



# Mitteilungen

aus der Biologischen Bundesanstalt  
für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem

## **Aktuelle Beiträge zum Pflanzenschutz im Ackerbau**

Zur Verabschiedung von Direktor und Professor  
Dr. Gerhard Bartels

## **Plant Protections in Arable Crops - Current Developments**

Farewell tribute to Director and Professor  
Dr. Gerhard Bartels

**Die Abbildung der Titelseite zeigt den  
„Versuchsstandort Ahlum“**

# 410

Herausgegeben von der  
Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Berlin und Braunschweig

2007

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland  
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig  
E-Mail: Ackerbau@bba.de

**Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme**

Ein Titeldatensatz für diese Publikation ist erhältlich bei  
„Die Deutschen Bibliothek“

ISBN-13: 978-3-930037-32 -2

ISBN-10: 3-930037-32-7

ISSN: 0067-5849

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 2006

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 photo-mechanischem 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, Berlin.

**Präsident und Professor Dr. Georg F. Backhaus**

## **Laudatio für Herrn Direktor und Professor Dr. Gerhard Bartels**

Am 17. Juni 2007 vollendete Herr Direktor und Professor Dr. Gerhard Bartels, der langjährige Leiter des Instituts für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, sein 65. Lebensjahr. Mit einer Festveranstaltung wurde er am 29. Juni 2007 zum Monatsende in den Ruhestand verabschiedet. Als Ort der Festveranstaltung wurde bewusst das Versuchsgut Sickinge der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft gewählt, denn es repräsentiert die enge Verbundenheit von Herrn Dr. Bartels mit dem wissenschaftlichen Feldversuchswesen und der praktischen Landwirtschaft. Herr Dr. Bartels zählte über Jahrzehnte zu den namhaften wissenschaftlichen Vertretern des Pflanzenschutzes in landwirtschaftlichen Kulturen, den er in seinen vielseitigen Facetten nach innen und außen darzustellen und zu repräsentieren verstand. Der vorliegende Band der Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft ist ihm und seinem unermüdlichen Wirken, insbesondere für die Fortentwicklung integrierter und nachhaltiger Verfahren des Pflanzenschutzes, die zugleich auch den Schutz des Verbrauchers und der Umwelt gewährleisten, gewidmet. Mit einigen ausgewählten Beispielen aus der Forschung des von Herrn Dr. Bartels geleiteten Instituts für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland geben die Autorinnen und Autoren Einblicke in aktuelle Institutsarbeiten und danken ihrem bisherigen Leiter für sein langjähriges Engagement.



**Direktor und Professor  
Dr. Gerhard Bartels**

Gerhard Bartels wurde am 29. Juni 1942 in Hildesheim geboren. Nach dem Besuch der Michelsenschule in Hildesheim absolvierte er zunächst eine landwirtschaftliche Lehre im elterlichen Betrieb in Bönningen, Kreis Hildesheim, und auf der Domäne Isenhagen in Hankensbüttel, Landkreis Gifhorn.

Nach Abschluss der Gehilfenprüfung besuchte er die Landbau-abteilung der Michelsenschule und erlangte dort den Abschluss "Staatlich geprüfter Landwirt". Es folgte der Besuch der gymnasialen Oberstufe der Michelsenschule in Hildesheim mit dem Abschluss der Reifeprüfung.

Von 1964 bis 1968 studierte Gerhard Bartels an der Georg-August-Universität in Göttingen das Fachgebiet der Landwirtschaft, die er von der praktischen Seite bereits sehr gut kennen gelernt hatte.

Seine Promotionsarbeit führte Gerhard Bartels im Institut für Zuckerrübenforschung in Göttingen durch. Er untersuchte dort den Einfluss wurzelinfizierender Pilze auf Entwicklung, Leistung und Qualität der Zuckerrübe unter dem Aspekt einer Schadensprognose und wurde am 11. Februar 1971 an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen zum Doktor der Landbauwissenschaften (Dr. sc. agr.) promoviert.

Nach kurzer Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zuckerrübenforschung trat Dr. Gerhard Bartels am 1. August 1971 in die Dienste der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft ein.

Zunächst bearbeitete er als Wissenschaftlicher Mitarbeiter des damaligen Präsidenten der BBA, Professor Dr. Schuhmann, einen Forschungsauftrag über die Verseuchung von Getreidesaatgut mit pilzlichen Krankheitserregern. Am 1. August 1972 wurde Dr. Bartels als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am damaligen Institut für Botanik, dem heutigen Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig angestellt und übernahm das Aufgabengebiet „Getreidekrankheiten“. Den Schwerpunkt seiner Arbeiten bildeten Untersuchungen zur Epidemiologie und wirtschaftlichen Bedeutung wichtiger Getreidekrankheiten und die Entwicklung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen. Im Vordergrund stand dabei der Echte Mehltau an Weizen, Gerste und Hafer, er befasste sich aber auch mit anderen Getreidekrankheiten, wie z. B. *Typhula incarnata*, *Rhynchosporium secalis* und Ährenfusariosen. In enger Zusammenarbeit mit den Pflanzenschutzdiensten der Länder ermittelte Dr. Gerhard Bartels Befalls-Verlust-Relationen und entwickelte Schwellenwerte für eine gezielte Fungizidanwendung im Getreidebau. Im Rahmen verschiedener Forschungsvorhaben prüfte Dr. Bartels Weizensorten und Weizenzuchtstämme bezüglich ihres unspezifischen Resistenzverhaltens gegenüber dem Getreidemehltau und entwickelte Verfahren zur Selektion von Getreidesorten mit einer von Erregerassen unabhängigen relativen Krankheitsresistenz. Diese Untersuchungen wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Bundessortenamt und verschiedenen namhaften Getreidezüchtern durchgeführt. Bereits diese wissenschaftlichen Arbeiten begründeten das besondere Verhältnis von Dr. Bartels zu allen Fragen der Widerstandsfähigkeit von Kulturpflanzensortimenten gegenüber Pflanzenkrankheiten, und er wurde nicht müde, immer wieder auf deren große Bedeutung im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes hinzuweisen.

Aufgrund seiner Leistungen und seines Engagements wurde Dr. Bartels am 8. Juni 1977 verbeamtet und zum Wissenschaftlichen Rat ernannt. Bereits im November 1979 folgte die Beförderung zum Wissenschaftlichen Oberrat.

Über seine wissenschaftlichen Arbeiten hinaus übernahm Dr. Bartels zu Beginn der 1980er Jahre mit der Bauplanung der Neubauten der Institute für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, für Pflanzenschutz im Gartenbau und für Pflanzenschutz im Forst am Standort Braunschweig eine weitere außerordentlich wichtige Aufgabe für die Biologische Bundesanstalt. Mehrere Institute mussten ihre bis dahin bestehenden Standorte aufgeben und sollten am Standort Braunschweig zusammengeführt werden. Als Bausprecher koordinierte er die Interessen der betroffenen Institute, für die der Neubaukomplex in Braunschweig errichtet wurde, und hatte diese gegenüber dem zuständigen Staatshochbauamt zu vertreten. So ist es auch sein Verdienst, dass das Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, zusammengelegt mit seiner Außenstelle in Kiel-Kitzeberg, das Institut für Pflanzenschutz im Gemüsebau aus Fischenich, das Institut für Pflanzenschutz im Zierpflanzenbau aus Berlin sowie das Institut für

Pflanzenschutz im Forst aus Hannoversch Münden im Jahr 1985 das neu errichtete Gebäude in Braunschweig beziehen konnten. Der Neubau wurde im Juni 1986 vom damaligen Bundesminister Kiechle feierlich eingeweiht. Damit war bereits damals ein wichtiger Schritt zur Konzentration der Institute der BBA in Braunschweig vollzogen.

Nach einem erfolgreichen Berufungsverfahren wurde Dr. Gerhard Bartels am 1. Dezember 1987 zum Direktor und Professor ernannt und zum Leiter des Instituts für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland der BBA bestellt. Damit wurde ihm die Leitung eines der damals größten Institute der BBA übertragen. Dr. Gerhard Bartels leitete das Institut mit großer fachlicher Kompetenz. Mit seiner grundsätzlich stets positiven und optimistischen Einstellung verstand er es hervorragend, auch in den kritischen Zeiten der permanenten Um- und Neustrukturierungen und angesichts der damit verbundenen personellen Engpässe die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter immer wieder zu motivieren und sie bei ihren wissenschaftlichen Arbeiten zu unterstützen. Die stringenten Personaleinsparungen der vergangenen 15 Jahre haben, wie in der gesamten BBA, so auch in seinem Institut die kapazitiven Grenzen der Leistungsfähigkeit immer wieder aufscheinen lassen. Umso stärkeres Gewicht legte Dr. Bartels auf die Kooperation mit Hochschulinstituten, Pflanzenschutzdiensten, Industrieunternehmen und anderen kompetenten Partnern, um die Forschung mithilfe von Drittmittelprojekten trotz allem voranzutreiben. Bei der Schwerpunktsetzung der Arbeiten seines Instituts verlor er nie die Probleme und Fragen der landwirtschaftlichen Praxis und die Umsetzung wissenschaftlicher Erkenntnisse in die Anbaupraxis aus dem Auge und folgte damit dem Motto Leonardo Da Vinci's (1452 – 1519): „Bedenke, dass Du zu jeder Erkenntnis ihre Nutzenanwendung setzen musst, damit die Wissenschaft nicht unnütz sei“.

Die Ergebnisse seiner wissenschaftlichen Arbeit, als Beispiele seien nur die gezielte Fungizidanwendung im Getreidebau nach Bekämpfungsschwellen oder die Nutzung der Sortenresistenzen genannt, stellen wesentliche Elemente des integrierten Pflanzenschutzes dar. Er gehörte auch zu denjenigen, die bereits zu Beginn der 1990er Jahre die Umstellung landwirtschaftlicher Versuchsflächen der BBA auf ökologischen Anbau befürwortete und vorantrieb. Die grundlegende Bedeutung der Pflanzenschutzmittel, besonders auch für die Zukunft des Pflanzenbaus, stand für ihn aber trotz aller Entwicklungen im nichtchemischen Pflanzenschutz nie zur Diskussion. Sein Wirken war geprägt durch eine äußerst enge und erfolgreiche Zusammenarbeit mit dem Amtlichen Pflanzenschutzdienst der Länder, den Universitäten und Hochschulen, dem Bundessortenamt, Pflanzenzüchtern, Industrieunternehmen und der Praxis. Ein wichtiges Forum hierfür war und ist die Arbeitsgemeinschaft für Krankheitsbekämpfung und Resistenzzüchtung in Getreide, Hülsenfrüchten und Raps, deren Geschicke Dr. Bartels seit über 25 Jahren als Geschäftsführer verantwortete und deren Tagungen er mit großem Erfolg organisierte. In vielen anderen wichtigen Gremien namhafter Organisationen vertrat Herr Dr. Bartels die Interessen der BBA und brachte die Ergebnisse der Forschungen seines Instituts mit großem Gespür für die Erfordernisse und Situationen ein. Besonders zu nennen sind u. a. verschiedene Gremien der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e. V. (DLG), der Ausschuss für Kartoffelzüchtung und Pflanzguterzeugung der Gesellschaft für Pflanzzüchtung e. V. (GFP), der Fachbeirat Nachhaltiger Pflanzenbau sowie der Technische Ausschuss des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, der Ausschuss für Pflanzenbau und Pflanzenschutz der Landwirtschaftskammer Niedersachsen und der Beirat der Union der Deutschen Kartoffelwirtschaft e. V. (UNIKA). Dr. Gerhard Bartels ist seit langem Mitglied der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e. V. (DPG). Hier leitete er viele Jahre hindurch mit großem Erfolg den „Arbeitskreis Integrierter Pflanzenschutz“ und engagierte sich im Rahmen der Koordinierung der verschiedenen Projektgruppen dieses Arbeitskreises intensiv für die wissenschaftliche Bearbeitung und Diskussion aktueller Fragen des Pflanzenschutzes in landwirtschaftlichen Kulturen.

Die Ergebnisse seiner Arbeiten hat er in zahlreichen Publikationen, Buchbeiträgen und wissenschaftlichen Vorträgen vorgestellt, u. a. ist er Mitglied im Editorial Board des Archivs für Phytopathologie und Pflanzenschutz.

Dr. Gerhard Bartels kann mit großer Befriedigung auf sein langes erfolgreiches Berufsleben zurückblicken. Die Ergebnisse seiner wissenschaftlichen Arbeiten haben breiten Eingang in die landwirtschaftliche Praxis gefunden und haben maßgeblich dazu beigetragen, den integrierten Pflanzenschutz weiterzuentwickeln. Unter seiner Leitung konnte sich eine ganze Reihe junger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler im Rahmen der vielfältigen Forschungsprojekte seines Instituts profilieren und anschließend wichtige Positionen in Industrie, Behörden und Forschungseinrichtungen gewinnen. Den jeweiligen Präsidenten der Biologischen Bundesanstalt wie auch den Kollegen stand Herr Dr. Bartels mit seiner weit reichenden Erfahrung stets hilfreich zur Seite. Sein Rat und seine Expertise wurden weit über den von ihm vertretenen reinen fachlichen Bereich hinaus sehr geschätzt. Für die Entwicklung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft und seines Instituts für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland hat Herr Dr. Bartels organisatorisch wie wissenschaftlich unschätzbare Dienste geleistet. Die Kollegen, Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft danken Herrn Direktor und Professor Dr. Gerhard Bartels sehr für sein erfolgreiches und weitsichtiges Wirken für die BBA und für das von ihm geleitete Institut und wünschen ihm für den verdienten Ruhestand Gesundheit und Wohlergehen im Kreise seiner Familie.

Braunschweig, den 29. Juni 2007

## Inhalt

<b>Backhaus, G.F.</b> Laudatio für Herrn Direktor und Professor Dr. Gerhard Bartels	3
<b>Bangemann, L.-W., Niepold, F., Zellner, M.; Kleinhenz, B.; Bartels, G.</b> Kupferminimierung im Ökologischen Kartoffelbau unter Einsatz des Prognosemodells „ÖKO-SIMPHYT“	8
<b>Brasse, D.</b> Der Arbeitsbereich Bienenschutz in der Geschichte der BBA	14
<b>Büchs, W., Raubuch, M., Prescher, S., Behr, K., Müller, A., Roose, K.</b> Impact of <i>Ostrinia</i> -resistant <i>Bt</i> -maize on microbial and invertebrate decomposer communities in field soils	26
<b>Flath, K.</b> Verstärkter Mehltreibbefall von Triticale erfordert Anbau resistenter Sorten	32
<b>Heimbach, U., Müller, A., Thieme, T.*</b> Sensitivitätsuntersuchungen an Rapsschadinsekten aus Deutschland mit Pyrethroiden	36
<b>Koch, S., Kreye, H.</b> Welche Auswirkungen hat der Anbau von Winterraps-Halbzwerg-Hybriden auf den Pflanzenschutz?	44
<b>Kreye, H., Niepold, F.</b> Diagnostischer und epidemiologischer PCR-Nachweis des Erregers der Anthracnose ( <i>Colletotrichum lupini</i> ) bei Lupinen	49
<b>Meyer, G.</b> Einfluss von Maissorte und Maiszünsler-Befall auf das Auftreten von Fusariosen und Mykotoxingehalt im Körnermais	59
<b>Rodemann, B., Mielke, H.</b> Anfälligkeit verschiedener Winterweizensorten gegenüber Ährenfusarium (Zulassungsjahre 2001 bis 2006)	66
<b>Schlein, O., Niepold, F., Büchs, W.</b> Detection of pollen beetle ( <i>Meligethes aeneus</i> ) DNA in the gut content of predators by Polymerase Chain Reaction (PCR)	84

**Bangemann, L.-W.<sup>1</sup>, Niepold, F.<sup>1</sup>, Zellner, M.<sup>2</sup>; Kleinhenz, B.<sup>3</sup>; Bartels, G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>) Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland

<sup>2</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz IPS 3d

<sup>3</sup>) Zentralstelle der Länder für EDV- gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP)

## **Kupferminimierung im Ökologischen Kartoffelbau unter Einsatz des Prognosemodells „ÖKO-SIMPHYT“**

### **Einleitung**

Noch Anfang der 90er Jahre führte der ökologische Landbau in Deutschland ein Nischendasein. Zwar wuchs der Flächenanteil schon seinerzeit kontinuierlich, doch insgesamt wurden weniger als 100.000 ha ökologisch bewirtschaftet. Getrieben durch verschiedene Faktoren – z.B. verbesserte Förderpolitik, Nachfrageanstieg durch die BSE-Krise – wuchs der ökologische Landbau seitdem mit rasanter Geschwindigkeit. So wurden beispielsweise schon 2005 insgesamt 767.891 ha (4,5 % der Fläche) auf 16.603 Betrieben (3,94 % der Betriebe) nach den Kriterien des ökologischen Landbaus bewirtschaftet.

Traditionell hat die Direktvermarktung eine hohe Bedeutung im ökologischen Anbau. Da sich die Kartoffel für diese Absatzmethode besonders gut eignet, wird ihr deshalb im ökologischen Anbau eine besondere Beachtung geschenkt. So betrug der Umfang des ökologischen Kartoffelanbaus im Jahr 2003 insgesamt 6100 ha. Von dieser Fläche wurden 5200 ha als Speisekartoffeln vermarktet, 900 ha dienten der verarbeitenden Industrie als Rohstoff.

Eines der zentralen Probleme im ökologischen Kartoffelanbau ist die Kraut- und Knollenfäule, verursacht durch den Pilz *Phytophthora infestans*. Unter entsprechenden Witterungsbedingungen (hohe Niederschläge, hohe Boden- und Luftfeuchtigkeit) kann der Pilz innerhalb weniger Wochen die Kartoffelpflanzen vollständig zerstören und damit empfindliche Ertragsverluste verursachen. Nach wie vor kann im ökologischen Landbau die Kraut- und Knollenfäule nur durch den Einsatz von Kupfer(Cu)-haltigen Pflanzenschutzmitteln begrenzt werden. Alle übrigen Ansätze – z.B. Resistenzzüchtung, Einsatz von Pflanzenstärkungsmitteln – führten bisher nicht zu praxisreifen Lösungen. Da Kupfer nicht im Boden abgebaut wird, kann es sich bei langjähriger Anwendung im Boden anreichern. Des Weiteren kann sich der Einsatz von Kupfer negativ auf Nicht-Ziel-Organismen (Gewässerorganismen, Regenwürmer) auswirken.

Ziel des Forschungsprojekts ist daher, den Einsatz von Kupfer bei der Krautfäule-Bekämpfung im ökologischen Kartoffelanbau auf das absolut notwendige Mindestmaß zu reduzieren. Als Kernpunkt dieser zielgerichteten Bekämpfungsstrategie soll das Prognosesystems SIMPHYT im Rahmen des Forschungsvorhabens an die Bedingungen des ökologischen Landbaus angepasst und ab 2007 unter dem Namen „ÖKO-SIMPHYT“ in die Praxis eingeführt werden.

### **Material und Methoden**

Da Kupfer als reines Kontaktfungizid stark durch Niederschläge von den Blättern abgewaschen werden kann, ist es für die Empfehlung von Behandlungsabständen erforderlich genau Kenntnisse zur Regenbeständigkeit von Cu zu erlangen. Deshalb dienten Gewächshausversuche zur Untersuchung der Wirkungsverluste von Cu nach einer Blattapplikation. Hierbei wurde sowohl das in der Praxis bewährte Kupferhydroxid als auch Nanoformulierungen von Kupfer bei unterschiedlichen Aufwandmengen unter verschiedenen Niederschlagsmengen getestet. drei Stunden nachdem Einzelpflanzen mit Kupfer behandelt worden waren, wurden sie Regenereignissen von 10-50 mm ausgesetzt. Daraufhin wurden einzelnen Blätter im Labor mit *P. infestans* inokuliert und in Klimakammern 7 Tage inkubiert.

Im Freiland wurde an drei Versuchsstandorten in den Jahren 2005-2006 untersucht, wie sich der Einsatz verschiedener Cu-Aufwandmengen und Spritzstrategien auf den Krautfäule-Befall und den Ertrag auswirkten. Zum Vergleich standen dabei wöchentliche Routineanwendung verschiedener Cu-Aufwandmengen und die Cu-Einsatzstrategie auf Basis des Prognosesystems SIMPHYT. Im Gegensatz zur Routinespritzung wird bei SIMPHYT der Spritzabstand und die Aufwandmenge auf Basis des aktuellen Infektionsdrucks, errechnet aus den aktuellen Wetterdaten, festgelegt. In Zeiten mit einem geringen Infektionsdruck verlängern sich die Spritzintervalle und die Aufwandmengen werden reduziert. Bei starker Infektionsgefahr hingegen werden die Abstände verkürzt und auch die Aufwandmengen erhöht. Diese Anpassung soll einerseits unnötige Behandlungen vermeiden und andererseits einen effizienten Einsatz der zur Verfügung stehenden 3 kg Cu/ha und Jahr ermöglichen bzw. bewirken, dass auch mit deutlich geringeren Gesamtkupfermengen eine erfolgreiche Bekämpfung durchgeführt werden kann. Die Versuche fanden an den Standorten Braunschweig (Ahlum), Bad-Salzuflen und Barnstedt statt.

Während am Standort Ahlum der Einfluss unterschiedlicher Sorten und des Vorkeimens im Vordergrund der Versuchsfragen stand, wurden in Bad-Salzuflen und Barnstedt vorwiegend die Applikationsstrategien auf der Basis des Prognosemodells mit den Standardgespritzungen verglichen. Hier wurden folgende Kernvarianten (s. Tabelle 1) in einer vollständig randomisierten Blockanlage mit 4 Wiederholungen getestet.

**Tab. 1** Kernvarianten

Variante	Pflanzenschutzmittel	Cu kg/ha pro Anwendung	Spritzabstand
1	Kontrolle	0	
2	Cuprozin fl.	0,500	wöchentlich
3	Cuprozin fl.	In Abhängigkeit vom Inf.druck: - sehr hoch: 0,750 - hoch: 0,625 - mittel: 0,500 - niedrig: 0,375 - sehr niedrig: 0,250	in Abhängigkeit vom Inf.druck (ÖKO-SIMPHYT)
4	SPU 1010	0,150	
5	Cuprozin fl.	0,750	
6	SPU 2690	0,450	
7	Cuprozin fl.	0,500	
8	Cuprozin fl.	0,250	
9	Cuprozin fl.	0,500	in Abhängigkeit vom Inf.druck (ÖKO-SIMPHYT) + 2 Tage

Zur Ermittlung der optimalen Aufwandmenge wurden bei einer wöchentlichen Behandlung unterschiedlich hohe Cu-Aufwandmengen verglichen (s. Tabelle 2).

**Tab. 2** wöchentliche Behandlungen mit Cu

10	Cuprozin fl.	0,750	
11	SPU 2690	0,450	
12	SPU 01010	0,150	
13	SPU 2690	0,250	wöchentlich
14	Cuprozin fl.	0,150	
15	Cuprozin fl.	0,750	
16	SPU 2690	0,150	
17	Cuprozin fl. + Nu-Film-P	0,500 + 0,3l/ha	

Zur Erlangung genauerer Kenntnisse über die tatsächliche Wirkungsdauer von Cu im Freiland nach einer Applikation wurden Varianten mit gestaffelten Applikationsterminen angelegt (Tabelle 3).

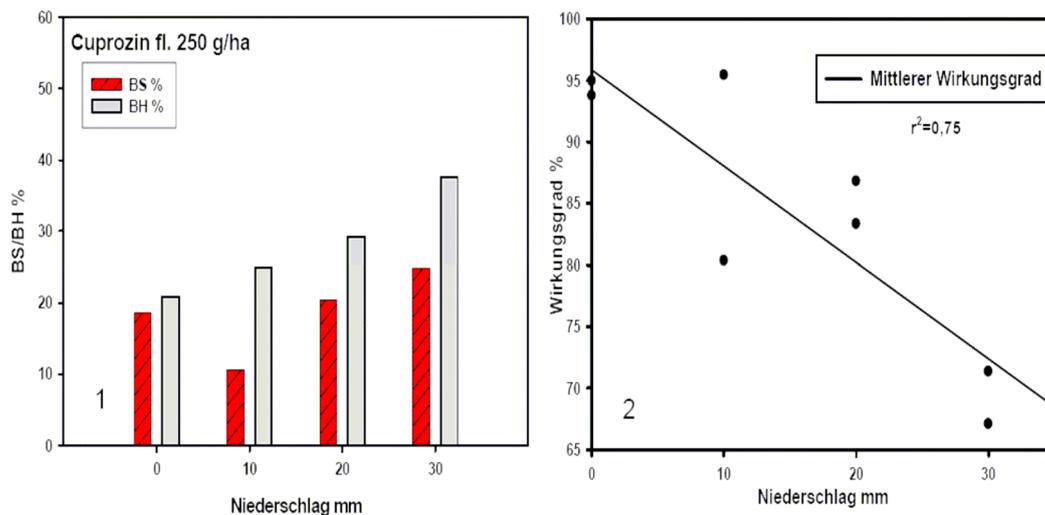
**Tab. 3** Staffelung von Cu-Applikation bei unterschiedlichen Aufwandmengen

Variante	Pflanzenschutzmittel	Anzahl Applikationen und Cu kg/ha pro Anwendung	Spritzabstand
18	Cuprozin fl.	1 x 0,750	wöchentlich
19	Cuprozin fl.	2 x 0,750	
20	Cuprozin fl.	3 x 0,750	
24	Cuprozin fl.	2 x 0,500	
25	Cuprozin fl.	3 x 0,500	
26	Cuprozin fl.	4 x 0,500	

Bei allen Varianten wurde der Spritzstart vom Prognosemodell errechnet.

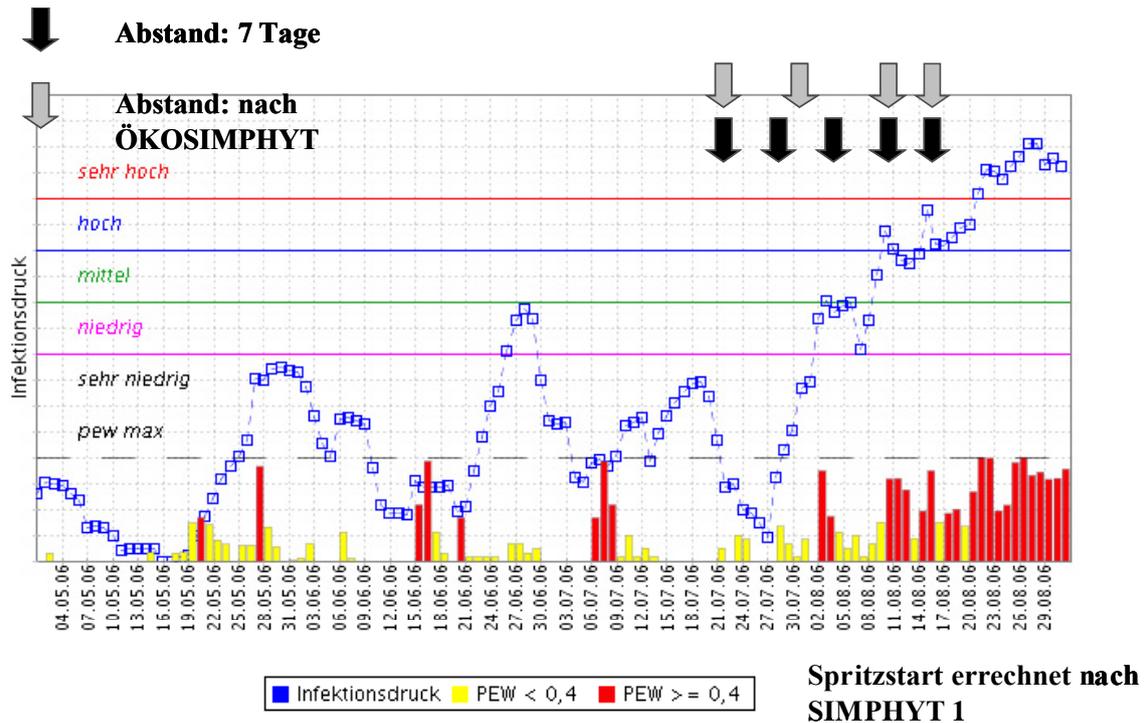
## Ergebnisse und Diskussion

In den Gewächshausversuchen konnte gezeigt werden, dass Niederschläge von mehr als 20 mm zu deutlichen Wirkungsverlusten einer Kupferapplikation führten. Hingegen bewirkten Niederschläge im Bereich von 10-20 mm kaum Wirkungsverluste. Erst Regenmengen von 30 mm erlaubten eine höhere Befallsstärke und –häufigkeit von *P. infestans*, weil das Kupfer von den Blättern abgewaschen worden war (Abbildung 1).



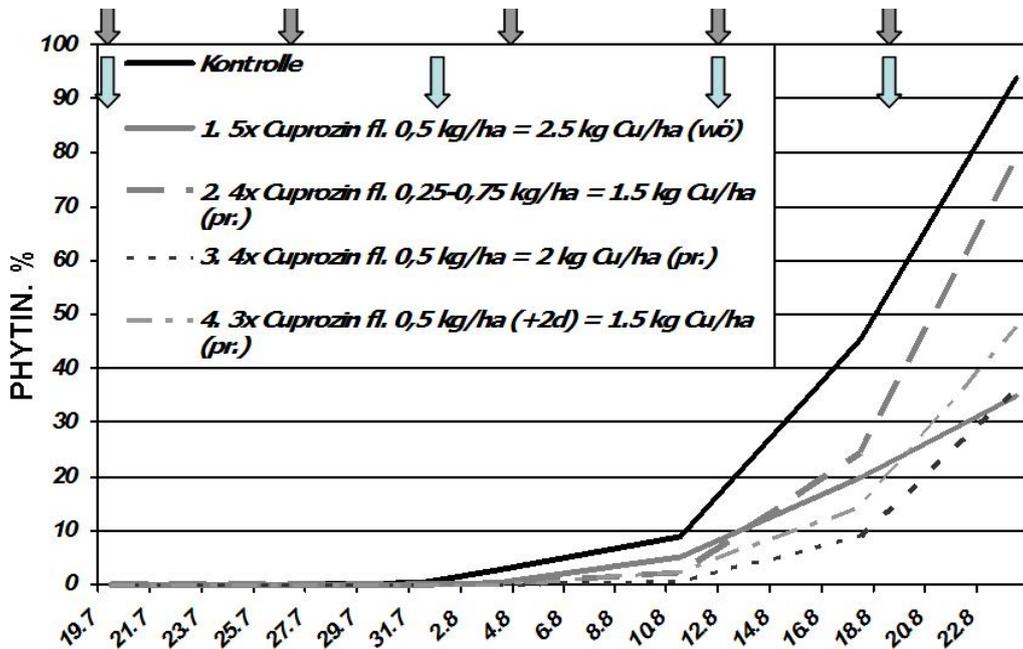
**Abb. 1** 1) Befallsstärke (BS) und Befallshäufigkeit (BH) von *P. infestans* im Gewächshaus, Berechnung 3 h nach Applikation von Cuprozin fl. 250 g Cu/ha, Mittelwert aus 3 Versuchen, Niederschlagsintensität ca. 20mm/h;  
2) Mittlerer Wirkungsgrad von Cuprozin fl. (250-750 g Cu/ha) nach Berechnung 3 h nach Applikation.

Die Feldversuche der Versuchsjahre 2005 und 2006 zeichneten sich an allen Versuchsstandorten durch Trockenphasen von Juni bis Anfang August aus. Auf Grund dieser Witterung war der Infektionsdruck der Krautfäule vergleichsweise niedrig was dazu führte, dass der Erreger erst spät bis mitunter gar nicht in den Versuchen aufzufinden war. Am Standort Bad-Salzuflen konnte in beiden Jahren der Erstbefall der Kontrolle Anfang August festgestellt werden. In allen Fällen konnte durch den Einsatz des Prognosesystems ein rechtzeitiger Bekämpfungsstart realisiert werden. Im Vergleich zu den wöchentlichen Routinespritzungen konnte durch das Prognosemodell ÖKO-SIMPHYT mindestens eine Applikation eingespart werden (Abbildung 2).



**Abb. 2** Infektionsdruck am Standort Bad-Salzuflen 2006 und Applikationstermine. Spritzstart: 19.07.06.

In beiden Versuchsjahren belegten die Ergebnisse der Feldversuche, dass eine Reduzierung der Kupfergesamtmenge durch ÖKO-SIMPHYT möglich ist. In den Kernvarianten konnte gezeigt werden, dass die Anpassung der Spritzabstände an den aktuellen Infektionsdruck die größten Einsparpotentiale beinhaltet. Die gleichzeitige Anpassung der Aufwandmenge von Cu allerdings bewirkte in den norddeutschen Versuchen stets einen weniger nachhaltigen Bekämpfungserfolg (Abbildung 3).



**Abb. 3** Befallsverlauf am Standort Bad Salzuflen im Jahr 2006. Vergleich wöchentlicher (wö.) und prognosegesteuerter (pr.) Behandlungen.

Durch den Einsatz des Prognosemodells konnten im Vergleich zu einer wöchentlichen Routinespritzung bis zu 50% der Kupfermengen eingespart werden, wobei vergleichbar gute Bekämpfungserfolge erzielbar waren (Tabelle 4).

**Tab. 4** Vergleich wöchentlicher (wö.) und prognosegesteuerter (pr.) Behandlungen und Bekämpfungserfolge am Standort Bad Salzuflen (2006). Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede in der Fläche unter der Befallskurve (AUDPC) an.

Variante	PSM (Spritzabstand)	Kg Cu/ha	Summe kg Cu/ha	Summe AUDPC	LSD P<0,05
	Kontrolle	0	0	1309.75	A
1	Cuprozin flüssig (wö.)	5x0.50	2.50	542.00	C
2	Cuprozin flüssig (pr.)	4x0.25-0,75	1.50	818.00	B
3	Cuprozin flüssig (pr.)	4x0.50	2.00	342.35	C
4	Cuprozin flüssig (pr. + 2 Tage)	3x0.50	1.50	503.75	C

Die Versuche mit wöchentlichen Spritzabständen zeigten in beiden Versuchsjahren, dass unter den schlechten Infektionsbedingungen dieser beiden Jahre eine Kontrolle der Krautfäule mit Aufwandmengen von 250 g Cu/ha möglich ist, wobei die beste Bekämpfung der Krautfäule durch den Einsatz von 750 g Cu/ha pro Applikation erreicht wurden. In diesen Varianten wurde jedoch auch die höchste Gesamtmenge an Kupfer ausgebracht. Dies zeigt, dass der Bekämpfungserfolg stark von der Höhe der Kupfermenge pro Applikation abhängig ist und eine zu geringe Aufwandmenge (< 250 g Cu/ha) auf Grund des schlechten Erfolges wenig sinnvoll ist. Ein weiterer Punkt ist die nachhaltige Wirkung einer höheren Aufwandmenge, wenn nicht mehr mit einem Blattneuzuwachs zu rechnen ist. Dies zeigten Versuche zur Dauerwirkung von Kupfer, da nämlich bei Aufwandmengen von 750 g Cu/ha noch 21 Tage nach der Applikation eine Wirkung gegen *P. infestans* festzustellen war.

Dass an allen Standorten in den Jahren 2005 und 2006 keine statistisch absicherbaren Mehrerträge durch die Behandlung mit Kupfer festgestellt werden konnten, ist auf das späte Erstauftreten der Krautfäule zurückzuführen, da hier die Ertragsbildung schon abgeschlossen war. Dennoch wurden zur Validierung der Applikationsstrategien Kupferspritzungen durchgeführt. Die Ergebnisse zu den Erträgen verdeutlichten allerdings auch, wie wichtig die Einbeziehung der Ertragsbildung einer Sorte am jeweiligen Standort ist, um unnötige Kupferbehandlungen aus ökologischer und ökonomischer Sicht zu vermeiden.

Die Versuche zur Sortenwahl und zum Vorkeimen ergaben in den beiden ersten Jahren auf Grund des geringen Befallsdruckes ebenfalls kaum Effekte dieser pflanzenbaulichen Maßnahmen auf den Ertrag der Kartoffeln. Allerdings zeigten sich auch hier großen Unterschiede im Abreifeverhalten und den Abreifezeitpunkten der unterschiedlichen Sorten. Daher wird die Ertragsbildung in Abhängigkeit vom Standort und der Sorte im weiteren Verlauf des Projektes eingehender analysiert und insbesondere das Ende der Ertragsbildung in den Kupferapplikationsstrategien berücksichtigt. Somit wäre es denkbar auf Grund eines späten Erstbefalls mit *P. infestans* und einer fortgeschrittenen Ertragsentwicklung ganz auf eine Kupferbehandlung zu verzichten. Die Ergebnisse sollen später mit in das Modell „ÖKO-SIMPHYT“ einfließen.

## Zusammenfassung

Nach zwei Versuchsjahren im Rahmen des Projektes: „Entwicklung, Überprüfung und Praxiseinführung des Prognosesystems ÖKO-SIMPHYT zur gezielten Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule (*P. infestans*) im ökologischen Kartoffelanbau mit dem Ziel, den Einsatz kupferhaltige Fungizide auf ein Minimum zu reduzieren“, war durch die Anpassung der Applikationsintervalle an den Infektionsdruck ein hohes Potenzial zur Reduzierung des Kupfereinsatzes zu erzielen. Es konnte im Vergleich zur wöchentlichen Standardvariante bis zu 50% der Gesamtkupfermenge bei gleichbleibender Bekämpfung des Erregers eingespart werden. Weniger gute Bekämpfungserfolge erzielte die Anpassung von Aufwandmenge und Spritzabstand.

Die im Gewächshaus durchgeführten Versuche zeigten einen Verlust des Wirkungsgrades einer Kupferapplikation von ca. 20 % bei Niederschlägen von mehr als 20 mm. Bei der wöchentlichen Standardvariante zeigte sich, dass mit Aufwandmengen von 0,25 kg Cu/ha ausreichende Bekämpfungserfolge erzielt werden können, während Aufwandmengen von 0,15 kg Cu/ha zu weniger zufriedenstellenden Ergebnissen führte.

Versuche zur Dauerwirkung von Cu belegten, dass unter den in den Versuche herrschenden Umweltbedingungen mit der Anpassung der Applikationsintervalle an den Infektionsdruck ein weiterhin hohes Potenzial zur Reduzierung des Kupfereinsatzes vorhanden ist. Hier konnten im Vergleich zur Standardvariante bis zu 50% der Gesamtkupfermenge bei gleichbleibender Bekämpfung des Erregers eingespart werden.

Die trockene Witterung der Jahre 2005 und 2006 bedingten einen niedrigen Infektionsdruck und somit ein sehr spätes Auftreten der Krautfäule. Unter diesen Umweltbedingungen hatte eine Applikation von 0,75 kg Cu/ha noch fast 3 Wochen später eine ausreichende Wirkung auf *P. infestans* im Freiland. So können diese Ergebnisse möglicherweise eine Alternative für eine Behandlungsstrategie in der Zeit bieten, in der die Kartoffeln keinen Neuzuwachs an Blättern mehr haben. Dadurch ließe sich der Zeitraum bis zur Ernte mit sehr wenigen Applikationen überbrücken.

Im Vergleich zu anderen feuchteren Jahren fehlt nach wie vor eine Erprobung des Prognosemodells „ÖKO-SIMPHYT“ und somit der Applikationsstrategien unter günstigen Bedingungen für den Erreger der Kraut- und Knollenfäule *P. infestans*. Diese Erprobung ist notwendig da das Prognosemodell „ÖKO-SIMPHYT“ so bald wie möglich im Internet den Landwirten zur Verfügung stehen.

Diese Arbeit ist Teil des Gesamtprojektes „Entwicklung, Überprüfung und Praxiseinführung des Prognosesystems ÖKO-SIMPHYT zur gezielten Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule (*P. infestans*) im ökologischen Kartoffelanbau mit dem Ziel, den Einsatz kupferhaltige Fungizide auf ein Minimum zu reduzieren“. Der Dank gilt dem Bundesprogramm Ökologischer Landbau für die Förderung dieses Projektes

## Weiterführende Literatur

- BANGEMANN, L.-W.; WOHLLEBEN, S.; BENKER, M.; KLEINHENZ, B.; ZELLNER, M.; BARTELS, G. (2006): *Phytophthora*-Sekundärbefall- Kupferminimierungsstrategien im ökologischen Kartoffelanbau. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 400, Beiträge zur 55. Deutschen Pflanzenschutztagung S. 96.
- ZELLNER, M.; BENKER, M.; KLEINHENZ, B.; BARTELS, G. (2006): Strategien zur Minimierung des Einsatzes kupferhaltiger Fungizide bei der Krautfäulebekämpfung im ökologischen Kartoffelanbau- ein vom Bundesprogramm Ökologischer Landbau gefördertes Forschungsprojekt. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 400, Beiträge zur 55. Deutschen Pflanzenschutztagung S. 329.
- KÜHNE, S.; ADLER, C.; BANGEMANN, L.-W.; BARTELS, G.; HALLMANN, J.; HEIMBACH, U.; KOLLAR, A.; MAIXNER, M.; MEYER, G.; PALLUT, B.; PELZ, HJ.; SIECKMANN, G.; WALTHER, B.; VERSCHWELE, A., VOGT, H. (2006): Bericht 2005 der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft zum Pflanzenschutz im Ökologischen Landbau. Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2006, Landbauforschung Völknerode FAL Agricultural Research. Sonderheft 298. S. 127.

**Brasse, D.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

## **Der Arbeitsbereich Bienenschutz in der Geschichte der BBA**

### **Einleitung**

Die Begründung für die Wertschätzung der Imkerei und damit der Honigbienen in der Gesellschaft hat im Laufe der Zeit eine deutliche Wandlung erfahren. Seit der frühesten Menschheitsgeschichte bis in den Beginn des 20. Jahrhunderts hinein wurden Bienen beinahe ausschließlich wegen der von Ihnen gelieferten Produkte geschätzt: Honig war der einzige verbreitete Süßstoff für Speisen, der einfach und auch relativ preiswert erhältlich war, Wachs wurde sehr früh schon als Grundstoff für Kosmetika und Heilmittel sowie zur Kerzenherstellung verwendet. Heute ersetzt der aus Zuckerrohr oder Zuckerrüben gewonnene Zucker den Honig als Süßstoff.

Es ist anzunehmen, dass der aus Zuckerrohr gewonnene Zucker bereits im 1. Jahrhundert aus Südostasien nach Europa gelangte. Seit dem 16. Jahrhundert wird Zuckerrohr zur Zuckergewinnung in Lateinamerika angebaut. Rohrzucker blieb aber teuer und war für Normalbürger nicht erschwinglich.

Bereits im Jahre 1747 entdeckte der Berliner Chemiker und Apotheker Sigismund Marggraf, dass der Zucker aus der Zuckerrübe chemisch identisch ist mit dem des Zuckerrohrs. Aufgrund dieser Entdeckung begann der aus Berlin stammende Unternehmer Franz Karl Archard in Schlesien damit, den Zuckergehalt der Zuckerrübe durch Züchtung zu erhöhen, um ihn wirtschaftlich gewinnen zu können. Archard baute schließlich im Jahre 1802 in Schlesien die erste Zuckerfabrik der Welt. Die breite Einführung des Rübenzuckers gelang jedoch erst viel später, so dass Bienenvölker als Süßstofflieferanten weiterhin eine zentrale Funktion hatten und bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts üblicherweise auch in Großstädten gehalten wurden.

Am Ende des 18. Jahrhunderts gelang dem Brandenburger Lehrer und Biologen Christian Konrad Sprengel die bahnbrechende Entdeckung der Blütenbefruchtung durch Bienen. 1792 veröffentlichte er die Erkenntnisse aus seinen jahrelangen Naturbeobachtungen in der Schrift „Das entdeckte Geheimnis der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen“. Die große ökonomische Bedeutung seiner Entdeckung fasste er in seiner 1811 veröffentlichten Arbeit „Die Nützlichkeit der Bienen und die Notwendigkeit der Bienenzucht, von einer neuen Seite darstellend“ in folgendem Satz zusammen: „Der Staat muss dankbar und froh sein, dass es Imker gibt, sonst wäre er gezwungen, auf Staatskosten ein stehendes Heer von Bienenvölkern zu halten“. Sprengels bedeutende Entdeckung geriet jedoch in Vergessenheit und wurde erst etwa 50 Jahre nach seinem Tod wiederentdeckt und gewürdigt.

### **Untersuchungen zu Bienenkrankheiten (1898-1924)**

Die Tatsache, dass die große ökonomische und ökologische Bedeutung der Honigbiene in ihrer Bestäubungstätigkeit und nicht in der Honig- und Wachsproduktion liegt, wurde bei der Gründung der „Biologischen Abtheilung für Land- und Forstwirtschaft“ am kaiserlichem Gesundheitsamt in mehrfacher Hinsicht in den Dankschriften berücksichtigt. Aus dieser Kenntnis heraus wird bereits in der 1. Denkschrift aus dem Jahre 1901 aus zwei Gründen eine wissenschaftliche Beschäftigung mit der Honigbiene gefordert. So wird unter Punkt 2. der Denkschrift folgendes ausgeführt: „Ferner fällt in das Arbeitsgebiet der Abtheilung das Studium der Nützlinge aus dem Thier- und Pflanzenreiche, z. B. der die Befruchtung der Kulturpflanzen vermittelnden Insekten,....“.

