

# 430

## Julius-Kühn-Archiv

### Drittes Nachwuchswissenschaftlerforum

23. - 25. November 2010  
in Quedlinburg



### **Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)**

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

Hauptaufgabe des JKI ist die Beratung der Bundesregierung bzw. des BMELV in allen Fragen mit Bezug zur Kulturpflanze. Die vielfältigen Aufgaben sind in wichtigen rechtlichen Regelwerken, wie dem Pflanzenschutzgesetz, dem Gentechnikgesetz, dem Chemikaliengesetz und hierzu erlassenen Rechtsverordnungen, niedergelegt und leiten sich im Übrigen aus dem Forschungsplan des BMELV ab. Die Zuständigkeit umfasst behördliche Aufgaben und die Forschung in den Bereichen Pflanzengenetik, Pflanzenbau, Pflanzenernährung und Bodenkunde sowie Pflanzenschutz und Pflanzengesundheit. Damit vernetzt das JKI alle wichtigen Ressortthemen um die Kulturpflanze – ob auf dem Feld, im Gewächshaus oder im urbanen Bereich – und entwickelt ganzheitliche Konzepte für den gesamten Pflanzenbau, für die Pflanzenproduktion bis hin zur Pflanzenpflege und -verwendung. Forschung und hoheitliche Aufgaben sind dabei eng miteinander verbunden.

Weiterführende Informationen über uns finden Sie auf der Homepage des Julius Kühn-Instituts unter <http://www.jki.bund.de>. Spezielle Anfragen wird Ihnen unsere Pressestelle ([pressestelle@jki.bund.de](mailto:pressestelle@jki.bund.de)) gern beantworten.

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

The Julius Kühn-Institut is both a research institution and a higher federal authority. It is structured into 15 institutes and several research service units on the sites of Quedlinburg, Braunschweig, Kleinmachnow, Siebeldingen, Dossenheim und Dresden-Pillnitz, complemented by an experimental station for potato research at Groß Lüsewitz. The head quarters are located in Quedlinburg. The Institute's core activity is to advise the federal government and the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection in particular on all issues relating to cultivated plants. Its diverse tasks in this field are stipulated in important legal acts such as the Plant Protection Act, the Genetic Engineering Act and the Chemicals Act and in corresponding legal regulations, furthermore they arise from the new BMELV research plan.

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

More information is available on the website of the Julius Kühn-Institut under <http://www.jki.bund.de>. For more specific enquiries, please contact our public relations office ([pressestelle@jki.bund.de](mailto:pressestelle@jki.bund.de)).

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

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,

Tel.: 03946 47-200, E-Mail: [GFF@jki.bund.de](mailto:GFF@jki.bund.de)

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

4 3 0

Julius-Kühn-Archiv

Drittes  
Nachwuchswissenschaftlerforum

23. - 25. November 2010  
in Quedlinburg



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

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

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

ISSN 1868-9892  
ISBN 978-3-930037-70-4

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, 2011. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben bei auch nur auszugsweiser Verwertung vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der Fassung vom 24. Juni 1985 zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, Berlin.





## Inhalt – Contents

### **Stir Bar Sorptive Extraction – Eine Methode zur Bestimmung von volatilen Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanzen?** 5

Stir Bar Sorptive Extraction – A method for detection of volatiles from potato plants?  
Beyer, K., Ziegler, A., Ulrich, D., Weiß, K., Grünwald, R., Wilhelm, R.

### **Kupfer- und andere Schwermetalle in Hopfen- und Weinbergsböden und ihre Auswirkungen auf die Bodenzönose** 9

Copper and other heavy metals in hop and vineyard soils and their effects on soil coenosis  
Steindl, A., Strumpf, T., Riepert, F.

### **Dust in the Wind – Abdrift insektizidhaltiger Stäube – ein Risiko für Honigbienen (*Apis mellifera L.*)?** 15

Dust in the wind - drift of dust containing insecticides - a risk for honey bees  
(*Apis mellifera L.*)?  
Georgiadis, P.-Th., Pistorius, J., Heimbach, U.

### **Molekularbiologische Charakterisierung der Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels im Hinblick auf die Aromastoffproduktion in reifenden Früchten** 20

Molecular characterization of the lipoxygenase gene family in apple  
(*Malus domestica* Borkh.) contributing to the production of flavour compounds  
in ripening fruits  
Vogt, J., Dunemann, F.

### **Etablierung eines neuen Hybridsystems zur Züchtung von Möhren mit spezifischer Anbaueignung unter Trocken- und Salzstressbedingungen in Zentralasien** 29

Establishment of a new hybrid system for carrot breeding with enhanced drought and  
salt stress tolerance in Central Asia  
Rode, A., Nothnagel, T., Kampe, E.

