahmen.

Abstract

In cereal production, an efficient nitrogen (N) fertilization plays a very important role for an ecologically and economically sustainable land cultivation. Limaux et al. (1999) report a very low fertilizer N recovery of 19 to 55 % by winter wheat. Therefore, application of N fertilizers contributes to N leaching and greenhouse gas emissions by nitrous oxide in a substantial way. Besides, recently increasing fertilizer prizes enhanced direct costs of cereal production considerably. Among other things, Shanahan et al. (2008) hold the field-specific assumption of mean conditions for constant fertilizer application responsible for low N recoveries. However, this corresponds to the legal requirements of "good agricultural practice". To improve N efficiencies, precision farming technologies can be used. In this context, the measurability of in-field variability is the base for site-specific N fertilization. Positive effects of new technologies have to be verified by experiments. To compare constant and site-specific (variable) N fertilization, on-farm trials were conducted. The variable N application was realized with a mechanical sensor, the "Crop-Meter", which measures the heterogeneity of aboveground cereal plant mass indirectly. On-farm trials were established on farmer's field with expectable plant mass heterogeneity to justify the sensor implementation. However due to the desired in-field variability, one could expect that no identical experimental pre-conditions were created between fertilizer treatments. Additionally, N application and grain yield data were localized by GPS. Therefore, spatial trends and autocorrelations, respectively, had to be taken into account. Ignoring spatial autocorrelation may lead to modified F-tests and therefore, erroneous statistical inference.

Possibly, assumptions of classic analysis of variance (ANOVA) (equality of variances, stochastic independence of errors) were not tenable. Hence, ANOVA assumptions were generalized using the SAS procedure *MIXED*. Generalizations were realized in *MIXED* by allowing covariates for spatial trends and spatial autocorrelation by fitting covariance models for errors. Simultaneously, variance homogeneity was tested, and spatial trends (equal or unequal slopes) and correlation models, respectively, on the intercept and treatment level were checked. As a result, the influence of assumptions on estimates for treatment differences, standard errors of difference and P-values was confirmed. So, an individual check of classic ANOVA assumptions is recommended for on-farm trials generating spatial data.

Literatur

- Limaux, F.; Recous, S.; Meynard, J.M., Guckert, A. (1999): Relationship between rate of crop growth at date of fertilizer N and fate of fertilizer N applied to winter wheat. *Plant and Soil*, 214, 49-59.
- Shanahan, J.F.; Kitchen, N.R.; Raun, W.R., Schepers, J.S. (2008): Responsive in-season nitrogen management for cereals. *Computers and Electronics in Agriculture* 61, 51-62.

Autoren

	A			L	
Adler		65	Leukers		75
Admassu		24	Lorenz		65
	B		Lüpken		10
Balko		17		M	
Bartelmann		17	Marx		50
Bischoff		34	Mattes		77
Bisutti		40		N	
Buschhaus		46	Nehrlich		45
Büttner		34, 46	Nothnagel		28
	C		Nowak		49, 50
Carle		28		O	
Congyanghui		78	Ordon		10, 13, 16, 24, 25, 41, 50
Cöster		16		P	
	D		Perner		74
Deising		24	Perovic		10, 16, 25, 41
Dowideit		28	Pestemer		34
	E		Pistorius		30, 33
Eibach		21	Prokop		77
Ellner		46	Przulj		25
Esther		74	Purfürst		16
	F			R	
Fischer		7, 77	Reichmuth		65
Flachowsky		24	Reim		38
Freier		34, 61	Riedel		13
Friedt		24	Romeis		25
	G		Ruge-Wehling		7
Gärber		50		S	
Georgiadis		33	Schenke		30
Goßmann		46	Schliephake		41
Grineva		61	Schmitt		49, 50
	H		Schnug		69, 70
Haas		41	Scholz		7
Habekuss		7, 10, 13, 16	Schulz		28
Hanke		24	Schulz-Witte		28
Hassoun		69	Schuster		50
Heimbach		30, 31, 33	Schwabe		31
Herzog		24	Schwander		21
Hirschfeld		46	Seddig		17
Hüsken		28	Seddon		50
	I		Selmar		70
Imholt		74	Serfling		50
	J		Sipos		73
Jacob		74, 75, 77	Stein		10
Jacobs		34		T	
Joachimsmeier		30	Thöle		78
	K			U	
Kammerer		28	Ullrich		61
Kleinwächter		70	Ulrich		28
Knolle		70		V	
Koch		56	Verschwele		42
König		25	Volk		74
Konstantinidou-Doltsinis		49, 50		W	
Kopahnke		16, 25	Waßmuth		42
Krämer		10, 16	Wehling		7
Krengel		34	Wink		77
			Wunderle		56

Veröffentlichungen des JKI

Das **Julius-Kühn-Archiv** setzt die seit 1906 erschienenen Mitteilungshefte, eine Reihe von Monographien unterschiedlichster Themen von Forschungsarbeiten bis zu gesetzlichen Aufgaben fort. Alle bisher erschienenen Ausgaben sind OPEN ACCESS kostenfrei im Internet zu lesen.

Öffentlichkeit und Fachwelt versorgen wir zusätzlich 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 im Internet auf den thematisch dazugehörigen Seiten finden.

Seit 2009 wird vom Julius Kühn-Institut als wissenschaftliches Fachorgan das **Journal für Kulturpflanzen – Journal of Cultivated Plants** (vormals Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes) monatlich herausgegeben (<http://www.journal-kulturpflanzen.de>).

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 17. bis 19.11.2009 fand das 2. Nachwuchswissenschaftler-Forum des Julius Kühn-Institutes statt. In Berlin-Dahlem trafen sich über 50 junge Forscherinnen und Forscher zum gegenseitigen wissenschaftlichen Austausch. Sie präsentieren ihre aktuellen Ergebnisse aus den Themenbereichen Züchtungsforschung/Züchtung, Pflanzenschutz/Phytopathologie sowie zu Pflanzenbau, Bodenkunde und weiteren Themen. Schwerpunkte und Stand der Arbeiten sind im vorliegenden Tagungsband dargestellt.

The Second Young Scientists Forum organized by the Julius Kühn-Institute took place from 17 to 19 November 2009. More than 50 young researchers attended the conference in Berlin and enjoyed a mutual scientific exchange. Presenting their recent research results, the participants addressed key issues from the fields of breeding research and plant breeding, plant protection and phytopathology, plant cultivation and soil sciences, along with other topics. The focal points and current state of their scientific work are recorded in the present proceedings