Und unter Punkt 5. heißt es: „Experimentelle Forschungen sind endlich erforderlich auf den Gebieten der Bienenzucht und der Fischzucht. Abgesehen von den Krankheiten der Bienen und der Fische verdient das Studium der Lebensbedingungen der Fische besondere Beachtung.“ Damit war das Arbeitsgebiet der Bienenkunde im Aufgabenkatalog der Biologischen Abteilung im Kaiserlichen Gesundheitsamt (später Biologischen Reichsanstalt bzw. Biologischen Bundesanstalt) für Land- und Forstwirtschaft festgelegt. Der Arbeitsbereich wurde dem bakteriologischen Laboratorium zugewiesen, das von 1903 bis 1923 von Prof. Dr. Albert Maaßen geleitet wurde.

Das Hauptgewicht der Arbeiten lag in der Bearbeitung der damals bekannten, wichtigsten Bienenkrankheiten, vor allem der bösartigen oder amerikanischen Faulbrut.

Maaßen gelang es 1908, unabhängig von dem Amerikaner G.F. White, die Ursache dieser für die Bienenvölker verheerenden Krankheit zu entdecken und den Erreger zu bestimmen. Das die Krankheit – damals als Nymphenseuche bezeichnet – verursachende Bakterium wurde von ihm *Bacillus brandenburgiensis* genannt, weil er zunächst glaubte, die Verbreitung der Krankheit sei auf das Gebiet Brandenburgs beschränkt. (*Bacillus brandenburgiensis* → *Bacillus larvae* → *Paenibacillus larvae*, zuerst entdeckt und beschrieben von G.F. White im Jahre 1904). Wie Maaßen später bei seinen ausgedehnten Erhebungen zu den Krankheitsuntersuchungen erkennen musste, trat die Krankheit immer wieder unvermutet in den verschiedensten Regionen des damaligen Reichsgebietes auf.

Maaßen beschäftigte sich in den Jahren nach der Klärung der Ursache der bösartigen Faulbrut mit weiteren, verbreiteten Bienenkrankheiten. Neben Nosemose, Ruhr, Kalkbrut, Steinbrut, Maikrankheit und gutartiger Faulbrut wurden auch Arbeiten zur Verbreitung und Bekämpfung von Parasiten wie Wachsmotte und Tracheenmilbe durchgeführt. Besonders hervorzuheben sind seine Untersuchungen zur gutartigen Faulbrut, damals als Larvenseuche bezeichnet. Es gelang ihm, den gesamten Erregerkomplex dieser Krankheit nachzuweisen und durch ausgedehnte Infektionsversuche von der bösartigen Faulbrut (Nymphenseuche) abzugrenzen. Alle Arbeiten waren wissenschaftlich nicht nur auf die Ätiologie der Krankheiten ausgerichtet, sondern entsprechend dem Geist der Denkschriften auch auf deren Bekämpfung. In enger Zusammenarbeit mit praktizierenden Imkern wurden für einige der genannten Krankheiten, vor allem aber für die bösartige Faulbrut, Methoden zur Bekämpfung und Eindämmung sowie Strategien zur Vermeidung entwickelt, die zum großen Teil heute noch Bestand haben. Außerdem wurde untersucht, ob die festgestellten Krankheiten auf andere verwandte Hymenopterenarten wie Hummeln und Wespen übertragen werden könnten. Die bei den Untersuchungen gesammelten Erkenntnisse zur Bekämpfung und Vermeidung der Krankheiten wurden in den einschlägigen Fachzeitschriften publiziert. Außerdem aber wurden regelmäßig dazu Kurse für Wissenschaftler und interessierte Imker abgehalten, um die neuen Erkenntnisse möglichst rasch in die praktische Imkerei einzuführen. Durch die umfangreiche Untersuchungs-, Beratungs- und Lehrtätigkeit entwickelte sich das von Maaßen geleitete Laboratorium zu einer zentralen Untersuchungsstelle für Bienenkrankheiten in Deutschland. Sichtbarer Ausdruck der großen Bedeutung des Laboratoriums für Bienengesundheit in Deutschland war die Umsetzung der grundlegenden Erkenntnisse zur Bekämpfung der Bienenkrankheiten, insbesondere der gutartigen und der bösartigen Faulbrut, in zahlreichen Verordnungen der Länder sowie in der Seuchengesetzgebung des Deutschen Reiches.

Durch die intensive Beschäftigung mit der Bekämpfung der Bienenkrankheiten und Parasiten wurde der wirtschaftlichen Bedeutung der Honigbienen Rechnung getragen. Dies wurde auch dadurch deutlich, dass nach dem 1. Weltkrieg das ursprüngliche bakteriologische Laboratorium in die „Naturwissenschaftliche Abteilung“ eingegliedert wurde, während das neu gegründete Laboratorium für die Bekämpfung der Bienenkrankheiten der „Wirtschaftlichen Abteilung“ zugeordnet wurde. Dass man der Honigbiene nun als Produktionsfaktor in der Landwirtschaft große Bedeutung beimaß, kam auch dadurch zum Ausdruck, dass das Arbeitsgebiet im Jahre 1919 durch zwei Wissenschaftler verstärkt wurde, den Tierarzt Dr. med. vet. Alfred Borchert und den Zoologen Dr. phil. Walter Trappmann (Borchert übernahm im Jahre 1923 die Leitung des Laboratoriums für Bienenkrankheiten, Trappmann wurde im Jahre 1924 Leiter des Laboratoriums für Zoologie der Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel).

## Auswirkungen des chemischen Pflanzenschutzes 1924-1945

Unter dem Einfluss der aufblühenden chemischen Industrie vollzog die Landwirtschaft nach dem 1. Weltkrieg einen spürbaren Wandel. Die Bekämpfung von Schadorganismen der Land- und Forstwirtschaft mit chemischen Mitteln nahm stetig zu. Die Bekämpfung tierischer Schadorganismen stand zunächst im Vordergrund und es wurden dabei so hochgiftige Substanzen wie Arsen und Blei eingesetzt. Da die Anwendungen teilweise auch zur Blütezeit stattfanden, konnten Schäden an Bienenvölkern und die darauf folgenden Klagen aus der Imkerschaft nicht lange ausbleiben. Hieraus ergab sich die zwingende Notwendigkeit, die Imkerei vor dieser neuen Gefahr zu schützen. Bereits im Jahre 1920 wurde in der „Wirtschaftlichen Abteilung“ der Biologischen Reichsanstalt (BRA) eine „Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel“ eingerichtet (die spätere Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik der Biologischen Bundesanstalt). Die „Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel“ befasste sich gleich nach ihrer Gründung auch mit Auswirkungen der Pflanzenschutzmittel auf Bienen. So finden sich bereits im Bericht über die „Prüfung von Pflanzenschutzmitteln in den Jahren 1921/22“ aus den Mitteilungen der BRA bei einigen Mitteln Angaben zur Auswirkung auf die Honigbiene. Diese Angaben basierten auf Versuchsergebnissen von Borchert und Winkelmann (damaliger Leiter des Laboratoriums für Botanik in der Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel). Die Prüfmethode ließ zunächst nur die Ermittlung der Toxizität der Mittel für Bienen bei oraler Aufnahme zu. Sie wurde von Borchert und Hilgendorff 1926 unter dem Titel „Ermittlung der Empfindlichkeit der Bienen gegen Arsenstäubemittel“ veröffentlicht. Erst später wurde die Prüfung um eine Methode zur Erfassung der Kontakt- und Atemgiftwirkung erweitert.

Es gab in dieser Zeit noch kein gesetzlich geregeltes Zulassungsverfahren für Pflanzenschutzmittel, so dass auch eine Prüfung der Auswirkungen auf Bienen nicht vorgeschrieben war und nur fakultativ stattfand. Jedoch gab die „Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel“ Empfehlungen zur Anwendung der Mittel ab. So wurde z. B. empfohlen, bienengefährliche Pflanzenschutzmittel möglichst nur außerhalb der Blütezeit der Kulturpflanzen anzuwenden, besonders bei Obst und Raps. Auch die Empfehlung der Anwendung bienengefährlicher Mittel in blühenden Kulturen abends nach dem täglichen Bienenflug gab es bereits für besonders begründete Ausnahmefälle. Weiterhin wurde in die Überlegungen zur Verbesserung des Bienenschutzes einbezogen, auch blühende Unkräuter vor der Behandlung mit bienengefährlichen Mitteln zu schützen und in Obstkulturen den blühenden Unterwuchs vor einer Behandlung abzumähen.

Diese Überlegungen zur Gewährleistung des Bienenschutzes sind heute in der Bienenschutzverordnung niedergelegt und im Pflanzenschutz geläufig, damals waren sie als Pionierleistung anzusehen. Mit der Aufnahme der Untersuchungen zur Toxizität von Pflanzenschutzmitteln gegenüber Bienen hatte sich endgültig das Gewicht der Arbeiten des Laboratoriums für Bienengesundheit in eine neue Richtung verlagert. Untersuchungen zu schädigenden Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen standen nunmehr im Mittelpunkt, während die Bienenpathologie fast nur noch in Beratungen und gelegentlichen Schulungen behandelt wurde.

Die Prüfung der Auswirkungen der Mittel auf Bienen lag bald auch im Interesse der Hersteller, weil von der „Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel“ zunehmend Hinweise zur Anwendung unter Berücksichtigung des Bienenschutzes gegeben wurden. Diese Empfehlungen wurden von zahlreichen Regierungen der Länder aufgegriffen und in entsprechenden Anordnungen umgesetzt. Am 01.02.1933 wurde in Mecklenburg die erste dieser Anordnungen mit dem Titel „Anordnung zur Bekämpfung von Obstbaumschädlingen und zum Schutz der Bienen“ herausgegeben. 10 derartige Anordnungen mit fast gleichlautendem Titel und Inhalt sind bekannt. Sie verpflichten die Eigentümer und Pächter von Obstanlagen zur Bekämpfung von Obstkrankheiten und -schädlingen unter Einhaltung der Vorschriften des Bienenschutzes.

So war die Anwendung von Arsen-haltigen Mitteln zur Blütezeit verboten und die Behandlung von Obstbäumen in unmittelbarer Nähe von Bienenständen nur nachts erlaubt.

Diese Anordnungen waren im Grunde die Vorläufer der ersten Verordnung zum Schutz der Bienen vor Gefahren durch Pflanzenschutzmittel (Bienenschutzverordnung). Das Reichsernährungsministerium forderte im September 1937 die BRA auf, die auf Länderebene bestehenden Anordnungen zu einem einheitlichen Entwurf für eine im ganzen Reichsgebiet geltende Verordnung zusammenzufassen. Dieser Entwurf wurde im Jahre 1938 vorgelegt und trug den Titel: „Verordnung über das Verbot der Anwendung arsenhaltiger Pflanzenschutzmittel bei blühenden Kulturpflanzen“. Bei den folgenden Überarbeitungen wurde der Schutzzweck auf „andere blühende, gärtnerische und landwirtschaftliche Kulturpflanzen, insbesondere Raps“ ausgedehnt. Schon damals wurden einige landwirtschaftliche Kulturen von dem Verbot der Anwendung Arsen-haltiger Pflanzenschutzmittel zur Blütezeit ausgenommen, weil angenommen wurde, dass die Blüten dieser Kulturpflanzen nicht von Bienen befliegen wurden. Dies waren die Kulturen Wein, Kartoffel und Spargel. Inzwischen wurde festgestellt, dass Weinrebe und Spargel doch von Bienen befliegen werden, so dass in der derzeitigen Fassung der Bienenschutzverordnung als nicht von Bienen beflogene Kulturen nur Hopfen und Kartoffeln aufgeführt sind. Die Verordnung trat nie für das gesamte Reichsgebiet in Kraft, sondern nur in den Ländern, die zuvor keine „Anordnung zur Bekämpfung von Obstbaumschädlingen und zum Schutz der Bienen“ erlassen hatten.

Mit der Zunahme der Entwicklung chemischer Pflanzenschutzmittel in den 30er Jahren gewann der Bienenschutz immer größere Bedeutung, da sich die Berichte über umfangreiche Bienenverluste als Folge der Anwendung bienengefährlicher Pflanzenschutzmittel mehrten. So wurde im Jahre 1934 aus dem Bereich der Landwirtschaftskammer Münster ein Schaden an Bienenvölkern als Folge der Anwendung bienengefährlicher Mittel im Raps berichtet, für den die Versicherung des Anwenders die enorme Summe von 2000,- Reichsmark als Schadensersatz zahlen musste. Aufgrund derartiger Berichte wurde nun versucht, durch eine Verbesserung bzw. Verschärfung der Anwendungsvorschriften für bienengefährliche Mittel den Bienenschutz zu erhöhen. Voraussetzung dafür war jedoch, dass die Auswirkungen der Mittel auf Bienen vor dem In-Verkehr-bringen geprüft wurden. So erschienen in dieser Zeit zahlreiche Arbeiten aus der BRA und den Bieneninstituten der Länder, die sich mit diesem Thema beschäftigten. Es wurden Methoden zur Ermittlung der Toxizität der Mittel gegenüber Bienen entwickelt. Die Bestimmung einer „Dosis letalis minima“ wurde zum Vorläufer der heute gebräuchlichen „LD 50“. Der damalige Direktor der Bayerischen Landesanstalt für Bienenzucht in Erlangen, Prof. Dr. E. Zander, gab 1937 in seiner Veröffentlichung „Bienenzucht und Schädlingsbekämpfung“ einen Überblick über die zusammen mit der BRA erarbeiteten Maßnahmen zur Gewährleistung des Bienenschutzes bei der Durchführung von Pflanzenschutzmaßnahmen. Mit seiner damals geäußerten Forderung, durch Pflanzenschutzmittel getötete Bienen müssten in der BRA chemisch auf Rückstände untersucht werden, war er seiner Zeit weit voraus. Realisiert wurde diese Forderung erst nach 1950.

Die Zeit des 2. Weltkrieges ist gekennzeichnet durch eine Forcierung der landwirtschaftlichen Produktion verbunden mit einer Intensivierung des chemischen Pflanzenschutzes. Dies rief naturgemäß Konflikte mit der Imkerschaft hervor, auch wenn man dem Bienenschutz nach wie vor einen hohen Stellenwert einräumte. Zahlreiche Aufrufe der Pflanzenschutzdienste der Länder an die Anwender der Mittel sind ein Beleg dafür. Nach dem Ende des Krieges begann zunächst einmal eine relativ günstige Zeit für die Bienenhaltung in Deutschland. Es gab kaum Pflanzenschutzmittel und man entsann sich der großen, einfach zu habenden Produktionsleistungen der Bienen. Es gab in dieser Zeit schätzungsweise mehr als 2,5 Mio. Bienenvölker in Deutschland. Diese Zahl wurde jedoch nicht lange gehalten. Mit der Konsolidierung der politischen Situation begann sich das wirtschaftliche Leben in Deutschland wieder zu entwickeln. Es kam bald zu einem Aufblühen der chemischen Industrie, die wieder neue Pflanzenschutzmittel entwickelte. Der zunehmende Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft führte auch bald wieder zu schwerwiegenden Verlusten von Bienenvölkern. Darüber hinaus ließ das Interesse an der Bienenhaltung nach, weil wegen der Verbesserung der ökonomischen Situation Zucker wieder einfach und preiswert zu haben war und den Honig als Süßmittel zu ersetzen begann.

## Aufbau des Bienenschutzes nach dem 2. Weltkrieg

Mit der Teilung Deutschlands war auch die Zerschlagung der BRA verbunden. Nachfolgeeinrichtungen wurden in der sowjetisch besetzten Zone (später DDR), die Biologische Zentralanstalt (BZA) mit Sitz in Kleinmachnow und in den westlichen Besatzungszonen (später Bundesrepublik Deutschland), die Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA). In der DDR baute der ehemalige Leiter des bakteriologischen Laboratoriums, Dr. Borchert einen gut funktionierenden Bienenschutz auf. Dank seiner Initiative wurde bereits im Jahre 1948 – noch vor der Gründung der DDR – in der sowjetischen Besatzungszone die 1. Bienenschutzverordnung in Kraft gesetzt. Die entsprechende Verordnung der Bundesrepublik folgte 2 Jahre später im Jahre 1950. Die Initiative zum Aufbau eines effektiven Bienenschutzes im Westen erfolgte zunächst durch Prof. Dr. Koch, der in Personalunion Leiter der damaligen Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht (ehemals Reichsanstalt für Seidenbau) und des Bieneninstitutes in Celle war. Zwei Persönlichkeiten hatten am Aufbau des Bienenschutzes in der Bundesrepublik besonderen Anteil:

Dr. Joachim Evenius, ehemaliger Leiter des Bieneninstitutes in Finkenwalde bei Stettin, betrieb von Celle aus den Zusammenschluss der wissenschaftlichen Bieneninstitute zur Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung. 1949 wurde diese Arbeitsgemeinschaft in Marburg mit dem Ziel gegründet, die Bearbeitung aller wissenschaftlichen und praktischen Fragen der Bienenkunde in den Dienst der Imkerei zu stellen.

Auf Anregung von Prof. Koch beschäftigte sich in der Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht der Chemiker Dr. Karl Stute schon seit 1946 mit Verfahren zum Nachweis von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in toten Bienen und mit der Entwicklung einer standardisierten Methode zur Prüfung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen.

Durch die Tätigkeit dieser beiden Wissenschaftler wurde Celle zum Ausgangspunkt des Bienenschutzes in der Bundesrepublik Deutschland. Durch die rückstandsanalytischen Arbeiten von Stute an toten Bienen wurde erstmals eine Möglichkeit eröffnet, die Verursachung von Schäden an Bienenvölkern durch Pflanzenschutzmittel exakt nachzuweisen. In der Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht entwickelte sich dadurch die erste Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen. Nach dem Inkrafttreten der Bienenschutzverordnung im Jahre 1950 veröffentlichte Stute im Jahre 1953 die erste Fassung einer „Richtlinie für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienengefährlichkeit“, mit deren Hilfe nunmehr die zur Umsetzung der Bestimmungen der Verordnung erforderliche Differenzierung der Pflanzenschutzmittel hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf Bienen vorgenommen werden konnte. Dank der Vorarbeiten von Evenius beteiligten sich die meisten der in der Arbeitsgemeinschaft zusammengeschlossenen Institute an den Pflanzenschutzmittelprüfungen. Die Ergebnisse der Prüfungen wurden im „Arbeitskreis für die Beurteilung der Einwirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Bienen“ (später Fachgruppe „Bienenschutz“ des Sachverständigenausschusses für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln) diskutiert und bewertet.

An den Sitzungen des Arbeitskreises, dessen erster Obmann Prof. Koch war, nahmen als Vertreter der BBA Dr. Zeumer (Leiter der Abteilung für Pflanzenschutzmittel und -geräte) und Dr. Steiner sowie später Dr. Herfs als Leiter des Laboratoriums für Zoologische Mittelprüfung zunächst als Gäste teil. Das Pflanzenschutzgesetz vom 10.05.1968 regelte das Verfahren der Prüfung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln neu. An die Stelle des bisherigen Anerkennungsverfahrens trat nunmehr eine Zulassung zum Vertrieb der Pflanzenschutzmittel. Das bisherige Prüfverfahren zur Auswirkung auf Bienen wurde grundsätzlich beibehalten, jedoch stellte nunmehr die BBA die Prüfpläne zusammen, die zur praktischen Durchführung und Verteilung der einzelnen Prüfungen auf die Prüfstellen an Dr. Stute in der Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht in Celle verschickt wurden. Im Jahre 1976 wurde die Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht als Institut in die Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig-Völkenrode eingegliedert. Mit dem Eintritt von Dr. Stute in den Ruhestand im gleichen Jahr wurde der Arbeitsbereich Bienenschutz, d. h. die Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen und die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienengefährlichkeit an die BBA nach

Braunschweig in das Laboratorium für zoologische Mittelprüfung verlegt und das im Arbeitsbereich Bienenschutz tätige Personal nach Braunschweig versetzt. Der Arbeitsbereich Bienenschutz wurde von da an mit zwei kurzen Unterbrechungen vom Verfasser wahrgenommen.

## Untersuchungen von Bienengiftungen

Seit Installierung der Untersuchungsstelle für Bienengiftungen durch Dr. Stute wurden die jährlich gemeldeten Schäden an Bienenvölkern aufgezeichnet. Den Aufzeichnungen ist zu entnehmen, dass die überwiegende Anzahl der Schäden in nur wenigen Kulturen entstand. So wurde in den 50er und 60er Jahren die meisten Schäden nach Angaben der Imker auf eine Mittelanwendung im Obstbau zurückgeführt. Aber auch die Bekämpfung von tierischen Schädlingen in Raps, Spargel und Kleingärten führte regional zu bedeutenden Bienenverlusten. Seit Beginn der 70er Jahre nahmen die Bienenschäden in den Weinbaugebieten, vor allem aber in Baden, deutlich zu. Ursache für die Entstehung dieser Bienenverluste war die intensive Anwendung von Herbiziden in den Rebanlagen, durch die den Bienen jegliche attraktive Tracht entzogen wurde. Die Bienen waren nun gezwungen, die für sie eigentlich unattraktive Reblüte zu befliegen. Da die Ansicht weit verbreitet war, die Rebe werde von Bienen nicht befliegen, wurden in den Weinbaugebieten die Rebschädlinge auch zur Blütezeit mit bienengefährlichen Mitteln bekämpft. Der am intensivsten eingesetzte Wirkstoff Carbaryl bewirkte die zahlreichen Bienenschäden vor allem aufgrund seiner ausgeprägten Fraßgiftwirkung. Der Wirkstoff wurde mit dem kontaminierten Rebpollen in die Völker eingetragen und dort an Jungbienen und Brut verfüttert. Unglücklicherweise konnte der Wirkstoff Carbaryl, mit den damals zur Verfügung stehenden Analysemethoden in toten Bienen nur schwer nachgewiesen werden. Die Serie schwerster Bienenschäden in den Weinbaugebieten konnte erst dadurch beendet werden, dass Dr. G. Vorwohl (später Leiter der Landesanstalt für Bienenkunde in Stuttgart-Hohenheim) nach intensiven Beobachtungen den Beflug der Reblüte durch Bienen belegen konnte und, weil 1978 die ersten chemischen Nachweise für den Wirkstoff Carbaryl in toten Bienen gelangen.

Im Jahre 1974 erreichten die Schadensfälle mit 467 gemeldeten Schäden ihren Höhepunkt. Nicht alle gemeldeten Schäden wurden jedoch von den Imkern auf die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in landwirtschaftlichen Kulturen zurückgeführt. In etwa 25% der Fälle wurde von den Geschädigten als Schadensursache Frevel, d. h. mutwillige Vergiftung z. B. bei Nachbarschaftsstreitigkeiten angegeben und in ebenso viel Fällen wurden keine Angaben zur Schadensursache gemacht. Dieser prozentuale Anteil an der Gesamtsumme der gemeldeten Schäden ist bis heute etwa gleich geblieben.

Bei der Klärung der Schadensursachen bewährte sich von Anfang an die enge Zusammenarbeit zwischen der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, der Untersuchungsstelle für Bienengiftungen und den Pflanzenschutzdiensten der Länder. So wurden bestimmte Fragen im Zusammenhang mit Bienengiftungen zur Bearbeitung an einzelne Wissenschaftler der Arbeitsgemeinschaft vergeben. Beispielsweise untersuchte Prof. Dr. Wahl (Marburg) den Zusammenhang zwischen Ernährungsstatus der Bienen und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Pflanzenschutzmitteln. Prof. Dr. Steche (Hohenheim) arbeitete über den Einfluss von *Nosema apis* Zander auf die Entstehung von Bienenschäden durch Pflanzenschutzmittel. Bereits im Jahre 1955 wurden als Ergebnis dieser Zusammenarbeit der Arbeitsgemeinschaft mit dem Pflanzenschutzdienst „Richtlinien für die Entnahme von toten Bienen bei Verdacht der Vergiftung durch Pflanzenschutzmittel“ in den amtlichen Pflanzenschutzbestimmungen herausgegeben. (Amtl. Pflanzenschutzbest. N.F: VIII, 1, 8-11).

Die Verlegung des Arbeitsbereiches Bienenschutz von Celle nach Braunschweig brachte für die Untersuchungsstelle für Bienengiftungen eine deutliche Verbesserung der apparativen Ausstattung mit sich. Durch die Einrichtung von zwei modernen gaschromatographischen Messplätzen war es erstmals möglich, bei der Rückstandsanalyse von Pflanzenschutzmitteln modernen Anforderungen zu genügen. Die Bearbeitung der Bienenschäden aus den Weinbaugebieten war die erste Bewährungsprobe dafür.

Das in der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen tätige Personal (1 Chemikerin und 1 technische Assistentin) wurde aufgrund einer Übereinkunft zwischen allen Bundesländern und dem Deutschen Imkerbund von diesen nach einem bestimmten Schlüssel bezahlt. Das Eintreiben der Gelder durch die BBA war ein jährlich wiederkehrendes, unerquickliches Ritual. Immer wieder weigerten sich einzelne Länder aus unterschiedlichen Gründen, die von ihnen gemäß der Vereinbarung zu zahlende Summe zu überweisen. Mitte der 80er Jahre bot sich mit der Novellierung des Pflanzenschutzgesetzes die Gelegenheit, dem unerfreulichen Gezerre um die Finanzierung der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen ein Ende zu machen. Auf Vorschlag des damaligen Präsidenten der BBA, Prof. Dr. G. Schuhmann, wurden die Untersuchungen von Bienenvergiftungen durch (zugelassene) Pflanzenschutzmittel 1986 als zusätzliche Aufgabe für die BBA unter § 33 Abs. 2 Nr. 8 in das neu gefasste Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen aufgenommen. Seit dem Inkrafttreten sind die Untersuchungen von Bienenvergiftungen Aufgabe der BBA. Das ehemals aus Ländermitteln bezahlte Personal wurde in den Bundesdienst übernommen. Nach der Übernahme der Aufgabe war erstmals eine räumliche Trennung der beiden in der Untersuchungsstelle durchgeführten Untersuchungsabläufe der biologischen und chemischen Untersuchungen erforderlich, weil die bisher in der Untersuchungsstelle tätige Chemikerin, Frau Dr. I. Kaufmann, in den Ruhestand trat. Die biologischen Untersuchungen (Aedes-Test, Pollenanalyse, Krankheitsuntersuchungen) sowie die Gesamtleitung für alle Untersuchungen, einschließlich der chemischen, und die Vertretung der Untersuchungsstelle nach außen (z. B. bei Gerichtsverhandlungen zu Bienenschäden) verblieben in Braunschweig. Die chemischen Untersuchungen wurden nun an den BBA-Standort in Berlin verlagert. Eine weitere Folge der Verlagerung der chemischen Untersuchungen nach Berlin war eine deutliche Verbesserung der apparativen Ausstattung der Untersuchungsstelle. Erstmals wurde für die Durchführung der chemischen Untersuchungen ein Massenspektrometer beschafft, so dass die von da an herausgegebenen chemischen Befunde auf dem modernsten Stand der Analysetechnik erstellt werden konnten. Diese Modernisierung der Analysetechnik war erforderlich, um die Untersuchungsbefunde im Hinblick auf eine gutachterliche Verwendung vor Gericht abzusichern.

Die Vereinigung der beiden Aufgaben - Untersuchung von Bienenvergiftungen durch Pflanzenschutzmittel und Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen - in einer Institution war für den praktischen Bienenschutz von besonderer Bedeutung. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit die durch die Zulassung ausgesprochenen Einstufungen der Mittel hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf Bienen bei deren praktischer Anwendung auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. So ergab sich verschiedene Male aufgrund der chemischen Untersuchungsbefunde die Notwendigkeit, die in der Zulassung ausgesprochene Einstufung von Mitteln im Hinblick auf die Auswirkungen auf Bienen zu ändern:

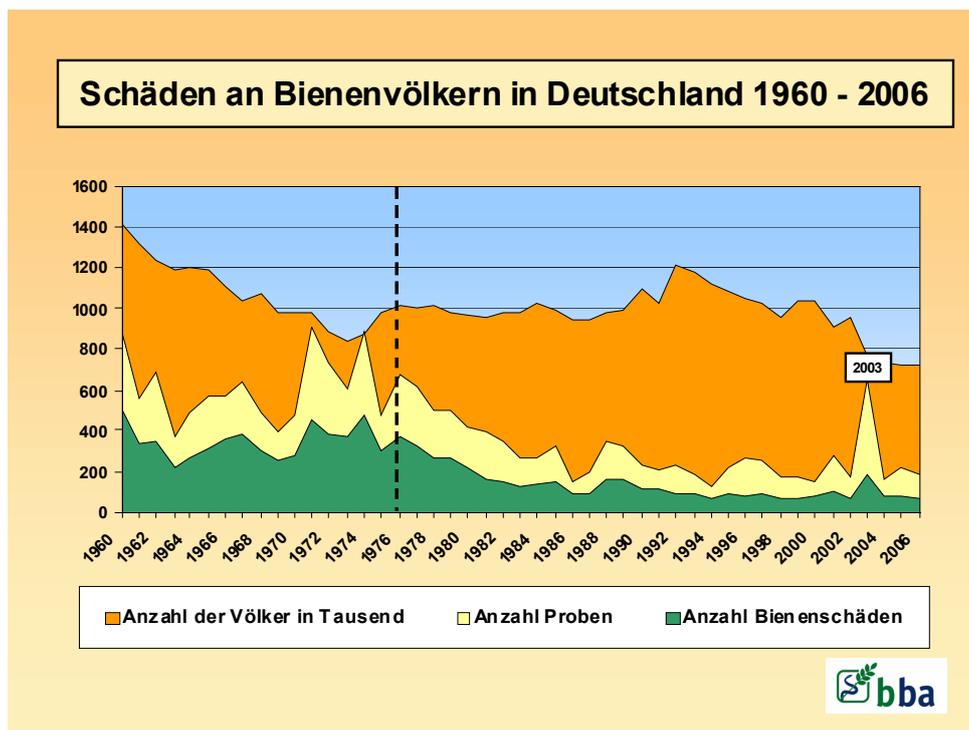
Ende der 70er Jahre wurden sämtliche bienengefährlichen Präparate, die für die Anwendung abends nach dem täglichen Bienenflug in blühenden Kulturen vorgesehen waren, erneut auf Bienengefährlichkeit überprüft, weil die Wirkstoffe dieser Präparate sehr häufig im Zusammenhang mit Bienenvergiftungen nachgewiesen wurden. Die Überprüfung ergab, dass die meisten Präparate aus dieser Indikation gestrichen werden mussten und als bienengefährlich eingestuft wurden.

Ebenfalls Ende der 70er Jahre wurde aufgrund der chemischen Untersuchungen festgestellt, dass Carbaryl-haltige Insektizide die massiven Bienenschäden in den Weinbaugebieten bewirkten (s.o.). Der Wirkstoff wurde daraufhin in die Anlage 1 der Pflanzenschutzmittel-Anwendungsverordnung aufgenommen. Seine Anwendung ist seither verboten.

Mitte der 80er Jahre wurden aus Hessen und Nordrhein-Westfalen massive Bienenvergiftungen durch die Anwendung bienengefährlicher Pflanzenschutzmittel im Getreideanbau gemeldet. Die Mittel waren zur Bekämpfung von starkem Blattlausbefall angewendet worden. Bei der Bekämpfung wurden umfangreiche Honigtauvorkommen kontaminiert, die von Bienen befliegen wurden. Die Diskussion um die Entstehung der Schäden führte 1992 zu einer Änderung der Bienenschutzverordnung und der Einführung des Honigtaus als schützenswerte Trachtquelle in die Verordnung.

Im Jahre 1989 wurden die ersten Pyrethroide nach intensiven Prüfungen als nicht bienengefährlich eingestuft. Die Präparate wurden praxisüblich in Mischung mit Fungiziden aus der Gruppe der Ergosterol-Biosynthese-Hemmer (Azole) ausgebracht. Derartige Mischungen führten bei Anwendungen in blühenden Kulturen zu Bienenschäden, die durch die chemischen Nachweise in Verbindung mit der Pollenanalyse belegt werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Prüfung der in Diskussion stehenden Tankmischungen eingeleitet, die im Ergebnis dazu führte, dass derartige Mischungen in blühenden Kulturen nur noch abends nach dem täglichen Bienenflug angewendet werden dürfen.

Der Wirkstoff Imidacloprid wird seit Mitte der 90er Jahre von Imkern verdächtigt, in zahlreichen Ländern der Erde umfangreiche Verluste von Bienenvölkern zu verursachen. Da auch in Deutschland Imidacloprid-haltige Pflanzenschutzmittel zugelassen sind, wurde auch von deutschen Imkern diese Behauptung vertreten. Hierdurch veranlasst wurden seit 1998 sämtliche Proben, bei denen die Möglichkeit einer Kontamination durch den Wirkstoff Imidacloprid angenommen werden konnte, gezielt auf Rückstände des Wirkstoffes untersucht. Bislang konnte der Wirkstoff jedoch trotz aller Bemühungen in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden, so dass damit jeglicher Beweis für die angebliche Verursachung von Bienenverlusten durch den Wirkstoff Imidacloprid fehlt. Die chemischen Untersuchungsergebnisse haben in diesem Falle also die bestehende Einstufung der Imidacloprid-haltigen Saatgutbehandlungsmittel zur Auswirkung auf Bienen - Aufgrund der durch die Zulassung festgelegten Anwendung des Mittels werden Bienen nicht gefährdet (B3) - bestätigt.



**Abbildung** Anzahl der gemeldeten Bienenschäden zwischen 1960 und 2006.

Durch die aufgeführten Beispiele wird die wechselseitige Beeinflussung der Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen im Zulassungsverfahren und die Untersuchung von Vergiftungsfällen deutlich belegt. Dies hat neben anderen Einflussfaktoren dazu geführt, dass die Anzahl der gemeldeten Schäden in den vergangenen 30 Jahren deutlich zurückgegangen ist. (Abbildung) Während im Jahre 1976 noch 363 Schadensfälle gemeldet wurden, so liegt seit 1992 die Zahl der gemeldeten Schäden jährlich unter 100. Einzige Ausnahme war das Jahr 2003, in dem insgesamt 178 Schadensfälle gemeldet wurden. Die Schäden dieses Jahres, die hauptsächlich in den niedersächsischen Kartoffelanbaugebieten entstanden, waren jedoch auf das unglückliche Zusammentreffen mehrerer widriger Faktoren zurückzuführen: Langanhaltende, hohe Temperaturen und fehlende Niederschläge hatten im Hochsommer jegliche Blütentracht für die Bienen versiegen lassen. Gleichzeitig war es in den

Speisekartoffelbeständen zu einer explosionsartigen Vermehrung der Blattlauspopulationen gekommen. Dadurch waren in den Kartoffelbeständen große Honigtauvorkommen entstanden, die nun von den Bienen anstelle der Blütentracht genutzt wurden. Landwirte, die wegen des starken Blattlausbefalls ihre Kartoffelernte in Gefahr sahen, behandelten ihre Bestände mit bienengefährlichen Insektiziden und bewirkten so zahlreiche Bienenvergiftungen. Durch eine intensive Beratungstätigkeit des amtlichen Pflanzenschutzdienstes konnten derartige Vergiftungsfälle in den folgenden Jahren weitgehend vermieden werden.

Bedingt durch die wechselnden Schwerpunkte der Schadensursachen von Vergiftungsfällen ergibt deren Verteilung auf die Bundesländer kein homogenes Bild. (Tabelle) Doch hängt die Anzahl der aus den einzelnen Ländern gemeldeten Schäden nicht nur davon ab, mit welcher die Bienen gefährdenden Situation im Pflanzenschutz die Bienenvölker konfrontiert sind, sondern sie ist auch bedingt durch die jeweilige Versicherungssituation für die Imker der einzelnen Landesimkerverbände. So sind z. B. in bestimmten Landesverbänden die so genannten „Stäubeschäden“ (d. h. Schäden durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln) nicht mehr versichert. Diese Tatsache beeinflusst das Verhalten der von einem Schadensfall betroffenen Imker. Immer wieder wird berichtet, dass tatsächlich entstandene Vergiftungsfälle nicht an die Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen gemeldet werden. Dies ist deshalb bedauerlich, weil dadurch kein vollständiges Bild der tatsächlich in Deutschland aufgetretenen Schäden entstehen kann.

Den Übersichten zur Verteilung der Schäden auf die Bundesländer (Schäden von 1971-1989 und Schäden von 1990-2006) ist zu entnehmen, dass sich die lokalen Schwerpunkte der Schadensentstehung verlagern. So sind in der Zeit zwischen 1971 und 1989 die meisten Schäden in Baden-Württemberg entstanden, gefolgt von Bayern und Niedersachsen. Der Tabelle 1971-1989 ist zu entnehmen, dass für Bayern in den Jahren 1982-1986 keine Schadensmeldungen angegeben sind. In diesen Jahren war Bayern aus der Finanzierungsgemeinschaft der Untersuchungsstelle ausgetreten und hat die entstandenen Vergiftungsfälle von einem privaten Untersuchungslabor bearbeiten lassen. In der Zeit zwischen 1990 und 2006 nehmen die Schäden in Niedersachsen vor allem gegen Ende der Periode deutlich zu. Während die hohen Schadenszahlen zu Beginn der 70er Jahre in Niedersachsen in den Obstbaugebieten des Alten Landes entstanden waren, sind die erhöhten Schadensmeldungen zwischen 2003 und 2006 durch die o. g. Anwendungen von Insektiziden in Speisekartoffeln bedingt. Auch wenn die tabellarischen Übersichten kein vollständiges Bild über die tatsächlich entstandenen Schäden geben, weil aus unterschiedlichen Gründen nicht alle Schäden gemeldet werden und weil häufig von den Imkern keine Angaben zur Schadensursache gemacht werden, so ist doch festzustellen, dass die Gesamtzahl der gemeldeten Schäden deutlich zurückgegangen ist im Vergleich zur Zeit der Übernahme der Untersuchungsstelle durch die BBA im Jahre 1976. Es ist kaum anzunehmen, dass die Zahl der Schäden noch deutlich gesenkt werden kann. Diese Tatsache stimmt überein mit entsprechenden Feststellungen vom Central Science Laboratory (CSL), der englischen Schwestereinrichtung der BBA in York.

#### **Verteilung der Bienenschäden auf Bundesländer von 1971 bis 1979**

	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979
Baden-Württemberg	192	137	105	134	77	143	118	63	69
Niedersachsen	65	42	46	78	52	35	50	43	45
Bayern	41	60	53	65	45	64	54	50	57
Nordrhein-Westfalen	59	40	42	69	40	48	43	39	26
Hessen	27	30	53	43	30	26	17	28	30
Rheinland-Pfalz	33	44	32	50	26	24	14	16	16
Schleswig-Holstein	20	15	18	15	19	10	16	17	14
Saarland	6	6	7	5	0	3	8	3	2
Hamburg	3	7	4	5	3	4	2	3	2
Bremen	1	4	1	2	1	2	1	0	1
Berlin	0	1	3	1	2	4	1	2	2
<b>gesamt</b>	<b>447</b>	<b>386</b>	<b>364</b>	<b>467</b>	<b>295</b>	<b>363</b>	<b>324</b>	<b>264</b>	<b>264</b>

**Verteilung der Bienenschäden auf Bundesländer von 1980 bis 1989**

	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989
Baden-Württemberg	50	42	52	44	51	43	24	22	31	51
Niedersachsen	36	31	35	31	28	37	21	18	29	23
Bayern	46	15	0	0	0	0	0	2	47	28
Nordrhein-Westfalen	26	26	24	13	29	18	6	23	15	14
Hessen	18	20	11	12	11	19	9	11	14	19
Rheinland-Pfalz	26	9	12	5	12	19	12	7	14	9
Schleswig-Holstein	18	3	4	12	3	7	10	6	11	15
Saarland	3	1	0	3	0	4	1	0	2	0
Hamburg	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Bremen	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Berlin	0	3	0	4	1	2	0	0	1	0
<b>gesamt</b>	<b>223</b>	<b>151</b>	<b>139</b>	<b>125</b>	<b>135</b>	<b>150</b>	<b>83</b>	<b>91</b>	<b>165</b>	<b>160</b>

**Verteilung der Bienenschäden auf Bundesländer von 1990 bis 1997**

	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Baden-Württemberg	31	22	22	26	26	13	24	26
Niedersachsen	17	23	11	12	16	12	17	7
Bayern	32	20	21	12	9	9	6	22
Nordrhein-Westfalen	5	20	9	4	6	3	8	15
Hessen	8	8	7	6	6	4	4	4
Rheinland-Pfalz	9	2	6	9	6	7	4	3
Schleswig-Holstein	8	12	6	1	7	2	7	5
Saarland	2	0	1	1	0	0	0	0
Hamburg	1	4	2	1	1	0	0	0
Bremen	0	0	0	0	0	0	0	1
Berlin	1	0	0	2	0	0	0	0
Brandenburg	0	1	3	1	2	1	3	0
Mecklenburg-Vorpom.	0	0	1	3	3	1	2	0
Sachsen	0	1	2	2	2	4	1	3
Sachsen-Anhalt	0	0	2	0	4	1	2	2
Thüringen	0	0	0	2	1	1	2	5
<b>gesamt</b>	<b>114</b>	<b>113</b>	<b>93</b>	<b>82</b>	<b>89</b>	<b>58</b>	<b>80</b>	<b>93</b>

**Verteilung der Bienenschäden auf Bundesländer von 1998 bis 2006**

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Baden-Württemberg	12	17	10	7	11	5	7	6	5
Niedersachsen	10	15	16	15	9	133	16	23	24
Bayern	11	12	18	14	12	3	6	9	10
Nordrhein-Westfalen	5	6	5	8	8	12	8	3	6
Hessen	6	1	2	1	3	6	5	5	4
Rheinland-Pfalz	5	4	2	5	2	1	2	4	3
Schleswig-Holstein	2	6	5	1	1	3	4	2	1
Saarland	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Hamburg	0		0						
Bremen	0		0						
Berlin	0		0						
Brandenburg	3	2	8	6	4	1	2	8	2
Mecklenburg-Vorpom.	4	4	2	3	4	3	3	5	2
Sachsen	5	2	5	4	2	8	4	2	7
Sachsen-Anhalt	2	1	6	4	6	2	5	5	4
Thüringen	3	2	1	7	3	1	3	4	4
<b>gesamt</b>	<b>68</b>	<b>72</b>	<b>80</b>	<b>75</b>	<b>65</b>	<b>178</b>	<b>67</b>	<b>77</b>	<b>72</b>

Ein großer Schwachpunkt im Hinblick auf die Zuordnung von Bienenschäden im Hinblick auf ihre Entstehung ist die Probenahme. Obwohl bereits seit 1979 in den amtlichen Pflanzenschutzbestimmungen die unter Beteiligung von Vertretern der Imkerschaft und des Pflanzenschutzdienstes erarbeiteten „Richtlinien zur Entnahme von Bienen- und Pflanzenproben bei Verdacht der Vergiftung von Bienen durch Pflanzenbehandlungsmitteln“ die Einbindung eines Vertreters des Pflanzenschutzdienstes bei der Probenahme vorgesehen ist, wird diese nur selten praktiziert. Dies wäre aber im Hinblick auf eine Verifizierung der Anzahl der tatsächlich durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln entstandenen Schäden an Bienenvölkern erforderlich.

Der Schutz der Honigbiene hat in den letzten Jahren eine erhebliche Politisierung erfahren. Verluste von Bienenvölkern finden immer häufiger Beachtung in den Massenmedien. Wobei regelmäßig auch ohne beweisbare Begründung Schuldzuweisungen gegenüber dem chemischen Pflanzenschutz erfolgen. Die von der Presse veröffentlichten Zahlen zu Völkerverlusten sind häufig sensationsbedingt aufgebauscht und an Einzelfällen festgemachte Verlustquoten werden unzulässigerweise auf eine fiktive Gesamtsituation übertragen. Die durch eine mangelhafte Völkerführung oder eine unzureichende Krankheitsbekämpfung entstandenen Probleme der Imkerei finden in der Regel keine Beachtung.

So wurden in der jüngsten Vergangenheit wahrscheinlich durch den Import von Königinnen aus anderen Kontinenten in Europa bisher unbekannte Bienenkrankheiten (*Nosema ceranae*, Kaschmirvirus) und Parasiten eingeschleppt. Schließlich wurde auch die Varroamilbe als derzeitig noch immer bedeutendste Bedrohung unserer Bienenvölker aus Asien erst im Jahre 1976 eingeschleppt. Welchen Einfluss die neuen Krankheiten bei der Entstehung von Schäden an Bienenvölkern durch Pflanzenschutzmittel haben, ist weitgehend unbekannt.

Dem Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren beim Auftreten außergewöhnlich hoher Völkerverluste muss in Zukunft mehr Beachtung geschenkt werden. Diesem Ziel dient unter anderem ein zur Zeit von den wissenschaftlichen Bieneninstituten der Länder durchgeführtes Monitoring-Programm.