### **Molekulare Verwandtschaftsanalyse von *Gaultheria*-Arten** 35

Molecular distance analysis for *Gaultheria* species  
Lehmann, C., Nehrlich, S., Budahn, H., Plaschil, S.

### **Auftreten von *Plasmodiophora brassicae* als Erreger der Kohlhernie im Winterrapsanbau in Europa sowie Identifizierung, Charakterisierung und molekulare Kartierung neuer Kohlhernieresistenzgene aus genetischen Ressourcen** 40

European monitoring of *Plasmodiophora brassicae* as the causal agent of clubroot disease in  
oilseed rape and phenotyping and molecular mapping of new resistance genes derived from  
genetic resources  
Lüders, W., Abel, S., Friedt, W., Kopahnke, D., Ordon, F.

- Regulierung von Rapsschädlingen im ökologischen Winterrapsanbau durch den Einsatz naturstofflicher Pflanzenschutzmittel sowie durch den Misanbau mit Rüben** 44  
 Organic Control of Oilseed Rape Pests through Natural Pesticides and Mixed Cultivation with Turnip Rape  
 Ludwig, T., Jansen, E., Trost, B., Mayer, J., Kühne, S., Böhm, H.
- Entwicklung und Anwendung molekularer und informatorischer Werkzeuge für das genetische Monitoring bei Wildrüben.** 48  
 Development and application of molecular and bioinformatic tools for the genetic monitoring of wild beets.  
 Enders, M., Frese, L., Nachtigall, M.
- Etablierung einer Methode zur Phänotypisierung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) resistenz in der Weinrebe (*Vitis spec.*)** 54  
 Development of a method for phenotyping Black Rot (*Guignardia bidwellii*) resistance on grapevine (*Vitis spec.*)  
 Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R.
- Die Bedeutung sekundärer Pflanzenstoffe bei der Vergrämung von Wühlmäusen** 58  
 The repelling effect of secondary plant compounds against voles  
 Fischer, D., Prokop, A., Mattes, H., Wink, M., Jacob, J.
- Ausbreitungsdynamik von Feldmäusen in Agro-Ökosystemen** 60  
 Dispersal dynamics of common voles in agro-ecosystems  
 Leukers, A., Jacob, J.
- Zusammenhang zwischen Mikrohabitatstrukturen, Nahrungsverfügbarkeit und Abundanz von Waldnagern** 62  
 The impact of microhabitat structures and food availability on the abundance of forest rodents  
 Kühn, K., Reil, D., Imholt, C., Mattes, H., Jacob, J.

## **Stir Bar Sorptive Extraction – Eine Methode zur Bestimmung von volatilen Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanzen?**

Stir Bar Sorptive Extraction – A method for detection of volatiles from potato plants?

Beyer, K.<sup>1</sup>, Ziegler, A.<sup>1</sup>, Ulrich, D.<sup>2</sup>, Weiß, K.<sup>2</sup>, Grünwald, R.<sup>1</sup>, Wilhelm, R.<sup>1</sup>

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

<sup>1</sup>Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen,

<sup>2</sup>Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz,

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,

Kontakt: ralf.wilhelm@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Die Anwendung der Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) als Methode zur Extraktion von emittierten volatilen Substanzen von Kartoffelblättern für die Bestimmung mittels GC/MS wird untersucht. Es soll eine effiziente Methode entwickelt werden, die zur Darstellung von sortenbedingten Unterschieden im Spektrum der volatilen Substanzen bei Kartoffelpflanzen geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass SBSE Nachweise gestattet, die bei geringerem Aufwand mit bekannten Methoden vergleichbar sind. Weitere Untersuchungen dienen der Optimierung der Methodik. Ziel ist es, das Spektrum der volatilen Stoffe als Parameter für eine Bewertung von Sorten (z.B.: Pflanzengesundheit, Pflanzenschutz, Biosicherheit) heranzuziehen.

Stichwörter: Sesquiterpene, GC/MS, Kartoffel

### **Abstract**

The application of Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) as a method for extraction of emitted volatile compounds of potato leaves using GC/MS will be studied. A suitable efficient method shall be developed to describe differences in the spectrum of volatile compounds of potato varieties. It was shown that SBSE yields results similar to other established methods but with less effort. The method will be optimised further. The use of the spectrum of volatile compounds as a parameter for variety assessment (e.g.: plant health, plant protection, biosafety) is planned.

Keywords: sesquiterpene, GC/MS, potato

### **Einleitung**

Volatile Substanzen sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die mit der Umwelt der Pflanze wechselwirken. Unter diesen Substanzen stellen die Terpenoide (Mono- und Sesquiterpene) eine bedeutende Gruppe dar. Sie sind Signalstoffe (Semiochemicals) bei der Kommunikation der Pflanzen mit Insekten (Herbivoren, Carnivoren).