Probleme des Bienenschutzes in Deutschland treten in den letzten Jahren meistens auch zeitgleich in anderen europäischen Ländern auf. Es ist deshalb zu begrüßen, dass verstärkt auch auf internationaler Ebene nach Lösungen gesucht wird. So werden z. B. in der Europäischen Gemeinschaft seit 1992 die Prüfungen zur Auswirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen nach einer von der International Commission for Plant-Bee Relationships (ICP-BR) entwickelten Prüfrichtlinie durchgeführt, die in den Richtlinienkatalog der European Plant Protection Organization (EPPO) Eingang gefunden hat.

Die Entwicklung weiterer spezieller Bienenprüfrichtlinien in der ICP-BR und OECD ist begonnen worden. Auch die Harmonisierung der Methoden zur Untersuchung von Schäden an Bienenvölkern durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln wurde durch eine Arbeitsgruppe der ICP-BR in Angriff genommen. Die jahrelangen deutschen Erfahrungen auf dem Gebiet des Bienenschutzes sind bei diesen Entwicklungen eine große Hilfe.

## Literatur

ANONYM (1901): Denkschrift über die Begründung und über die bisherige Tätigkeit der biologischen Abteilung für Land- und Forstwirtschaft im Kaiserlichen Gesundheitsamte. Verordnung über die Anwendung bienengefährlicher Pflanzenschutzmittel (Bienenschutzverordnung) vom 22. Juli 1902, BGBe. I S. 1410.

BÖTTCHER, F.K. (1937): Die Wirkung der chemischen Schädlingsbekämpfung auf die Bienenzucht. Anzeiger für Schädlingskunde 10, 121-126.

BORCHERT, A. (1929): Über die Giftigkeit einiger Pflanzenschutzmittel (Arsenpräparate und Fluornatrium) für die Bienen. Archiv für Bienenkunde 10, 1, 1-33.

GÖTZE, G. (1929): Inwieweit wird die Bienenzucht durch die Verwendung zuckerhaltiger Pflanzenschutzmittel gefährdet? Anzeiger für Schädlingskunde 5, 73-75.

- HERFS, W. (1972): Bienengefährliche Pflanzenschutzmittel, Prüfung und Zulassung nach dem Pflanzenschutzgesetz. Allgemeine deutsche Imkerzeitung 6, 4, 1-7.
- HILGENDORFF, G., BORCHERT A. (1926): Über die Empfindlichkeit der Bienen gegen Arsenstäubemittel. Anzeiger für Schädlingskunde 6, 37-38.
- MAABEN, A. (1909): Über die unter dem Namen „Faulbrut“ bekannten seuchenhaften Bruterkrankungen der Honigbiene. Parey, Berlin.
- MAABEN, A.: Tätigkeitsberichte des bakteriologischen Laboratoriums der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft in Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft der Jahre 1905, 1906, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1914/15, 1916, 1918.
- PRELL, H. (1934): Über die Dosisletalminima des Arsens für Bienen. Zeitschrift f. Pflanzenkrankheiten 10 (3) 25-36.
- SCHLUMMBERGER, O. (1949): 50 Jahre Deutsche Pflanzenschutzforschung. Festschrift zum 50-jährigen Bestehen der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- SPRENGEL, C.K. (1793): Das entdeckte Geheimnis der Natur und in der Befruchtung der Blumen. Vieweg, Berlin.
- SPRENGEL, C.K. (1811): Die Nützlichkeit der Bienen und die Notwendigkeit der Bienezucht, von einer neuen Seite dargestellt. Vieweg, Berlin.
- STUTE, K. (1957): Möglichkeiten des Nachweises von Insektiziden in toten Bienen. Anzeiger für Schädlingskunde 30, 7, 97-99.
- ZANDER, E. (1937): Bienezucht und Schädlingsbekämpfung. Anzeiger für Schädlingskunde 13, 28-31.

**Büchs, W.<sup>1</sup>, Raubuch, M.<sup>2</sup>, Prescher, S.<sup>1</sup>, Behr, K.<sup>2</sup>, Müller, A.<sup>1</sup>, Roose, K.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

<sup>2</sup>Universität Kassel, Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften, Fachgebiet Bodenbiologie und Pflanzenernährung, Nordbahnhofstr. 1a, 37213 Witzenhausen, Germany

## **Impact of *Ostrinia*-resistant *Bt*-maize on microbial and invertebrate decomposer communities in field soils\***

### **Introduction**

In laboratory trials, *Bt*-toxin was detected in root exudates of *Bt*-maize (Saxena et al., 1999). Furthermore, it was proved that *Bt*-toxins remain active as an insecticide in the soil for a longer time depending on pH and content of clay minerals (Tapp & Stotzky, 1998). Within a nation-wide research cluster on corn borer-resistant *Bt*-maize in Germany, Tebbe & Baumgarte (2004) showed that maize stubbles (root material) still contain about 10% of the *Bt*-toxin of green plants even six months after harvest, in the next spring. These values exceed the *Bt*-toxin content in free soil 1000-fold. Because toxins from transgenic plants can be released into the soil for a considerable longer period as conventional pesticides or *Bt*-toxins from conventional microbial *Bt*-formulations, their potential risk for non-target organisms is considerably higher. Furthermore, the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* belongs to the Lepidoptera-specific pathotype A, but also shows some minor efficacy as pathotype B, which acts against Nematocera. Therefore, the investigation of effects of *Bt*-maize, transformed with genes from *B.t. kurstaki*, on saprophagous Diptera is particularly justified. Most of these belong to the family of fungus gnats (Sciaridae). They live in the upper layers of field soils and are hatching in rates of up to 8000 ind./m<sup>2</sup>. The importance of microorganisms in soils is obvious, as they are responsible for about 90% of the carbon turnover. Microorganisms in the soil are directly linked to saprophagous Diptera as the latter feed on plant material pre-decomposed by microorganisms. They take part in the primary and secondary decomposition of decaying plant materials (e.g. harvest residues).

### **Methods**

Field and laboratory experiments were conducted in Germany with two transgenic corn borer-resistant-*Bt*-maize varieties ("Novelis", transformation event Mon810 and Valmont, transformation event *Bt* 176) and the two corresponding conventional isolines ("Nobilis" and "Prelude"). Furthermore, a "Nobilis + insecticide" (Pyrethroid) treatment as a conventional method to control the corn borer was included as well as the variety „Eurostar“ used in commercial production for many years. As decomposers, microbial communities and larvae of saprophagous Diptera were investigated. The field experiment near Halle/Sachsen-Anhalt ran over three growing periods (April 2001 - April 2004), each treatment with six replicates. On a 27 ha field 54 plots with a size of 67,5m x 54,0m were installed.

### **Sciarid feeding trial**

For feeding trials under defined conditions in the lab Petri-dishes were filled with water agar and provided with a defined amount of maize plant material (slices of leaves, stems, roots or pollen). Then, a defined number of *Lycoriella castanescens*-larvae (Diptera: Sciaridae) were released. Recorded parameters included the LD<sub>50</sub>-value, the time period until pupation and until hatching, the pupation and the hatching rate. These parameters form a chronological sequence according to (life cycle) development,

---

\* This is an extended abstract of results. Details will be published elsewhere.

which is crucial when assessing the importance of mortality factors. For instance, if > 50% of the larvae die at the first day of the trial, even a short time period until pupation will not be able to compensate these losses. Also, if we observe a longer time period until pupation, which results in a high risk of predation, parasitism and pathogen infection, it is questionable if these losses can be compensated by a higher hatching rate. Especially for Sciaridae-larvae, which do not have a hard-shelled chitin-cover and have limited movement ability, the time period until pupation is a very important parameter for the assessment of side-effects of *Bt*-maize litter on those decomposers.

### **Tritrophic feeding trials**

Tritrophic feeding trials were conducted with *Atheta coriaria* (Coleoptera: Staphylinidae) and *Poecilus cupreus* (Coleoptera: Carabidae). The specimens were observed from hatching until pupation. As prey, larvae of *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae) were offered which were reared on maize litter from the different treatments of the field trial (Mon 810 *Bt* „Novelis“, isogen „Nobilis“ and „Nobilis“ + insecticide). Predator larvae were kept single in 50ml glass tubes filled with peat and fed ad libitum with *Bradysia*-larvae. Each treatment was conducted in 10-15 replicates. Assessments of feedings rates, morphological and weight changes, behaviour, duration of development, mortality, pupation and hatching rates were conducted every 2-3 days.

### **Toxin analysis**

The ELISA-analysis was conducted with 210 larvae of *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae), which were reared exclusively on Mon 810-*Bt*-maize litter: on agar Petri-dishes, 0,2g *Bt*-maize litter was applied of which the *Bt*-toxin-content was analysed before. After 4-5 adult fungus gnats per dish had laid eggs, hatching larvae were kept at 15 °C, at 12h day/night-simulation. If necessary, *Bt*-maize litter was added. After 4 weeks larger larvae were narcotized by CO<sub>2</sub> and stored at -80 °C. As soon as sufficient larvae were collected, the Cry1Ab-toxin content of a suspension of the larvae was analysed by a standard ELISA test.

### **Incubation experiment**

An incubation experiment in the laboratory was done in climate chambers adjusted to 15 °C. Two grams of milled plant residues (dry weight) were added to 50 g of sieved (2 mm) fresh soil in 500 ml bottles. CO<sub>2</sub> was trapped during the complete sampling periods in KOH and detected by titration (Isermeyer, 1952). Respiration intervals were adjusted depending on the activity of the soils. Microbial biomass C (carbon) was estimated by fumigation-extraction (Vance et al., 1987). Organic C in the extracts was measured as CO<sub>2</sub> by infrared absorption after combustion at 850 °C using a Dimatoc 100 automatic analyzer (Dimatec, Essen). Microbial biomass C was calculated using a conversion factor (k<sub>EC</sub> = 0.45) (Joergensen, 1996). From both, the respiration rate and the microbial biomass C is the respiration-to-microbial biomass C ratio or metabolic quotient (qCO<sub>2</sub> = µg CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> Cmik d<sup>-1</sup>) calculated (Anderson and Domsch 1985 a; 1985 b) as an indicator for physiological condition of microbial biomass. The detection of respiration rates was performed over short periods starting at daily and later at two-day, three-day and four-day intervals. Analogous to respiration measurements a second series of bottles was prepared for destructive sampling and detection of ATP and microbial biomass C.

## Results and discussion

### Sciarid feeding trial

The main food for saprophagous Diptera-larvae in maize fields are the decaying parts of leaves, stems and roots of the maize plants after harvest. After uptake of litter of the conventional maize cultivar „Eurostar“, Sciaridae-larvae needed the significantly shortest time until pupation. Even after exclusive uptake of *Bt*-176 „Valmont“-litter or of litter of the „corresponding“ isogen cultivars „Prelude“ and „Nobilis“ the Sciaridae-larvae needed significant less time until pupation compared to exclusively feeding on litter of the isogen „Nobilis + insecticide“ and particularly after feeding on Mon810 *Bt*-„Novelis“ litter. This significant delay of development indicates that the litter of the transgenic *Bt*-cultivar Mon810 has a lower food quality as the litter of the other maize cultivars, so that saprophagous Diptera-larvae need to feed more and longer on this transgenic litter, before they are able to pupate.

*Sciaridae*-larvae were fed exclusively with Mon 810-*Bt*-maize leaf and stem pieces for 4 weeks: With an initial content of 2817ng Cry1Ab-toxin in dried leaves measured by ELISA, 15,05 ng toxin (Cry1 Ab) were determined per gram fresh weight of the larvae. Although Diptera larvae take up some *Bt*-toxin, the measured value is only 0.5% of the toxin level in plant material. Still, when Sciaridae-larvae take up *Bt*-toxin, they can pass it on in the food chain. We have detected this with the predatory rove beetle *Atheta coriaria* and the ground beetle *Poecilus cupreus* who is one of the most abundant carnivorous ground beetle species in arable fields.

### Tritrophic feeding trials

The results of these feeding trials showed:

1. Both, the predatory carabid as well as rove beetle larvae consumed significantly more Sciaridae-larvae fed with Mon 810-*Bt*-maize litter than those fed with maize litter of the isogenic cultivar 'Nobilis' (in this case it was not relevant whether the litter originated from the treatment with or without insecticide application).
2. Although they consumed more, beetle larvae - fed on Sciaridae-larvae which were raised with *Bt*-toxin containing litter - needed longer till pupation than beetles which consumed Sciaridae-larvae fed on isogenic maize litter. Thus, again a delay in development was observed.

Delays in invertebrate development or a less effective use of *Bt*-containing plant material or prey as food (in respect to food quality), were reported for other predators and all levels of the food chain. For earthworms as decomposers 200 days after uptake of *Bt*-11 maize-litter a reduction of weight of 18% was recorded after uptake of conventional non-*Bt*-maize however a weight increase of 4% was observed (Zwahlen et al., 2003). For *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and for *Inachis io* (Lepidoptera: Nymphalidae) as herbivores an uptake of 5 or 10 *Bt*-176 pollen resulted in a delay of the weight increase and of the development especially of the first larval instars (Felke & Langenbruch, 2002, 2004). For the larvae of the Western corn root worm (*Diabrotica v. virgifera*) the growth rate after feeding on Mon 810-*Bt*-maize „Novelis“ was reduced compared to *Bt*-176 and an isogenic cultivar, however, the feeding rate was increased (Moeser & Vidal, 2003). We observed a similar effect here for the saprophagous Diptera-larvae with the same maize cultivar. And finally for lacewings (*Chrysoperla carnea*) as carnivorous invertebrates the development of larvae fed on *Ostrinia nubilalis*-larvae (Lepidoptera: Pyralidae) containing *Bt*-toxin was significantly delayed in comparison to the uptake of *Ostrinia*-larvae which were fed only with non-*Bt*-plants (Hilbeck et al., 1998a, b).

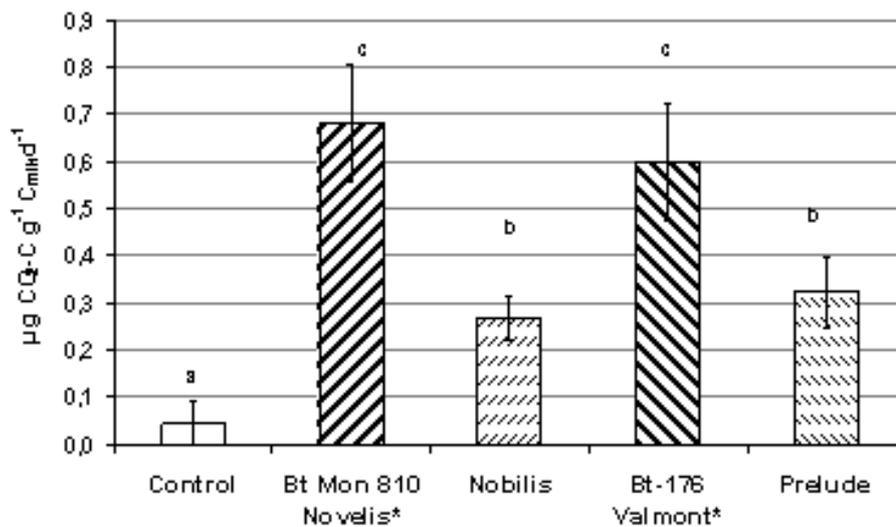
These delays of development in several taxa of different levels of the food chain, which indicate that – compared to isogenic treatments - the litter of transgenic cultivars as e.g. Mon 810 has obviously a lower quality as food in respect to energy use as the litter of the other maize cultivars. This could explain that in our experiments, saprophagous Diptera-larvae and finally their predators needed to feed more and longer on transgenic litter or *Bt*-containing prey, before they were able to pupate.

A significant reduction of the quality of food with the consequence of a delay of larval development can result in the long term - a period of 15 years continuous maize-growing on the same field, which is not unrealistic – in drastic consequences for the development of the populations of saprophagous Diptera or for herbivorous insects and their predators by a massive disturbance of the patterns of dominance and of the species communities of decomposers, herbivores and predators. It may also bring functional processes within agro-ecosystems out of balance and thus, can affect biodiversity.

### Incubation experiment

Assessing the impact of transgenic *Bt*-maize on the physiological state and activity of microbial decomposers by incubating soil with *Bt*-maize litter leads to a better understanding of food quality and energy-use issues.

The addition of maize straw stimulated both respiration and growth of microbial biomass. Both varieties of *Bt*-maize caused an increased stimulation of respiration rates between day 2 and at least day 7 after substrate addition. The maximal respiration rates at day 2 after addition of *Bt*-maize litter are significantly higher than after addition of isogenic straw. Therefore, it can be concluded that *Bt*-maize increases respiration rates. However, our data show that addition of transgenic plant residues affected the metabolic quotient significantly on a short term (fig. 1). The specific respiration pattern after addition of transgenic *Bt*-maize indicates an increased turnover rate, which is obviously not used for growth. We suggest as a probable explanation a stress situation of microbial decomposers on a short term. This interpretation is supported by the findings after 49 days of incubation.



**Fig. 1** Respiration to biomass C ratio ( $\mu\text{g CO}_2\text{-C}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{C}_{\text{mik}}\text{d}^{-1}$ ) of soil micro-organisms two days after addition of litter of two *Bt*-maize cultivars (*Bt*-Mon 810 “Novelis”; *Bt*-176 “Valmont”) and their isogenic partners (“Nobilis”; “Prelude”). In control no litter was added. (columns sharing the same letters are not significant different ( $\alpha < 0.05$  Mann/Whitney))

## Conclusions

Micro-organisms, invertebrate decomposers as well as invertebrate predators, which represent different levels of the food chain, show similar reactions to *Bt*-maize. Possibly (as it is shown for microorganisms as model organisms), *Bt*-maize consumption induces detoxification processes, which require a high input of energy but cannot be used to increase biomass. Thus, growth is reduced and – in consequence - cells are not able to synthesise as much ATP anymore. At least it reduces fitness which potentially might affect reproduction success and thus, population development. Thus, these very subtle and sublethal effects may result in risks for ecological processes and ecosystem functions particularly if *Bt*-maize is grown subsequently over many years on the same field. In respect of our results it is doubtful whether tier based test routines restricted to selected functional endpoints are able to reproduce such subtle effects.

## Abstract

Field and laboratory experiments with two transgenic *Ostrinia*-resistant-*Bt*-maize varieties ('Novelis' event Mon810 and 'Valmont' event *Bt* 176) and the two corresponding conventional isolines ('Nobilis' and 'Prelude') were conducted in Germany. As decomposers microbial communities and larvae of saprophagous Diptera were taken into consideration.

During the growth phase of soil microbial communities the addition of transgenic maize straw increased respiration rates and specific respiration ( $q\text{CO}_2$  and  $\text{CO}_2$ -to-ATP ratio) significantly compared to the addition of conventional maize straw. The energy production from respiration was twice as high in soils treated with transgenic varieties, but the energy could not be used for growth or energy store in ATP and ADP. The data indicate that the addition of maize caused a fast reaction of 'r'-strategists which are wasteful with energy and that *Bt*-maize especially caused additionally a kind of stress. It could be shown that detoxification took place.

Laboratory feeding tests with *Lycoriella castanescens* (Diptera: Sciaridae) with litter of *Bt*-Mon810 "Novelis" showed in comparison to its isogenic partner cultivar "Nobilis" and another conventional cultivar "Eurostar" a significant longer period until pupation. Additionally, trials were conducted in which Sciaridae-larvae which were raised exclusively either with *Bt*-Mon810 "Novelis" or the isogenic partner "Nobilis" (with and without insecticide treatment) and afterwards offered as prey to predacious rove beetle *Atheta coriaria* (Coleoptera: Staphylinidae) and ground beetle *Poecilus cupreus* (Coleoptera: Carabidae). Even in these trials a considerable delay of larval development of the predators could be observed when they exclusively preyed on Sciaridae-larvae which were fed with *Bt*-Mon810-"Novelis" maize-litter: Although they fed more Sciaridae-larvae raised with *Bt*-Mon 810-litter *P. cupreus*- as well as *A. coriaria* -larvae needed significant more days until they start to pupate.

It is highly striking that micro organisms, invertebrate decomposers as well as invertebrate predators which represent different levels of the food chain show very similar reactions to *Bt*-maize. Obviously (Mon810-) *Bt*-maize consumption induces detoxification procedures which require a high input of energy which however cannot be used to increase biomass so that growth is reduced and – in consequence – larval development are delayed. It is basic knowledge that in case of stress as e.g. detoxification the respiration rate of mitochondria increases and in consequence – caused by some processes in between – cells are not able to synthesise ATP anymore. At least it reduces fitness which potentially might affect reproduction success and thus population development. These possible risks of *Bt*-maize are discussed in respect to impacts on ecological processes and ecosystem functions as well as in respect to consequences for the commercial growing of *Ostrinia*-resistant *Bt*-maize and the design of test procedures.

Keywords: GMO, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bt*-maize, maize, soil microorganisms, respiration rate, decomposers, Diptera-larvae, Sciaridae, predators, ground beetles, rove beetles, Carabidae, Staphylinidae

## Acknowledgements

We cordially thank PD Dr. Christoph Tebbe, Dr. Sabine Baumgarte (FAL, Braunschweig) and Dr. U. Jehle (Dienstleistungszentrum Rheinland-Pfalz; Neustadt/Pfalz) for help in Bt-toxin-content analysis of Diptera-larvae. The research was financially supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF), no. 0312631G

## References

- ANDERSON, T.-H., DOMSCH, K.H. (1985a): Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. - *Biol Fertil Soils* 1, 81-89.
- ANDERSON, T.-H., DOMSCH, K.H. (1985b): Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. - *Soil Biol Biochem* 17, 197 -203.
- CHANDER, K.C., DYCKMANS, J., JOERGENSEN, R.G., MEYER, B., RAUBUCH, M. (2001): Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. - *Biol Fertil Soils* 34, 241-247.
- FELKE, M., LORENZ, N., LANGENBRUCH, G.A. (2002): Laboratory studies on the effects of pollen from Bt-maize on larvae of some butterfly species. – *Journal of applied entomology* 126, 320-325.
- FELKE, M., LANGENBRUCH, G.A. (2004): Untersuchungen zu subletalen Effekten geringer Pollenmengen der transgenen Maislinie *Bt-176* auf Raupen des Tagpfauenauges (*Inachis io*) und der Kohlmotte (*Plutella xylostella*). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 396, 320.
- HARDEN, T., JOERGENSEN, R.G., MEYER, B., WOLTERS, V. (1993): Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb. - *Soil Biol Biochem* 25, 1273-1276.
- HILBECK, A., BAUMGARTNER, M., FRIED, P.M., BIGLER, F. (1998a): Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27: 480-487.
- HILBECK, A., MOAR, W.J., PUSZTAI-CAREY, M., FILIPPINI, A., BIGLER, F. (1998b): Toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) using diet incorporated bioassays. *Environ. Entomol.* 27: 1255-1263.
- ISERMEYER, H. (1952): Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Carbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 56, 25-38.
- JOERGENSEN, R.G. (1996): The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the kEC value. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 25-31.
- MOESER, J., VIDAL, S (2003): Das variable Fraßverhalten des Maiswurzelbohrers. [www.dekalb.de/mais/443.htm](http://www.dekalb.de/mais/443.htm), 5pp.
- ODUM, E.P. (1969): The strategy of ecosystem development. *Science* 164, 262-270.
- PERUCCI, P., VISCHETTI, C., BATTISTONI, F. (1999): Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties and varying microcosm conditions. *Soil Biol Biochem* 31:195-204.
- SAXENA, D., STOTZKY, G. (2001): *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1225-1230.
- TAPP, H., STOTZKY, G. (1998): Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* in soil. - *Soil. Biol. Biochem.* 30: 471-476.
- TEBBE, C., BAUMGARTE, S. (2004): Nach der Ernte ist das Bt-Toxin nicht einfach verschwunden. <http://www.biosicherheit.de/aktuell/243.doku.html>

- VANCE, E.D., BROOKES, P.C., JENKINSON, D.S. (1987): An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- ZWAHLEN, C., HILBECK, A., HOWALD, R., NENTWIG, W. (2003): Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*.- *Molecular Ecology* 12 (4), 1077-1086.

**Flath, K.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Außenstelle Kleinmachnow, Stahnsdorfer Damm 81, 14532 Kleinmachnow

**Verstärkter Mehлтаubefall von Triticale erfordert Anbau resistenter Sorten**

Triticale (*xTriticosecale* Wittm.) galt lange Zeit als "Gesundfrucht", deren wirtschaftlicher Anbau sich vor allem in der geringen Krankheitsanfälligkeit begründete. Im Jahr 2004 zeigte sich erstmals eine zunehmende Anfälligkeit einiger Triticalesorten gegenüber Echtem Mehлтаub, *Blumeria graminis* DC. In den Folgejahren trat die Krankheit in vielen Regionen Deutschlands epidemisch auf. Bereits im Herbst 2006 konnte verstärkter Mehлтаubefall in vielen Triticalebeständen beobachtet werden. Die für den Mehлтаub günstigen Entwicklungsbedingungen im darauf folgenden milden Winter, führten im Frühjahr 2007 bei einigen mehltaubanfälligen Triticalesorten sogar zu Totalausfällen.

Mit Hilfe eines Infektionsversuches sollte geklärt werden, ob der auf Triticale beobachtete Befall durch Weizen- oder Roggenmehлтаub verursacht wurde, oder ob es sich hierbei um eine eigenständige Mehлтаubart handelt (Tabelle 1). Ein Blattsegmenttest mit insgesamt 56 Weizen-, Roggen- und Triticalemehлтаubisolaten aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands ergab, dass von den getesteten 61 Triticalesorten nur einige wenige von Weizen- und Roggenmehлтаub befallen wurden. Der Triticalemehлтаub konnte die Mehrzahl der Weizensorten, jedoch nur einige wenige Roggensorten befallen. Daraus lässt sich schließen, dass Triticalemehлтаub vermutlich aus Weizenmehлтаub entstanden ist, der sich speziell an diesen neuen Wirt angepasst hat.

**Tab. 1** Reaktion unterschiedlicher Getreidearten auf von Weizen-, Roggen- und Triticale isoliertem Mehлтаub (+++ Mehrzahl, + wenige, – keine der getesteten Sorten befallen)

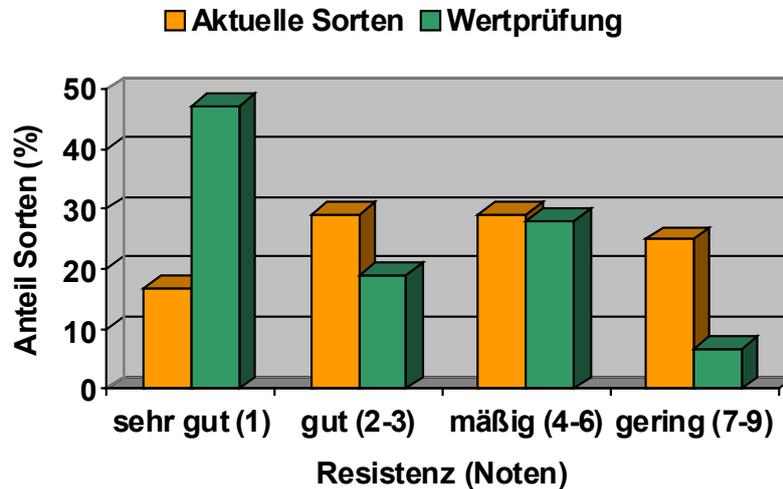
Getreideart	Mehлтаubisolate		
	Weizen (N=20)	Roggen (N=5)	Triticale (N=31)
Weizen (N=39)	+++	-	+++
Roggen (N=6)	-	+++	+
Triticale (N=61)	+	+	+++

Wie weit diese Anpassung bereits vorangeschritten ist, zeigen Feldversuche mit aktuellen Wintertriticalesorten an den Versuchsstandorten Berlin-Dahlem und Braunschweig in den Jahren 2004 bis 2006 (Tabelle 2). Unter natürlichen Infektionsbedingungen wiesen nur 9% der untersuchten 27 Sorten eine sehr gute Mehлтаuresistenz auf. In Versuchen mit künstlicher Inokulation eines Gemisches hochvirulenter Triticalemehлтаubisolate zeigte sich innerhalb nur eines Jahres eine deutliche Abnahme des Anteils mehлтаuresistenter Triticalesorten von 22% auf 10% (Boniturnote 1) bzw. von 41% auf 14% (Boniturnoten 2-3).

**Tab. 2** Prozentualer Anteil aktueller Wintertriticalesorten (N=27) mit sehr guter (Note 1), guter (Note 2-3), mäßiger (Note 4-6) und geringer (Note 7-9) Mehлтаuresistenz unter natürlichen und künstlichen Infektionsbedingungen in den Jahren 2004-2006

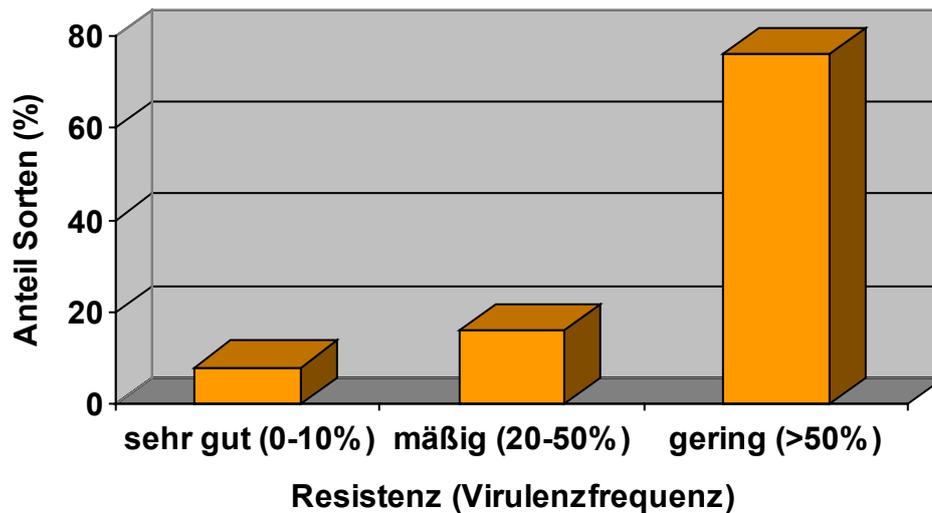
Standort	Infektion	Jahr	Anteil (%) Sorten mit Boniturnote			
			1	2-3	4-6	7-9
Braunschweig	natürlich	2004	9	32	23	36
Berlin-Dahlem	künstlich	2005	22	41	11	26
Berlin-Dahlem	künstlich	2006	10	14	52	24

Vergleichsweise wurden auch die zur Zulassung beim Bundessortenamt angemeldeten Wintertriticale Sorten des 2. und 3. Wertprüfungsjahres am Standort Berlin-Dahlem in den Jahren 2005 und 2006 mit künstlicher Mehltauinokulation im Stadium BBCH 21-23 geprüft (Abbildung 1). Im Mittel der Jahre 2005 und 2006 erwies sich der Anteil mehltauresistenter Sorten (Noten 1-3) im Wertprüfungssortiment mit 65% höher als im aktuellen Triticalesortiment (46%).



**Abb. 1** Anteil aktueller (N=27) und im Wertprüfungsverfahren stehender Wintertriticale Sorten (N=20) mit sehr guter (Note 1), guter (Note 2-3), mäßiger (Note 4-6) und geringer (Note 7-9) Mehltauresistenz unter künstlichen Infektionsbedingungen im Mittel der Jahre 2005 und 2006

Zur Bewertung rassenspezifischer (qualitativer) Resistenzeigenschaften wurden die aktuellen Wintertriticale Sorten im Blattsegmenttest (Flath, 2000) mit 31 Triticalemehltauisolaten aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands inokuliert, für 12 Tage bei 16°C inkubiert und hinsichtlich der Befallstypen bonitiert (Abbildung 2).



**Abb. 2** Anteil aktueller Wintertriticale Sorten (N=25) mit sehr guter, mäßiger und geringer Mehltauresistenz nach Inokulation mit 31 Triticalemehltauisolaten, 2005

Dabei zeigten nur die Wintertriticalesorten Vitalis und Agrano eine sehr gute Resistenz. Der überwiegende Anteil der Sorten (76%) wurde von mehr als der Hälfte der getesteten Isolate befallen und besitzt demzufolge nur eine geringe bzw. keine Mehлтаuresistenz. Das bedeutet, dass sich die Mehлтаupopulation bereits weitestgehend an die im Keimpflanzenstadium wirkenden rassenspezifischen Resistenzen der aktuellen Triticalesorten angepasst hat und nur die im Feldtest beobachteten Adultpflanzenresistenzen noch einen ausreichenden Schutz vor Mehltau bieten.

Die Entwicklung des Triticalemehltaus verdeutlicht die enorme Anpassungsfähigkeit von Pathogenpopulationen auch an neue Fruchtarten. Dies erfordert eine möglichst schnelle Reaktion auf die veränderte Befallssituation, um weiteren Schaden abzuwehren. Zur Bekämpfung des Triticalemehltaus kann in den nächsten Jahren auf den Einsatz von Fungiziden nicht mehr verzichtet werden. Ein vermehrter Fungizideinsatz könnte jedoch innerhalb weniger Jahre zur Entstehung von Fungizidresistenzen führen, wie sie bei Weizenmehltau schon seit langem beobachtet werden. Erste Befunde Strobilurin-resistenter Triticalemehltauisolate liegen bereits für Gebiete in Niedersachsen und Sachsen vor (Felsenstein, 2006). Für die Kontrolle dieses wirtschaftlich bedeutsamen Schaderregers ist demzufolge ein geeignetes Resistenzmanagement, insbesondere unter Einbeziehung der Sortenresistenz, erforderlich.

Aus diesem Grund sind sowohl eine gezielte Resistenzzüchtung, als auch die Überwachung der Virulenzsituation und der Fungizidresistenz des Erregers notwendig, wie sie für die Wirt-Pathogen-Systeme Weizen/Mehltau und Gerste/Mehltau schon seit vielen Jahren erfolgreich praktiziert werden (Felsenstein, 2007). Dies ist sowohl für die Züchtung resistenter Sorten als auch für die Beratung der landwirtschaftlichen Praxis von entscheidender Bedeutung, um das Auftreten neuer Pathotypen in den Pathogenpopulationen frühzeitig zu erkennen und die Wirksamkeit rassenspezifischer Resistenzen einzuschätzen zu können.

## Literatur

- FELSENSTEIN, F.G. (2006): Strobilurin/Qol-Resistenz des Mehltaus an Triticale in Stichproben aus verschiedenen Regionen der Bundesländer SH, NI, BB, HE, TH und BY, 2006. unveröffentlicht.
- FELSENSTEIN, F.G. (2007): Fungizidresistenz bei pilzlichen Getreidepathogenen und Wirksamkeit der vertikalen (qualitativen) Mehлтаuresistenz bei Gerste und Weizen, Situationsbericht 2006. EpiLogic GmbH Agrarbiol. Forschung und Beratung. [www.epilogic.de](http://www.epilogic.de).
- FLATH, K. (2000): Getreidemehltau. In: BARTELS, G. und G.F. BACKHAUS: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt, Teil 2. Mitt. Biol. Bundesanstalt, Land- u. Forstwirtschaft. 373, 6-8.

**Heimbach, U., Müller, A., Thieme, T.\***

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland,  
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

\*BTL Bio-Test Labor Sagerheide, 18184 Sagerheide

## **Sensitivitätsuntersuchungen an Rapsschadinsekten aus Deutschland mit Pyrethroiden**

### **Einleitung und Aufgabenstellung**

In den letzten Jahren hat die zunehmende Ausbreitung von pyrethroidresistenten Rapsglanzkäferpopulationen (Ballanger et al., 2003, 2007; Derron et al., 2004; Hansen, 2003; Wegorek & Zamojska, 2006) in Europa die Landwirtschaft vor große Bekämpfungsprobleme gestellt. Für Deutschland nahm die Bedeutung der resistenten Populationen stetig zu (Burghause & Jörg, 2005; Heimbach, 2005; Heimbach & Müller, 2006 b; Heimbach et al., 2007 a, b; Nauen, 2005; nicht veröffentlichte Daten von Nauen; Sattler, Slater; Thieme 2005, 2006, 2007). Im Jahr 2006 kam es aufgrund des Zusammentreffens mehrerer Faktoren zu einer Eskalation bei der Bekämpfung des Rapsglanzkäfers. Eine deutliche Zunahme der Resistenz in der Fläche und Intensität ging mit massiven Bekämpfungsproblemen in mehreren betroffenen Bundesländern einher, so dass es großflächig zu Totalverlusten der Pflanzenbestände und Schäden auf mehr als 200.000 ha gekommen ist. Dies führte zu einem intensiveren Monitoring der Resistenz gegenüber den ersten Untersuchungen aus 2005 (Heimbach et al., 2006a). Neben der Möglichkeit, Tierproben zur Testung an die BBA zu schicken, wurde im Rahmen des Monitoring ein Test-Kit entworfen und erstellt, das an die Pflanzenschutzdienste der Länder und andere interessierte Personen verschickt wurde. Mit diesem, auf dem Adult-Vial-Test (jetzt auch als IRAC Methode 11, (2006, verfügbar) basierenden Test-Kit, war es möglich, eine Testung von Rapsglanzkäfern direkt vor Ort vorzunehmen. Die Ergebnisse dieser Tests wurden zentral in Braunschweig gesammelt und ausgewertet. Die Daten dieser eingesandten und der selbst untersuchten Populationen geben ein umfassendes Bild der Resistenzsituation für den Rapsglanzkäfer im Jahr 2006 (Heimbach et al., 2007b).

Andere regelmäßig in den Beständen auftretende Rapsschadinsekten unterliegen einem ähnlichen Selektionsdruck wie der Rapsglanzkäfer. Erste Resistenzuntersuchungen aus dem Jahr 2005 deuten auf eine mögliche Sensitivitätsverschiebung auch bei anderen Rapsschadinsekten hin (Heimbach et al., 2006 a). Im Jahr 2006 wurden deshalb Proben unterschiedlicher Schadinsektenarten, insbesondere von *Ceutorhynchus* spp., da diese 2005 eine verringerte Sensitivität im Vergleich zu anderen Arten aufwiesen, hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Pyrethroiden untersucht.

### **Material und Methoden**

#### **Sensitivitätstests**

Die Sensitivitätstests mit eingesandten Tierproben wurden nach der bereits im Monitoring 2005 angewendeten Methode der Adult-Vial-Tests durchgeführt. Hierfür wurden Glasröhrchen einer einheitlichen Größe (Höhe 6,5 cm, Radius 1,2 cm) mit unterschiedlichen Konzentrationen des in Aceton gelösten technischen Wirkstoffs 1-Cyhalothrin (stellvertretend für die anderen 2006 in Deutschland zugelassenen Pyrethroide) beschichtet. Dazu wurden eine Aceton-Wirkstoff-Lösung der entsprechenden Konzentration in die Gläser pipettiert und diese bis zum vollständigen Verdunsten des Lösungsmittels auf einem Rollenmischer gedreht. Die fertig beschichteten Gläser wurden entweder direkt für die Sensitivitätstests verwendet oder aber für eine spätere Nutzung dunkel und kühl (5 °C) im Kühlschrank gelagert.

Für die Tests wurden bis zu 7 Aufwandmengen verwendet (siehe Tabelle 1). Diese wurden nach der für den Wirkstoff I-Cyhalothrin zugelassenen Feldaufwandmenge (7,5 g a.s./ha = 100 %) gewählt.

**Tab. 1** Verwendete Aufwandmengen des Wirkstoffes I-Cyhalothrin im Adult-Vial Testverfahren und Anteil an dem Feldaufwand von 7,5 g I-Cyhalothrin/ha

Aufwand ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	(%) Feldaufwandmenge
0,0015	2
0,0030	4
0,0150	20
0,0375	50
0,0750	100
0,3750	500
0,7500	1000

Die Anzahl der Wiederholungen jeder Aufwandmenge richtete sich nach der Verfügbarkeit der Testorganismen. Wenn möglich wurden bis zu vier Wiederholungen mit je zehn Tieren je Aufwand für die Tests angesetzt. Waren weniger Tiere vorhanden wurden die Anzahl der Wiederholungen und/oder der getesteten Aufwandmengen verringert.

Die eingeschickten Tiere wurden nach ihrem Eintreffen in Braunschweig für mindestens eine Nacht bis zu mehreren Tagen mit Rapsblättern oder Rapsblüten in der Klimakammer bei 10 °C gehältert. Für die Tests wurden nur agile und fit wirkende Tiere mit Hilfe eines Exhausters in die beschichteten Testgefäße überführt. Die Exposition der Gefäße erfolgte über 24 h in einem moderat belichteten, auf 20 °C temperierten Klimaschrank in liegender Position. Während dieses Zeitraums wurden nach einer Stunde, nach fünf und 24 Stunden Bonituren der Tiere durchgeführt. Hierbei wurden die Gläser mit den Tieren kurz geschüttelt und die anschließende motorische Reaktion der Tiere in die Kategorien „vital“, „beeinträchtigt“ und „tot“ eingeteilt. Die Anteile der Kategorien „beeinträchtigt“ und „tot“ wurden für die spätere Auswertung als Mortalität zusammengezogen. Für die Auswertung der Daten wurde keine Korrektur der Mortalitäten um den Wert der Kontrollmortalität vorgenommen. Für die Berechnung von  $LC_{50}$  und  $LC_{90}$  Werten der Proben wurde eine Probit-Analyse mit dem Programm PoloPlus 1.0 durchgeführt.

Für die Auswertung werden die berechneten prozentualen Mortalitäten nach einer Exposition der Tiere von 5 Stunden und einem Aufwand von 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  vergleichend dargestellt. Nach den Erfahrungen aus dem Monitoring 2005 (Heimbach et al., 2006a) ist dieser Wert besonders gut dazu geeignet, als „discriminating dose“ für Rapsglanzkäfer zu fungieren und damit in der Lage, sensitive von resistenten Populationen zu trennen.

2006 wurden insgesamt 105 Populationen verschiedener Rapsschadinsekten zur Untersuchung an die BBA geschickt. Von diesen 105 Populationen konnten 93 für die Sensitivitätstests im Labor verwendet werden.

Von den getesteten 93 Populationen entfallen 47 Proben auf den Rapsglanzkäfer (fast alle aus Deutschland) und 46 Proben auf die Gruppe der Rüssler und Erdflöhe (alle aus Deutschland). Die Proben stammten aus fast allen Bundesländern und geben daher einen guten Gesamteindruck für Deutschland.

### Externes Rapsglanzkäfermonitoring mit verschickten Test-Kits

Zusätzlich wurde aufgrund des erwarteten großen Probenaufkommens in 2006 für die Untersuchung zur Resistenzeinschätzung von Rapsglanzkäfern Test-Kits hergestellt und versandt, die eine Untersuchung der betroffenen Populationen direkt vor Ort ermöglichten.

Die Test-Kits für das externe Rapsglanzkäfermonitoring wurden mit lediglich vier Aufwandmengen (0,003, 0,015, 0,075 und 0,375  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin) plus Kontrollen mit je zwei Wiederholungen erstellt.

Durch diese Maßnahme konnte ein Instrumentarium zur schnellen Beurteilung der Resistenzsituation der Käfer auf den beprobten Flächen zur Verfügung gestellt werden.

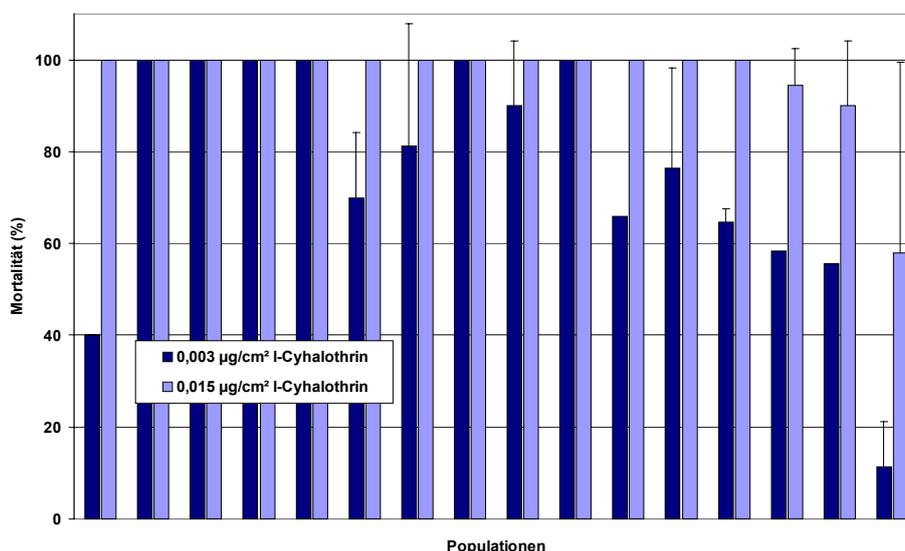
Von insgesamt 86 Test-Kits wurden 73 Boniturbögen der vor Ort durchgeführten Tests zurückgeschickt. Davon konnten 64 in der anschließenden Auswertung berücksichtigt werden. Durch die zentrale Auswertung der erhobenen Daten in der BBA ist es möglich, ein flächendeckendes Bild der Resistenzsituation des Rapsglanzkäfers für die Saison 2006 zu erstellen.

Die Kontrollmortalität bei den für Tabelle 3 verwerteten Ergebnissen aus den verschickten Test-Kits und aus den eigenen Untersuchungen lag häufig bei 0% aber nie über 10%.

## Ergebnisse des Monitoring 2006

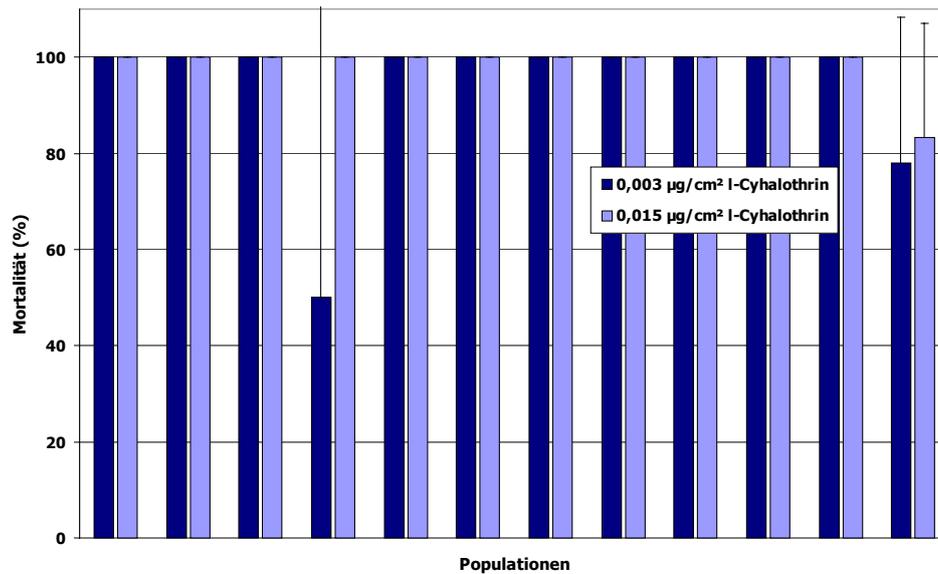
### Ergebnisse des Resistenz- Monitoring für Rapschadinsekten: Rüssler und Erdflöhe

Gefleckter Kohltriebrüssler (*Ceutorhynchus pallidactylus*): Für die 16 auswertbaren Proben der Kohltriebrüssler ist an drei Standorten eine verminderte Mortalität festzustellen, bei einer Population aus Bayern liegt die Wirkung sogar nur bei 58 % (Abbildung 1). Bei einem verminderten Aufwand von 0,003  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin zeigen sich bei 6 Proben noch 100 % Wirkung. Bei den nächst höheren Aufwandmengen (0,0375, in dem Fall aus Bayern nur 0,075 getestet) wurden jeweils 100 % Wirkung erreicht.



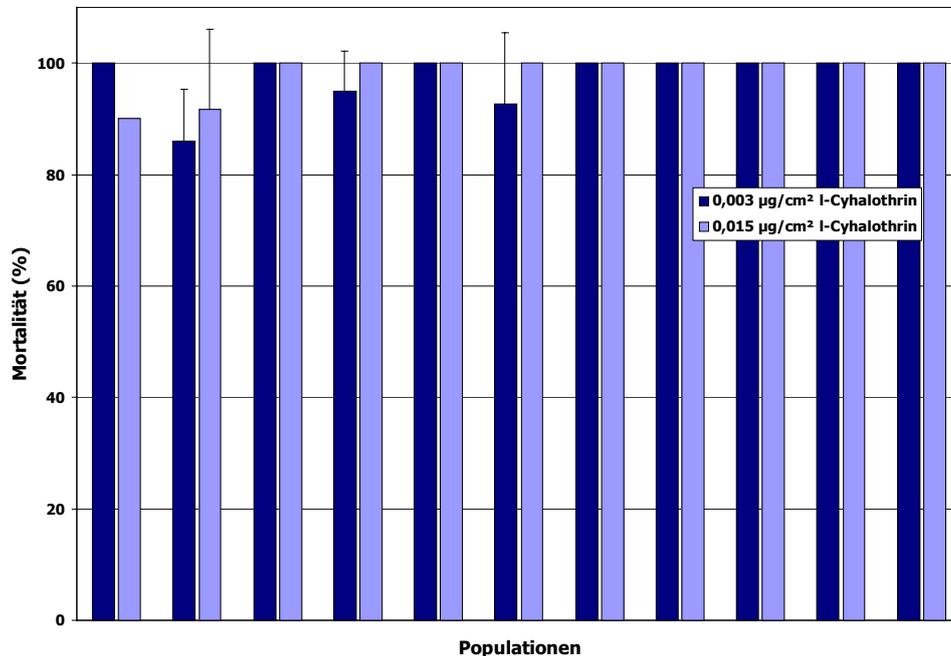
**Abb. 1** Mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) der Kohltriebrüssler 5 h nach Exposition zu 0,003 und 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin

Großer Rapsstängelrüssler (*Ceutorhynchus napi*): Von 12 auswertbaren Populationen zeigt lediglich eine Probe aus Mecklenburg-Vorpommern mit einer Mortalität von 83 % nicht die erwartete 100 %ige Mortalität nach einem Boniturzeitraum von 5 Stunden und einem Aufwand von 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin (Abbildung 2). 100 % Wirkung werden aber bei der nächst höheren Menge von 0,0375  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  erreicht. Bei einem Aufwand von 0,003  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zeigten alle Proben bis auf 2 Proben 100 % Mortalität.



**Abb. 2** Mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) der Großen Rapsstängelrüssler 5 h nach Exposition zu 0,003 und 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin

Kohlschotenrüssler (*Ceutorhynchus assimilis*): 9 von 11 Proben zeigten die erwartete Mortalität von 100 % bei 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Abbildung 3). Alle Proben wiesen beim nächst höheren Aufwand (0,0375  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine 100 %ige Mortalität im Test auf.

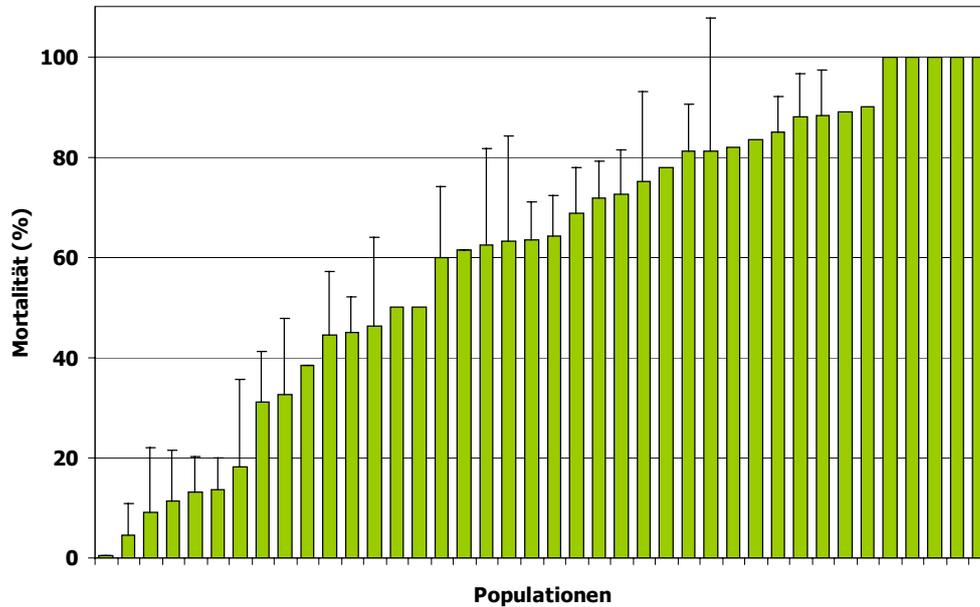


**Abb. 3** Mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) der Kohlschotenrüssler 5 h nach Exposition zu 0,003 und 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin

Kohlerdfloh (*Phyllotreta* spp.): Alle drei im Rahmen des Monitoring untersuchten Populationen zeigten 100 %ige Mortalität im Test bei 0,015  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin.

### Ergebnisse des Resistenz-Monitoring: Rapsglanzkäfer

Eigene Labordaten zum Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus*): Bei 40 auswertbaren Proben aus Deutschland zeigt sich bei Betrachtung der „discriminating dose“ von  $0,015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  nach 5 Stunden Versuchsdauer ein uneinheitliches Bild (Abbildung 4).



**Abb. 4** Mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) der Rapsglanzkäfer 5 h nach Exposition zu  $0,015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin

Lediglich 12,5 % der untersuchten Populationen aus Deutschland zeigten die für sensitive Proben erwartete Mortalität von 100 % gegenüber I-Cyhalothrin im Test. Der überwiegende Teil der übrigen Proben reagierte mit einer verminderten Mortalität, die als Anzeichen für die Existenz von resistenten Tieren innerhalb der Populationen gilt. Dabei unterscheiden sich die Resistenzniveaus der jeweiligen Proben erheblich. Dies zeigt sich auch bei den ermittelten  $LC_{50}$  Werten für die Populationen (Tabelle 2). Sensitive Populationen wie die Probe 84 (Herkunft ist ein Ökorapsfeld in der Nähe von Braunschweig) unterscheiden sich deutlich von resistenten Populationen aus Gebieten mit schon länger bekannter Resistenz wie Probe 97 (Brandenburg) und 90 (Rheinland-Pfalz). Die zugehörigen  $LC_{50}$  Werte schwanken zwischen  $0,00015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für die sensitive Probe 84 und  $0,0847 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für die resistenteste Probe 90 um einen Faktor von über 500. Der geringste  $LC_{90}$  Wert ließ sich für die Probe 107 mit  $0,0277 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  errechnen. Den höchsten  $LC_{90}$  Wert erreichte die Probe 94 mit  $0,796 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , also etwa 30mal höher. Insgesamt schwanken die Faktoren zwischen  $LC_{50}$  und  $LC_{90}$  Werten zwischen den einzelnen Proben stark. So liegt bei der Probe 84 der  $LC_{90}$  mehr als 300fach über dem  $LC_{50}$  Wert. Für viele Proben sind die  $LC_{90}$  Werte weniger als 10fach höher. In der Tendenz haben allerdings die Proben mit höheren  $LC_{50}$  Werten auch die höheren  $LC_{90}$  Werte. Für eine Probe aus England konnten keine LC berechnet werden. Die Tiere zeigten über 95 % Mortalität bereits ab  $0,0015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin. Die  $LC_{90}$  lag somit unter  $0,0015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , was weniger als 1/10 der  $LC_{90}$  der empfindlichsten Probe aus Deutschland entspricht.

**Tab. 2** Empfindlichkeit (LC<sub>50</sub> und LC<sub>90</sub> in µg/cm<sup>2</sup>) von Rapsglanzkäferpopulationen aus Deutschland gegen I-Cyhalothrin. Die Werte sind aufsteigend nach LC<sub>50</sub> sortiert. (CI Konfidenzintervall)

Proben Nr.	LC <sub>50</sub> (90% CI)	LC <sub>90</sub> (90% CI)
84	<b>0,0002</b> (0,0000 - 0,0008)	<b>0,0503</b> (0,0190 - 0,2849)
107	<b>0,0016</b> (0,0003 - 0,0035)	<b>0,0277</b> (0,0154 - 0,0720)
101	<b>0,0078</b> (0,0039 - 0,0131)	<b>0,1108</b> (0,0579 - 0,3156)
102	<b>0,0125</b> (0,0072 - 0,0202)	<b>0,2668</b> (0,1347 - 0,7619)
94	<b>0,0213</b> (0,0100 - 0,0382)	<b>0,7969</b> (0,3258 - 4,0402)
106	<b>0,0284</b> (0,0150 - 0,0466)	<b>0,3275</b> (0,1686 - 1,0911)
100	<b>0,0326</b> (0,0184 - 0,0546)	<b>0,1718</b> (0,0938 - 0,5348)
96	<b>0,0485</b> (0,0279 - 0,0834)	<b>0,3997</b> (0,1989 - 1,3954)
92	<b>0,0497</b> (0,0336 - 0,0747)	<b>0,5843</b> (0,3244 - 1,3657)
85	<b>0,0514</b> (0,0379 - 0,0737)	<b>0,1275</b> (0,0849 - 0,3601)
99	<b>0,0587</b> (0,0353 - 0,1006)	<b>0,4727</b> (0,2365 - 1,5434)
95	<b>0,0626</b> (0,0285 - 0,1322)	<b>0,4947</b> (0,2120 - 2,8774)
98	<b>0,0683</b> (0,0506 - 0,0957)	<b>0,2640</b> (0,1702 - 0,5422)
91	<b>0,0688</b> (0,0478 - 0,0979)	<b>0,6020</b> (0,3593 - 1,2856)
97	<b>0,0765</b> (0,0460 - 0,1265)	<b>0,6149</b> (0,3207 - 1,8432)
90	<b>0,0847</b> (0,0504 - 0,1495)	<b>0,6244</b> (0,3068 - 2,2136)

### Ergebnisse der versandten Test-Kits zum Rapsglanzkäfer

Die Ergebnisse der von den einzelnen Bundesländern durchgeführten Resistenztests wurden an der BBA in Braunschweig gesammelt und mit den eigenen Ergebnissen der Labortests ausgewertet. Die Bewertung der ermittelten Mortalitäten erfolgte durch eine Einteilung der Ergebnisse in fünf unterschiedliche Klassen (Tabelle 3). Bei der Bildung der Klassen wurden die Mortalitäten der Käfer bei unterschiedlichem Aufwand im Test nach fünf Stunden Versuchsdauer zugrunde gelegt.

**Tab. 3** Klassenanteile von insgesamt 103 Populationen aus Deutschland (64 gewertete Test-Kits und 39 selbst getestete Proben) und Kriterien zur Einteilung der Resistenzklassen (Bonitur nach 5 h)

Klasse	Anteil an Proben (%)	Kriterium für Klasse
sehr sensitiv	6,80	keine Überlebenden ab 0,015 µg/cm <sup>2</sup>
sensitiv	7,77	bis 30 % Überlebende bei 0,015 µg/cm <sup>2</sup> , darüber keine Überlebenden
geringe Resistenz	18,45	ab 31 % Überlebende bei 0,015 µg/cm <sup>2</sup> , oder bis 10 % Überlebende darüber
Resistenz	40,78	11 – 50 % Überlebende ab 0,075 µg/cm <sup>2</sup>
hohe Resistenz	26,21	über 50 % Überlebende ab 0,075 µg/cm <sup>2</sup>

Die Testergebnisse der einzelnen Populationen wurden den unterschiedlichen Klassen zugeordnet. Zusammen mit den insgesamt 64 gewerteten externen Datensätzen wurden auch die selbst getesteten Populationen entsprechend genauso in Klassen eingeteilt. In Deutschland sind 2006 nur noch wenig nicht resistente Herkünfte vorhanden, im Nord-Osten Deutschlands und in Rheinland-Pfalz waren alle Proben resistent oder hoch resistent (Tabelle 3, siehe auch Verbreitungskarte in Heimbach et al., 2007 b). Einige Proben aus England, Polen und Österreich zeigten unterschiedliche Resistenzniveaus: während die Populationen aus England und Österreich überwiegend sehr sensitiv reagierten, schienen drei polnische Proben eher der deutschen Situation zu entsprechen.

## Diskussion

Beim Rapsglanzkäfer ist durch Minderwirkungen aus der Praxis und anhand von Labordaten nachgewiesen, dass Resistenz gegen die bisher in Deutschland zugelassenen Pyrethroide vorliegt. Die Resistenzsituation ist 2006 im Vergleich zu 2005 (s.a. Daten bei Heimbach et al., 2006, 2007 a, b) härter geworden und resistente Stämme waren 2006 fast überall in Deutschland zu finden (siehe Verbreitungskarte bei Heimbach et al., 2007 b). Ende 2006 wurde daher vom Fachausschuss Pflanzenschutzmittelresistenz Insektizide/Akarizide eine Anti-Resistenzstrategie für das Jahr 2007 verabschiedet, in der empfohlen wird, bei einer Bekämpfung des Rapsglanzkäfers möglichst in ganz Deutschland auf den Einsatz von Pyrethroiden zu verzichten, um eine weitere Resistenzentwicklung einzudämmen (BBA, 2007). Die  $LC_{50}$  und  $LC_{90}$  Werte zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Herkünften, wobei große Unterschiede zwischen  $LC_{50}$  und  $LC_{90}$  Wert auf eine Populationsmischung aus recht sensitiven und hoch resistenten Tieren hindeuten, die wohl vor allem in Regionen anzutreffen sein wird, in denen die Resistenz noch nicht lange vorliegt. Ähnliche  $LC_{50}$  und  $LC_{90}$  Werte deuten auf Populationen mit einer recht gleichmäßigen Reaktion der Individuen hin. Der deutliche Unterschied deutscher Herkünfte zu denen aus England in 2006 lässt vermuten, dass die angenommene diskriminierende Dosierung eher zu hoch als zu niedrig angesetzt wurde. So wurde eine Population jeweils vom selben Standort in 2005 noch als hoch sensitiv, in 2006 dagegen schon mit Überspringen einer Stufe als gering resistent eingestuft (Heimbach et al., 2007).

Bei *Ceutorhynchus* spp. sind bisher keine Fehlwirkungen in der Praxis einer Resistenz zugeordnet worden. Labordaten des Jahres 2005 (Heimbach et al., 2006) zeigten jedoch, dass die Sensitivität einiger Arten nicht ganz den Erwartungen entsprach, was sich in der Saison 2006 erneut in deutschen Untersuchungen gezeigt hat. Ballanger et al. (2007) konnten aber 2006 in Frankreich keine beunruhigenden Ergebnisse bei anderen Rapsschadinsekten erzielen. Insgesamt müssen noch weitere Untersuchungen erfolgen, um zu klären, ob relevante Sensitivitätsverschiebungen vor allem bei *Ceutorhynchus* spp. stattgefunden haben. Insbesondere sollten Proben dieser Arten dort genommen werden, wo Landwirte trotz gezielter Anwendung nur einen unzureichenden Bekämpfungserfolg beobachteten.

## Zusammenfassung

Im Rahmen des Monitoring 2006 konnten 93 Populationen der unterschiedlichen Rapsschadinsekten (47 Rapsglanzkäferproben, 13 Große Stängelrüsslerproben, 18 Kohltriebrüsslerproben, 12 Kohlschotenrüsslerproben und 3 Kohlerdflohproben) aus dem gesamten Bundesgebiet, Polen und England mit Hilfe des Adult-Vial-Testes auf ihre Sensitivität gegenüber dem pyrethroiden Wirkstoff I-Cyhalothrin getestet werden. Für die Gruppe der Rüssler und Erdflöhe konnten insgesamt sechs Populationen mit verringerten Mortalitäten im Test mit der angenommenen „discriminating dose“ von  $0,015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin beobachtet werden. Bei einer Kohltriebrüssler-Population ist die Mortalität im Test so gering, dass die Veränderung der Sensitivität dieser Tiere durch zusätzliche Untersuchungen abgesichert werden sollte. Alle anderen Proben zeigten nur gering veränderte Mortalitäten, die evtl. mit der natürlichen Variabilität in den Populationen zu erklären sind.

Die Ergebnisse für die Rapsglanzkäfer zeigten dramatisch, dass die Entwicklung der Resistenz im Jahr 2006 in der Intensität und in der Fläche zugenommen hat. Lediglich gut 10 % der im Monitoring untersuchten Proben reagierten im Test noch empfindlich auf I-Cyhalothrin. Der größte Teil der untersuchten Proben reagierte mit teilweise drastisch verringerten Mortalitäten. Bei den untersuchten Proben, für die eine Probit-Analyse gerechnet werden konnte, variierten die  $LC_{50}$  von 0,0002 bis 0,0847 und die  $LC_{90}$  Werte zwischen 0,0277 und 0,7969  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  I-Cyhalothrin. Keine dieser Proben war noch voll sensitiv.

## Danksagung

Die Vielzahl von Proben wäre nicht ohne Hilfe durch viele andere mögliche gewesen:

Herr Schackmann, Herr Burghause, Herr Mayer, Herr Raiser, Herr Ostermeier, Herr Faber, Herr Schemmel, Frau Nagel, Herr Erichsen, Frau Eichstaedt, Herr Münkler, Herr Ulber, Herr Ernst, Herr Ziegler, Herr Rupprecht, Frau Rippel, Herr Klingenhagen, Frau Weiske, Herr Mühlberg, Herr Krull, Herr Eiselt, Herr Ohnmacht, Herr Vonnahme, Herr Renzel, Frau Havers, Herr Kayser, Herr Bayer, Herr Schaper-Viedt, Herr Graser, Herr Kettel, Herr Köhler, Frau Dömpke, Frau Landschreiber, Herr Baumgartner, Herr Kahl, Bill Parker (ADAS UK), Heather Maker (ADAS UK), Herr Steingroever, Herr Kühne, Herr Schulz, Herr Hanschke, Herr Lehradt, Herr Roßbach, Herr Hoppe, Herr Schröder, Frau Weiser, Herr Scheid und andere Beteiligte.

Die UFOP hat sich dankenswerterweise an den Unkosten der Untersuchungen beteiligt.

## Literatur

- BALLANGER, Y., DETOURNE, D., DELORME, R., PINOCHET, X. (2003): Difficulties to control pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) in France revealed by unusual high level infestations in winter rape fields - Proceedings GCIRC, 11th Internat. Rapeseed Congress, Copenhagen, 6-10 July 2003, Vol. 3, 1048-1050.
- BALLANGER, Y., DÉTOURNÉ, D., DELORME, R., PINOCHET, X. (2007): France, difficulties to manage insect pests of winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera*): resistances to insecticides, Proceedings GCIRC, 12th Internat. Rapeseed Congress, Wuhan, 26-30 March 2007, Vol. 4, 276-279.
- BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT (2007): Empfohlene Bekämpfungsstrategie 2007 mit Insektiziden im Raps. [http://www.bba.bund.de/cln\\_044/nn\\_916044/DE/Home/pflanzen\\_\\_schuetzen/pfsmittel/resistenz\\_\\_psm/bekampfungsstrategie2007InsektizideRaps.html](http://www.bba.bund.de/cln_044/nn_916044/DE/Home/pflanzen__schuetzen/pfsmittel/resistenz__psm/bekampfungsstrategie2007InsektizideRaps.html), Mai 2007.
- BURGHAUSE, F., JÖRG, E. (2005): Bald keine Wirkung mehr? DLG Mitteilungen H. 4: 40-44.
- DERRON, J.O., LE CLECH, E., BEZENÇON, N., GOY, G. (2004): Résistance des méligèthes du colza aux pyrèthrinoides dans les bassin lémanique. Revue Suisse Agriculture 36, 237-242.
- HANSEN, L.M. (2003): Insecticide-resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus* F.) found in Danish oilseed rape (*Brassica napus* L.) fields. Pesticide Management Science 59, 1057-1059.
- HEIMBACH, U. (2005): „Ausschuss für Resistenzfragen- Insektizide und Akarizide“, Bericht über das erste Treffen im Februar 2005 in der BBA in Braunschweig. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 57, 172-173.
- HEIMBACH, U., MÜLLER, A., THIEME, T. (2006 a): First steps to analyse pyrethroid resistance of different oil seed rape pests in Germany. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 58, 1-5.
- HEIMBACH, U., MÜLLER, A. (2006 b): Achtung: Resistente Rapsschädlinge. DLZ Agrarmagazin 2/2006, 40-43.
- HEIMBACH, U., MÜLLER, A., THIEME, T. (2007 a): Pyrethroid resistance in pest insects of oil seed rape in Germany. Proceedings GCIRC, 12th Internat. Rapeseed Congress, Wuhan, 26-30 March 2007, 246-249.
- HEIMBACH, U.; MÜLLER, A. THIEME, T. (2007 b): Resistenz beim Rapsglanzkäfer. Raps 25, 68-72.
- IRAC (2006): IRAC Susceptibility Test Methods Series, Method No: 11 Pollen Beetle, *Meligethes aeneus*, adults, synthetic pyrethroids. <http://irac-online.org/documents/method11.pdf>, Mai 2007.
- NAUEN, R. (2005): Insecticide resistance in European agriculture: Research instead of rumours. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Crop Science & Technology 2005, 3, 123-130.
- WEGOREK, P., ZAMOJSKA, J. (2006): Resistance of pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to pyrethroids, chloronicotynyls and organophosphorous insecticides in Poland. IOBC/wprs Bulletin 29(7), 135-140.

**Koch, S., Kreye, H.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

## **Welche Auswirkungen hat der Anbau von Winterraps-Halbzwerg-Hybriden auf den Pflanzenschutz?**

### **Einleitung**

Neu zugelassene Winterrapsorten sind in den letzten Jahren im Wuchs tendenziell kürzer geworden. Dies trifft insbesondere auf die sogenannten Halbzwerg-Hybriden zu, die im Vergleich zum Mittel der herkömmlichen Liniensorten ein geringeres Längenwachstum aufweisen. Die erwarteten Vorteile der Halbzwerghybriden werden vor allem in der besseren Druschfähigkeit gesehen. Hohe Energiepreise und zunehmende Auslastung der Mähdrescher führen zu der Forderung der Landwirte, bei gleichen Erträgen weniger Biomasse zu verarbeiten und demnach die Leistungsfähigkeit des Mähdreschers zu erhöhen. Sorten mit einem kompakten Schotenpaket, gleichmäßiger Abreife, geringer Lagerneigung und guten Erträgen werden gewünscht.

Eine Möglichkeit in diese Richtung soll die Züchtung von Halbzwerg-Hybriden sein. Dieser neue Wuchstyp ist eine Kreuzung aus einer speziellen, so genannten Zwerglinie, einer extrem kleinwüchsigen Rapsform und einem weiteren Elternteil, der auf den herkömmlichen Liniensorten basiert. In Deutschland wurde die erste Sorte dieses Wuchstyps im Dezember 2005 vom Bundessortenamt zugelassen. Im europäischen Ausland sind darüber weitere Sorten bekannt.

Aus Sicht des Pflanzenschutzes stellte sich die Frage, in wieweit sich ein verringertes Längenwachstum auf das Unkrautunterdrückungsvermögen des Rapses auswirkt und in welchem Umfang das Auftreten von Krankheiten beeinflusst wird. Zur Klärung der Fragen wurden seit 2004 Feldversuche mit verschiedenen Sortentypen durchgeführt.

### **Methoden**

Im Jahr 2004 wurde an der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig mit dem Versuchsprogramm begonnen. Die Versuche wurden mit vier Wiederholungen angelegt. Um Nachbarschaftseffekte möglichst auszuschalten, wurden Doppelparzellen angelegt. Die Parzellengröße betrug 2 x 2 x 12 m. Am Versuchsstandort Braunschweig wurden drei Winterrapsorten mit unterschiedlichen Wuchstypen miteinander verglichen. Stellvertretend für eine lange hochwüchsige Sorte wurde die Hybridsorte Artus ausgewählt. Als Sorte mit mittlerer Wuchshöhe wurde die Sorte Express und als Vertreter der Halbzwerghybriden wurde in den ersten beiden Versuchsjahren die in Frankreich zugelassene Sorte Belcanto angebaut. Im Versuchsjahr 2006 wurde letztere durch die erstmals in Deutschland zugelassene Halbzwerghybride PR45D01 ausgetauscht.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf potentielle Auswirkungen, die mit einem verringerten Wuchs in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählt vor allem die Konkurrenzskraft gegenüber Unkräutern. Um die Entwicklung der Pflanzen zu charakterisieren, wurde sowohl der Kulturdeckungsgrad im Herbst und Frühjahr geschätzt, als auch das Längenwachstum im Herbst und Frühjahr gemessen. Dieser ist ein Maß für das Vermögen der Pflanzen, die Erde zu bedecken und somit ein Parameter für die Konkurrenzkraft des Bestandes gegen Unkräuter. Je höher der Deckungsgrad, desto konkurrenzstärker ist der Bestand.

Des Weiteren wurden das Auftreten von Krankheiten, speziell der Weißstängeligkeit und der Phoma Wurzelhals- und Stängelfäule, untersucht. Während des Versuches wurden weitere Faktoren wie Lagerneigung bzw. Standfestigkeit und Ertrag der einzelnen Sorten festgehalten. Die Untersuchungen erfolgten bei unterschiedlichen Pflanzenschutzintensitäten, wobei die Fungizide zu verschiedenen Terminen während der Vegetation appliziert wurden (Tabelle 1).

**Tab. 1** Varianten mit unterschiedlichen Pflanzenschutzintensitäten

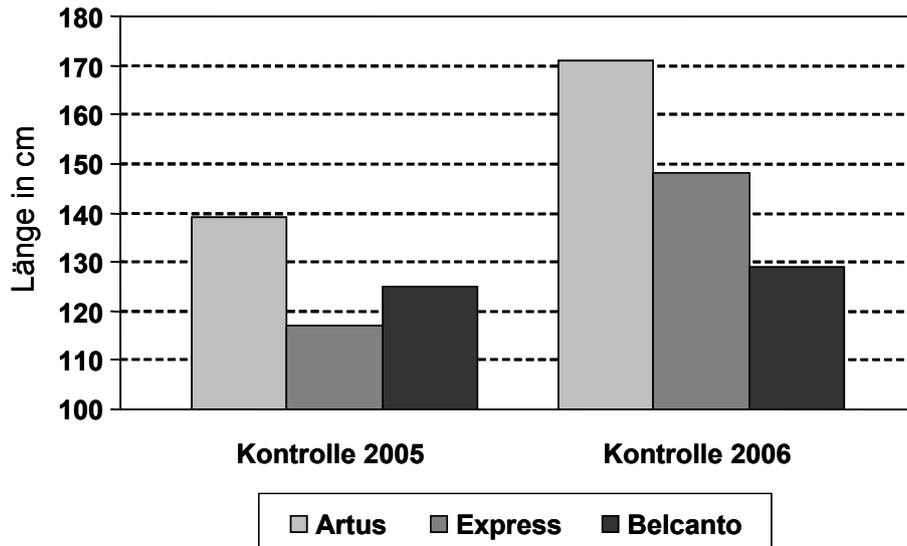
Variante	Herbizidanwendung im Herbst/ha	Fungizidanwendung/ha	Zeitpunkt (BBCH)
1	ohne	ohne	-
2	2,0 l Butisan Top + 0,5 l Select	0,7 l Folicur	16
3	2,0 l Butisan Top + 0,5 l Select	0,7 l Folicur	16 + 32
4	2,0 l Butisan Top + 0,5 l Select	0,5 kg Cantus	65
5	2,0 l Butisan Top + 0,5 l Select	ohne	-

## Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen ergaben, dass die beiden Halbzwerghybriden im Herbst eine vergleichbare Bedeckung des Bodens erreichen. Die Blattrosette wird primär flächig ausgebildet. Die Bedeckung des Bodens bleibt auch im Verlauf der Vegetation erhalten, wie die Bonituren zu BBCH 55 zeigten. Ein veränderter Wuchs ergibt sich lediglich durch die geringere Streckung der Sprossachse der Halbzwerghybriden im Vergleich zu den beiden anderen Wuchstypen. Messungen im Herbst 2006 ergaben für den am 31. August gedrillten Raps, der keine Wachstumsreglerbehandlung erhalten hatte, eine Länge von 2,7 cm beim Artus, 1,0 cm beim Express und 0,7 cm beim PR45D01. Bereits zu diesem Termin wird das geringere Längenwachstum deutlich. Ob hieraus eine generelle bessere Winterhärte abgeleitet werden kann, bleibt abzuwarten. Hofmann und Christen (2007) konnten in ihren Untersuchungen zur Wurzeltiefe zwischen Halbzwerghybriden und normal wüchsigen Hybriden feststellen, dass bei späteren Aussatterminen die Halbzwerghybriden ein deutlich tieferes Wurzelwachstum vor Winter zeigten als die normalwüchsigen Hybriden. Bei frühen Aussatterminen konnte jedoch kein Unterschied im Wurzelwachstum festgestellt werden.

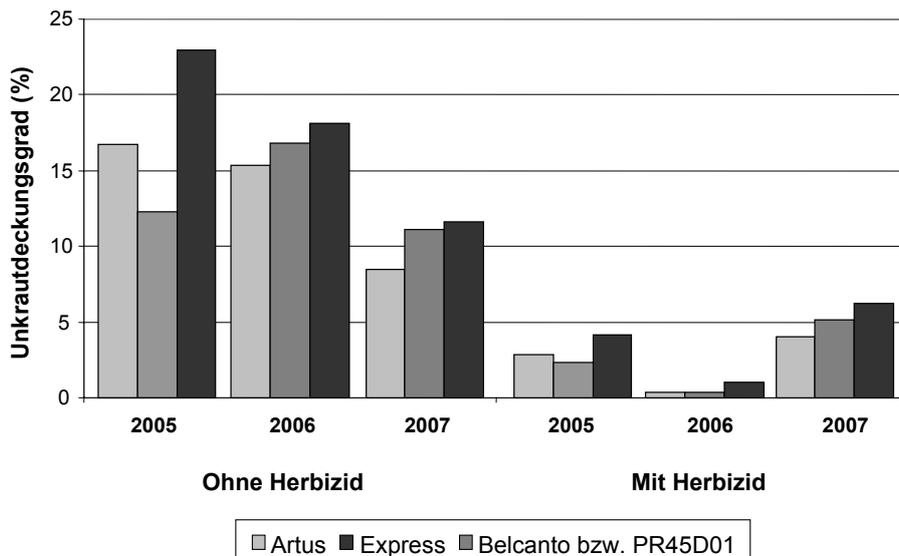
Die Messungen der Pflanzenhöhe zu BBCH 75, die in der Abbildung 1 dargestellt sind, zeigen noch eindrucksvoller den Unterschied zwischen den Hybridtypen auf. Die Sorte Artus war sowohl im Jahr 2005 mit 139 cm als auch mit 171 cm im Jahr 2006 die längste Sorte. Zwischen den beiden anderen Sorten bestand 2005 nur ein geringer Unterschied im Wuchs von 6 cm. Hierbei war Express mit 117 cm sogar niedriger als die Halbzwerghybride Belcanto mit 125 cm. Im darauf folgenden Jahr war der Unterschied deutlicher. Während Express mit 148 cm länger als im Vorjahr wurde, reagierte die Sorte Belcanto mit einer Länge von 129 cm nur unwesentlich auf die besseren Wuchsbedingungen. Diese Unterschiede im Längenwachstum konnten auch in anderen Untersuchungen bestätigt werden (Feiffer et al., 2006; Hofmann & Christen, 2007).

Aufgrund der geringen Lagerneigung der Sorten in den letzten beiden Jahren konnten keine Unterschiede zwischen den Varianten mit unterschiedlich terminiertem Wachstumsreglereinsatz festgestellt werden. Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass der Einsatz von Wachstumsregulatoren bei den getesteten Halbzwerghybriden nicht notwendig ist, um eine Stauchung des Bestandes zu erreichen und um eine geringere Biomasse zu erhalten. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass diese Konsequenzen für den Einsatz von Wachstumsregulatoren derzeit nur für eine Sorte des neuen Wuchstyps gezogen werden können. Ob aus dem geringeren Längenwachstum generell eine höhere Standfestigkeit für alle Halbzwerghybriden abgeleitet werden kann, muss in Frage gestellt werden. Aus dem Getreideanbau ist bekannt, dass die Pflanzenlänge kein eindeutiges Indiz für die Standfestigkeit ist. Nach den bisherigen Erfahrungen kann auf den Wachstumsreglereinsatz im Herbst verzichtet werden. Aber auch hier sind Sortenunterschiede denkbar.

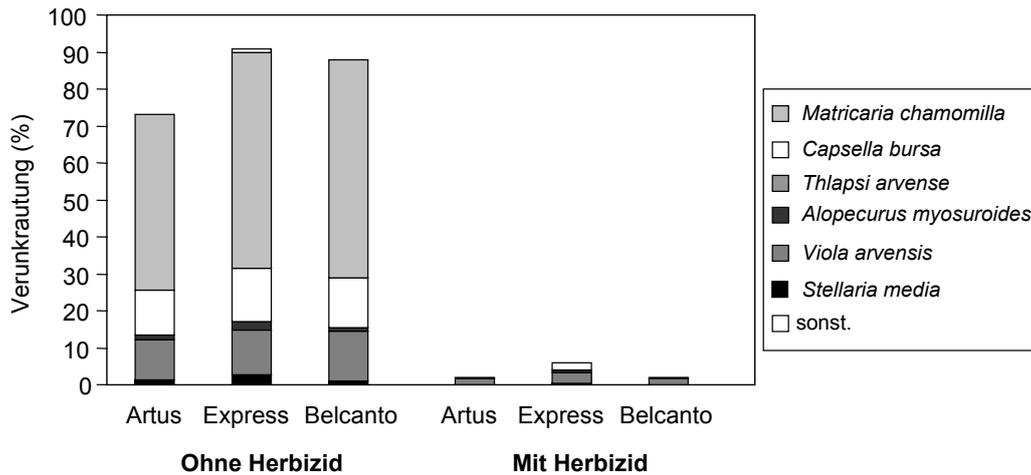


**Abb. 1** Pflanzenlänge in cm in den Kontrollparzellen der einzelnen Sorten zu BBCH 75 in den Jahren 2005 und 2006

Für die Unkrautbekämpfung ergaben sich in den Versuchen keine neuen Anforderungen für eine veränderte Anwendung der Herbizide. In Abbildung 2 ist der Unkrautdeckungsgrad der Varianten 1 und 5 mit und ohne Herbizidanwendung dargestellt. Durch die flächige Ausbildung der Blattrosette ist das Unkrautunterdrückungsvermögen vergleichbar zu den bisherigen Wuchstypen. Ein stärkeres Durchwachsen von Unkräutern im Verlauf der Vegetation konnte nicht festgestellt werden. Da die Bestände in den letzten drei Jahren gleichmäßig gut aufgelaufen waren, lagen allerdings gute Bedingungen für einen Bestandesschluss vor, der den Boden beschattet und die Entwicklung der Unkräuter behindert hat. Besonders der milde Herbst und Winter im Jahr 2006/07 führte zu einer raschen und guten Entwicklung des Rapses, so dass sich nur sehr wenige Unkräuter unter dem Blätterdach des Rapses entwickeln konnten. Die Abbildung 3 macht deutlich, dass weder die Anzahl der Unkrautpflanzen noch die Artenzusammensetzung durch die einzelnen Sortentypen beeinflusst wurde.



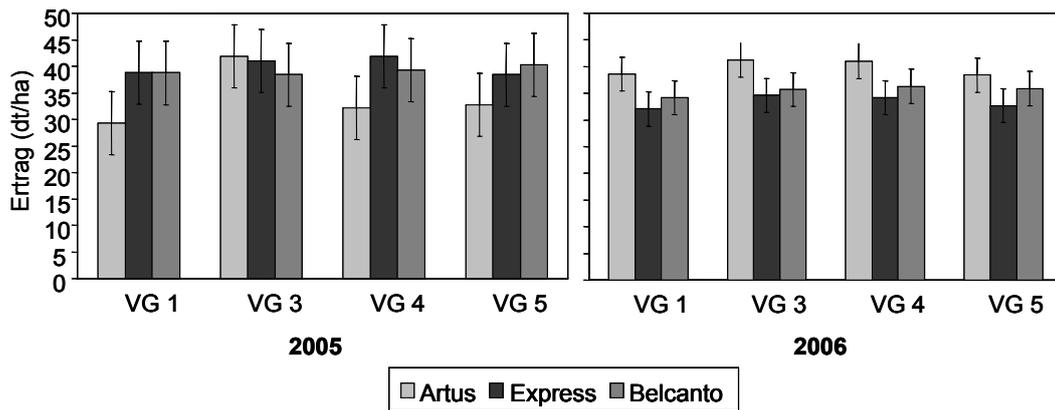
**Abb. 2** Unkrautdeckungsgrad (%) im Frühjahr zu BBCH 50 mit und ohne Herbizid in den Varianten mit und ohne Herbizidanwendung im Untersuchungszeitraum (2005-2007)



**Abb. 3** Anteil der Unkrautarten (%) im Herbst 2005 zu BBCH 18 mit und ohne Herbizid in den Varianten mit und ohne Herbizidanwendung

Erwartete Unterschiede im Auftreten einzelner Krankheiten konnten nicht festgestellt werden. Speziell für die Weißstängeligkeit wurden Unterschiede auf Grund der veränderten Exposition der schotenträgenden Triebe zum Boden erwartet. Durch den geringen Befallsdruck von *Sclerotinia sclerotiorum* in den Versuchsjahren unterschied sich die in der Variante 5 durchgeführte Blütenbehandlung ertraglich nicht von den anderen Varianten. Das Mikroklima des Bestandes unterschied sich entsprechend der ermittelten Befallswerte nicht wesentlich zwischen den Wuchsformen. Die Durchdringung des Bestandes zur Behandlung war durch die gewählte Wassermenge und Druck in allen drei Sorten gewährleistet. Unterschiede im Auftreten der Phoma Wurzelhals- und Stängelfäule konnten bei mittlerem Befallsniveau nicht ermittelt werden. Dies bedeutet, dass keine spezielle Anpassung bestehender Fungizidstrategien an die neue Wuchsform erforderlich ist. Für das Krankheitsauftreten sind nach wie vor die natürlichen Gegebenheiten vor Ort und das Resistenzvermögen der Sorte entscheidend. Die Resistenz wird sich sicherlich auch bei diesem neuen Wuchstyp zwischen den Sorten unterscheiden und zu Differenzierung im Sortiment führen. Die zur Durchfahrt als Vorteil für den Wuchstyp der Halbzwerghybride angegebene geringere Bestandeshöhe zur Blütenbehandlung konnte in unseren Versuchen auf Grund der Parzellenanlage und -größe nicht beurteilt werden. Im Versuchsjahr 2005 waren allerdings, wie gezeigt, die Höhenunterschiede zur Sorte Express nicht vorhanden.

In beiden Versuchsjahren unterschieden sich die Erträge der Sorte Express und der Halbzwerghybride Belcanto im Mittel der Varianten nicht voneinander. Der Vergleich zur langen Sorte Artus zeigt zwei gegensätzliche Jahre auf. Während 2005 die herkömmliche lange Hybride Artus dem Halbzweig ertraglich überlegen war, zeigten sich im zweiten Jahr die Auswirkungen der Wuchslänge und Standfestigkeit. In den Varianten, in denen keine Einkürzung durch Wachstumsregler vollzogen wurde, trat Lager in der Sorte Artus auf und die Varianten vielen im Ertrag vergleichsweise stark ab. Bereits die Einkürzung im Herbst führte zu einer gewissen Ertragssteigerung, doch erst die Frühjahrsbehandlung verhinderte die Lagerbildung und die Sorte Artus erzielte einen etwas höheren Ertrag als die Vergleichssorten. Ohne Wachstumsreglereinsatz wurden die sortenbedingten Standfestigkeitseigenschaften deutlich und spiegelten sich im Ertrag wieder. Ein Vorteil der bisher getesteten Halbzwerghybride gegenüber standfesten Sorten mit kürzerem Wuchs wurde nicht sichtbar. In Untersuchungen von Hofmann und Christen (2007) mit der Halbzweig-Hybride Belcanto zeigte sich ebenfalls, dass im Durchschnitt von drei Jahren die Sorte Belcanto ein um 3-4 dt/ha höheren Ertrag erbrachte, als die Vergleichssorten Talent und Express. Der Ölgehalt war hingegen geringer im Vergleich zu den anderen Sorten.



**Abb. 4** Erträge [dt/ha] in Abhängigkeit von der Sorte und der PSM-Behandlung in den Versuchsjahren 2005 und 2006; (VG 1 = Kontrolle, VG 3 = Herbizidbehandlung (Herbst) + Fungizid-/Wachstumsreglerbehandlung (Frühjahr u. Herbst), VG 4 = Herbizidbehandlung (Herbst) + Fungizidbehandlung (Blüte); VG 5 = Herbizidbehandlung (Herbst) ohne Fungizidbehandlung.

Weitere Überlegungen gehen dahin, dass durch die geringere Biomasseentwicklung bei den Halbzweigen die Stickstoff-Anreicherung in der Pflanze geringer ist. Dies würde dazu führen, dass weniger Stickstoff nach Raps freigesetzt werden würde. Sieling und Kage (2007 a, b) konnten in Stickstoff- Düngungsversuchen diese Hypothese nicht bestätigen. Sowohl die N-Aufnahme während der Vegetationsperiode als auch die oberirdische Trockenmasse der Halbzweig-Hybride unterschied sich im Mittel über die Jahre nicht von den anderen Sorten.

## Zusammenfassung

Eine Anpassung des Herbizid- und Fungizidmanagements ist nach den bisherigen Ergebnissen beim Anbau von Halbzweighybriden nicht erforderlich, sofern eine gute Bestandesetablierung erreicht wird. Wie der Halbzweigtyp auf eventuell auftretende Bestandeslücken im Vermögen reagiert, Unkraut zu unterdrücken, konnte bisher noch nicht untersucht werden. Bisher ergeben sich nur für den Einsatz von Wachstumsreglern Unterschiede. Auf diese kann bei normalen Witterungsverhältnissen verzichtet werden. Der Ertrag der Halbzweighybriden befindet sich auf dem Niveau der bisherigen Sorten. Nur im Ölgehalt liegt der Halbzweig unter den bisherigen Sorten. Unterschiede im Krankheitsauftreten konnten nicht festgestellt werden. Welchen Anbauumfang die Halbzweig-Hybriden in den nächsten Jahren erreichen werden, bleibt abzuwarten. Die Eigenschaften geringe Lagerneigung und gegebenenfalls eine höhere Druschleistung sind positive Argumente für einen Anbau in der Praxis. Weitere Untersuchungen in Bezug zur Winterfestigkeit und zur Anfälligkeit gegenüber Krankheiten dieses Sortentyps sind jedoch notwendig.