Die Zucht von Kulturpflanzen greift in den Pflanzenstoffwechsel ein. Ungezielte bzw. indirekte Veränderungen in der Synthese von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden oft jedoch nicht berücksichtigt, ökologische Auswirkungen bleiben unklar. Bei der Sicherheitsbewertung von transgenen Pflanzen spielt gerade die Abschätzung der ökologischen Folgen eine wichtige Rolle. Die Wirkung transgener Pflanzen auf Nichtzielorganismen oder Fragen der Pflanzengesundheit sind zu berücksichtigen. Ist die ökologische Relevanz der Wirkungen von volatilen Substanzen bekannt, können diese prinzipiell zur Sicherheitsbewertung, aber auch zur züchterischen Optimierung herangezogen werden. Dies setzt voraus, dass die natürliche Variationsbreite der Stoffe, deren Funktion und Nutzen für die landwirtschaftliche Praxis quantifiziert werden können. Für die Bearbeitung der Fragestellung wird eine effiziente Methodik benötigt. Die Analyse von volatilen Pflanzeninhaltsstoffen erfolgt bisher häufig mit Versuchsansätzen, bei denen die Anzahl von parallelen Messungen durch den hohen Aufwand stark begrenzt ist. Die SBSE hingegen bietet die Möglichkeit einer schnellen und aufschlussfreien Extraktion von flüchtigen Substanzen in gasförmigen Proben, wie z.B. im

Headspace von Pflanzenmaterial. Unter Verwendung der SBSE und anschließender Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/ MS) wird eine Methode entwickelt, die reproduzierbare Ergebnisse zur Darstellung des Spektrums von volatilen Stoffen liefert. Die Versuche werden mit *Solanum tuberosum* durchgeführt.

### Material und Methoden

Bei der SBSE werden mit einer Sorptionsphase (Polydimethylsiloxan-PDMS) beschichtete Rührstäbchen der Firma Gerstel, auch „Twister“ genannt, verwendet. *Twister* von 10 mm Länge und einer PDMS Schichtdicke von 0,5 mm werden zusammen mit Pflanzenblättern in Glasgefäße gebracht und mehrere Stunden belassen. Das Prinzip der Extraktion beruht auf einer Gleichgewichtseinstellung für jede volatile Substanz zwischen PDMS-Schicht und Probenvolumen. Anschließend werden die am *Twister* gebundenen Stoffe thermisch bei 250 °C desorbiert und der GC/ MS zugeführt. Zur Stofftrennung wird eine polare Säule (HP INNOWax, 0,25 mm ID x 30 m Länge und 0,5 µm Schichtdicke) verwendet. Das Trägergas ist Helium (1,1 ml/min).

Die ersten Versuche wurden mit 20 ml Glasröhrchen durchgeführt. In jedes Glasröhrchen kam zusammen mit dem *Twister* ein abgeschnittenes Seitenfiederblättchen der Kartoffelpflanze. Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur über 24 Stunden. Die verwendeten Kartoffelpflanzen wurden aus *in vitro* vermehrtem Material herangezogen. Die Anzucht erfolgte in handelsüblicher Pflanzenerde in der Klimakammer bzw. im Gewächshaus.

### Ergebnisse und Diskussion

Mit der SBSE Methode konnten bei den ersten Versuchen in zwei Kartoffelsorten (Cascada und Hermes) 19 Sesquiterpene nachgewiesen werden, was qualitativ mit bisherigen Ergebnissen anderer Methoden vergleichbar ist (Tabelle 1). Karlsson et al. (2009) konnten mehr als 30 und Weissbecker et al. (2000) 14 emittierte Sesquiterpene bei den Kartoffelsorten Princess bzw. Surprise identifizieren. Bei beiden Versuchsaufbauten wurden die Kartoffelpflanzen in geschlossenen Gefäßen platziert, das heißt die Pflanzen sind künstlichen Bedingungen bei der Beprobung ausgesetzt. Aus dem über die Pflanze geleiteten Luftstrom wurden die volatilen Stoffe an einer Festphase gesammelt/aufkonzentriert. 17 der 30 von KARLSSON et al. (2009) identifizierten Sesquiterpene wurden auch unter Verwendung der SBSE bei Blättern der Kartoffelsorten Cascada und Hermes gefunden (Tabelle 1). SZAFRANEK et al. (2005) konnten 19 Sesquiterpene bei 10 polnischen Sorten identifizieren, wobei das Blattmaterial mit Lösungsmittel extrahiert wurde. Keine der Methoden kommt bei den Probenahmen ohne Manipulation am Pflanzenmaterial aus. Auch das Abschneiden der Blätter bei unserer Methode stellt eine mechanische Beschädigung dar, die Einfluss auf die Emission von volatilen Stoffen bei Pflanzen haben kann. Der Vorteil der SBSE gegenüber den „klassischen“ Methoden ist der wesentlich geringere Aufwand. Dies ermöglicht eine parallele Beprobung von mehreren Pflanzen. Durch die einfache Handhabung sind sogar Beprobungen von Freilandpflanzen möglich.