## Literatur

- HOFMANN, B., CHRISTEN, O. (2007): Effect of sowing date and genotype on the yield, yield formation and root development of winter oilseed rape. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Vol. III, Agronomy: Cultivation Technology, Wuhan, China, 139-142.
- FEIFFER, A.; DITTMANN, A.; STEGER, HUCKE (2006): Erste Druschversuche mit Halbzweigen. Raps 4, 206-209.
- SELING, K., KAGE, H. (2007 a): Semi-dwarf genotypes-a chance to reduce the N problem after oilseed rape? Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Vol. III, Agronomy: Cultivation Technology, Wuhan, China, 198-201.
- SELING, K., KAGE, H. (2007 b): Bieten Raps-Halbzweige eine Möglichkeit zur Verminderung der Nitratproblematik? Raps 2, 81-83.

**Kreye, H., Niepold, F.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

## **Diagnostischer und epidemiologischer PCR-Nachweis des Erregers der Anthracnose (*Colletotrichum lupini*) bei Lupinen**

### **Einleitung**

Die Anthracnose der Lupine wird durch den Pilz *Colletotrichum lupini* verursacht und ist in der Literatur auch wegen der Verbräunung des befallenen Gewebes als „Brennfleckenkrankheit der Lupine“ bekannt. Mittlerweile lässt sich *Colletotrichum lupini* genetisch und morphologisch von den beiden nahe verwandten Spezies *Colletotrichum acutatum* und *Colletotrichum gloeosporioides* gut unterscheiden (Talhinhas et al., 2005, Nierenberg, 2005, Nierenberg, Feiler, Hagedorn, 2002, Feiler, Nierenberg, 1999). Früher hingegen wurden die beiden nahe verwandten Erreger in der Fachliteratur als Anthracnose-Pathogene der Lupine identifiziert (Reed et al., 1996).

Bei der Anthracnose handelt es sich um eine relativ neue Krankheit, die wahrscheinlich Anfang der 90er Jahre aus Lateinamerika mit infizierten Samen nach Europa eingeschleppt wurde. Dass eine Übertragung des Erregers auch samenbürtig erfolgen kann, konnte Frey (1985) bereits früh zeigen.

Eine charakteristische Symptom-Ausprägung dieser Krankheit ist die mit Blühbeginn einsetzende spiralförmige Krümmung von befallenen Pflanzen. Gleichzeitig sind an diesen Krümmungen Einschnürungen zu sehen, auf denen sich länglich-oval eingesunkene Flecke befinden. Als äußeres Erscheinungsbild entsteht im Bestand eine so genannte Lochbildung, da die befallenen Pflanzen weniger hoch wachsen, als nicht infizierte, gesunde Lupinen. Die Infektionen treten im Feld nesterartig auf und können im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode als Infektionsherd dienen, so dass es dann auch -bei günstigen Bedingungen für den Pathogen- zu einem Totalausfall kommen kann. Gleichzeitig kann es auch bei der Ernte zu einer Infektion der Lupinensamen mit Konidien (Samenübertragbarkeit) des Pilzes kommen (Amelung, 1997). Diagnostisch lassen sich dabei die für *Colletotrichum lupini* typischen Infektionsorgane (Appressorien) sichtbar machen, wenn der SNA-Agar nach Nirenberg (1976) verwendet wird.

Durch das verstärkte Auftreten der Anthracnose in den vergangenen Jahren wurde das Interesse für eine Methode zur Früherkennung des Pilzes im Saatgut geweckt (Römer, 1998). Der Pilz kann sowohl oberflächlich an der Schale anhaften als auch im Sameninnern zwischen der Schale und dem Endosperm vorkommen. Deshalb ist *Colletotrichum lupini* mit herkömmlichen Methoden relativ schwer nachweisbar. So bot sich der Einsatz der gentechnischen Nachweismethode Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für epidemiologische Untersuchungen des Verhaltens von *Colletotrichum lupini* in der Pflanze und im Samen an.

Zum PCR-Nachweis von *Colletotrichum lupini* wurden spezifische Sequenzdaten der ITS (intern transkribierter Spacer)-Mitochondrien-DNA eines *Colletotrichum gloeosporioides*-Isolates verwendet, um geeignete Primer zu entwickeln. Untersuchungen von Sreenivasaprasad et al. (1996) an der *Colletotrichum*-ITS-Sequenz hatten gezeigt, dass bei *Colletotrichum gloeosporioides* die beste zwischenartliche Unterscheidungsmöglichkeit in diesem DNA-Bereich besteht. Daher wurde diese DNA-Sequenz für die spezifische Herstellung von Primern zum Nachweis von *Colletotrichum lupini* ausgewählt.

In dieser Arbeit wird auch über die erfolgreiche Entwicklung und Anwendung von Primern berichtet, die sich zur sicheren Unterscheidung des Erregers und für epidemiologische Studien des Lupinen-Pathogens eignen. Gleichzeitig wird eine Extraktion von samenbürtigen *Colletotrichum lupini* vorgestellt, mit der sich oberflächliche Pilzkontamination mittels PCR nachweisen lassen, ohne dass später eine Beeinträchtigung des Keimverhaltens der behandelten Samen zu beobachten war.

## Material und Methoden

### Erprobung von Primern und PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *Colletotrichum lupini*-DNA

Zur Herstellung von Primern für den Nachweis des Lupinen-Pathogens *Colletotrichum lupini* wurde die veröffentlichte ITS-DNA-Sequenz von *Colletotrichum gloeosporioides* verwendet (Sreenivasaprasad et al., 1996). Die Primer wurden mit dem Computer-Programm OLIGO, 4,0–2019, Primer Analysis Software, 1989–91 (Wojciech Rychlik) ausgewählt. Es kamen zwei Primerpaare zur Anwendung: ein 20mer Primerpaar Collet 1 (5' gtg aac ata cct aac cgt tg 3') und Collet 2 (5' cag aag aga cgt ctg gta aa 3'), sowie ein 18mer Primerpaar Collet 3 (5' ttg tga aca tac cta acc 3') und Collet 4 (5' cgt cgt gta aat aga gtt 3'), die von der Fa. IBA, Göttingen, synthetisiert wurden. Die Amplifikation fand in einem Gesamtvolumen von 25 µl statt, wobei sich der Reaktionsmix wie folgt zusammensetzte: 2,5 µl 10 x Polymerase Puffer (wurde als MgCl<sub>2</sub>-freier Puffer von der Fa. Perkin Elmer geliefert), 0,25 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 10 mM Nukleotid-Mix, je 0,5 µl der jeweils zusammengehörigen Primer (1nM), 0,25 µl Taq- Polymerase (5–7 Einheiten/µl, Fa, Perkin Elmer) und 14,0 µl H<sub>2</sub>O. Unmittelbar vor der PCR-Reaktion im Thermozykler erfolgte die Zugabe von 5 µl der extrahierten Pilz- bzw. Lupinen-DNA. Zur Durchführung der PCR wurde der Thermozykler PTC-100 von der Fa. JM Research Inc. wie folgt programmiert: 5 min bei 96 °C, dann 45 Zyklen zu 50 sec. bei 94 °C, 55 sec. bei 56 °C und 50 sec. bei 72 °C. Am Ende erfolgte eine Inkubation bei 72 °C für 5 min, um eine vollständige Synthese sämtlicher Amplifikate zu erreichen.

Nach Beendigung der PCR wurden je 10 µl in einem Agarosegel (1,5 %) elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Als Längenstandard diente der DNA-Größenstandard Lambda/Eco47I der Fa. MBI, Lithuania.

### Anzucht von Pilzmaterial in Flüssig- bzw. Festmedien und Keimlingstests bei Lupinen zur Diagnose des samenbürtigen Erregers *Colletotrichum lupini*

Um DNA aus Reinkulturen von Pilzen zu gewinnen, wurden diese entweder auf Agarplatten (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt) oder in Flüssigkultur (Czapek-Dox, Oxoid, Hamburg) bis zu einem sichtbaren Myzelwachstum kultiviert. Das Pilzmyzel wurde entweder aus der Flüssigkultur abfiltriert oder als Luftmyzel von Agarplatten gewonnen.

Die Untersuchung von Lupinen auf Befall mit *Colletotrichum lupini* erfolgte mit frisch geerntete Lupinensamen. Beim verwendeten Lupinensaatgut handelt es sich um Muster aus Feldversuchen. Die Lupinensamen wurden für 2 min. in eine Natrium-Hypochlorid-Lösung (10 %) getaucht, um so an den Schalen äußerlich anhaftende Saprophyten abzutöten. Danach wurden die Samen reichlich mit sterilem Leitungswasser gewaschen, um das überschüssige Natrium-Hypochlorid zu beseitigen. Da sich *Colletotrichum lupini* sehr oft unterhalb der Schale befindet, beeinflusst diese Behandlung nur oberflächlich anhaftende Pilze.

Zur Bestimmung eines Befalls mit *Colletotrichum lupini* bei Lupinensamen wurden 50 Lupinensamen in Plastikschaalen mit Deckel (24 x 24 cm) gelegt, die zuvor mit einem Fließpapier ausgelegt und angefeuchtet wurden. Nach dem Auflegen eines weiteren angefeuchteten Fließpapiers auf die Lupinensamen wurden diese im Dunkeln bei 20 °C sieben Tage mit gelegentlichem Anfeuchten inkubiert (ISTA-Vorschrift, Anonym, 1993). Befanden sich an den Lupinenkeimlingen rosafarbene oder rote Konidienlager, wurden diese abgenommen und für eine DNA-Extraktion weiter verwendet.

### DNA-Extraktionsmethoden zum Nachweis von *Colletotrichum lupini* und anderen pflanzenpathogenen Pilzen mit der modifizierten CTAB-DNA-Extraktion nach Day and Shattock (1997)

Vom Pilzmyzel bzw. Konidien (abisoliert von Agarplatten oder von Lupinen-Keimlingen) wurden ca. 10 mg abgenommen und in einem Plastikreaktionsgefäß (Eppendorf) mit einem sterilen Mörser unter Hinzugabe von 100 µl eines frisch vorbereiteten CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) – Extraktionspuffers (1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % CTAB, mit 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) abgepuffert) zerkleinert. Nach Inkubation des Extraktes für eine Stunde bei 65 °C und Aufschütteln nach je 15 min, wurde 600 µl Chloroform hinzugegeben, 10 sec mit dem Vortex geschüttelt und 5 min bei 13.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen (ca. 500 µl) und in ein neues Plastikgefäß überführt. Nach Hinzugabe von 300 µl Isopropanol und kurzem Schütteln, inkubierten die Extraktionen 10 min bei Zimmertemperatur. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 10 min und Zimmertemperatur. Nach Verwerfen des Überstands und Hinzupipettieren von 600 µl 70 %igem Äthanol wurde kräftig geschüttelt und 10 min bei 13.000 x g erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet getrocknet und mit 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Diese Methode eignete sich auch zur Extraktion von DNA aus gesunden und infizierten Lupinen.

#### Pilzisolat

Die für die Entwicklung des PCR-gestützten Nachweises des Lupinen-Pathogens *Colletotrichum lupini* verwendeten Pilzisolat sind in Tabelle 1 aufgelistet:

**Tab. 1** Auflistung der verwendeten Pilzisolat

Pilzisolat	Herkunft	Quelle
<i>Colletotrichum acutatum</i> 1635	Anemone	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Colletotrichum lupini</i> 70063	Lupine	Pilzsammlung BBA Berlin
<i>Colletotrichum acutatum</i> 1755	Begonie	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 62146	Zitrus	DSMZ, Braunschweig*
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 62136	Zitrus	DSMZ, Braunschweig
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 63144	Bohne	DSMZ, Braunschweig
<i>Colletotrichum coccodes</i> 2492	Tomate	DSMZ, Braunschweig
<i>Fusarium</i> ssp. Isolat1	Lupine	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Fusarium</i> ssp. Isolat2	Lupine	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Fusarium oxysporum</i>	Kartoffel	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Typhula</i> sp.	Getreide	Pilzsammlung BBA Braunschweig
<i>Cercospora</i> sp.	Getreide	Pilzsammlung BBA Braunschweig

\* Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen.

#### Anzucht von Lupinen und Pilzmaterial zur Inokulation des Erregers *Colletotrichum lupini*

Um die DNA aus Reinkulturen von Pilzen zu gewinnen, wurde Myzel auf Agarplatten (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt) bis zu einem sichtbaren Myzelwachstum kultiviert und frisch gewachsenes Pilzmyzel wurde als Luftmyzel von Agarplatten zur weiteren Verarbeitung abgenommen.

Bei den verwendeten Lupinen handelt es sich um Erntegut von verschiedenen norddeutschen Standorten. Die Samen wurden in 20x20 cm Töpfe mit Einheitserde gepflanzt und unter Langtags-Bedingungen bei 23 °C für 3 Wochen im Gewächshaus kultiviert.

Die mit 70% Äthanol gewaschenen Samen zwecks DNA Nachweis von *Colletotrichum lupini* wurden vor dem Auspflanzen auf Fliespapier getrocknet und zur späteren Beurteilung des Infektionsgrades der Samen ausgesät. Nach 3 bis 4 Wochen erfolgte eine Bonitur der Pflanzen auf ihre Symptome.

### **Epidemiologische Untersuchungen von *Colletotrichum lupini* in Lupinenpflanzen und Extraktion von Pilz-DNA von Lupinensaatgut**

Zur Untersuchung der Epidemiologie von *Colletotrichum lupini* an Lupinenpflanzen wurden entweder infizierte Pflanzen aus dem Feld oder im Gewächshaus angezogene und künstlich infizierte Pflanzen verwendet. Bei der künstlichen Infektion wurde Pilzmyzel mit einem sterilen Zahnstocher in die Stängel von Lupinen inokuliert und mittels PCR dessen Ausbreitung innerhalb der Stängelstücke zu verschiedenen Wachstumsstadien verfolgt. So wurde beispielsweise von ausgewachsenen Pflanzen das Stängelmateriale in ca. 2 cm Stücke geschnitten und mit der PCR untersucht. Beim auf SNA Agarplatten (Nirenberg, 1976) gewachsenen Pilzmyzel wurden 10 mg abisoliert. Beide Proben wurden unter Hinzugabe von 1000 µl eines frisch vorbereiteten CTAB- Extraktionspuffer mit einem Pistill im Mörser 2 min lang zerkleinert und nach Day and Shattock (1997) weiter aufgearbeitet.

Zur Ermittlung der oberflächlichen Kontamination einzelner Lupinensamen-Partien mit *Colletotrichum lupini* wurden je 15 Samen in 10 ml 70% Äthanol bzw. dest. Wasser für 15 min bei 60 UPM und Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 10.000x g für 10 min abzentrifugiert, dekantiert, das Pellet mit CTAB-Puffer aufgenommen und im Mörser zerkleinert. Die weiteren Extraktionsschritte erfolgten nach der CTAB-Methode (Day and Shattock, 1997).

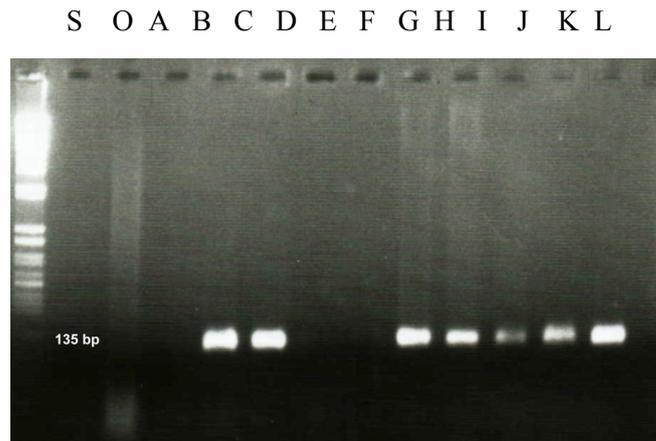
## **Ergebnisse**

### **Extraktion**

Die modifizierte CTAB-Extraktionsmethode eignete sich gut zur DNA-Extraktion von auf Agarplatten kultivierten Pilzisolaten und Konidienlagern, die von Keimen befallener Lupinensamen abisoliert worden waren. Die gewonnene DNA-Konzentration schwankte zwischen 1 µg und 100 ng. Ebenso ließ sich mit dieser CTAB-Extraktionsmethode direkt Pilz-DNA von Lupinenkeimlingen isolieren. Die Konidienlager waren an den Keimen für gewöhnlich nach siebentägiger Inkubation in Feuchtschalen groß genug, um unter dem Binokular abisoliert werden zu können.

### **Anwendung von zwei verschiedenen Primern aus der ITS-Region von *Colletotrichum gloeosporioides* im PCR-Nachweis**

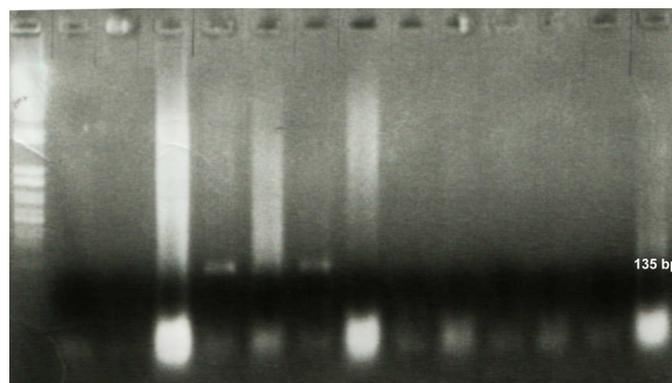
Die beiden Primer wurden auf ihre Spezifität für einen Nachweis des Lupinen-Pathogens *Colletotrichum lupini* getestet. Nur die Verwendung des 20mer Primerpaares Collet1 mit der Sequenz 5' gtg aac ata cct aac cgt tg 3' und Collet2 mit der Sequenz 5' cag aag aga cgt ctg gta aa 3' zeigte ein spezifisches Amplifikat mit einer Größe von 135 bp für alle getesteten pathogenen *Colletotrichum*-Arten. Die DNA aller anderen getesteten pflanzenpathogenen Pilze (vgl. Tabelle 1) oder Lupinen-DNA zeigten nach Amplifikation mit den Primern Collet1 und Collet2 keine DNA-Bande bei 135 bp (Abbildung 1).



**Abb. 1** Verwendung des 20mer Primerpaares Collet1 und Collet2 zum spezifischen Nachweis von *Colletotrichum* spp. Die Größe der Amplifikate war nach der veröffentlichten DNA-Sequenz mit 135 bp vorgegeben.

O = Wasserkontrolle; A = *Typhula* sp.; B = *Cercospora* sp.;  
 C = *Colletotrichum acutatum* (1635, Anemone);  
 D = *Colletotrichum lupini* (70063, Lupine); E = *Fusarium* sp. (Lupinenisolat1);  
 F = *Fusarium* sp. (Lupinenisolat2); G = *Colletotrichum gloeosporioides* (62146);  
 H = *Colletotrichum lindemuthianum* (63144); I = *Colletotrichum coccodes* (2492);  
 J = *Colletotrichum gloeosporioides* (62136); K = *Colletotrichum acutatum* (1755, Anemone);  
 L = *Fusarium oxysporum*

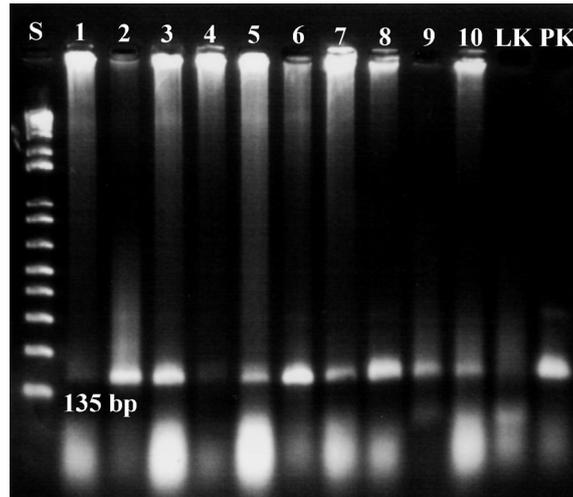
Zur Überprüfung der Verwendbarkeit der Primer Collet1 und Collet2 zum Nachweis von *Colletotrichum lupini* wurden nach sieben-tägiger Inkubation Keimlinge der Lupinensamen auf das Auftreten von rötlichen Konidienlagern bonitiert. Diese wurden abisoliert, die DNA nach der CTAB-Extraktionsmethode extrahiert und unter Verwendung der Primer Collet1 und Collet2 eine PCR durchgeführt (Abbildung 2). Nur bei den Extrakten C und E konnte eine Infektion der Lupinenkeimlinge mit *Colletotrichum lupini* festgestellt werden. Bei den anderen abisolierten rötlichen Konidien handelte es sich meistens um *Fusarium* sp., was sich auch in einem späteren Wachstumsstadium mikroskopisch anhand der gebildeten Sporen bestätigen ließ. Gerade die zu Verwechslungen bei der Diagnose führenden ebenfalls rötlich gefärbten Konidienlager anderer Pilze an Lupinenkeimlingen lassen sich nun mit der PCR eindeutig unterscheiden.



**Abb. 2** Rötliche Konidienlager wurden von Lupinen-Keimlingen geerntet, die DNA nach der CTAB-Methode extrahiert und eine PCR mit dem Primerpaar Collet1 und Collet2 durchgeführt. Nur bei den Extrakten C und E wurde das 135 bp große DNA-Fragment amplifiziert, was eine Infektion mit *Colletotrichum lupini* anzeigt. Ähnlich aussehende rötliche Pilzkonidien zeigten keine Amplifikate.

### Epidemiologische Untersuchungen von *Colletotrichum lupini*

Insgesamt 50 künstlich infizierte Lupinen wurden mit der PCR untersucht. Die CTAB-Extraktionsmethode war gut zum epidemiologischen Nachweis von *Colletotrichum lupini* in Pflanzenteilen der Lupine geeignet. Dabei zeigte sich bei den künstlich inokulierten Lupinenpflanzen kaum eine Ausbreitung von *Colletotrichum lupini* von den verschiedenen Orten der Inokulation. Wenn es zu einer Ausbreitung kam, war in den untersuchten Stängelabschnitten immer nur ein Wachstum des Myzels in akropetaler Richtung nachweisbar. Erwartungsgemäß trat bei den Kontroll-Extrakten von gesunden Lupinen kein PCR Signal auf (Abbildung 3). Obwohl die verwendeten Primer Kreuzreaktionen mit anderen *Colletotrichum* Spezies zeigten (vgl. Abbildung 1), lassen sich die Primer dennoch anwenden, da an den Lupinen nur die Art *Colletotrichum lupini* vorkommt.



**Abb. 3** PCR Nachweis von *Colletotrichum lupini* in infizierter Lupine an verschiedenen Stängelabschnitten. 1-10 zeigen exemplarisch Stängelabschnitte, die mit *Colletotrichum lupini* infiziert sind. LK repräsentiert DNA Extrakte von gesunden Lupinen und PK DNA Extrakte aus *Colletotrichum lupini*-Myzel. S ist der DNA Standard der Fa. MBI.

Die mit der PCR ermittelte Verteilung des Myzels von *Colletotrichum lupini* zeigte in den untersuchten Stängelstücken Unregelmäßigkeiten auf. Der Grund hierfür könnte ein durch das schnellere Steckungswachstum des Lupinenstängels bedingter Abriss des *Colletotrichum*-Pilzfadens sein, der sich bis zur Pflanzenspitze transportieren lässt. Generell war ein Pilzwachstum in akropetaler Richtung feststellbar. In jenen Fällen, bei denen die Stängelspitze durch die Infektion total infiziert worden war und dadurch abstarb (Abbildung 4), fand ein begrenztes Wachstum in basipetaler Richtung statt, um dann wieder beim nächst liegenden Internodium im Seitentrieb in akropetaler Richtung weiter zu wachsen.

Die akropetale Ausbreitung von *Colletotrichum lupini* konnte auch bei infizierten Lupinen aus Feldversuchen mit der PCR bestätigt werden, wobei die Pflanzen zum Teil wegen des starken Befalls abgestorben waren. Aber auch hier zeigte sich genau wie mit sonst gemachten Beobachtungen, dass ein PCR-Signal nicht in allen Stängelabschnitten einer Pflanze gleichmäßig verteilt auftrat.

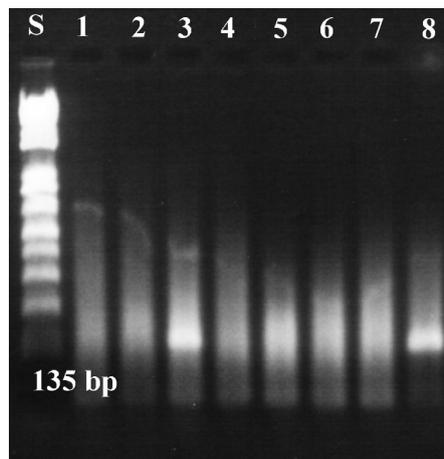


**Abb. 4** Lupine infiziert mit dem Anthracnose Erreger *Colletotrichum lupini*. Basispetales Wachstum des Erregers konnte immer nur dann festgestellt werden, wenn der Haupttrieb vom Erreger zerstört worden war.

#### Samenbürtiger *Colletotrichum lupini*-Nachweis mit der PCR

Untersuchungen zum Vorkommen des Pilzes in Lupinenhülsen aus Feldversuchen ergaben, dass der Pilz, abhängig vom Wachstumsstadium der Lupine, gegen Ende der Vegetationsperiode in den Hülsen nachweisbar war. Ob *Colletotrichum lupini* auch auf oder in den Samen vorkam wurde ebenfalls mit der PCR untersucht.

Zum Nachweis des Vorhandenseins von *Colletotrichum lupini* auf der Oberfläche von Lupinensamen war nur eine Äthanol-Extraktion geeignet, die das Myzel bzw. die Konidien abwaschen konnte. Nur diejenigen Proben zeigten ein deutliches PCR-Signal, die mit Äthanol behandelt worden waren (Abb. 5). Hingegen war eine Wasserbehandlung derselben Samenpartie nicht erfolgreich und wies demzufolge in der PCR keine DNA-Bande auf (Abbildung 5).



**Abb. 5** Oberflächenbehandlung von Lupinensamen mit Wasser und Äthanol und anschließender PCR Analyse auf das Vorkommen von *Colletotrichum lupini*. 1-3: je 15 Lupinensamen gewaschen mit 70% Äthanol. Nur die Probe 3 enthielt den Pilz, nachgewiesen mit der PCR. 4-6: die gleichen Proben wie 1-3, nur mit dest. Wasser gewaschen. Hier wurde kein PCR-Amplifikat gebildet. 7 ist die negativ Kontrolle (Samen einer Gesundpartie) und 8 *Colletotrichum lupini*-DNA.

Bei der Aussaat der mit Äthanol behandelten Lupinensamen (je 100), zeigten die aufgelaufenen Pflanzen im Gewächshausversuch keine Symptome und alle ausgesäten Lupinen keimten und liefen zu gesunden Pflanzen auf. Die mit Wasser extrahierten und ausgesäten Lupinensamen der gleichen Charge zeigten nach dem Aufgang deutliche Symptome der Brennfleckenkrankheit.

Bislang sind Möglichkeiten einer Bestimmung des Befalls von Lupinensamen mit dem Lupinen-Pathogen *Colletotrichum lupini*, der sich auch im Innern und auf der Samenschale befindet, sehr begrenzt. Eine direkte DNA-Aufarbeitung der Lupinensamen hat sich als schwierig erwiesen, weil die in großen Mengen vorkommenden Polysaccharide und Schleimsbstanzungen des Sameninneren eine erfolgreiche DNA-Extraktion verhinderten. Deshalb konnten auch die beiden Primer Collet1 und 2 bei nachweislich mit *Colletotrichum lupini* infiziertem Saatgut auch kein PCR-Amplifikat erzeugen. Eine Möglichkeit zur Aufreinigung von amplifizierbarer DNA, extrahiert aus dem Sameninneren, ist eine Aufreinigung über DNA-bindende Säulen. Mit ihnen lassen sich Polysaccharide und andere Stoffe abtrennen, die dann später die Polymerase hemmen würden. Allerdings ist diese Säulenextraktion zurzeit für Routineuntersuchungen viel zu teuer.

## Diskussion

Bislang sind die Möglichkeiten einer Bestimmung des Befalls von Lupinensamen mit dem Lupinen-Pathogen *Colletotrichum lupini*, der sich sowohl auf der Samenschale als auch im Innern befindet, sehr begrenzt. Keimungsversuche von Lupinen sind zwar relativ zeitaufwendig, können aber Auskunft über die Befallssituation einer bestimmten Saatgut-Charge geben. Diese Aufwuchstests waren seinerzeit die einzig praktikable Methode zum Nachweis von *Colletotrichum lupini* (Feiler, Nirenberg, 1998, Müller et al., 1999). Dabei wurden die für *Colletotrichum lupini* typischen Infektionsorgane (Appressorien) bonitiert, unter Verwendung des SNA-Agars nach Nirenberg (1976).

Ein Nachteil der Frühdiagnose von Konidienlagern an Lupinenkeimlingen besteht darin, dass eine Vielzahl anderer Pilze und Bakterien die Keimlinge von *Colletotrichum lupini* nach relativ kurzer Zeit überwachsen kann und sich eine Diagnose des Erregers sehr schwierig gestalten. Bei Verwendung der Feucht-Kammer-Keim-Methode kann in manchen Fällen der Erreger nicht eindeutig diagnostiziert werden. Deshalb müssen verdächtige Gewebeteile auf Agrarböden übertragen und erneut kultiviert werden (Müller et al., 1999), was dann zu Verzögerungen bei der Diagnose führt. Da es aber spezieller mykologischer Kenntnisse bedarf, um beispielsweise die Konidienlager von *Colletotrichum lupini* von anderen, ähnlich gefärbten Konidien z. B. der Fusarien zu unterscheiden, erwies sich dafür die PCR als Schnelltest sehr hilfreich.

So kann die Verwendung der PCR anstelle des Biotests die Diagnose von *Colletotrichum lupini* zeitlich stark verkürzen. Mit dem nun entwickelten PCR-Test und den Primern Collet1 und Collet2 kann der Erreger der Anthracnose erfolgreich und schnell bei der Lupine von Pilzen mit ähnlicher oder gleicher Konidien-Form und -Farbe differenziert werden. Mit der PCR-Technik lässt sich auch eine semi-quantitative Auswertung der Infektion von Lupinen mit *Colletotrichum lupini* durchführen. Allerdings ist eine eindeutige Quantifizierung der vorhandenen *Colletotrichum lupini*-DNA nur mit einer „Realtime-PCR“ zu erzielen, die aber zu teuer für Routinetests ist.

Um eine noch schnellere PCR-Diagnose zu erzielen, müsste eine direkte Aufarbeitung der Lupinensamen erfolgen, um so *Colletotrichum lupini* direkt aus dem Sameninneren zu extrahieren. Die dann extrahierte DNA könnte mit der sogenannten „nested PCR“ amplifiziert (vervielfältigt) werden, bei der durch eine erneute Amplifikation des bereits bestehenden, ersten Amplifikates mit einem zweiten Primerpaar erfolgt. Das garantiert eine weitaus höhere Sensitivität und auch Spezifität des Nachweises von *Colletotrichum lupini*, weshalb sich mit dieser „nested PCR“ routinemäßig geringste Mengen der pilzlichen Erreger-DNA im Pflanzengewebe nachweisen lassen (Niepold, Schöber-Butin, 1997). Bestrebungen in dieser Richtung werden bereits in Australien kommerziell von der Fa. BioWest durchgeführt und erste Erfolge werden wohl nicht mehr lange auf sich warten lassen.

Das Ergebnis der mit Äthanol behandelten Lupinensamen deutet zunächst einmal auf nur oberflächlich anhaftendes *Colletotrichum lupini*-Myzel bzw. -Konidien hin, da sich sonst in dieser Behandlungsvariante auch Symptome an den Pflanzen hätten zeigen müssen, wenn noch Pilzmyzel innerhalb der Lupinensamen vorhanden gewesen wäre. Nach diesen Ergebnissen scheint sich für die Praxis die Möglichkeit zu eröffnen, oberflächlich anhaftendes *Colletotrichum lupini*-Myzel durch die Behandlung mit 70%igem Äthanol abwaschen zu können. Da erfreulicherweise die Keimfähigkeit der Samen durch die Äthanolbehandlung nicht beeinträchtigt wurde, könnte in Zukunft die Äthanolbehandlung eine „biologische“ Alternative zur chemischen Beizung darstellen. Inwieweit man mit der Äthanolbehandlung auch eine erfolgreiche komplette Abtötung von *Colletotrichum lupini* -also auch im Sameninneren- erzielen kann, soll in Feldversuchen geklärt werden. Vielversprechend könnte dabei das Ergebnis sein, dass keine Symptome bei den ausgesäten Lupinen auftraten, die zuvor mit 70%igem Äthanol behandelten worden waren. Hier könnte tatsächlich der 70%ige Äthanol eine Tiefenwirkung entwickelt haben, so dass auch der innerhalb der Schale vorkommende *Colletotrichum lupini*-Pathogen abgetötet wurde.

Generell war nach der künstlichen Infektion der Stängelbasis mit *Colletotrichum lupini* ein akropetales Wachstum des Pilzes zu verzeichnen. Obwohl bei den im Feld infizierten Lupinen eine massive Schädigung des oberen Teils der Lupinen auffällig war, ließ sich in vielen Fällen dort mit der PCR keine DNA des Erregers nachweisen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Schädigung der Gesamtpflanze entweder durch das Verstopfen von Leitbündeln in der Nähe bzw. direkt am Infektionsort oder durch die Bildung eines noch nicht näher identifizierten Toxins verursacht wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben der relativ zeitaufwendigen Keimungsversuche von Lupinen, zur Auskunft über die Befallssituation einer bestimmten Saatgut-Charge mit *Colletotrichum lupini* (Feiler, Nirenberg, 1998, Müller et al., 1999) auch der Nachweis mit der PCR alternativ anwendbar ist. Epidemiologische Versuche haben gezeigt, dass sich der PCR-Nachweis mit dem Primerpaar Collet1 und Collet2 auch zur Erfassung der Ausbreitung von *Colletotrichum lupini* in einer Lupinenpflanze eignet.

## Zusammenfassung

Zum PCR-Nachweis des Erregers der Anthracnose *Colletotrichum lupini* an Lupinen wurden Primer aus einer bereits sequenzierten ITS 1 Region eines *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates hergestellt. Ein von insgesamt zwei synthetisierten Primerpaaren erwies sich als geeignet, um das Lupinen-Pathogen *Colletotrichum lupini* nachzuweisen. Die im Biotest gekeimten Lupinen wurden visuell auf Befall mit *Colletotrichum lupini* untersucht. Bei typisch aussehenden Konidien konnte das Vorliegen des Erregers der Anthracnose an Lupinen schnell und sicher mit den entwickelten Primern und der PCR diagnostiziert werden, obwohl viele in Form und Farbe ähnliche Konidien anderer Pilze an den Lupinensämlingen vorkamen, die aber kein Amplifikat zeigten. Bei den getesteten Pflanzenproben zeigte sich eine akropetale, aber anscheinend nicht immer gleichförmige Ausbreitung des Pilzes im Stängelgewebe. Nur in Fällen einer totalen Zerstörung von Teilen des Haupttriebes fand ein minimales Wachstum von *Colletotrichum lupini* basipetal statt, um dann wieder akropetal im noch gesunden Seitentrieb weiter zu wachsen. Oberflächlich an Lupinensamen anhaftendes Pilzmaterial konnte mit 70%igem Äthanol abgelöst und die DNA mit der PCR nachgewiesen werden. Die mit Alkohol behandelten Samen keimten in Pflanzversuchen im Gewächshaus gut aus und zeigten später auch keine Symptome.

Stichwörter: *Colletotrichum lupini*, Anthracnose, Lupine, ITS 1 Region PCR-Test, Epidemiologie, Samenkontamination.

## Literatur

- AMELUNG, D. (1997): Anthraknose der Lupine: Wie mit dieser Krankheit „leben“? Raps, 15, 164-166.
- ANONYM (1993): Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut, Ergänzung 1996. A.: Methoden zur Keimfähigkeitsbestimmung, Tabelle 5 A, S. 171 ff. (in Deutsch). Seed Sci. and Technol. 21, Suppl., S. 321.
- DAY, J.P., SHATTOCK, R.C. (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. European Journ. of Plant Path. 103, 379–391.
- FEY, F. (1985): Pflanzenschutzprobleme beim Anbau von Lupinen in Südbrasilien. GTZ-Bericht, 58 pp.
- FEILER, U., NIRENBERG, H. (1998): Eine neue klassische Methode zur Bestimmung des *Colletotrichum*-Befalls an Saatgut von *Lupinus* spp. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 50, 259-262.
- NIEPOLD F., SCHÖBER-BUTIN, B. (1997): Application of the one-tube PCR technique in combination with a fast DNA extraction procedure for detecting *Phytophthora infestans* in infected potato tubers. Microbiological Research 152, 345-351.
- NIERENBERG, H., FEILER, U., HAGEDORN, G. (2002): Description of *Colletotrichum lupini* com. nov. in modern terms. Mycologia, 94 (2), 307-320.
- NIRENBERG, H. (1976): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusariensektion *Liseola*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw., Berlin-Dahlem, 169, 1-117.
- MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. (1992): Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiol. Lett. 77, 137-143.
- MÜLLER, C., STEINBACH, P., BRÖTHER, H. (1999): Zum Nachweis des Anthraknoseerregers *Colletotrichum* sp. an Saatgutproben von Lupinen (*Lupinus* spp.). Gesunde Pflanzen 51, 150-154.
- REED, P.J., DICKENS, J.S.W., O'NEILL, T.M. (1996): Occurrence of anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) on ornamental lupine in the United Kingdom. Plant Pathology 45, 245-248.
- RÖMER, P. (1998): Anthraknose 1997: Bestandsaufnahme und Lösungsansätze. In: M. Wink (Eds): Lupinen in Forschung und Praxis, Heidelberg 99-116.
- SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R., MEEHAN, B.M., BROWN, A.E. (1996): Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. Genome, 39 499-512.
- TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, S., OLIVEIRA, J.H. (2005): Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a Low Level of *C. gloeosporioides* with Olive Anthracnose. Appl. Environm. Microbiology, 71, 2987-2998.

**Meyer, G.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

**Einfluss von Maissorte und Maiszünsler-Befall auf das Auftreten von Fusariosen und Mykotoxingehalt im Körnermais**

**Einleitung**

Mit der Verordnung EU-VO 1881/2006 treten am 1. Juli 2007 europaweit einheitliche Grenzwerte für Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisine (zum 1. Oktober 2007) für unverarbeiteten Mais und zahlreiche Maisprodukte in Kraft (Tabelle1, Anonymus, 2006). Vor diesem Hintergrund und der bisher fehlenden Bekämpfungsmöglichkeiten kommt der *Fusarium*-Resistenz von Maissorten eine zentrale Bedeutung bei der Minimierung der Mykotoxinbelastung von Maisprodukten zu. Doch im Gegensatz zur Bewertung der Stängelfäule gibt es vom Bundessortenamt keine Richtlinien zur Bewertung der Resistenz gegenüber der *Fusarium*-Kolbenfäule. Das Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung einer Prüfungsmethode zur Bewertung der Resistenz von Maissorten gegen Kolbenfusariosen für das Bundessortenamt, um über die Bundessortenliste den Landwirten die Auswahl resistenter Sorten für den Körnermaisbau zu ermöglichen.

**Tab. 1** Grenzwerte für *Fusarium*-Mykotoxine in Maisprodukten nach Verordnung EU-VO 1881/2006

Produkt	Toxin	Höchstmenge	
Unverarbeiteter Mais	Deoxynivalenol (DON)	1750	µg/kg
	Zearalenon (ZEA)	200	µg/kg
	Fumonisine (FUM)	2000	µg/kg <sup>2</sup>
Maismehl, Maisschrot, Maisgrits	Deoxynivalenol	750	µg/kg <sup>1</sup>
	Zearalenon	200	µg/kg
	Fumonisine	1000	µg/kg <sup>2</sup>
Lebensmittel aus Mais zum direkten Verzehr (Cerealien)	Deoxynivalenol	500	µg/kg
	Zearalenon	50	µg/kg
	Fumonisine	400	µg/kg <sup>2</sup>
Getreidekost aus Mais und Beikost für Kleinkinder & Säuglinge	Deoxynivalenol	200	µg/kg*
	Zearalenon	20	µg/kg*
	Fumonisine	200	µg/kg* <sup>2</sup>

<sup>1</sup> gültig ab 01.Juli 2006, <sup>2</sup> gültig ab 01.Oktober 2007, \* in Bezug auf die Trockenmasse

Der *Fusarium*-Befall im Mais führt je nach Entwicklungsstadium der Maispflanze zu sehr unterschiedlichen Symptomen. Bei früher Aussaat und niedrigen Bodentemperaturen befällt *Fusarium* spp. als Auflaufkrankheit Körner und Keimlinge, was zu einem lückigen Auflaufen des Bestandes oder zum Absterben oder Verkümmern im 1-2 Blattstadium führen kann. Von dieser frühen Infektion ausgehend können die Fusarien Wurzel- und Stängelgewebe durchwachsen und insbesondere bei Trockenheit als Wurzel- und Stängelfäuleerreger die Wasserversorgung der Pflanze stören und zu einer Notreife führen. Entscheidend für die Mykotoxinbelastung des Erntegutes ist jedoch der *Fusarium*-Kolbenbefall. Die Infektion erfolgt hauptsächlich über die Nabenfäden und den Nabenfädenkanal, jedoch bieten auch Wunden durch Maiszünslerfraß (*Ostrinia nubilalis*) oder Hagelschlag günstige Eintrittspforten für die verschiedenen *Fusarium*-Arten (Munkvold, 2003). Das Pilzmyzel befällt entweder einzelne Körner oder breitet sich flächig vom Infektionspunkt aus. Je nach auftretender *Fusarium*-Art ist das Myzel weiß- bis tiefrot gefärbt und es werden zahlreiche unterschiedliche Mykotoxine gebildet, wie man Tabelle 2 entnehmen kann.

**Tab. 2** Auftreten und Mykotoxinbildung von *Fusarium*-Arten an Mais in Europa

Art	Häufigkeit		Toxine
	Mittel-	Südeuropa	
<i>F. graminearum</i>	+++	+	DON, NIV, ZEA
<i>F. subglutinans</i>	++	±	MON, BEA, FUP
<i>F. avenaceum</i>	++	±	MON
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEA, ZOH
<i>F. culmorum</i>	+	-	DON, NIV, ZEA, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	-	T2, HT2
<i>F. poae</i>	+	-	DAS, NIV
<i>F. verticillioides</i>	+(+)	+++	FUM
<i>F. proliferatum</i>	±	+++	FUM, FUP, MON, BEA

\* BEA: Beauvericin, DAS: Diacetoxyscirpenol, FUP Fusaproliferin, FUS Fusarenon X, MON: Moniliformin, NIV: Nivalenol, (H)T2: (H)T2-Toxin, ZOH  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol (nach Logrieco et al., 2002, geändert)

## Material und Methoden

In einem Sortenversuch wurden im Jahr 2006 zwanzig Körnermais-Sorten (je 10 mittelfrüh bzw. mittelspät) in Freilandversuchen auf ihre Anfälligkeit gegen *Fusarium* spp. untersucht. Ein vergleichender Sortenversuch wurde nach Vorfrucht Mais an den Standorten Sickte (bei Braunschweig) und in Münzesheim (Kraichtal, Baden-Württemberg) in zwei Varianten in je 4 Wiederholungen à 30 qm angelegt. In der ersten Variante gab es nur die verbliebenen Maisstoppeln der vorhergehenden Saison als Inokulumquelle, während in der zweiten Variante zusätzlich rund 6-7 zusätzliche Maisstoppeln pro m<sup>2</sup> zur Erhöhung des Inokulumdrucks ausgebracht wurden. Zur Bewertung der Kolbenfusariosen wurden zur Ernte die Lieschblätter von den Kolben entfernt und die befallene Kolbenfläche an 60 Kolben pro Sorte und Variante bonitiert, wobei Kolben, die durch Zünslerbefall geschädigt waren, mit erfasst wurden. Die Erfassung der Stängelfäule erfolgte durch Aufschneiden von 10 Stängeln je Sorte und Variante. Die Bestimmung der Mykotoxine Deoxynivalenol und Fumonisin B1 erfolgte durch ELISA.

Zusätzlich wurden am Standort Sickte Versuche zur künstlichen Inokulation der Maissorten durchgeführt. Dabei wurde zu BBCH 59 das 3. Stängelinternodium über eine Wunde mit 1 ml einer Konidien suspension mit  $5 \times 10^5$  Konidien/ml von fünf verschiedenen *Fusarium*-Arten (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* und *F. subglutinans*) inokuliert. Die Inokulation der Kolben erfolgte mit einem identischen Inokulum zu BBCH 69 (Ende Blüte) entweder mit 1 ml Suspension in den Nabenfädenkanal oder mit einer Lanzettnadel durch die Lieschblätter (Lemmens, 1999, Clements et al., 2004). Die Stängelfäule wurde 4 Wochen nach der Inokulation und dann alle 2 Wochen als befallene Fläche visuell bonitiert. Die Bonitur der befallenen Kolbenfläche erfolgte zur Ernte nach dem Entfernen der Lieschblätter. Zudem wurden aus zwei Praxisschlägen in Hötzum (bei Braunschweig) und Meitingen (bei Augsburg, Bayern) zu den Stadien BBCH 32, BBCH 59 (Ende Rispen schieben) und BBCH 79 (Späte Milchreife) jeweils 10 Pflanzen entnommen und die Internodien 1, 3, 5, 7 und der Kolbenstängel auf Selektivnährmedium ausgelegt, um die Befallshäufigkeit mit *Fusarium* spp. zu ermitteln.

## Ergebnisse

Das Versuchsjahr 2006 war von extremen Witterungsbedingungen geprägt. Die Aussaat des Mais erfolgte Ende April unter optimalen trocken-warmen Bedingungen, was zu einem zügigen Auflaufen führte. Die folgende kühl-feuchte Periode hemmte das Wachstum der Jungpflanzen und bedeutete gleichzeitig gute Bedingungen für Wurzelinfektionen durch *Fusarium* spp.. Mit der Hitzeperiode Anfang Juni wurde der Entwicklungsrückstand durch ein extremes Wachstum der Maispflanzen aufgeholt. Zur Blüte im Juli waren aufgrund fehlender Niederschläge die Infektionsbedingungen für *Fusarium* spp. am

Kolben sehr ungünstig, was sich am Standort Sickte in einem sehr geringen Befall zeigte. In Münzesheim dagegen führten andauernde Niederschläge im August zu einer Nachblüte, die eine zweite, diesmal günstige Infektionsperiode bedeutete. Zugleich kam es dort auch zu einem sehr starken Auftreten (26% geschädigte Kolben) des Maiszünslers, dessen Fraßschäden an Kolben und Stängel Eintrittspforten für Pilzinfektionen boten.

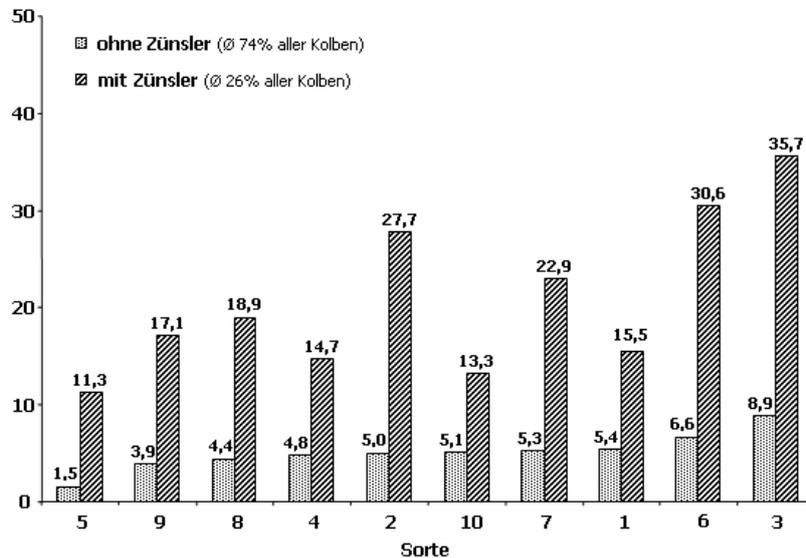


Abb. 1 Einfluss von Maiszünsler-Schäden auf die durchschnittlich mit *Fusarium* befallene Kolbenfläche 2006

Weder am Standort Sickte, noch in Münzesheim konnte zwischen den Varianten ohne / mit zusätzlicher Inokulation durch zusätzliche Maisstoppeln ein Unterschied beim Kolbenbefall oder Artenspektrum festgestellt werden. In Sickte lag der durchschnittliche Befall bei unter einem Prozent und nur eine Sorte zeigte mit rund 18% befallener Kolbenfläche einen sehr starken Befall. Hierbei dominierten die *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. poae*, so dass weder DON noch Fumonisin B1 in nennenswerter Menge gefunden wurden.

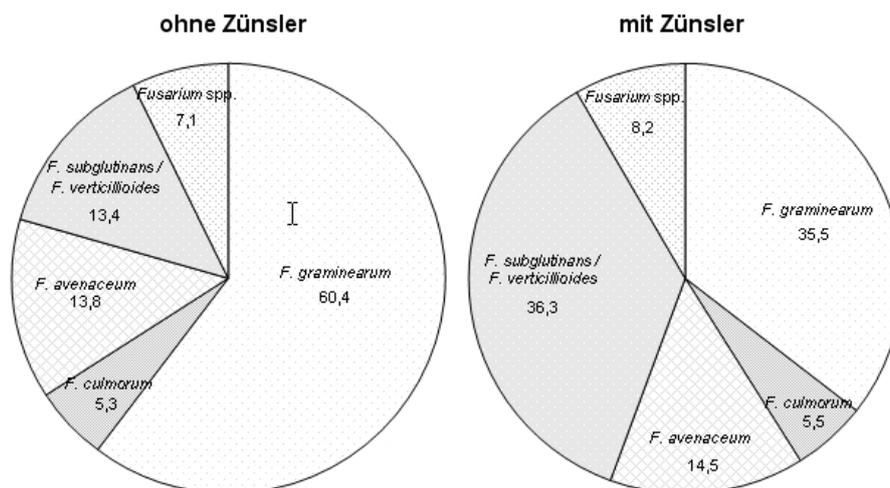
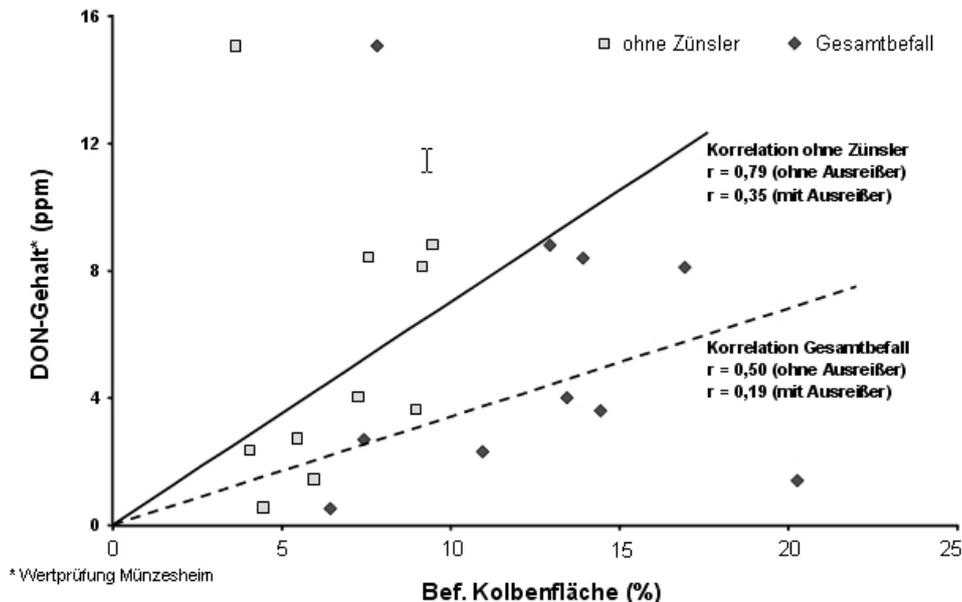


Abb. 2 Artenspektrum von *Fusarium* spp. an unbeschädigten / Zünsler-geschädigten Maiskolben am Standort Münzesheim

Die befallene Kolbenfläche bei den mittelfrühen Sorten lag in Münzesheim ohne Zünslerschäden zwischen 1,5 und 8,9% und mit Schädigung zwischen 11,3% und 35,7%. Bei den mittelspäten Sorten lag die befallene Kolbenfläche zwischen 3,8% und 17,6% ohne Zünsler und zwischen 16,9% und 45,8% mit Zünsler. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der befallenen Kolbenfläche und der Anfälligkeit

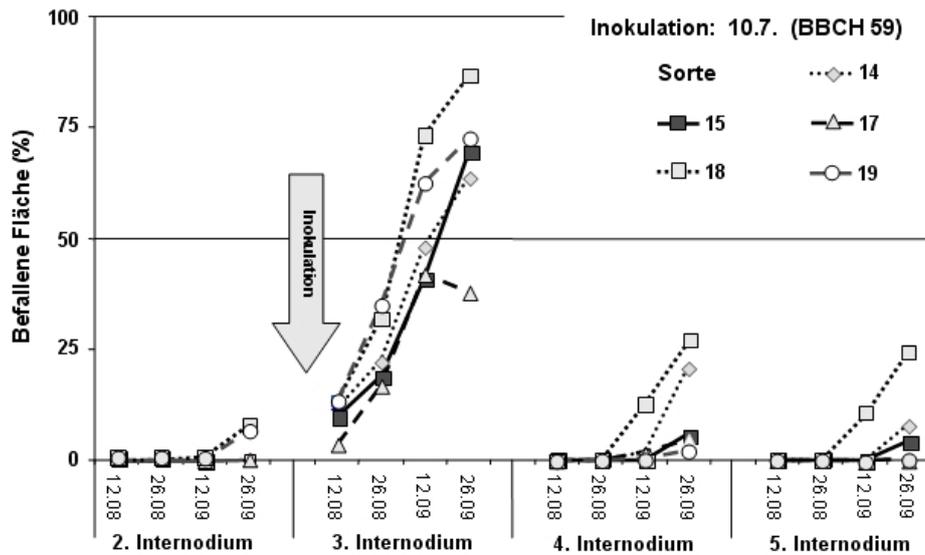
der Maissorte gegenüber Stängelfusariosen laut Bundessortenliste beobachtet werden. Das Artenspektrum bei unbeschädigten Kolben wurde vor allem von *F. graminearum* dominiert, während *F. avenaceum*, *F. subglutinans* und *F. verticillioides* ungefähr gleich häufig auftraten. An Zünsler-geschädigten Kolben mit ihrer 3-5 mal größeren Befallsfläche verschob sich das Artenspektrum zugunsten von *F. verticillioides* und *F. subglutinans*, die zusammen genauso häufig isoliert wurden wie *F. graminearum* (Munkvold, 2003).

Das häufige Auftreten von *F. graminearum* und *F. verticillioides* spiegelt sich auch in der hohen Mykotoxinbelastung mit Deoxynivalenol und Fumonisin am Standort Münzesheim wieder. Nur zwei Sorten blieben unter dem in der Verordnung (EG) Nr. 856/2005 festgelegten Grenzwert von 1,75 mg DON/kg Mais. Bei den anderen Sorten lagen die DON-Gehalte zwischen 2,4 und 16 ppm DON, was insgesamt einen durchschnittlichen Gehalt von rund 4,5 ppm entspricht. Die Gehalte an Fumonisin B1 lagen zwischen 0,3 und 2,5 ppm und damit in den meisten Fällen unter dem Grenzwert von 2000 mg/kg, doch wurden insbesondere bei Zünsler-geschädigten Kolben Überschreitungen des Grenzwertes festgestellt. Das häufige Auftreten von *F. avenaceum* und *F. subglutinans* lässt zudem eine Kontamination der Proben mit Moniliformin erwarten, welches mit ELISA aber nicht nachzuweisen ist. Wie man der folgenden Abbildung 3 entnehmen kann, waren insgesamt die DON-Gehalte mit der bonitierten befallenen Kolbenfläche korreliert, auch wenn ein Ausreißer von 15 ppm DON bei 3,5% Befall ohne Maiszünsler bzw. 7% Gesamtbefall, den Korrelationskoeffizienten deutlich verschlechterte.



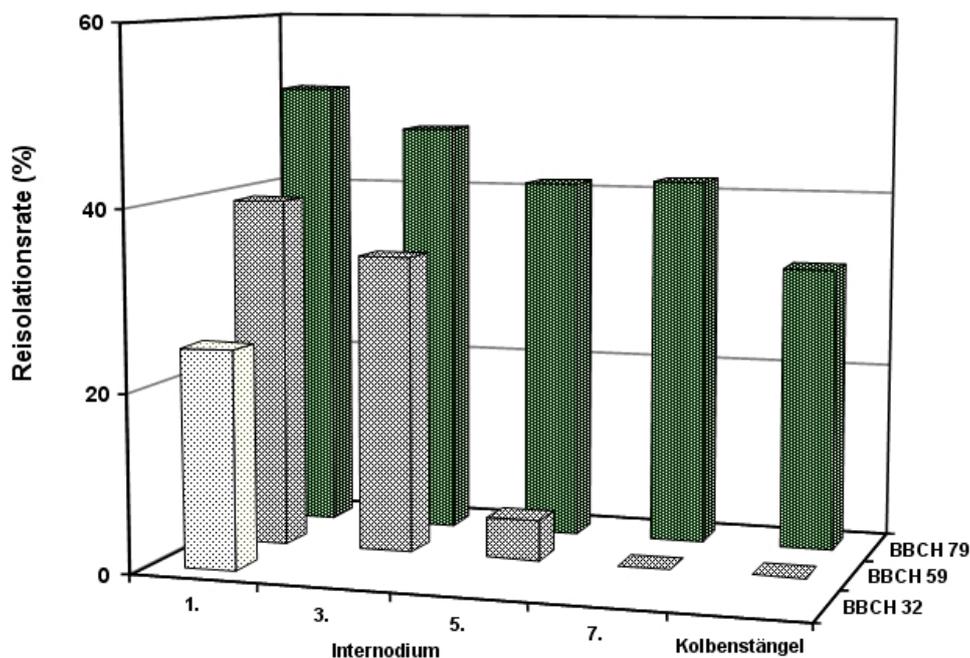
**Abb. 3** Korrelation zwischen *Fusarium*-befallener Kolbenfläche und DON-Gehalt

Bei der Inokulation über den Nabenfädenkanal zeigten sich Fäulesymptome vornehmlich an der Spitze des Kolbens, vereinzelt jedoch traten Symptome auch an tiefer gelegenen Bereichen des Kolbens auf. Bei der Wundinokulation konzentrierte sich die Kolbenfäule auf den Bereich um die Einstichstelle und betraf auch immer wieder die Kolbenspindel. Beim Vergleich der künstlichen Inokulationsmethoden mit dem natürlichen Kolbenbefall zeigte sich, dass nur wenige hoch anfällige Sorten mit diesen Methoden sicher als anfällig identifiziert werden konnten (Lemmens, 1999, Pascale et al., 1997). Mit der Inokulation über den Nabenfädenkanal wurde am Standort Sickte im Mittel eine ähnliche Befallsstärke erreicht wie unter natürlichen Bedingungen in Münzesheim. Bei den anfälligen Sorten lag nach Inokulation der Befall deutlich über dem natürlichen Befall, während starke Schwankungen keine Differenzierung zwischen den anderen Sorten erlaubten (Pascale et al., 2002). Nur die drei Sorten, die bei der Wundinokulation einen Befall >10% aufwiesen, waren gleichzeitig die Sorten mit einer befallenen Kolbenfläche >40% bei Schädigung durch den Maiszünsler.



**Abb. 4** Ausbreitung von *Fusarium*-Stängelfäule bei mittelspäten Sorten nach künstlicher Inokulation

Bei der künstlichen Inokulation des Stängels mit einer Konidiensuspension in das dritte Internodium zeigten sich insgesamt nur geringe Sortenunterschiede. Die Ausbreitung der Fäulesymptome blieb vereinzelt zwar auf einen engen Bereich um die Einstichstelle begrenzt, meist breitete sie sich über mehrere Internodien vornehmlich akropetal aus. So waren bei der Abschlussbonitur Ende September 2006 bei den mittelfrühen Sorten durchschnittlich 55-65% der inokulierten Internodien verfault und bei den mittelspäten Sorten rund 65-75%. Der geringe Befall der Sorte 17 von 38% beruht auf der Bonitur einiger nicht ausreichend inokulierter Stängel, während sich bei der Sorte 18 mit der Stängelfäule-Einstufung 3 (Bundessortenliste) eine höhere Anfälligkeit durch eine deutliche Symptomausprägung in den benachbarten Internodien andeutet. Insgesamt konnte die Einstufung der Sorten in der Bundessortenliste nur bedingt nachvollzogen werden. Bei zwei Sorten wurde *Fusarium* spp. überdurchschnittlich häufig sogar aus Kolbenstängeln isoliert. Trotz massiver Fäulesymptome blieben die Stängel bis zur Ernte druckfest und es kam zu keinem Lager.



**Abb. 5** Ausbreitung von *Fusarium* spp. im Maisstängel während der Vegetationsperiode in Praxis schlägen

Die symptomlose Ausbreitung, die sich in dem Stängelinokulationsversuch zeigte, konnte auch bei den Proben aus den Praxisschlägen beobachtet werden (Desjardins, Plattner 1998). Bereits zu BBCH 32 konnte in rund 25% der 1. Internodien eine Infektion durch *Fusarium* spp. nachgewiesen werden. Bereits zu BBCH 59 stieg der Anteil auf knapp 40% und erreichte zu BBCH 79 insgesamt 55%. Gleichzeitig breitete sich der Pilz akropetal aus und konnte zu BBCH 69 in einem Drittel aller 3. Internodien nachgewiesen werden und vereinzelt sogar im 5. Internodium. Am Ende der Milchreife (BBCH 79) hatten die Fusarien sogar in 40 % aller untersuchten Pflanzen systemisch das 7. Internodium und in 30% der Fälle den Kolbenstängel erreicht. Ein Zusammenhang mit Kolbenfusariosen konnte aber nicht beobachtet werden, wie es Desjardins und Plattner (1998) beschrieben haben. Aus dem breiten *Fusarium*-Spektrum traten im Stängel fast ausschließlich *F. culmorum* und *F. avenaceum* auf.

## Zusammenfassung

Sowohl unter den ungünstigen Infektionsbedingungen in Sickinge bzw. den sehr guten Infektionsbedingungen in Münzesheim konnte kein Unterschied beim Kolben- und Stängelbefall zwischen den Varianten mit bzw. ohne Zusatzinokulum festgestellt werden. Am Standort Münzesheim zeigten sich deutlich Sortenunterschiede, wobei die mittelfrühen Sorten etwas geringer befallen waren als die mittelspäten Sorten (Pascale et al., 1997). Die gleiche Tendenz zeigte sich auch beim Befall Maiszünsler-geschädigter Kolben, wobei einzelne Sorten stärker reagierten als andere. Die Sorte mit dem deutlich stärksten Kolbenbefall zeigte auch am Standort Sickinge trotz des geringen Befallsdrucks den signifikant höchsten Kolbenbefall.

In Münzesheim dominierte an unbeschädigten Kolben *F. graminearum*, während sich an Maiszünsler-geschädigten Kolben das Spektrum zugunsten von *F. verticillioides* und *F. subglutinans* verschob. Dies zeigte sich auch an den höheren Gehalten von Fumonisin B1, neben der hohen DON-Belastung, in den entsprechenden Proben. Von Kolben mit fleckigem Befall, der in Frankreich als *F. moniliforme* beschrieben wird, wurden an beiden Standorten hauptsächlich *F. avenaceum* und *F. poae* isoliert, was auch den geringen Gehalten an DON und Fumonisin B1 entsprach. Im Vergleich zu Logrieco et al. (2002) trat *F. verticillioides* häufiger auf als erwartet, insbesondere nach Schäden durch den Maiszünsler.

Bei den Versuchen mit einer künstlichen Inokulation konnte der Kolbenbefall der Maissorten nur bedingt nachvollzogen werden und eine Differenzierung von geringer und mittlerer Anfälligkeit war nicht möglich. Nur wenige höher anfällige Sorten konnten auch durch künstliche Inokulation eindeutig ermittelt werden, was für eine Bewertung der Sorten hinsichtlich ihrer *Fusarium*-Anfälligkeit aber nicht ausreichend ist.

Stängelfäule trat an beiden Versuchsstandorten nur im geringen Maße auf und trat in Münzesheim fast immer in Verbindung mit Fraßschäden des Maiszünslers auf. Die häufigsten *Fusarium*-Arten waren *F. culmorum* und *F. avenaceum*, während *F. graminearum* seltener isoliert wurde. Die Ausbreitung der Fusarien im Stängel erfolgte symptomlos und hauptsächlich akropetal, wie sich sowohl im Inokulationsversuch als auch auf den Praxisschlägen zeigte.

## Ausblick

Aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse und Veröffentlichungen lassen sich für die Methoden zur Bewertung der Anfälligkeit von Maissorten gegenüber *Fusarium*-Kolbenfäule folgende Forderungen stellen:

- Freilanduntersuchungen in Körnermais-Anbaugebieten
- Anbau in enger Mais-Fruchtfolge (hoher Inokulumdruck)
- nachhaltige Bekämpfung des Maiszünslers
- Bonitur der befallenen Kolbenfläche und Maiszünsler-Schäden
- Bestimmung der beteiligten *Fusarium*-Arten (PCR)
- Bestimmung von DON- und Fumonisin-Gehalt, evtl. Zearalenon

Auf dieser Basis sollte eine zuverlässige Einstufung von Maissorten für die Bundessortenliste möglich sein, die dann den Landwirten die Chance bietet mit weniger anfälligen Sorten das Risiko einer Toxinbelastung des Erntegutes zu mindern und so die Grenzwerte der Richtlinie EU-VO 1881/2006 auch in ungünstigen Jahren einhalten zu können.

## Literatur

- ANONYMUS (2006): Verordnung EU-VO 1881/2006, Amtsblatt der Europäischen Union, L 364/5.
- CLEMENTS, M.J., MARAGOS, C.M., PATAKY, J.K., WHITE, D.G. (2004): Source of Resistance to Fumonisin Accumulation in Grain an *Fusarium* Ear and Kernel Rot of Corn, American Journal of Plant Pathology 94 (3): 251-259.
- DESJARDINS, A.E., PLATTNER, R.D. (1998): Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production, Plant. Dis. 82:953-958.
- LEMMENS, M. (1999): Anwendung künstlicher Inokulationsmethoden zur Kolbenfusariose-Resistenzbestimmung bei Mais, Bericht über die 50. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter 1999, 55-62.
- LOGRIECO, A., MULE, G., MORETTI, A., BOTTALICO, A. (2002): Toxigenic *Fusarium* Species and Mycotoxins Associated with Maize Ear Rot in Europe, European Journal of Plant Pathology, 108 (7): 597-609.
- MUNKVOLD, G.P. (2003): Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mykotoxins in maize ears, European Journal of Plant Pathology 109: 705-713.
- PASCALE, M., VISCONTI, A., PRONCZUK, M., WISNIEWSKA, H., CHELKOWSKI, J. (1997): Accumulation of Fumonisin in Maize Hybrids Inoculated under Field Conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon, J. Sci. Food Agric. 74:1-6.
- PASCALE, M., VISCONTI, A., CHELKOWSKI, J. (2002): Ear rot susceptibility and mykotoxin contamination of maize hybrids under field conditions, European Journal of Plant Pathology 108: 645-651.

**Rodemann, B., Mielke, H.**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

## **Anfälligkeit verschiedener Winterweizensorten gegenüber Ährenfusarium (Zulassungsjahre 2001 bis 2006)**

### **1. Einleitung**

Die Partielle Taubährigkeit, verursacht durch verschiedene *Fusarium*-Arten, ist derzeit die gefährlichste Ährenkrankheit im Weizenanbau. Der Befall mit Ährenfusarien führt bei Weizen zu Ertragsverlusten, Qualitätsbeeinträchtigungen und zu Deoxynivalenol-Belastungen des Erntegutes (Bartels, Rodemann, 2003). Die Mykotoxine können für Mensch und Tier gefährlich sein, wenn sie mit der Nahrung aufgenommen werden.

Aus der Sicht der Anbauer, der Ernährung und der Verarbeiter gilt es die Forderung nach Resistenzzüchtung gegen die Mykotoxinbildner zu forcieren. In Anbetracht der Bedeutung der Ährenfusarien ist diese Krankheit zu einem Zulassungskriterium im Rahmen der Beurteilung des landeskulturellen Wertes für Winterweizen beim Bundessortenamt geworden. Das verstärkte Auftreten der Partiellen Taubährigkeit sollte für die Getreidezüchtung Anlass sein, noch mehr nach verbesserten Weizensorten gegenüber diesem Schaderregerkomplex zu suchen, als es bislang der Fall ist.

Seit Jahrzehnten wurden und werden auch heute noch im Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland der Biologischen Bundesanstalt Resistenzbewertungen gegen Ährenfusarien mit natürlich induzierte und künstlichen Sporeninokulationen durchgeführt (Rodemann, 2002). Dies geschieht in Amtshilfe für das Bundessortenamt.

In der vorliegenden Arbeit soll über die Anfälligkeit von neueren Winterweizensorten gegenüber *Fusarium culmorum* berichtet werden, die in den Jahren 2001 bis 2006 zugelassenen wurden. Anhand dieser Resistenzuntersuchungen soll auch geklärt werden, inwieweit sich Fortschritte in der Resistenzzüchtung erzielen ließen.

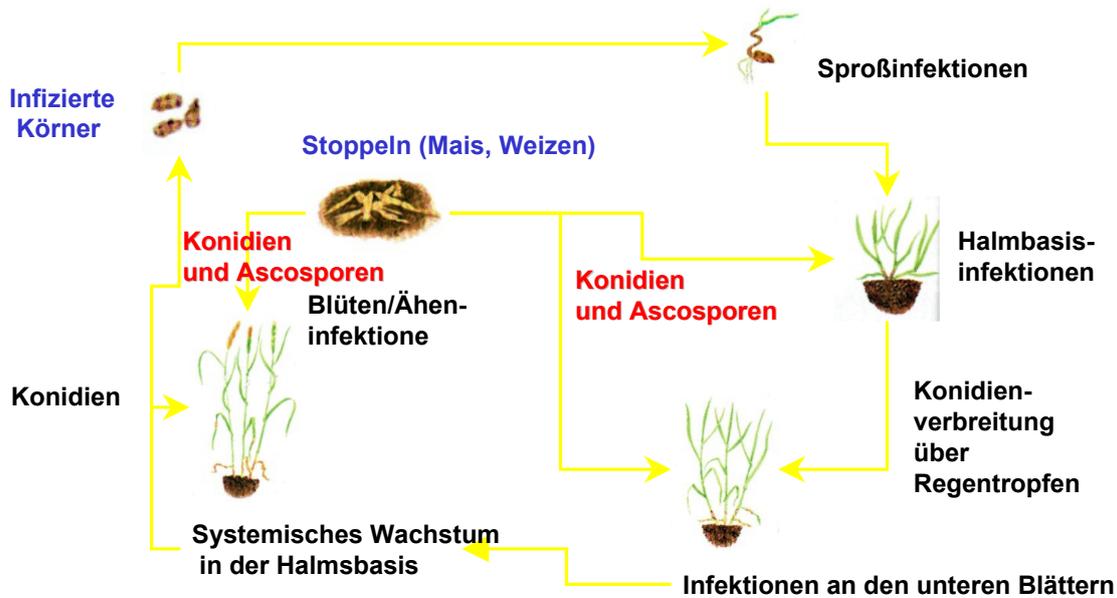
### **2. Schaderreger und Schadbild**

Kommt es zu einem Fusariumährenbefall durch *F. culmorum* oder *F. graminearum*, bleichen infolge von Infektionen und nachfolgender Pilzausbreitung einzelne Ährchen und Ährenpartien aus. Der Befall äußert sich zuerst in einer Violettfröbung der Ährchen, danach bleichen sie aus (Weißährigkeit). Im weiteren Befallsverlauf sind an der Spindel bräunlich bis violette Verbräunungen zu erkennen. In Abhängigkeit von der Witterung bilden sich an der Basis des Ährchens und z.T. auf den Spelzen orangerote Sporenlager. Bei den Fruchtarten Weizen – Triticale – Hafer - Roggen – Sommer- und Wintergerste variieren die Befallssymptome in ihrer Ausprägung.



**Abb. 1** Befallssymptome nach erfolgter Infektion durch *F. culmorum* oder *F. graminearum* beginnend mit Einzelährchenbefall und einer folgenden Befallsausbreitung in der Ähre, Ausbildung von Sporenlager in den Kulturen Weizen (A), Sommergerste (B) und Triticale (C)

Die Blüteninfektion mit Fusarium führt in der Regel zur Kümmerkornbildung und Toxinbelastung in den Karyopsen. Besonders gefährdet ist der Weizen - und mittlerweile auch der Triticale – durch eine Infektion im empfindlichen Entwicklungsstadium der Blüte. Erfolgt eine Infektion bereits zum Blühbeginn, kommt es zu extremer Kümmerkornbildung bzw. die Kornfüllung (z.B. Sommergerste) bleibt aus. Bei späteren Infektionen - in der Zeit vom Blühende bis zum Beginn der Milchreife - entwickelt sich das Korn annähernd normal. Oft ist optisch kaum ein Unterschied zwischen gesunden und kranken (infizierten) Körnern festzustellen. Dennoch können diese Körner in der äußeren Samenschale (Testa) vom Fusariumpilz durchsetzt sein und schädliche Toxine enthalten. Unter diesen Gegebenheiten (z.B. im Erntejahr 2002) erweist sich die technische Abtrennung des Besatzes durch Windreinigung oder Siebsortierung als problematisch.

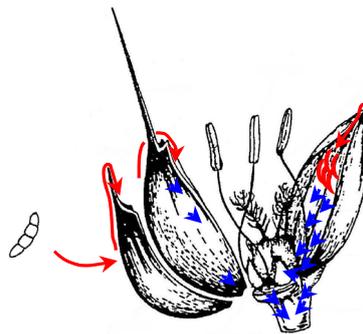


**Abb. 2** Inokulumquellen für eine mögliche Fusariumähreninfektion bei Getreide, Entwicklungszyklus nach Obst und Paul (1993), modifiziert

## 2.1 Befallsverlauf und Ausbreitung

Zu den Inokulumquellen der *Fusarien* sp. zählen infizierte Körner, Weizen- und Maisstoppelreste sowie befallene Pflanzenteile, von denen Ascosporen bzw. Konidien durch Wind oder Regenspritzer in die Ähre gelangen können. Wenn zum Zeitpunkt des Sporenflugs die Weizenpflanze das anfällige Blütenstadium erreicht hat, so kann der Pilz mit seinen Infektionshyphen in die Pflanze eindringen. Die Penetration durch die Infektionshyphen geschieht auf der Innenseite der Spelzen.

Zu den wichtigsten „Infektionspforten“ zählen die Antheren, der Fruchtknoten und Spaltöffnungen auf der Innenseite der Spelzen. Sollten Ascosporen durch Wind auf die Außenseite der Spelzen kommen, so müssen ihre Infektionshyphen erst auf die Innenseite wachsen, um die Penetration (Eindringen in die Pflanze) vollziehen zu können.



**basipetales  
Wachstum**

**Abb. 3** Schematische Darstellung des Pilzwachstums auf der Oberfläche der Spelzen bzw. nach erfolgreicher Infektion in dem Ährchen; Kang und Buchenauer (1999).

Nach erfolgter Infektion setzt ein basipetales Wachstum des Pilzes von der Spelze, dem Fruchtknoten oder den Antheren ausgehend zur Spindel hin ein. Je nach Widerstand der Fruchtart und Sorte bewegt sich der Erreger weiter basipetal in den Leitbahnen der Spindel und unterbindet durch massives Myzelgeflecht den Nährstofftransport zu den höher positionierten Kornanlagen. Folglich findet man in der Regel oberhalb des Infektionsortes nur kümmerliche Körner ohne Fusariumbesatz und Toxinbelastung.



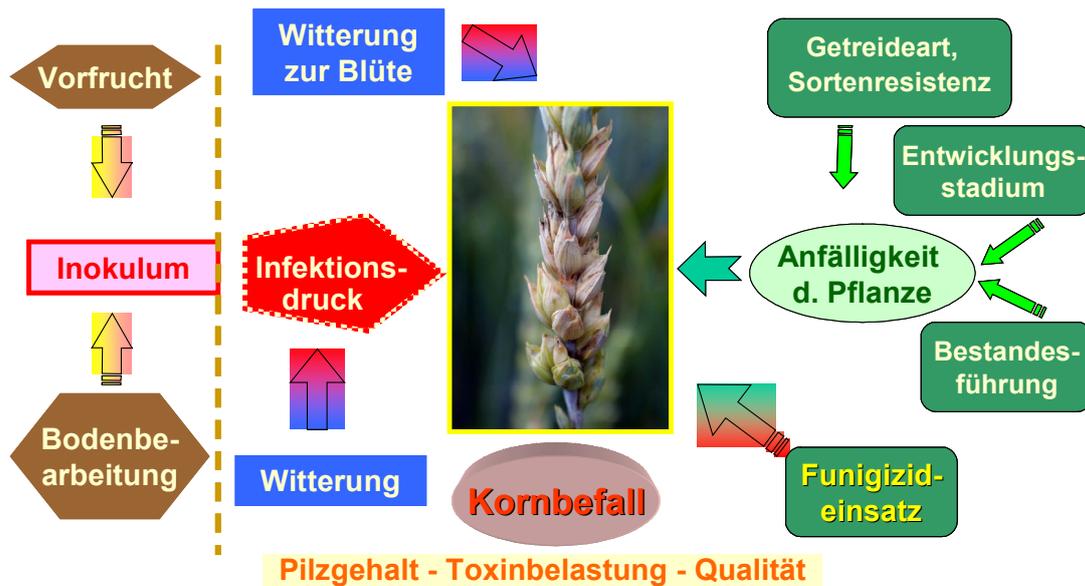
**Abb. 4** Befallsausbreitung von *F. culmorum* nach erfolgreicher Einzelährcheninfektion (Punktinokulation mit rotem Band gekennzeichnet)

Erste Mykotoxine können bereits bei Kontakt von Penetrationshyphen und Pflanzenoberfläche in die Pflanzenzellen abgegeben werden. Die größte Menge der toxischen Stoffwechselprodukte wird allerdings vom Pilz in der Samenschale und im Mehlkörper gebildet.

## 2.2 Einfluss- und Risikofaktoren

Zahlreiche Untersuchungen verschiedener Institutionen konnten aufzeigen, dass Vorfrucht, Bodenbearbeitung, Sortenwahl, Witterung und Fungizideinsatz die wichtigsten Einflussfaktoren für die Infektion und den Befall des Weizens mit Fusarien darstellen. Von der Vorfrucht und Bodenbearbeitung hängt die Menge des Inokulums ab. Durch das Zusammenwirken des Infektionspotentials und der Witterung werden Infektionszeitpunkt und -druck bestimmt. Das sind die Voraussetzungen für einen Ährenbefall. Im Wesentlichen hängt der Ährenbefall unter Risikobedingungen von der Anfälligkeit der Weizensorte und bei einer Fungizidapplikation von deren Wirkung ab. Ein frühzeitig sichtbarer Ährenbefall ist häufig ein Indiz für eine Kornbeeinträchtigung.

Stellt sich zur Blüte des Weizens eine schaderregerbegünstigende Witterung mit ausreichender Feuchtigkeit und Temperaturen  $>18\text{ °C}$  ein, kann sich das Befallsrisiko um ein Vielfaches erhöhen. Insbesondere die Witterung nach erfolgreicher Infektion hat einen entscheidenden Einfluss auf Pilzwachstum und Toxinbildung. Temperaturen zwischen  $25\text{ und }28\text{ °C}$  und  $a_w$ -Werten von  $0,97$  fördern sowohl die Ausbreitung von *F. culmorum* und *F. graminearum* als auch die Bildung der Trichothecene B (z.B. Deoxynivalenol und Nivalenol).



**Abb. 5** Zusammenhang zwischen dem Einfluss und dem Zusammenwirken verschiedener Einflussfaktoren auf den Fusariumährenbefall am Beispiel des Weizens

In dem Komplex der Einflussfaktoren ist deutlich zu erkennen (s. Abbildung 5), dass der Anbau geringanfälliger oder resistenter Weizensorten einen entscheidenden Ansatz darstellt, der sowohl das Risiko eines Ährenfusariumbefalls als auch das mit Toxinen belasteter Erntepartien zu mindern vermag. Für die Anbauplanung sind Kenntnisse über die Blühmorphologie, Anfälligkeit und die pflanzeigenen Abwehrreaktionen der Weizensorte, insbesondere im Hinblick auf eine Unterbindung der Mykotoxinakkumulation im Korn, von großer Bedeutung für den Landwirt.

### 3. Resistenztypen gegenüber Ährenfusarium

Die Weizenzüchtung ist nach wie vor bemüht, der Praxis resistente oder wenig anfällige Weizensorten gegenüber Ährenfusarium zur Verfügung zu stellen. Bislang konnten noch keine vollresistente Genotypen, aber doch eine Reihe von Sorten mit einer deutlich geringen Anfälligkeit zugelassen werden. Für die Anbauplanung sind somit Kenntnisse über die Anfälligkeit von Sorten, ihre Blümmorphologie und ihre pflanzeigenen Abwehrreaktionen, besonders im Hinblick auf eine Unterbindung der Mykotoxinakkumulation im Korn von besonderem Interesse des Landwirts.

Zur Beurteilung der Anfälligkeit gegenüber Ährenfusariosen lassen sich Weizensorten und – zuchtstämme nach Schröder und Christensen (1963) sowie nach Mesterhazy (1987, 1995, 1999) in sog. Resistenztypen einteilen. Allerdings ist die Resistenz gegen *Fusarium sp.* immer als Zusammenwirken verschiedener Faktoren zu sehen, die von der Symptomausprägung, der Krankheitsentwicklung bei verschiedenen Typen und weiteren morphologischen Faktoren und Parametern beeinflusst wird.

**Resistenztyp I:** Widerstandskraft gegen einen Primärbefall, geringe Anzahl befallener Ährchen (Schroeder, Christensen, 1963)

**Resistenztyp II:** Widerstandskraft gegen die Schaderregerausbreitung in der Spindel oder im Ährchen nach erfolgter Infektion (Schroeder, Christensen, 1963))

**Resistenztyp III:** Resistenz gegen einen Einzelkornbefall ausgehend von befallener Spindel (Mesterhazy, 1987, 1995, 1999)

**Resistenztyp IV:** Toleranz der Sorte gegen einen Fusariumbefall (Mesterhazy, 1987, 1995, 1999)

**Resistenztyp V:** Resistenz gegen eine Toxinakkumulation im Korn bzw. die Fähigkeit zum Toxinabbau (Miller et al., 1985; Miller, Arnison, 1986; Mesterhazy, 1999)

**Resistenztyp VI:** Resistenz gegen eine späte Ährenbleiche (unveröffentl. Mesterhazy)

**Resistenztyp VII:** Resistenz gegen das Absterben von Ährenteilen oberhalb des Infektionspunktes (unveröffentl.)

Bei diesen idealisiert dargestellten Resistenztypen muss allerdings auch kritisch hinterfragt werden, inwieweit sich einzelne Typen so exakt von einander unterscheiden lassen. Dabei sind die zur Ermittlung dieser Resistenztypen eingesetzten Methoden und Parameter zu berücksichtigen und zu prüfen. Erschwerend kommt hinzu, dass es momentan keine Sorte mit vollständiger Resistenz gibt. Es treten vielmehr Sorten auf, die einen schwachen Primärbefall zeigen, eine geringe Befallsausbreitung in der Ähre und von Korn zu Korn aufweisen bzw. bei denen Korninfektionen nachweisbar sind. Selten sind Ertragsverluste zu ermitteln und teilweise kann die Toxinkontamination sehr gering sein.

Für Sorten oder Linien mit einem geringen bis sehr geringen Anfälligkeitsniveau kann diese Resistenztypen-Gruppierung kaum vorgenommen werden. Folglich findet man diese differenzierenden Typen häufig nur bei den mittelresistenten bis hochanfälligen Genotypen.

Neben den genetischen Faktoren gibt es auch morphologische Parameter, die die natürliche Infektion stark beeinflussen. Hierzu zählt die Pflanzenlänge (Mesterhazy, 1995; BSA, 2002; Rodemann, Bartels, 2005), die Länge der oberen Internodien; die Korndichte in der Ähre und die Stellung der Ähren (erectophil oder planophil).

Nach Parry et al. (1995) und Mesterhazy, (1995) müsste bei genetisch hochanfälligem Material die Pflanzenlänge über 1m betragen, das Internodium über dem Fahnenblatt, also der Abstand zur Ähre, mindestens 20-30 cm betragen und das Fahnenblatt sollte keine erectophile Stellung einnehmen.

Bei Genotypen mit einem hohen genetischen Resistenzgrad ist der Einfluss morphologischer Faktoren gering, während bei anfälligem Material diese Parameter eine steigende Bedeutung erlangen.

#### 4. Standort, Versuchsanlagen, Material und Methoden

Die Resistenzprüfungen zur Beurteilung der Anfälligkeit von Winterweizen wurden auf den Löß- und Schwarzerdestandorten der BBA in Ahlum und Apelnstedt (Krs. Wolfenbüttel) durchgeführt. Die Prüfungen erfolgten in einfaktoriellen Blockanlagen, wobei die Sorten in 1,5 m<sup>2</sup> großen Parzellen in vierfacher Wiederholung ausgesät wurden. Die Aussaatstärken entsprachen den ortsüblichen Saatsmengen mit 350 Körner / m<sup>2</sup> unter Berücksichtigung von Tausendkornmasse und Keimfähigkeit.

Die zur Zulassung anstehenden Winterweizensorten wurden im Vergleich zu den zugelassenen Referenzsorten auf ihre Anfälligkeit untersucht. Alle Genotypen gehörten der Weizenart *Triticum aestivum* an.

Die Resistenzprüfungen gegen *Fusarium culmorum* wurden mit einer Sprühinokulation durchgeführt. Als Inokulum für die Resistenzprüfungen dienten Konidiensuspensionen, die von *F. culmorum* nach einer von Bockmann (1962) beschriebenen und selbst modifizierten Methode im Labor hergestellt wurden. Die Inokulationen erfolgten zu Beginn der Blüte (BBCH 61) und zur Vollblüte des Weizens, dabei wurden die zu prüfenden Genotypen mit einer Konidiensuspension bei einer Wasseraufwandmenge von 600 l/ha durch eine fahrbare Parzellenspritze besprüht (Bockmann et. al., 1975). Die Konidiensuspensionen wiesen Sporendichten von  $2,5 \times 10^5$  Konidien / ml Wasser auf. Um einen sicheren Infektionserfolg zu erzielen, wurden die Ähren beidseitig besprüht und die gesamte Inokulation nach 3-5 Tagen wiederholt.

#### 5. Erfassung der Partiellen Taubährigkeit

Um die Anfälligkeit der Weizensorten gegenüber der Partiellen Taubährigkeit beurteilen zu können, wurden die zu prüfenden Weizengenotypen in der Zeit von 2001 bis 2006 von ein und derselben Person bonitiert.

Die visuelle Befallsbewertung begann ca. 18-21 Tage nach der Inokulation (dpi) mit einer dreimaligen Wiederholung im Abstand von 5-7 Tagen.

Die Bewertung der Ährenbleiche erfolgt anhand der Parameter Anteil befallener Ähren (Befallshäufigkeit) und der Befallsstärke der befallenen Ähren. Beide Parameter werden in Prozent erfasst. Im Einzelnen gibt die Befallsstärke die Befallsausbreitung in der Ähre wieder und kann somit beschreiben, inwieweit es sich um partiellen Befall handelt oder eine Totalschädigung vorliegt.

Aus den Bewertungskriterien Befallshäufigkeit und Befallsstärke wird nach der Formel von Tekauz et. al. (2000) der Fusariumährenbefall berechnet:

$$\text{Fusariumährenbefall (FHB, \%)} = [\text{Befallshäufigkeit (\%)} / \text{Befallsstärke (\%)}] / 100 (\%)$$

In den folgenden Abbildungen sind von den Resistenzprüfungen die Fusariumbefallswerte der neu zugelassenen Winterweizensorten jahrgangsweise in Mittelwerten mit ansteigendem Befall der einzelnen Genotypen aufgeführt. Darüber hinaus wurden diese Genotypen im Rahmen weiterer Untersuchungen dreijährig geprüft, deren Befallswerte in separaten Abbildungen dargestellt sind.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Allgemeine Beobachtungen

In den vorliegenden Resistenzprüfungen von 2001 bis 2006 war durch die Sprühinokulation in jedem Jahr ein gut differenzierbarer Befall mit *Fusarium culmorum* zu erkennen. Obwohl in den Jahren 2003 und insbesondere in 2004 die Witterungsbedingungen (Trockenheit in den Sommerwochen) für die Fusarium – Infektionen sowie für die Entwicklung des Schaderregers *F. culmorum* alles andere als günstig waren, konnten dennoch die Winterweizensorten auf ihre Anfälligkeit untersucht werden.

Wie sich bereits in früheren Resistenzuntersuchungen zeigte (Mielke, 1988, 1995), konnten auch bei vorliegenden Untersuchungen zum Zeitpunkt des sichtbaren Befallsbeginns noch keine Aussagen über die Anfälligkeit der Weizensorten gegen Partielle Taubährigkeit (*F. culmorum*) getroffen werden. Erst 24 bis 28 Tage nach den Inokulationen (dpi) war eine Gesamtbeurteilung der Weizensorten hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens möglich.

In den sechs Versuchsjahren ist der Befall mit *F. culmorum* an den inokulierten Weizensorten zumeist unterschiedlich hoch ausgefallen. Dies war, wie bereits erwähnt, auf die unterschiedlichen Witterungsbedingungen in den einzelnen Jahren auf den Standorten Ahlum und Apelnstedt zurückzuführen. Aber dennoch ließ sich bei den zu prüfenden Weizensorten eine Abstufung in der Anfälligkeitsbeurteilung erkennen (Abbildung 6 bis 14). Darüber hinaus wurde in den Grafiken die Ausprägungsstufe 5 (APS 5) als mittlerer Befallswert der Referenzsorten zur Einstufung der neuen Sorten dargestellt.

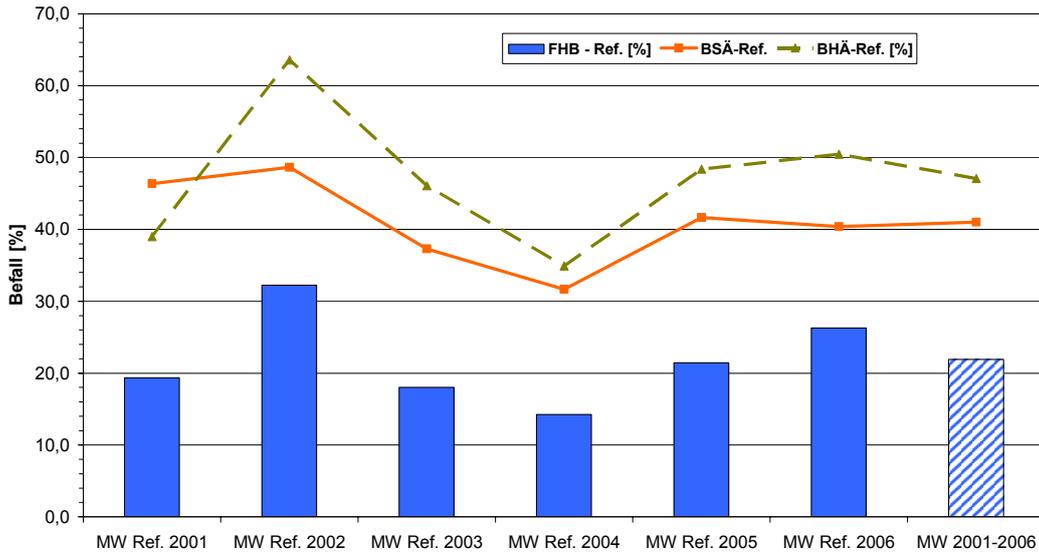
### 6.2 Befallsverlauf der Partielle Taubährigkeit an Winterweizen (Referenzsorten) auf dem Standort Ahlum von 2001 bis 2006

Bei zunehmender Verbreitung von Fusarien, die im Winterweizen die Partielle Taubährigkeit verursachen, stellt sich im Rahmen eines integrierten Bekämpfungskonzeptes die Frage:

- Welche Leistung bringen die derzeitig zur Verfügung stehenden Sorten?
- Wie stark trat die Krankheit in den letzten Jahren in Erscheinung.

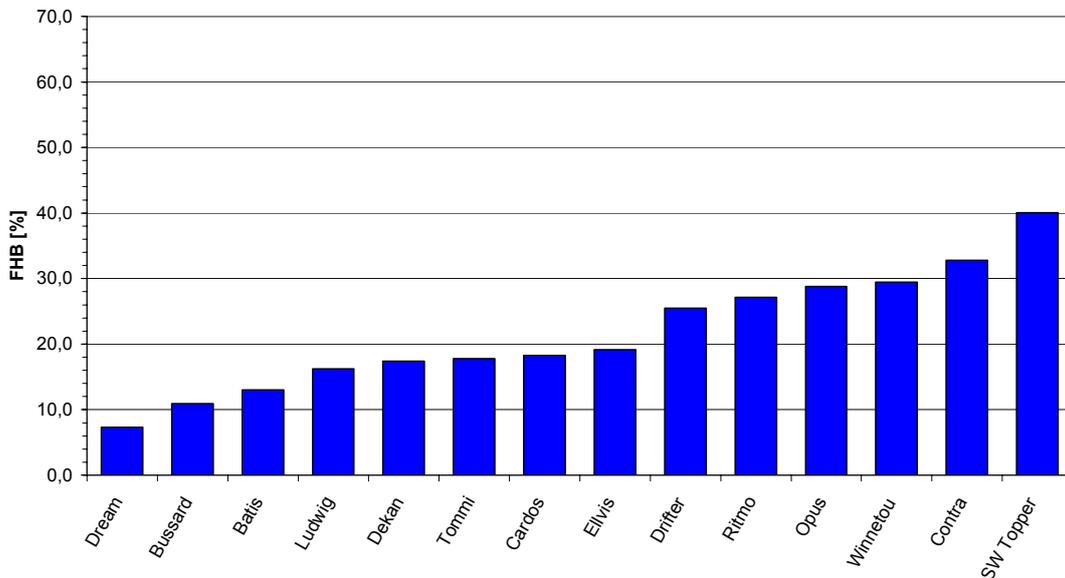
Um einen Überblick über das Ausmaß sowie über den Verlauf der Ährenfusariose aus den letzten sechs Jahren zu erhalten, wurden die mittleren Fusariumbefallswerte von 14 Referenzsorten aus den Inokulationsversuchen zusammengestellt (Abbildung 1), die auch im Rahmen offizieller Resistenzprüfungen für das Bundessortenamt genutzt wurden. Zu den Referenzsorten gehörten die Sorten Bussard, Cardos, Tommi, Batis, Ludwig, Dekan, Ellvis, Winnetou, Ritmo, Contra, Opus, Drifter, SW Topper und Dream (nur in 5 Jahren).

Wie aus der Abbildung 6 zu entnehmen ist, wiesen die Referenzsorten im Mittel der Jahre einen sichtbaren Ährenbefall von 21% auf, wobei die Befallswerte jahresabhängig zwischen 14% und 31% schwankten. Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, wie unterschiedlich hoch der Fusarium-ährenbefall von Jahr zu Jahr variierte. In den trockenen Jahren 2003 und 2004 blieb der Befall niedrig. Gerade im Jahr 2004 wurde durch die Inokulation der niedrigste Befallswert mit 14% erreicht. Sowohl die Befallsstärke als auch der Anteil befallener Ähren war sehr niedrig. Im Gegensatz dazu wiesen diese Vergleichssorten in 2002 ein mittleres Befallsniveau von 32% auf, der den höchsten Ährenbefall in den sechs Testjahren darstellte. Auch das Jahr 2006 lag trotz einer Vorsommertrockenheit mit 27% fast 6% über dem sechsjährigen Mittel.



**Abb. 6** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall der Referenzsorten im Untersuchungszeitraum 2001 bis 2006 am Standort Ahlum

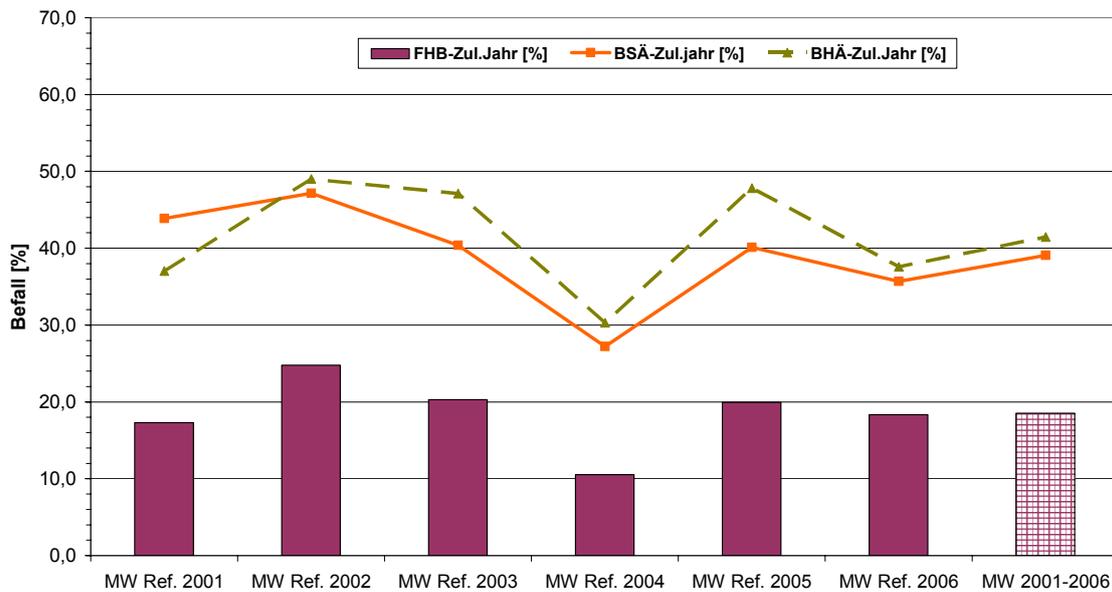
Die Befallswerte der untersuchten Referenzsorten, die nach den Kriterien Blühzeitpunkt, Reife und Anfälligkeit gegenüber *F. ulmorum* / *F. graminearum* ausgewählt worden waren, dienen der Beschreibung des Befallsniveaus in den sechs Jahren – 2001 bis 2006 - sowie zur Überprüfung der angewandten Inokulationsmethode. Gleichzeitig wurden die Befallsmittelwerte der Referenzsorten zur Einstufung neuer zur Zulassung angemeldeter Winterweizensorten genutzt. In der folgenden Abbildung 7 ist die Anfälligkeit der Referenzsorten aufsteigend nach Befall aufgeführt. Die Variation bewegte sich zwischen der gering anfälligen Sorte Dream mit 7% und der hoch anfälligen Sorte SW Topper mit 40% Ährenbefall.



**Abb. 7** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall der einzelnen Referenzsorten im Untersuchungszeitraum 2001 bis 2006 am Standort Ahlum

### 6.3 Fusariumanfälligkeit zugelassener Winterweizensorte 2001 bis 2006 – aktuelle Zulassungsjahrgänge

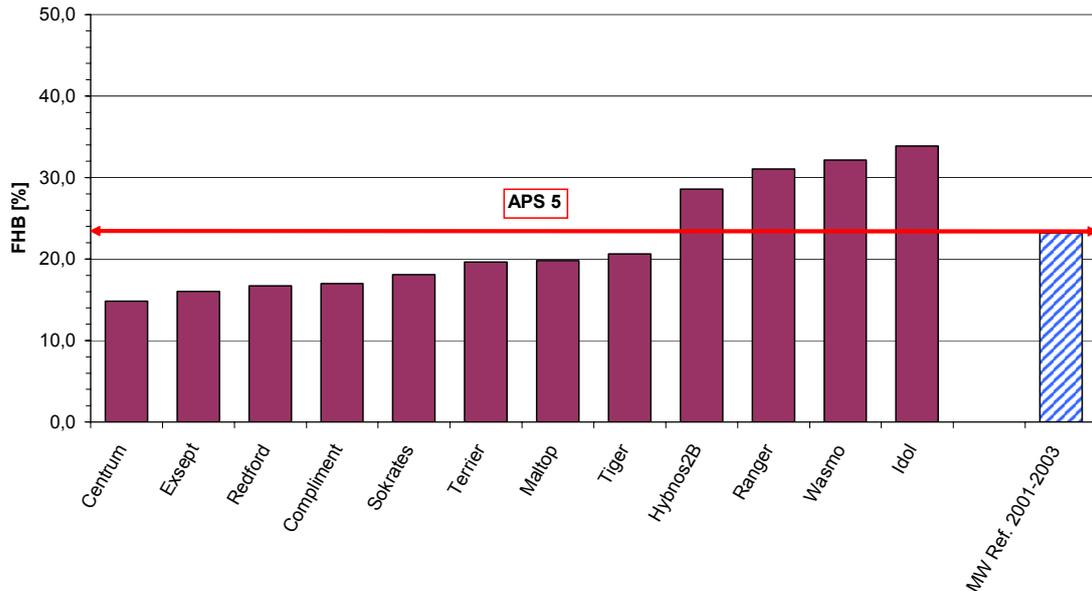
In der folgenden Abbildung 8 sind jahrgangswise die Ährenbefallswerte der zugelassenen Winterweizensorten im Vergleich zum 6-jährigen FHB-Mittel aufgeführt, das bei 19% lag. Die Befallswerte variierten ähnlich den Referenzsorten zwischen 6% Fusariumährenbefall in 2004 und dem höchsten Wert mit 26% in 2002. Durch die parallele Darstellung von Befallsstärke und Befallshäufigkeit wird deutlich, dass beide Parameter in den meisten Jahren eine enge Beziehung aufwiesen. Besonders auffällig ist das Jahr 2004 mit den sehr niedrigen Befallswerten, die nicht nur auf die Sortenleistung, sondern vielmehr auch auf die Trockenstreißperioden in den Sommermonaten zurückzuführen sind.



**Abb. 8** Durchschnittlicher jährlicher Fusariumährenbefall der zugelassenen Sorten im Untersuchungszeitraum 2001 bis 2006 am Standort Ahlum

### 6.4 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2001 im Vergleich zu den Referenzsorten

Im Jahre 2001 wurden 12 Winterweizensorten durch das Bundessortenamt zugelassen. Diese Sorten wurden dreijährig vor Erteilung der Zulassung auf ihre Anfälligkeit gegenüber Ährenfusarium geprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Mehrzahl der Genotypen unter dem Befallswert der Referenzsorten von 22% lagen (s. Abbildung 9). Den geringsten Befall im dreijährigen Mittel wies die Sorte Centrum mit 15%, gefolgt von der Sorte Exsept, Redford und Compliment mit ca. 16-17% Befall. Zu den anfälligen Sorten konnten Hybnos 2B, Ranger, Wasmo und Idol gezählt werden. Von den in 2001 zugelassenen Sorten besitzt derzeit nur noch die mittelanfällige Sorte Terrier eine größere Anbaubedeutung. Sie zeigte mit 20% einen moderaten Befall, der im Vergleich zu den Referenzsorten eine Verbesserung darstellte.

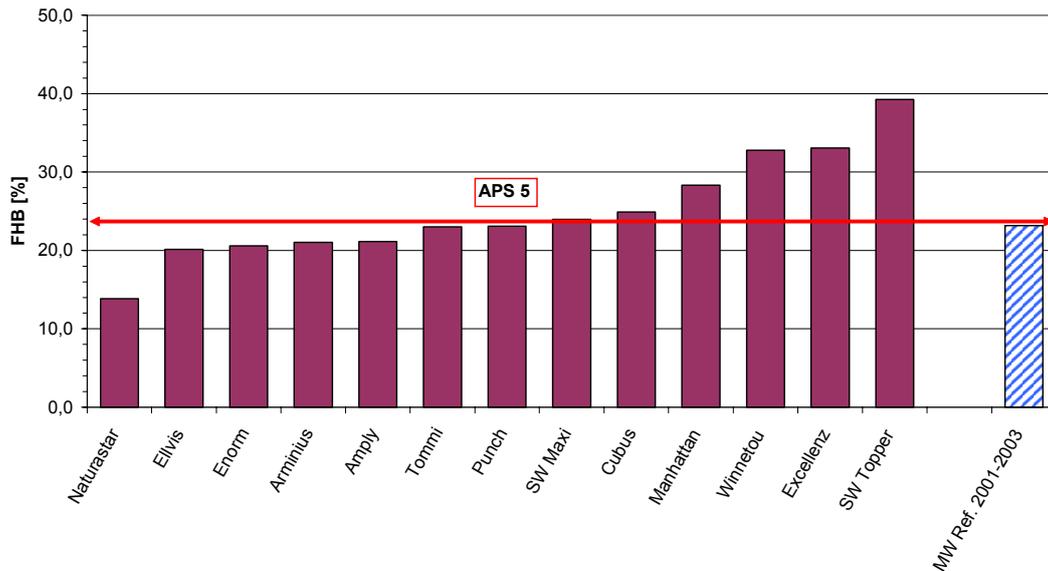


**Abb. 9** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2001 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2001 bis 2003 am Standort Ahlum; APS= Ausprägungsstufen

### 6.5 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2002 im Vergleich zu den Referenzsorten

Die Sortenprüfungen gegen *F. culmorum* fanden 2002 in einem ausgesprochenen „Fusariumjahr“ statt (s. Abbildung 10). Die Witterungsbedingungen für die Infektion und die Ausbreitung von *F. culmorum* waren äußerst günstig, so dass die Referenz- und die neu zugelassenen Sorten den höchsten Fusariumährenbefall in den untersuchten sechs Jahren aufwiesen. Bei den Referenzsorten konnte ein mittlerer Ährenbefall von 22% festgestellt werden.

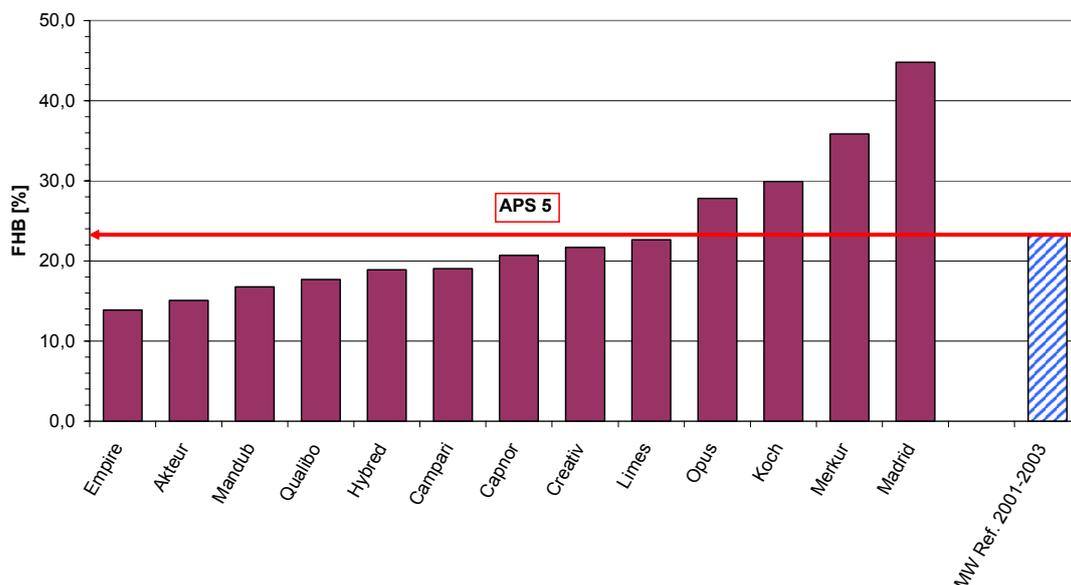
Bei den in 2002 zugelassenen 13 Winterweizensorten variierte der dreijährige Befall zwischen 14% und 39%. In den Prüffahren 2001 bis 2003 reagierte die Sorte Naturastar (früher Ökostar) mit einem Befall von 12% am wenigsten auf die *F. culmorum* –Inokulation, während SW Topper in allen Jahren einen sehr hohen durchschnittlichen Befallswert mit 39,5% aufwies. Während sich die Sorten Ellvis, Enorm und Amply im Testjahr 2002 als deutlich resistent erwiesen, zeigte das Ergebnis der dreijährigen Prüfung zwar einen mittleren Ährenbefall, aber keine Verbesserung gegenüber den Referenzsorten. Als hochanfällig konnten dagegen die Sorten Winnetou, Excellenz und insbesondere SW Topper eingestuft werden. Abweichend von den Ergebnissen der Sprühinokulation reagierte die Sorte Winnetou in der Prüfung unter naturidentischer Inokulation durch Ausbringen von Maisstoppeln mit mittlerer Anfälligkeit (APS 5 s. unten Abbildung 10). Als Erklärung der mittleren Anfälligkeit bei der Sorte Winnetou kommen hier ihre besonderen morphologischen Merkmale wie Pflanzenhöhe, Stellung des Fahnenblattes und Abstand von Fahnenblatt zu der Ähre zum Tragen.



**Abb. 10** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2002 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2001 bis 2003 am Standort Ahlum, APS= Ausprägungsstufen

### 6.6 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2003 im Vergleich zu den Referenzsorten

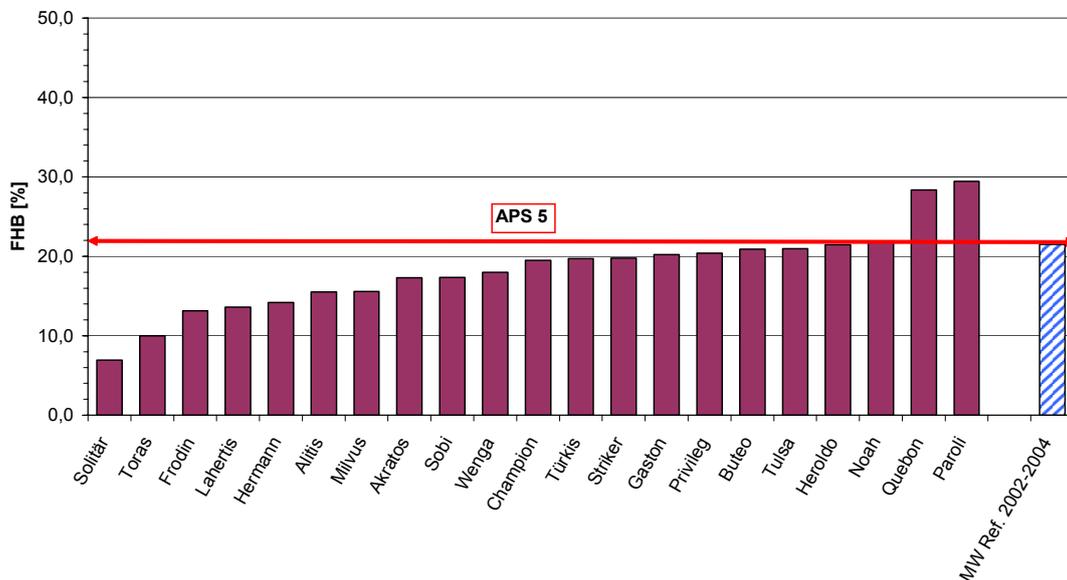
Im Jahre 2003 wurden 13 Winterweizensorten vom Bundessortenamt zugelassen und in die Beschreibende Sortenliste aufgenommen (s. Abbildung 11). In der dreijährigen Prüfung wiesen die Referenzsorten einen durchschnittlichen Befall von 22% auf, während der Fusariumährenbefall sich bei den zugelassenen Sorten zwischen 14% und 45% bewegte. Zu den gering anfälligen Sorten konnten Empire und Akteur mit 10-11% Befall bewertet werden, also nur die Hälfte des Befalls der Referenzsorten. Demgegenüber konnten Opus, Koch, Merkur (Zulassung bereits zurückgezogen) und besonders Madrid als anfällig bis hochanfällig eingestuft werden. Der Ährenbefall erreichte sogar die Befallswerte der Referenzsorten. Im Gesamtblick waren die restlichen Sorten fast alle besser als das Mittel der Referenzsorten. Aufgrund der geringen Fusariumanfälligkeit haben heute die Sorten Akteur, Hybred und Campari eine rel. große Anbaufläche erlangt.



**Abb. 11** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2003 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2001 bis 2003 am Standort Ahlum, APS= Ausprägungsstufen

### 6.7 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2004 im Vergleich zu den Referenzsorten

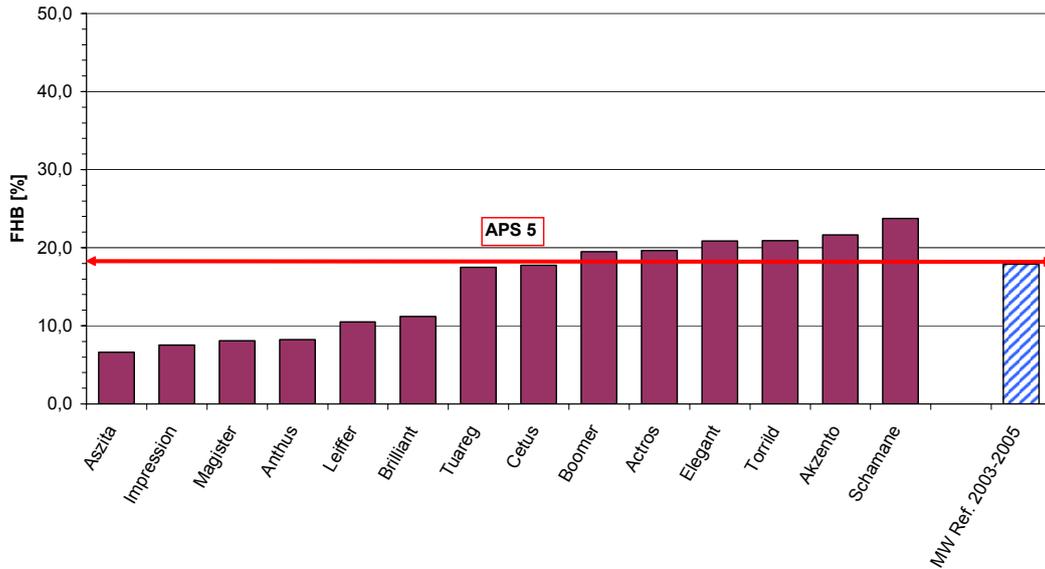
Das Versuchsjahr 2004 war durch die Zulassung von 24 Winterweizensorten gekennzeichnet. Anhaltende trockene Witterungsperioden in den Sommermonaten führten zu ungünstigen Bedingungen für eine Fusariuminfektion. Trotz des geringen Befallsniveaus war eine Differenzierung zwischen den Genotypen möglich. Die Referenzsorten wiesen im Mittel der Jahre 2002-2004 einen Ährenbefall von 22% auf. Im Vergleich dazu lag der Wert in 2004 nur bei 14% (Abbildung 12). Der Befallswert der zugelassenen Sorten rangierte zwischen 7% bei Solitär und ca. 30% bei Paroli. Insbesondere führten die Sorten Solitär und Toras mit Befallswerten zwischen 7% und 10% zu neuen Meilensteinen in der Fusariumresistenzzüchtung. Auch die Sorten Frodin, Lahertis und Hermann, nicht ganz so resistent wie die zuvor genannten Sorten, konnten auch als deutliche Verbesserung in der Fusariumresistenz von Winterweizen gewertet werden. Allerdings gab es in 2004 mit Quebon und Paroli zwei Sorten mit Befallswerten von 28% und 29%. Sie lagen damit ca. 25% über dem Versuchsmittel. Insgesamt blieben ca. 14 neu zugelassene Sorten mit ihren Befallswerten unter dem Durchschnitt der Referenzsorten.



**Abb. 12** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2004 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2002 bis 2004 am Standort Ahlum, APS= Ausprägungsstufen

### 6.8 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2005 im Vergleich zu den Referenzsorten

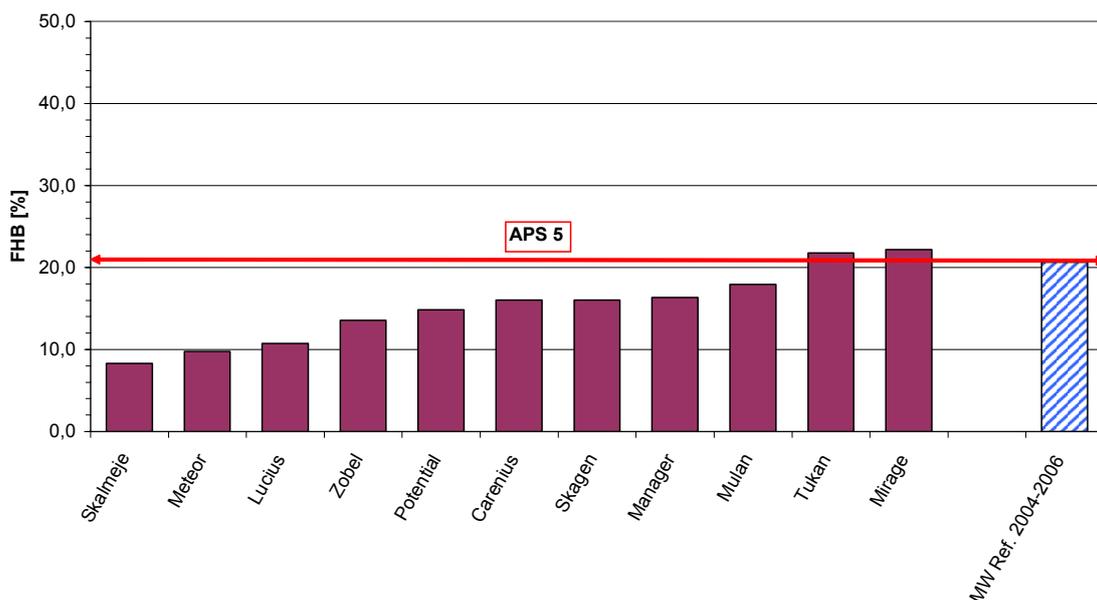
Im Jahre 2005 wurden 14 Winterweizensorten zugelassen und auf ihre Anfälligkeit gegenüber *F. culmorum* getestet (Abbildung 13). Das Befallsniveau der Referenzsorten lag im dreijährigen Mittel bei 18%. Innerhalb des Zulassungsjahrgangs 2005 schwankte der Ährenbefall zwischen 6% bei der Sorte Aszita und 24% bei der Sorte Schamane. Das zeigte eindeutig, dass diese Sorten im Vergleich zu den Referenzsorten fast alle zu einer Verbesserung der Fusariumresistenz führten. Zu den besonders gering anfälligen Sorten zählen Aszita, Impression, Magister und Anthus mit Befallswerten kleiner 10%. Diese hervorragende Gesundheit führte bei Impression und Anthus zu einer Vermehrungsfläche von jeweils 1800 ha. Dagegen lagen die Befallsergebnisse der Sorten Torrild, Akzento und Schamane leicht über dem Versuchsmittel.



**Abb. 13** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2005 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2003 bis 2005 am Standort Ahlum, APS= Ausprägungsstufen

**6.9 Fusariumanfälligkeit der Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2006 im Vergleich zu den Referenzsorten**

Wie bereits unter 6.2 beschrieben, konnte im Jahr 2006 der zweithöchste Befall im Untersuchungszeitraum ermittelt werden. Der Befall der Referenzsorten lag bei 27%, während im dreijährigen Mittel nur 20,5 % festgestellt wurden. Die in 2006 zugelassenen 11 Winterweizensorten wiesen eine geringere bzw. nahezu gleiche Anfälligkeit als die Referenzsorten auf (Abbildung 14). Die Befallswerte variierten zwischen 8% und 22%. Eine geringe Anfälligkeit wiesen die Sorten Skalmetje, Meteor und Lucius mit Befallswerten von ca. 10% auf, während Tukan und Mirage zu den mittelanfälligen Sorten gezählt werden können. Der deutliche Zuchtfortschritt wird bei diesen neu zugelassenen Sorten sichtbar.



**Abb. 14** Durchschnittlicher Fusariumährenbefall von Winterweizensorten des Zulassungsjahres 2006 ermittelt in den Untersuchungsjahren 2004 bis 2006 am Standort Ahlum, APS= Ausprägungsstufen

### 6.10 Zusammenhang zwischen Anteil befallener Ähren und der Befallsstärke

Durch Ermittlung der beiden Parameter Befallsstärke und Anteil befallener Ähren lassen sich Informationen zu den Resistenztypen gewinnen. Der Anteil befallener Ähren gibt einen Hinweis auf die Primäranfälligkeit einer Sorte, während durch die Schätzung der Befallsstärke die Ausbreitung des Erregers in der Ähre bewertet wird. Es wird die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegenüber dem Schaderregerwachstum ermittelt und als Resistenztyp II bezeichnet.

In den nach den Reifegruppen früh, mittel und spät aufgeführten Sorten war ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem steigenden Anteil befallener Ähren und einer zunehmenden Befallsstärke zu erkennen (Abbildung 15). Die enge Beziehung zwischen beiden Parametern, über alle Reifegruppen betrachtet, konnte eine Korrelation von  $r = 0,74$ ;  $p \leq 0,05$  festgestellt werden. In der Praxis bedeute dies, dass bei Sorten mit einem geringen Anteil befallener Ähren wie Arina (in der Schweiz zugelassene Sorte), Petrus, Romanus und auch Dream auch nur eine geringe Ausbreitung des Erregers in der Ähre zu erkennen war. Dagegen zeigten die hochanfälligen Sorten wie Contra, Topper, Clever und Ritmo einen hohen Befallsgrad.

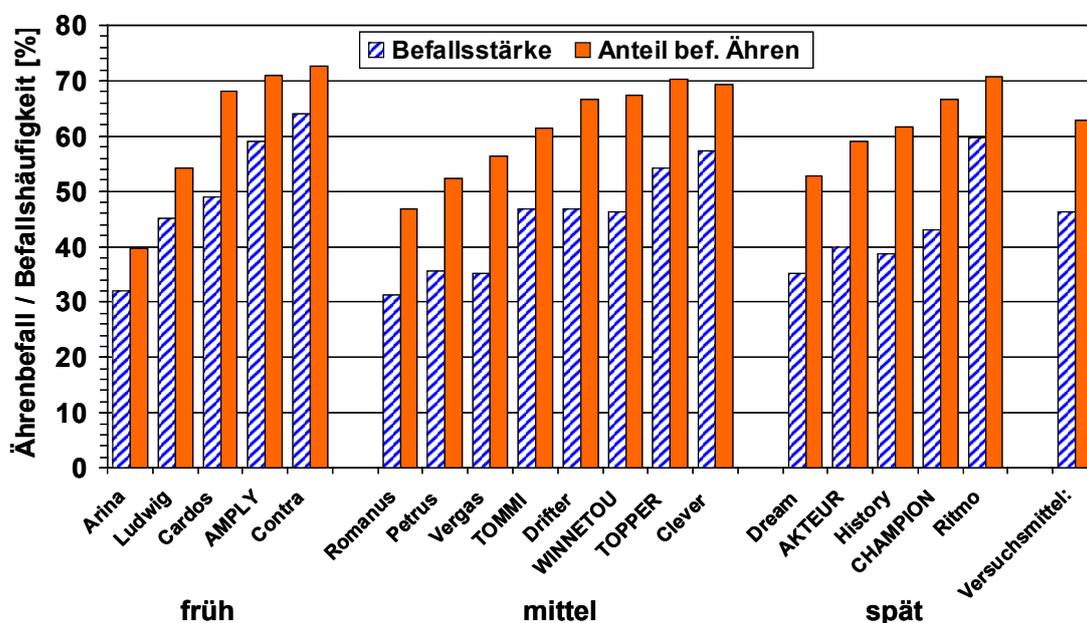


Abb. 15 Zusammenhang zwischen dem Anteil befallener Ähren und der Befallsstärke der bef. Ähren ausgewählter Winterweizensorten unter Infektionsbedingungen (Auszug Resistenzprüfung 2002, Ahlum)

### 6.11 Zusammenhang zwischen visuellem Ährenbefall und der Kontamination mit Deoxynivalenol

In der folgenden Abbildung wurde über einen sog. Fusarium-DON-Index die Einstufung der Sorten vorgenommen. Dieser dargestellte Index setzt sich aus den Parametern Fusariumährenbefall (FHB) und DON-Belastung im Korn zusammen. An den Untersuchungen aus dem Jahr 2004 wird deutlich, dass die in Abbildung 14 als sehr gering anfällig beschriebenen Sorten Toras und Solitär wie auch die älteren Sorten Romanus und Petrus unter Berücksichtigung beider Parameter einen sehr niedrigen Index aufwiesen. Demgegenüber zeigten die vom BSA mit der APS-Note 6 und 7 eingestuft Sorten Quebon und Florett (Stamm 50) einen hohen FDI -Index-Wert. Diese Ergebnisse belegen somit, dass unter den Prüfbedingungen der Jahre eine enge Korrelation zwischen sichtbarem Ährenbefall und der späteren DON-Belastung des Kornes festzustellen waren.

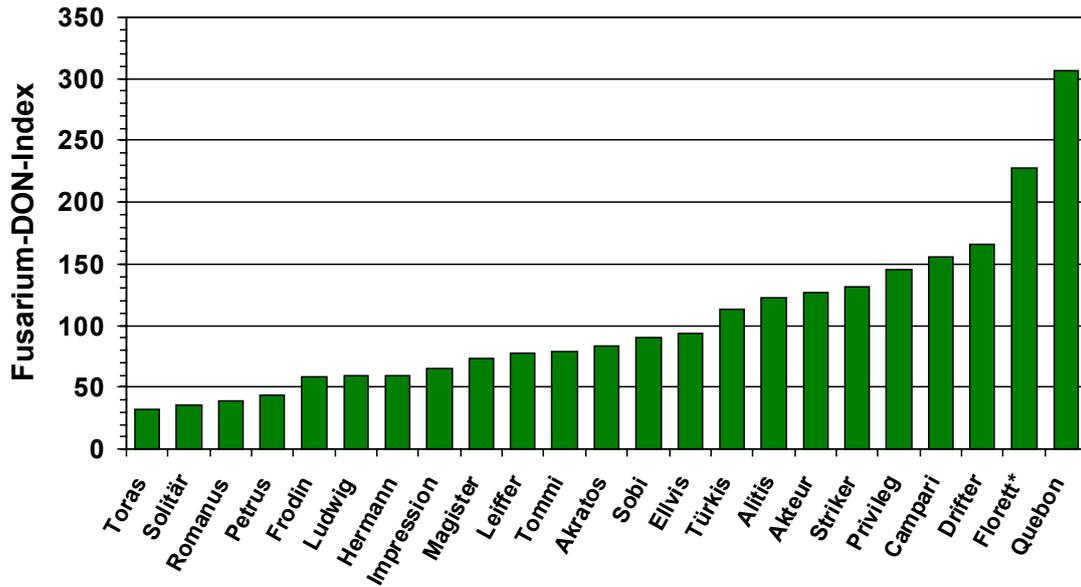


Abb. 16 Einstufung ausgewählter Winterweizensorten über einen Fusarium-DON-Index (Auszug Resistenzprüfung 2004, Ahlum)

## 7. Ergebnisbesprechung und Diskussion

In den letzten 15 Jahren konnte im Weizenanbau durch die Umstellung von wendender auf nicht wendende Bodenbearbeitung, aufgrund eines höheren Anteils von Mais als Vorfrucht und geänderten Witterungsbedingungen ein häufigeres Auftreten der Partiellen Taubährigkeit festgestellt werden. Da die Sortenwahl im Rahmen eines integrierten Bekämpfungskonzeptes (Bartels, Rodemann, 2003) die wichtigste Einflussgröße dargestellt, ist für die Praktiker die Information über das Resistenzverhalten der zur Verfügung stehenden Winterweizensorten hinsichtlich Gesundheit und Wirtschaftlichkeit von größter Bedeutung (Rodemann et. al., 2001). Gerade die Anfälligkeit von Winterweizensorten gegenüber Ährenfusarien einschließlich der Informationen zur Deoxynivalenolbelastung ist für den Praktiker ein wichtiges Anbaukriterium.

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, die Anstrengungen der Züchtung zur Verbesserung der Resistenz von Winterweizensorten gegenüber Ährenfusarium in den letzten sechs Jahren zu prüfen und Sorten mit besonders geringer Anfälligkeit aufzuzeigen.

In den Resistenzuntersuchungen mit Hilfe der künstlichen Inokulation wurden die o.g. Winterweizensorten auf ihre Anfälligkeit gegen *F. culmorum* auf dem Standort Ahlum in den Jahren 2001 bis 2006 geprüft. Um die Sicherheit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für jedes Jahr zu gewährleisten, wurde mit der Sprühinokulation gearbeitet. Als Vergleichs- und Bewertungsbasis galten 14 Referenzsorten, d.h. zugelassene Winterweizensorten mit entsprechender Anbaubedeutung. Neben den jährlichen Schwankungen im mittleren Befallsniveau wurde eine Sortenabfolge ermittelt, die in den getesteten Untersuchungsjahren nahezu identisch war.

Bei Betrachtung der getesteten neu zugelassenen Winterweizensorten (s. 6.2 bis 6.9) war zunächst festzustellen, dass unter den geprüften inländischen Genotypen eine große Variation in der Anfälligkeit gegenüber *F. culmorum* vorhanden war. Unter den Testbedingungen der sechs Jahre von 2001 bis 2006 konnte, wie schon in früheren Untersuchungen beschrieben (Mielke, 1988, 1995; Rodemann, 2002, 2004), keine Weizensorte mit vollständiger Resistenz ermittelt werden.

Im Vergleich aller in den letzten Jahren zugelassen Winterweizensorten wurde deutlich, dass die Mehrzahl der untersuchten Genotypen eine geringe Anfälligkeit gegenüber *F. culmorum* aufwies. Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Ergebnisse eine deutliche Verbesserung der Widerstandsfähigkeit von Winterweizensorten gegen *F. culmorum*, als einem der Verursacher der Partiellen Taubährigkeit, aufzeigen. Die positive Resistenzzüchtungsarbeit der deutschen Pflanzenzüchter in den letzten Jahrzehnten wird in diesen Untersuchungsergebnissen sichtbar.

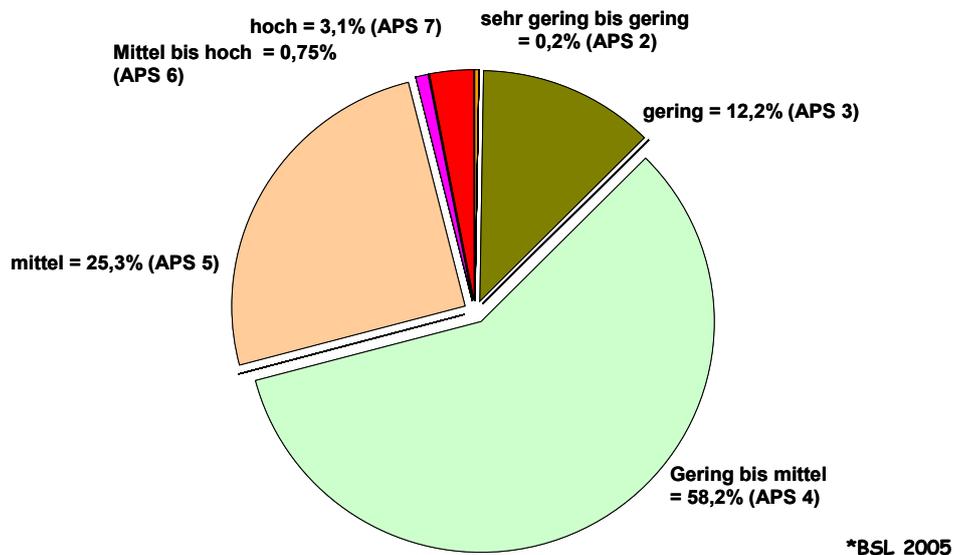
Durch die geeignete Sortenwahl kann das Fusariumrisiko beim Weizen einschließlich möglicher Toxinbelastungen im Erntegut deutlich reduziert werden (Rodemann, 2002). Anhand der Übersichten zur Anbaubedeutung bestimmter Winterweizensorten lässt sich mittlerweile erkennen, dass die Praktiker das Fusariumproblem sehr ernst nehmen und in ihrer Sortenwahl auf Sorten mit einer geringen Anfälligkeit gegenüber Ährenfusarium setzen. Neben den Merkmalen Ertrag und Qualität haben die Angaben zur Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* sp. eine gleichberechtigte Bedeutung erlangt. Eine fast resistente Sorte bildet die Grundlage für die Produktion von qualitativ einwandfreiem und mykotoxinunbelastetem Erntegut für den menschlichen Verzehr und für Futterzwecke.

## 8. Zusammenfassung

Das verstärkte Auftreten der Partiellen Taubährigkeit im Weizenanbau, vorwiegend hervorgerufen durch die Erreger *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum*, war Anlass die Leistung der Winterweizensorten gegenüber diesen Schadorganismen zu untersuchen.

Mit Hilfe der Sprühhinokulation wurde das Sortenverhalten gegenüber *F. culmorum* untersucht. Im Rahmen dieser Resistenzprüfungen wurde visuell der Anteil befallener Ähren und die Befallsstärke an den befallenen Ähren erfasst. Ergänzt wurden diese Erhebungen durch Toxinanalysen am Erntegut und Untersuchungen zum Pilzbesatz am einzelnen Korn.

Durch gezielte Züchtungsarbeit auf Fusariumresistenz konnte das Befallsniveau des inländischen Winterweizensortiments erheblich gesenkt werden. In den Jahren 2001-2006 wurde durch die Zulassung neuer Weizensorten der Anteil geringer bis fast resistenter Genotypen im deutschen Weizensortiment deutlich erhöht (Abbildung 17). Von derzeit 108 zugelassenen Sorten sind 12,5 % dem sehr gering bis gering anfälligem Bereich zuzuordnen (APS 2 und 3). Nahezu 60% der Sorten sind als gering bis mittel einzustufen (APS 4). In der Summe sind mehr als 70% der Sorten mit einer guten Widerstandsfähigkeit gegenüber den Erregern der Partiellen Taubährigkeit, *F. culmorum* und *F. graminearum* ausgestattet.



**Abb. 17** Anteile zugelassener Winterweizensorten an der Vermehrungsfläche aufgeführt nach einzelnen Befallsstufen, BSL 2005

Unter diesen neuen Sorten stehen mit Toras und Solitär zwei Sorten mit einem hohen Resistenzgrad (APS-Note 2) zur Verfügung und sind besonders für Risikoanbaugebiete mit nicht wendender Bodenbearbeitung und Mais als Vorfrucht der wesentliche Baustein eines integrierten Bekämpfungsansatzes. Mit einer etwas geringeren Widerstandsfähigkeit sind die Sorten Hermann, Impression, Lucius, Lahertis und Sobi ausgestattet, die aber unter normalen Anbaubedingungen ohne befallsfördernde Risikofaktoren eine Anbausicherheit für den Praktiker bieten.

## 9. Literaturverzeichnis

- BARTELS, G., RODEMANN, B. (2003): Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide. – Gesunde Pflanze 5, 125-135.
- BOCKMANN, H. (1962): Künstliche Infektionsversuche mit den Erregern der Fuß- und Ährenkrankheiten des Weizens. I. Vorbereitung und Durchführung der Feldinfektion sowie deren Neben- und Nachwirkungen. – Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 14 (10) 153 -156.
- BOCKMANN, H., MIELKE, H., WACHHOLZ, G. (1975): Untersuchungen über die Anfälligkeit verschiedener Winter- und Sommerweizensorten gegen *Septoria nodorum* Ber. und *Fusarium culmorum* Link. Z. Pflanzenzüchtung, 74, 39-47.
- BUNDESSORTENAMT (2002). Beschreibende Sortenliste für 2002. Getreide, Mais, Ölfrüchste, Leguminosen und Hackfrüchte. Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH, Hannover.
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (1999): Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. - Physiological and Molecular Plant Pathology 55 (5): 275-288
- MESTERHAZY, A. (1987): Selection of head blight resistant wheat through improved seedling resistance. - Plant Breeding 98, p. 25-36.
- MESTERHAZY, A. (1995): Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. - Plant Breeding 114, p. 377-386.
- MESTERHAZY, A. (1999): Breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat. Proc. Of the 6<sup>th</sup> Int. Wheat Conf. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, p. 353-358.
- MIELKE, H. (1988): Untersuchungen über *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. Als Fuß- und Ährenkrankheitserreger beim Weizen. - Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, Heft 283, 1-101.
- MIELKE, H. (1995): Untersuchungen zur Anfälligkeit verschiedener Weizensorten gegenüber der Partiellen Taubährigkeit (*Fusarium culmorum* [W.G. Sm.] Sacc.). – Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 47 (10), 254-262.
- MILLER, J.D., ARNISON, P.G. (1986): Degradation of Deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. - Can. J. Plat. Path. 8, p. 147-150.
- MILLER, J.D., YOUNG, J.C., SAMPSON, R.D. (1985): Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. - Phytopatholog. Zeitschrift 113, p. 359-367.
- OBST, A., PAUL, V.H. (1993): Krankheiten und Schädlinge des Getreides. - Verlag Th. Mann. Gelsenkirchen-Buer. 1-184
- PARRY, D.W., JENKINSON, P., MCLEOD, L. (1995): *Fusarium* ear blight (Scab) in small grain cereals - A review. – Plant Pathology (2): 207-238
- RODEMANN, B., MIELKE, H., BARTELS, G. (2001): Einfluss von Sortenwahl auf den Befall mit Ährenfusariosen bei verschiedenen Getreidefrüchten. - Getreidemagazin, 3, 152 – 155.
- RODEMANN, B. (2002): Wie leistungsstark sind Winterweizensorten zur Bekämpfung der Partiellen Taubährigkeit? - DLG-Mitteilungen 3, 54-58.

- RODEMANN, B. (2004): Ährenfusarium – Biologie, Epidemiologie und Sortenleistung. - Getreidemagazin, 4, 2003, S. 203-207.
- RODEMANN, B., BARTELS, G. (2005): Ährenfusariosen im Winterweizen – Biologie, Sortenleistung und fungizide Bekämpfung. – Landwirtschaft ohne Pflug Heft 2, 10-16.
- SCHROEDER, H.W., CHRISTENSEN, J.J. (1963): Factors affecting resistance to scab by *Giberella zea*. - Phytopathology 53; p. 831-838.
- TEKAUZ, A., MCCALLUM, B., GILBERT, J. (2000): Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. - Can J Plant Pathol 22 (1): 9-16

Schlein, O., Niepold, F., Büchs, W.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

## Detection of pollen beetle (*Meligethes aeneus*) DNA in the gut content of predators by Polymerase Chain Reaction (PCR)

### Introduction

The pollen beetle *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) is the economically most important species of its genus in central Europe. In spring when temperature exceeds 12°-15° C, adult female beetles place their eggs in young buds of the winter oilseed rape plants (Alford et al., 2003). Hatching larvae feed on ovaries and stamens within the buds before dropping to the ground. Pupation takes place in the soil; about 2000 single larvae can be counted per m<sup>2</sup> during this period and provide a large potential food source for predators (Büchs, 2003). Larval development includes two instars. The generation time from egg to the adult stage requires about one month; one generation appears per year (Alford et al., 2003). Fully grown larvae leave the racemes and drop to the ground to dig into the soil for pupation, often adhered to the falling flower petals (Büchs, 2003). During this period the opportunity for ground dwelling predators like carabid or staphylinid beetles is highest to prey on a large amount of larvae either directly on the surface or in the upper layers of the soil. To the present date, the dimension of this predation on pollen beetle larvae by epigeic polyphagous predators, the importance and dominance of particular key species as well as the degree of a temporary preference for this prey species during the main period of larval dropping are still completely unknown. The feeding ecology and efficacy of ground beetles as predators of the most important oilseed rape pest species have been investigated within the EU-project "MASTER" ("Integrated pest management strategies incorporating bio-control for European oilseed rape pests"). As part of this project, the feeding acceptance, food preferences and mean consumption rates of several carabid species which proved to be dominant on winter oilseed rape fields in Braunschweig, Germany, were investigated by laboratory research (Schlein, Büchs, 2004). Behavioural experiments (non-choice as well as choice feeding trials) and microscopical analyses of the predators' digestive tract (identifying specific morphologic features of the pest larvae within the gut content) were carried out to allow an assessment of the feeding habits of chosen carabid species in the oilseed rape field habitat. However, to achieve a reliable and distinct proof of the specific prey consumption, molecular analyses of the predators' gut content are essential. After laborious efforts in this difficult task, the general opinion is currently that PCR-based methods for detecting species-specific prey DNA in the gut content of polyphagous predators is far superior to analytical, costly and very time-consuming methods like enzyme electrophoresis and immunological approaches by using polyclonal and monoclonal antibodies (Agusti et al., 1999; Chen et al., 2000; Symondson, 2002 a, 2002 b). Indeed, using PCR-based analyses for detection of species-specific DNA in the digestive tract of insect and arachnid predators was just established during recent years in a concise number of successful studies (Agusti et al., 1999; Zaidi et al. 1999; Chen et al., 2000; Hoogendoorn, Heimpel, 2001; Agusti et al. 2003; Greenstone, Shufran, 2003; Morales et al., 2003 etc.; Juen, Traugott, 2005).

The most crucial criterion of detecting the prey with PCR is the ability of its DNA to resist digestion in the predators' gut. This intactness of at least short DNA fragments has to persist for a sufficient time span giving the chance for a distinct proof by amplification of certain DNA fragments (Agusti et al., 1999; Zaidi et al., 1999; Agusti et al., 2000). As the time factor of digestion is the critical point (especially if the definite aim is to survey predator material collected in the field with a totally unknown feeding history), preliminary laboratory investigations are needed. The present study confines to these basic findings in an approach to prove the consumption of *Meligethes aeneus* larvae in the digestive tract of carabids by PCR before analyses of field collected predator material can be performed.

## Material and methods

### Insects

Larvae of the pollen beetle *M. aeneus* were collected on a winter oilseed rape field near Braunschweig, Germany, using funnel traps placed beneath the plant branches and mainly, as well as adult pollen beetles, by beating them directly from the flower heads into flat, large dishes during May and June 2003. Larvae were frozen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  and defrosted just before being offered to the predators. For a survey of the suitability of different preservation methods for subsequent PCR, pollen beetle adults which were stored in 70% ethanol for approx. 3 years and in 96 % ethanol for 3 months, as well as larvae frozen for 3 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  were also evaluated for DNA-extraction.

Carabids were collected on the same winter oilseed rape field using dry pitfall traps placed in the soil. Laboratory stocks of the chosen carabid species *Amara similata* and *Pterostichus melanarius*, were assembled during the collecting season from May to October and kept alive continuously for their use in feeding trials. Feeding of the predators was performed in small round plastic dishes of approx. 10 cm in diameter and a height of ca. 3.5 cm. Beetle stock boxes as well as feeding dishes were placed in a laboratory climatic chamber holding  $20^{\circ}\text{C}$  and 80 % r.H. Before feeding 5 or 10 *M. aeneus* larvae, each beetle usually starved for 48 hours. After complete consumption of the prey larvae, a digestion time from zero up to 2 hours at  $20^{\circ}\text{C}$  was allowed, following intervals of 5 or 10 minutes. The predators were then frozen immediately at  $-70^{\circ}\text{C}$  in a deep freezer and stored for DNA extraction.

### DNA extraction

The total DNA was extracted from pools of 3 adult pollen beetles, 5 pollen beetle larvae and from each single specimen of the predators by using the CTAB-method (Day, Shattock, 1997). Assemblages of pollen beetle adults or larvae as well as the single predator specimens were freeze-dried in liquid nitrogen and ground carefully in a mortar; antennae and legs of the carabids were removed before the procedure. The CTAB-extraction procedure in brief: 800  $\mu\text{l}$  of CTAB-extraction buffer were added and the mixture was divided into two portions of 400  $\mu\text{l}$  each per *M. aeneus* assemblage or predator individual in a 2 ml safe-sealed micro tube. Probes were then incubated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 1 hour, being shaken every 15 minutes. 300  $\mu\text{l}$  of chloroform per probe were added for extraction. Probes were shaken for 10 seconds and centrifuged for 5 minutes at  $15.000 \times g$ . The upper phase (approx. 300  $\mu\text{l}$ ), containing the DNA, was transferred to a new micro tube. 150  $\mu\text{l}$  of isopropanol per probe were added. Probes were shaken and incubated at room temperature for 10 minutes before centrifuging at  $15.000 \times g$ , discarding the supernatant and rinsing the pellets with 300  $\mu\text{l}$  of 70 % ethanol and another centrifugation at  $15.000 \times g$  for 10 minutes. The resulting pellets were dried at  $50^{\circ}\text{C}$  in a hot-air cabinet for approx. 20 minutes and suspended in 30  $\mu\text{l}$  of TE Buffer per probe.

### Design of primers and PCR

For proving consumption of pollen beetle larvae by the chosen carabids, we used an already published sequence of a voltage-sensitive sodium channel gene of *M. aeneus* with a sequence length of 498 bp (Cazes, D. & Pauron, D.: NCBI gene bank, accession number AF354457). Six different primers were designed (named Melig1 and 2, Melig1a and 1b, Melig2a and 2b) and tested in the combinations Melig1-Melig2, Melig1-Melig2a, Melig1-Melig2b, Melig2-Melig1a and Melig2-Melig1b. Table 1 shows details about the primer sequences and the sizes of the amplified fragments.

**Tab. 1.** Primer combinations and characteristics tested for amplification of *Meligethes aeneus* DNA.

Names of paired primers	Primer sequences (5'-3')	Length of DNA product
Melig1 + Melig2	TTATGGGCAGAACAATGG + CGCCAAGAAGAGGTTTCAG	443 bp
Melig1 + Melig2a	(...) + TCCCCGCATAAACTCTA	269 bp
Melig1 + Melig2b	(...) + GGAAACCTGTCCACGTTA	191 bp
Meli2 + Melig1a	(...) + TTCCGGACCACGATCTAC	256 bp
Melig2 + Melig1b	(...) + GCGGGGAATGGATAGAAT	181 bp

PCR reactions were carried out in 0,2 ml PCR reaction plastic tubes containing amplification mixtures of varied concentrations; after a period of testing different concentrations with the established primer pairs and programmes, the following mixture delivered the most satisfying results: 1,2 µl of 10x polymerase buffer (incl. MgCl<sub>2</sub>), 0,4 µl of dNTP-mix (200 µM), 0,1 µl of each primer (0,325 mM), 0,2 µl of *Taq* DNA polymerase, 7,5 µl of DD water and 0,5 µl of DNA template. PCR reactions were performed in a Hybrid PCR-Sprint Thermal Cycler.

Seven different PCR programmes were tested for their suitability. These programmes generated an annealing temperature range from 50 °C to 60 °C (including optimal annealing temperatures of the primer combinations) and varied also in the number of cycles and duration of single PCR steps. Most distinct results were gained by the PCR programmes Msat 52, Mel 51 and Mel 52. Details of the thermocyclic steps of these programmes are shown in Table 2.

**Tab. 2** PCR programmes used for amplification of *Meligethes aeneus* DNA.

Programme step	Msat 52	Mel 51	Mel 52
Initial DNA denaturation	96 °C - 5 min. 1 cycle	96 °C - 3 min. 1 cycle	95 °C - 3 min. 1 cycle
Number of amplification cycles	45	45	45
- denaturation	94 °C – 45 sec.	94 °C – 50 sec.	94 °C – 45 sec.
- annealing	52 °C – 50 sec.	51 °C – 50 sec.	52 °C – 50 sec.
- extension	70 °C – 50 sec.	72 °C – 1 min.	72 °C – 1 min.
Final extension after amplification	72 °C – 5 min.	72 °C – 5 min.	72 °C – 5 min.
Cooling down	4 °C – 5-10 min-	4 °C – 5-10 min.	4 °C – 5-10 min.

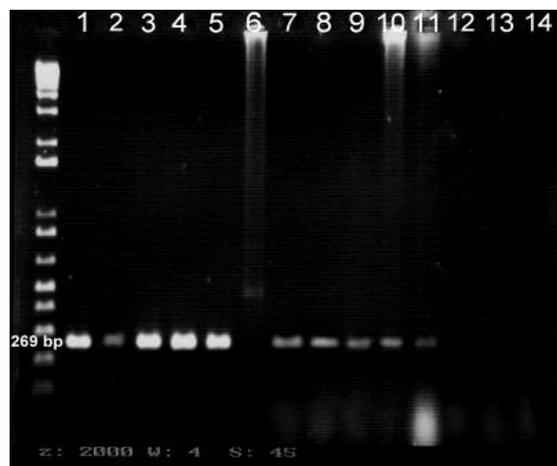
10 µl of the PCR products were used per probe for electrophoresis after adding 0,5 µl of RNAase per probe, allowing an incubation time of 5 minutes prior to electrophoresis which was performed at 80 V for approx. 120 minutes with a 1,5 % agarose gel in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA). After staining the agarose gel with ethidium bromide for approx. 10 minutes, resulting bands were visualised.

## Results

First successful PCR approaches, using the primers Melig1 and Melig2 which show an optimal annealing temperature at 51°C, amplified a DNA product of 443 base pairs in size. This DNA band, specific for *M. aeneus*, could be visualised and proved distinctly for all DNA probes of adult pollen beetles as well as for larvae with different freshness qualities. On the other hand, using these primers which deliver a comparably long DNA fragment, a proof of the pollen beetle DNA after consumption by the carabid predators (*Amara similata*, *Pterostichus melanarius*) could only be achieved when the beetles were frozen directly after completed consumption or up to a digestion time span of approx. 10 minutes. For digestion times longer than that threshold, the signal remained negative. By introducing the primers Melig1a, Melig1b, Melig2a and Melig 2b, which in combination with the former primers amplify much

shorter DNA fragments (see Table 1), a considerable extension of this digestion time threshold was obtained. After testing these primers in combination with Melig1 and Melig2, the primers Melig2a and Melig2b combined with Melig1 proved to be best suited for our purposes. Using Melig2 combined with Melig1a or Melig1b did not deliver distinct results.

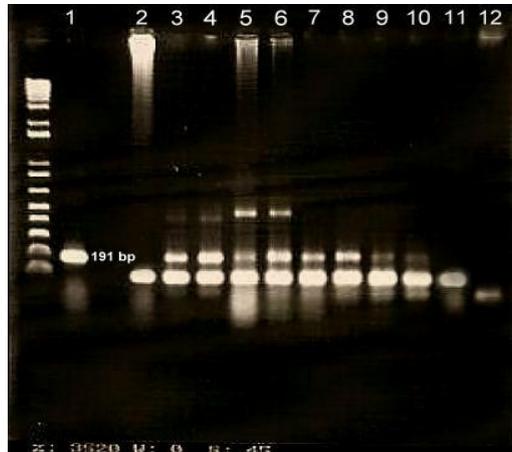
The primer combination Melig1 and Melig2a, amplifying a 269 base pair sized DNA fragment, delivered results as shown in Figure 1 (programme: Msat 52). The lanes 1-5 show the positive control of the different *M. aeneus* extractions. A strong and bright band signal, specific for *M. aeneus*, is visible from DNA extractions of the adult beetles as well as from the larvae; a weaker, but still distinct band is also evident even for larvae that have been stored in 70 % ethanol for about 3 years (lane 2). The specific band is, as expected, missing in the negative control (predator *A. similata* without feeding of prey larvae, see lane 6). The *Meligethes*-specific DNA fragment could be proved from predator specimens that were deep-frozen after a digestion time up to 25 minutes. Beyond this threshold, a PCR signal was no longer visible. There was again no cross-reaction with the predators' DNA (also none with *P. melanarius* in the forthcoming trials). This time limit for detecting *M. aeneus* DNA in the gut content of *A. similata* could not be exceeded even by variation of the PCR programme (Mel 51, Mel 52 and others). A change in the chemical concentration of the amplification mix, the usage of the primer Melig2b instead of Melig2a or a replication of the approach by extracting DNA from other *A. similata* specimens fed with pollen beetle larvae did not lead to a better sensitivity.



**Fig. 1** Ethidium-bromide-stained agarose gel of PCR products from *Meligethes aeneus* DNA, using the primers Melig1 and Melig2a. As a thermo cycler programme the Msat 52 was applied. Lane 1: *M. aeneus* adults, stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ ; Lane 2: *M.a.* adults, stored in 70 % ethanol for 3 years; Lane 3: *M.a.* adults, stored in 96 % ethanol for 3 months; Lanes 4 and 5: *M.a.* larvae, stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and at  $-70^{\circ}\text{C}$ ; Lane 6: Predator *A. similata* (starved 48 hours); Lane 7: *A.s.*, 5 min. digestion time (d.t.); Lane 8: *A.s.*, 10 min. d.t.; Lane 9: *A.s.*, 15 min. d.t.; Lane 10: *A.s.*, 20 min. d.t.; Lane 11: *A.s.*, 25 min. d.t.; Lane 12: *A.s.*, 30 min. d.t.; Lane 13: *A.s.*, 35 min. d.t.; Lane 14: Control (water). Far-left column: 100-bp DNA marker.

A more promising extension of the time limit when the prey's DNA signal finally was lost could be obtained by testing DNA extractions of the carabid predator *P. melanarius*. This species has a much bigger body size than *A. similata* and shows also a much faster and rigorous feeding behaviour; 5 or even 10 larvae of *M. aeneus* were quickly consumed without considerable intervals or feeding pauses between devouring a single larva. Using this predator species for PCR detection of *M. aeneus* DNA, an improvement in comparison with *A. similata* could be achieved. Most successful approaches were performed by combining Melig1 and the primer Melig2b, amplifying a specific DNA fragment of 191 base pairs in length. Comparable results were achieved applying the PCR programmes Mel 52 and Mel 51, and no constant difference according to their suitability could be found among them. During the initial period, testing a first extraction of *P. melanarius* individuals that were frozen in intervals of 5 minutes after consumption of 5 or 10 pollen beetle larvae, the prey-specific band signal disappeared after a digestion time of approx. 30 minutes, similar to the extractions of *A. similata* shown before. In Figure 2, the distinct specific signal of *M. aeneus* is visible at approx. 190 base pairs (see Lane 1), whereas in the negative control of the unfed predator, the signal is absent as expected (Lane 2). For the predator

specimens which consumed *M. aeneus*-larvae, the prey's DNA could be detected distinctly within a digestion time range from 5-25 minutes (Lanes 3-10). For later periods the signal vanished (Lane 11; tested extractions >30 min. are not shown in the figure). There is only a slight but obvious difference in the intensity of the PCR-signal when a consumption of 5 larvae is compared to the consumption of 10 larvae (see Lanes 3 to 4, 5 to 6 and 7 to 8), in favour of the latter.



**Fig. 2** Ethidium bromide-stained agarose gel of PCR products from *Meligethes aeneus* DNA, using the primers Melig1 and Melig2b. As a thermo cycler programme the Mel 52 was applied. Lane 1: *M. aeneus* larvae, stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ ; Lane 2: Predator *P. melanarius* (starved 48 hours); Lane 3: *P.m.*, 5 min. d. t. (5 larvae); Lane 4: *P.m.*, 5 min. d. t. (10 larvae); Lane 5: *P.m.*, 10 min. d. t. (5 larvae); Lane 6: *P.m.*, 10 min. d. t. (10 larvae); Lane 7: *P.m.*, 15 min. d. t. (5 larvae); Lane 8: *P.m.*, 15 min. d. t. (10 larvae); Lane 9: *P.m.*, 20 min. d. t. (10 larvae); Lane 10: *P.m.*, 25 min. d. t. (10 larvae); Lane 11: *P.m.*, 30 min. d. t. (10 larvae); Lane 12: Control (water). Far-left column: 100-bp DNA marker.

The best results with the chosen primers could be obtained by a further extraction series of *P. melanarius* specimens, deep frozen at intervals of 10 min. after consumption of 10 *M. aeneus* larvae. Using the primers Melig1 and Melig2b and the established concentrations for the PCR mixture, a distinct proof of the pollen beetle DNA could be achieved up to a digestion time of 80 min., whereas the positive signal was lost after 90 min. of digestion (see Figure 3). Also extractions beyond that threshold (digestion time spans of 100-120 min., not shown in the figure) did not reveal a specific amplificate.



**Fig. 3** Ethidium bromide-stained agarose gel of PCR products from *Meligethes aeneus* DNA, using the primers Melig1 and Melig2b. As a thermo cycler programme the Mel 51 was applied. Lane 1: *M. aeneus* adults, stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ ; Lane 2: *M. aeneus* larvae, stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ ; Lane 3: Predator *P. melanarius* (starved 48 hours); Lane 4: *P.m.*, 10 min. d. t. (10 larvae); Lane 5: *P.m.*, 20 min. d. t. (10 larvae); Lane 6: *P.m.*, 30 min. d. t. (10 larvae); Lane 7: *P.m.*, 40 min. d. t. (10 larvae); Lane 8: *P.m.*, 50 min. d. t. (10 larvae); Lane 9: *P.m.*, 60 min. d. t. (10 larvae); Lane 10: *P.m.*, 70 min. d. t. (10 larvae); Lane 11: *P.m.*, 80 min. d. t. (10 larvae); Lane 12: *P.m.*, 90 min. d. t. (10 larvae); Lane 13: Control (water). Far-left column: 100-bp DNA marker.

## Discussion

Polyphagous predators, especially carabid and staphylinid beetles in their adult and larval stages, are of outstanding importance especially in oilseed rape fields, by far more than stenophagous predators (Büchs and Alford, 2003). Most of the latter are more or less specialised on aphids, of which mainly one species of minor economic importance, *Brevicoryne brassicae*, occurs in winter oilseed rape in central Europe (Büchs, Alford, 2003). Büchi (2002) estimated the impact of polyphagous predators on the population of *M. aeneus* after a field study conducted for 3 years. About 20 % of the average total mortality was raised by the predators, approximately ten times higher than mortality caused by parasitoids (Büchs, 2003).

The carabids *Amara similata* and *Pterostichus melanarius* belong to an assemblage of over 20 ground beetle species which are abundant regularly in European oilseed rape fields. Of these, the two species chosen in the present work belong to the most numerous and common epigaeic active predators in oilseed rape fields and can therefore be characterised as dominant key predator species in this agricultural ecosystem (Büchs, 2003). After extensive field monitoring, Büchs and Nuss (2000) could prove that especially *A. similata* shows a peak of activity in the period when the most fully grown larvae of *M. aeneus* drop to the ground, reaching a maximum density of 50 individuals per m<sup>2</sup>. In spite of this distinct phenological coincidence with the pollen beetle's larval dropping period, suggesting *A. similata* to be an important antagonist of this pest species, the predatory impact of *A. similata* has been neglected, if not denied, because of its reputation of being more or less strictly phytophagous or granivorous (Jorgenson, Toft, 1997, Luka et al., 1998, Toft, Bilde, 2002). Our investigations, however, revealed that *A. similata* shows a distinctive and remarkable entomophagous feeding behaviour and mean consumption rates of pest larvae which are, for instance, comparable to a species like *Poecilus cupreus* (Schlein, Büchs, 2004). Although the phenology of *P. melanarius* does not show this distinct temporal coincidence with the larval dropping of *M. aeneus* (Büchs, 2003) and is therefore likely not to be mentioned among the key predators at least of *M. aeneus* larvae, it has been integrated in the present study also because of its convenient, rapid feeding habits that afford a more precise fixing of the freezing intervals for subsequent PCR.

Digested, degraded DNA ordinarily consists of fragments of 100-300 base pairs and the presence of comparably sized fragments in the gut of carabid predators is already documented (Agusti et al. 1999, 2000, Zaidi et al., 1999). Therefore, the application of primer combinations which generated amplicates of 180-270 base pairs instead of using the initial pair Melig1 and Melig2 (with a product of 443 bp) proved to be a yielding step, since it is well-known from previous works that shorter DNA fragments resist digestion in the predators' gut much longer than bigger sized fragments (Agusti et al., 1999, Zaidi et al., 1999, Hoogendoorn, Heimpel, 2001, Symondson, 2002 a, Juen, Traugott, 2005).

However, in all our approaches a *Meligethes aeneus*-specific DNA band was obtained and made visible for each extraction of the adult pollen beetles as well as for the larvae of different freshness qualities. All tested preservation techniques seemed to be appropriate for storing collected insect material prior to a subsequent PCR; no difference could be detected, at least for a period of some months, between deep-freezing at -70 or at -20 °C, for instance. DNA amplification of adult beetle or larval DNA did, as expected, not reveal any characteristic differences. Also the extraction of adult pollen beetles which were stored in 70% ethanol for about 3 years led to an acceptable result. Although the resulting specific DNA pattern was obviously weaker than the bands from fresher or deep-frozen material, the preservation in 70 % ethanol seems to be an adequate method for (at least short-time) storage of insect material until PCR analyses can be performed. For instance, predator material collected in the field might be placed directly into ethanol for transport and short-term storage and deep frozen later, if extractions cannot be done in upcoming months. Reiss et al. (1995) tested several preservation methods for field-collected insects for subsequent molecular genetic analyses. In their findings, the DNA of ethanol-stored insects already degraded after 6 weeks, so the present result reveals a distinct prolongation of the DNA's possible survival in ethanol.

The difference between extractions of *A. similata* and *P. melanarius*, regarding the more successful approach of the latter species, cannot be explained. It is known, on the other hand, that the time range of prey-detectability by PCR depends dramatically on the chosen predator and prey taxa and can vary strongly even among very closely related species (Symondson, 2002 b). So the differences in prey DNA detectability might be reasonable in the physiological and intrinsic characteristics of the involved species. Furthermore, it is remarkable that two extractions of the same species evaluated under similar PCR conditions can differ distinctly (see Fig. 2 and Fig. 3). Obviously, if one considers the manually operated procedures of extraction and amplification preparation to be done equally accurately, the beetle specimens chosen for extraction differ themselves in factors that cause success or failure of detecting the prey's DNA. Other studies also mention a more or less explicit share of extractions which failed in revealing the wanted amplification (Agusti et al., 1999, 2000, Zaidi et al., 1999, Chen et al., 2000). So it seems to be prevalent that a certain percentage of specimens which were handled under the same conditions and extracted after an identical digestion time span deliver no positive prey DNA signal like their equally treated conspecifics. The percentage of failure specimens seems to increase regularly with the duration of the digestion time, as previous works have shown (Agusti et al., 1999, 2000, Zaidi et al., 1999, Symondson, 2002 a). Considering this fact, we cannot foreclose that with a larger amount of treated carabid individuals per digestion time interval, there would have been a certain percentage of successful extractions even after 80 min. of consumption.

An interesting result was obtained by visualisation of the *P. melanarius* extraction after feeding 5 or 10 larvae of *M. aeneus*. The resulting specific bands after consumption of 10 larvae seem to be obviously brighter and more intense than the signals after consumption of the half prey assemblage (see Fig. 2), likely caused by a higher *M. aeneus* DNA content in the carabid guts. Although in previous works it is often stated that the amount of consumed prey individuals has no influence on the detectability of the prey's DNA (Zaidi et al., 1999, Hoogendoorn, Heimpel, 2001, Morales et al., 2003), the intensity of the signal, if there is any to be revealed, might be affected by the amount of devoured prey specimens, as our result suggests. In addition, since the applied primers are derived from the low copy sodium channel gene of *M. aeneus*, the increased intensity of the PCR signal can be explained when five or ten larvae were consumed.

The field of predator gut content investigation by PCR did just evolve rapidly during the last years. Before PCR was established as the most promising method, analyses of carabid beetles have been performed for instance using immunoassays like ELISA (Lövei et al., 1990) and iso-enzyme electrophoresis (Walrant and Loreau, 1995; for a review, see Symondson, 2002a, b). In other predatory arthropod taxa, the range of achieved time limits for a positive detection of prey DNA by specific primers in the predators digestive system is broad. Greenstone and Shufran (2003) were able to detect DNA of a corn aphid species in the guts of young lynx spiders up to 12 hours after feeding, whereas Agusti et al. (2003) could prove collembolan DNA fragments of 211-276 bp size in linyphiid spiders in even 100% of cases after 24 hours of digestion. Agusti et al. (1999) used PCR for detection of DNA fragments of a noctuid moth within the guts of predatory bugs (Anthocoridae, Miridae). A 254 bp amplicon could be visualised after 4 hours of digestion, but only in 45% of the tested specimens. Chen et al. (2000) examined coccinellid and chrysopid species with cereal aphids as target prey. They amplified a 198 bp fragment from the aphid remnants, which could be detected after approx. 4 hours in the case of the coccinellid and after 9 hours when the chrysopid was the predator (but in both cases only to 50% of treated specimens). Hoogendoorn and Heimpel (2001) reported the detection of a 150 bp sized DNA amplicon of a lepidopteran species up to 12 hours after digestion in the guts of a ladybug beetle. Morales et al. (2003) developed specific primers for mosquito larval DNA for detection by PCR in the gut content of dragonfly nymphs. They amplified a 390 base pair product which could only be visually confirmed up to 40 minutes after feeding. As a conclusion they assessed the digestion rate of being quite high and rapid.

Zaidi et al. (1999), analyzing carabid beetles like the present study, were able to prove the DNA of consumed mosquitos in the gut content of *Pterostichus (Poecilus) cupreus* without finding any correlation between the number of consumed mosquitos and the subsequent detectability by PCR. Amplifying and detecting PCR products of 263 and 146 bp length which were, at least partially and in 1 of 2 mosquito strains, both detectable even after 28 hours of digestion, this study did promise good possibilities for an evaluation of field-collected carabid predators in general. Even more effective was a study of Juen and Traugott (2005) who were able to amplify cockchafer DNA successfully in more than 50 % of analysed larval specimens of the carabid *Poecilus versicolor* after 32 h of digestion. The achieved time limit given for collecting predator specimens in the field and preserving them for subsequent laboratory analyses seemed to be well sufficient here.

Of course, the methods for a specific monitoring of field-collected predator material according to the consumption of a certain prey species have to be highly sensitive, reliable and established. It is doubtful if it makes sense to analyse DNA from large amounts of collected carabid specimens (which would be necessary to achieve a statistically sufficient evidence about naturally occurring predation rates) with a high expenditure if there is no certainty about the reasons for an absence of the prey-specific DNA band. The sought-after amplificate could be missing in most cases not because of low natural predation rates but mainly because of an insufficient time span for DNA detectability after consumption. It was therefore necessary for our objectives to gain a fundamental improvement by own gene sequencing and primarily by an inevitable switching to the mitochondrial, multi-copy cytochrome-c-oxidase 1 (COI) gene which was used for primer design in most of the previously cited studies. In spite of winning general technical expertise and some useful indications with the nuclear, single-copy sodium-channel gene of *M. aeneus*, the latter was not appropriate for proving natural occurring predation on the target species by carabids, as the time threshold of DNA detection will always remain too short due to the gene's single-copy nature. This lack of suitability can not be compensated by modifications of the PCR conditions, as our investigation showed. In further studies, we sequenced the mitochondrial COI gene and designed primers successfully for *M. aeneus* which were also adequate for field-collected predator material with an unknown feeding history. The publication of this more comprehensive and yielding survey, subsequent to the present primal study, will be published soon.

## Abstract

The feeding ecology and efficacy of common ground beetles (Carabidae) as predators of important oilseed rape pest species have been investigated within the EU-project "MASTER". To allow an assessment of the impact of these key predator species on the populations of the pest insects, a reliable proof of the naturally occurring consumption of the pest larvae is needed; this can be achieved by analyzing the gut content of collected predator specimens using PCR. In this work we concentrated on the pollen beetle *Meligethes aeneus* as prey. Specific primers have been designed for *M. aeneus* and were successfully applied on extracted DNA of adult beetles as well as larvae of different freshness quality and preservation methods. Adult individuals of the carabid species *Amara similata* and *Pterostichus melanarius* have been fed in the laboratory with either 5 or 10 larvae of *M. aeneus* and were frozen at -70°C after different time intervals following complete consumption. By variation of PCR conditions and primer combinations, prey DNA was detected in the predators gut content up to a time limit of approx. 80 minutes. However, as this threshold was not sufficient to ensure satisfying analyses of predators collected in the field, the usage of the chosen nuclear gene of *M. aeneus* was considered to be substituted by the mitochondrial COI gene for subsequent primer design.

Key words: Carabidae, digestion, gut content analysis, *Meligethes aeneus*, oilseed rape, PCR, predators.

## Acknowledgements

We thank Elke Rafiroiu, Daniela Felsmann, Ruth Polok and Fabian Zelmanski for technical assistance in the laboratory and field. The research was funded by the EU Commission (EU-QLK5-CT-2001-01447) as a part of the project "MASTER".

## References

- AGUSTI, N., DE VICENTE, M.C., GABARRA, R. (1999) Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, **8**, 1467-1474.
- AGUSTI, N., DE VICENTE, M.C., GABARRA, R. (2000) Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, **9**, 263-268.
- AGUSTI, N., SHAYLER, S.P., HARWOOD, J.D., VAUGHAN, I.P., SUNDERLAND, K.D., SYMONDSON, W.O.C. (2003) Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, **12**, 3467-3475.
- ALFORD, D.V., NILSSON, C., ULBER, B. (2003) Insect pests of oilseed rape crops. In: *Biocontrol of Oilseed Rape Insect Pests* (ed. Alford DV), pp. 9-41. Blackwell Publications, Oxford.
- BÜCHI, R. (2002) Mortality of pollen beetle (*Meligethes* spp.) larvae due to parasitoids and predators in rape fields and the effect of conservation strips. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **90**, 255-263.
- BÜCHS, W. (2003) Predators as biocontrol agents of oilseed rape pests. In: *Biocontrol of Oilseed Rape Insect Pests* (ed. Alford DV), pp. 279-298. Blackwell Publications, Oxford.
- BÜCHS, W., ALFORD, D.V. (2003) Predators of oilseed rape pests. In: *Biocontrol of Oilseed Rape Insect Pests* (ed. Alford DV), pp. 181-199. Blackwell Publications, Oxford.
- BÜCHS, W., NUSS, H. (2000) First steps to assess the importance of epicaeic active polyphagous predators as natural enemies of oilseed rape insect pests with soil pupating larvae. *IOBC/wprs Bulletin, Integrated Control in Oilseed Crops*, **23**, 151-163.
- CHEN, Y., GILES, K.L., PAYTON, M.E., GREENSTONE, M.H. (2000) Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, **9**, 1887-1898.
- DAY, J.P., SHATTOCK, R.C. (1997) Aggressiveness and other factors relating to the displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 379-391.
- GREENSTONE, M.H., SHUFRAK, K.A. (2003) Spider predation: species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. *Journal of Arachnology*, **31**, 131-134.
- HOOGENDOORN, M., HEIMPEL, G.E. (2001) PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal IST-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, **10**, 2059-2067.
- JORGENSEN, H.B., TOFT, S. (1997) Role of granivory and insectivory in the life cycle of the carabid beetle *Amara similata*. *Ecol. Entomol.*, **22**, 7-15.
- JUEN, A., TRAUGOTT, M. (2005) Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*, **142**, 344-352.
- LÖVEL, G.L., SOPP, P.I., SUNDERLAND, K.D. (1990) Digestion rate in relation to alternative feeding in three species of polyphagous predators. *Ecological Entomology*, **15**, 293-300.
- LUKA, H., PFIFFNER, L., WYSS, E. (1998) *Amara ovata* und *A. similata* (Coleoptera, Carabidae), zwei phytophage Laufkäferarten in Rapsfeldern. *Mitteilungen der Schweizer Entomologischen Gesellschaft*, **71**, 125-131.

- MORALES, M.E., WESSON, D.M., SUTHERLAND, I.W., IMPOINVIL, D.E., MBOGO, C.M., GITHURE, J.I., BEIER, J.C. (2003) Determination of *Anopheles gambiae* larval DNA in the gut of insectivorous dragonfly (Libellulidae) nymphs by polymerase chain reaction. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **19**, 163-165.
- REISS, R.A., SCHWERT, D.P., ASHWORTH, A.C. (1995) Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology*, **24**, 716-719.
- SCHLEIN, O., BÜCHS, W. (2004) Approaches to assess the importance of carnivorous beetles as predators of oilseed rape pests. *IOBC/wprs Bulletin, Integrated Protection in Oilseed Crops*, **70**, 291-294.
- SYMONDSON, W.O.C. (2002a) Diagnostic techniques for determining carabid diets. In: *The Agroecology of Carabid Beetles* (ed. Holland JM), pp. 137-164. Intercept, Andover.
- SYMONDSON, W.O.C. (2002b) Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, **11**, 627-641.
- TOFT, S., BILDE, T. (2002) Carabid diets and food value. In: *The Agroecology of Carabid Beetles* (ed. Holland, J.M.), pp. 81-110. Intercept, Andover.
- WALRANT, A., LOREAU, M. (1995) Comparison of iso-enzyme electrophoresis and gut content examination for determining the natural diet of the groundbeetle species *Abax ater* (Coleoptera: Carabidae). *Entomologia Generalis*, **19**, 253-259.
- ZAIDI, R.H., JAAL, Z., HAWKES, N.J., HEMINGWAY, J., SYMONDSON, W.O.C. (1999) Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology*, **8**, 2081-2087.

## Weitere Publikationen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, die kostenfrei aus dem Internetangebot der BBA abgerufen werden können:

### Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen - BBCH Monografie



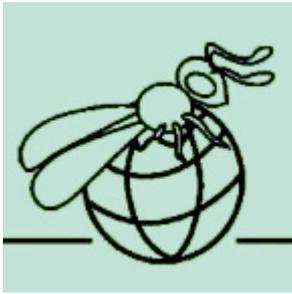
Entwicklungsstadien von Pflanzen exakt zu beschreiben und zu codieren, ist eine der wesentlichen Voraussetzungen, um nicht nur in den botanischen Wissenschaften und in der landwirtschaftlichen Praxis, sondern auch in der Agrarmeteorologie oder im Agrarversicherungswesen eine einheitliche Sprache zu sprechen. Der BBCH-Code baut auf einer Dezimal-Skala auf und ist eingeteilt in Makro- und Mikro-stadien. Er beschreibt eine Vielzahl von Pflanzen, die nicht nur in Mitteleuropa, sondern auch in den Tropen angebaut werden. Die Übersetzungen in bereits vier Sprachen zeugt von der allgemeinen Anerkanntheit, die den „Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen“ gezollt wird. Die Beschreibung der Entwicklungsstadien werden gerne kurz als BBCH-Code zitiert, benannt nach den ursprünglich beteiligten Organisationen, nämlich der Biologischen Bundesanstalt, dem Bundessortenamt sowie für die chemische Industrie dem Industrieverband Agrar. Die BBCH-Skala wird in deutsch, englisch, französisch und spanisch im PDF-Format angeboten.

### Rebschutznachrichten



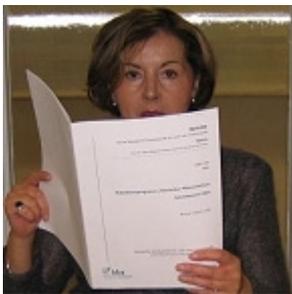
Die Rebschutznachrichten sind für den Winzer an Mosel-Saar-Rüwer gedacht, die mit ihren Steillagen unter besonderen Bedingungen anbauen. Aber die Informationen können mit Einschränkungen auf andere Weinbaugebiete übertragen werden. Für Laien sind vor allem die einleitenden Worte über das Wetter und den aktuellen Wachstumsstand der Reben interessant. So erreichten die Trauben 2006 einen Reifestand, der zehn bis vierzehn Tage vor dem langjährigen Mittel lag. Die Rebschutznachrichten können abonniert werden. Die Abonnenten erhalten die Informationen dann drei Wochen früher als hier im Internet. Interessenten wenden sich bitte an [Weinbau@bba.de](mailto:Weinbau@bba.de).

## Egg Parasitoid News



The „Egg Parasitoid News“ is the successor to the “Trichogramma News”. It is a publication of the Working Group “Egg parasitoids” of the **International Organisation for Biological Control (IOBC)**. The Editors are from the Institutes of Biological Control of the Federal Biological Research Centre (BBA) in Darmstadt. It is published once a year. The Working Group “Egg Parasitoids” consists of more than two hundred research workers all over the world and aims to promote research on this group of beneficial arthropods.

## Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft



Die Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft erscheinen seit 1995 in zwangloser Folge. Daten und Informationen zu komplexen oder speziellen Thema mit vorwiegend wissenschaftlichem Charakter werden hier umfassend dargestellt: beispielsweise die Fachgespräche Ökolandbau und andere Kolloquien, die Erhebungen im Projekt Neptun oder statistische Fragen von Versuchsanlagen. Einige Themen sind auch für die breite, verbraucherorientierte Öffentlichkeit von Interesse. Die "Berichte aus der BBA" können über den **SAPHIR VERLAG** bezogen werden

## Methoden für die Prüfung der Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln



Deutsche Fassungen bzw. deutsche Vorschläge für EPPO-Richtlinien. Seit Inkrafttreten (1. Juli 1998) des novellierten Pflanzenschutzgesetzes vom 14. Mai 1998 in Verbindung mit der Pflanzenschutzmittelverordnung vom 17. August 1998 sind für die Prüfung der Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln im Rahmen des Zulassungsverfahrens die entsprechenden Richtlinien der European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO-Richtlinien) zugrunde zu legen. Für einige dieser EPPO-Richtlinien wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen, bestehend aus Vertretern des amtlichen Pflanzenschutzdienstes, des Industrieverbandes Agrar (IVA) und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Fassungen in deutscher Sprache erarbeitet, die auf den EPPO-Richtlinien basieren. Diese Fassungen beinhalten den Text der EPPO-Richtlinien in deutscher Sprache und in einem Anhang fachlich begründete Erläuterungen zu einzelnen Punkten. Abweichungen, die fachlich begründet unter dem Niveau der EPPO-Richtlinien bleiben, werden in diesen Erläuterungen fett gedruckt. Es wird versucht, diese Erläuterungen künftig in die EPPO-Richtlinien einzubringen. Diese Erläuterungen haben für die Prüfung der Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln in Deutschland empfehlenden Charakter. Rechtlich verbindlich ist der originale englische Text der EPPO-Richtlinien. In Bereichen, für die zur Zeit keine EPPO-Richtlinien vorliegen, werden deutsche Vorschläge für EPPO-Richtlinien erarbeitet. Die bisher fertiggestellten deutschen Fassungen bzw. deutschen Vorschläge für EPPO-Richtlinien stehen im Internetangebot nach Wirkungsbereichen geordnet zur Verfügung.

- Übergeordnete Richtlinien
- Wirkungsbereich Akarizide
- Wirkungsbereich Fungizide
- Wirkungsbereich Herbizide
- Wirkungsbereich Insektizide
- Wirkungsbereich Molluskizide
- Wirkungsbereich Nematizide
- Wirkungsbereich Wachstumsregler