Die 5 Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllen, Germacren D, E- $\beta$ -Farnesen,  $\beta$ -Sesquiphellandren und  $\alpha$ -Bergamoten treten bei allen untersuchten Kartoffelsorten auf. Alle haben Bedeutung bei der Kommunikation der Pflanzen mit Insekten (Lockstoff, Repellent) oder der Kommunikation von Insekten untereinander (Pheromon, Alarmstoff: <http://www.pherobase.com>). Die Optimierung der Methodik und die Eingrenzung der Fehler(quellen) standen und stehen bei den nächsten Versuchen im Vordergrund. Zur Erhöhung des Probenvolumens an Pflanzenmaterial wurden verschiedene Gefäßvarianten getestet und 100 ml Weithals-Standflaschen mit Normschliff und Glas-Deckelstopfen ausgewählt. Dies ermöglicht die Arbeit mit Mischproben von mehreren Blättern. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, laufen Versuche zur Anzucht der Kartoffelpflanzen in *Perlite*.

**Tab. 1** Identifizierte Sesquiterpene (x) von Kartoffelblättern und Vergleich mit Angaben aus verschiedenen Literaturquellen

Sorte	Karlsson et al. (2009)			Szafranek et al. (2005)	Weissbecker et al. (2000)
	Cascada	Hermes	Princess	10 polnische Sorten	Surprise
Sesquiterpene					
$\beta$ -Caryophyllene	x	x	x	x	x
$\alpha$ -Caryophyllene	x	x	x		
Caryophyllene oxide	x	x	x		x
Germacrene D	x	x	x	x	x
E- $\beta$ -Farnesene	x	x	x	x	x
$\beta$ -Sesquiphellandrene I	x	x			
$\beta$ -Sesquiphellandrene II + Z- $\beta$ -Farnesene	x	x			
$\beta$ -Sesquiphellandrene III	x	x			
$\beta$ -Sesquiphellandrene			x	x	x
$\alpha$ -Bergamotene	x	x	x	x	x
$\beta$ -Bisabolene	x	x		x	
$\alpha$ -Zingiberene	x	x	x		x
$\alpha$ -Gurjunene	x	x	x	x	
Ledol	x	x	x		x
$\alpha$ -Cubebene	x	x	x	x	
$\beta$ -Cubebene	x	x	x	x	
$\beta$ -Elemene	x	x	x	x	
$\gamma$ -Elemene	x	x			
$\gamma$ -Muurolene	x	x	x		
$\delta$ -Cadinene	x	x	x		
$\alpha$ -Cadinene	x	x	x		
$\beta$ -Bourbonene	x		x		
sonstige	n.n.	n.n.	+ 15	+ 9	+ 6

n.n. nicht nachgewiesen, Substanzidentifikation: NIST Bibliothekssuche

Der Einfluss der Lagerungsdauer von beladenen *Twistern* wird untersucht indem die Twister bis zu 14 Tage im Kühlschrank bei 5 °C gelagert werden. Ferner soll die Sorptionszeit verkürzt werden (1h, 3h, 6h), um die Flexibilität der Methode zu erhöhen und die experimentellen Möglichkeiten zu erweitern.

Für zukünftige Untersuchungen wurden 30 Kartoffelsorten nach der Bundessortenliste auf Grund ihrer Virus- und Nematodenanfälligkeit ausgewählt und das Pflanzmaterial bereitgestellt.

Nach Abschluss der Versuche zur Methodik werden die Spektren der volatilen Substanzen (Sesquiterpene) der ausgewählten Kartoffelsorten bestimmt. Wenn sich durch die Methode sortenbedingte Unterschiede darstellen lassen, sind Voraussetzungen für die weiteren Untersuchungen des Zusammenhangs von physiologischen Sorten-Merkmalen mit möglichen ökologischen Auswirkungen gegeben (functional metabolomics).

## Literatur

- Szafranek, B., K. Chrapkowska, M. Pawinska, J. Szafranek (2005): Analysis of Leaf Surface Sesquiterpenes in Potato Varieties. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2817-2822.
- Weisbecker, B., J.J.A. Vanloon, M.A. Posthumus, H.J. Bouwmeester, M. Dicke (2000): Identification of volatile potato sesquiterpenoids and their olfactory detection by the two-spotted stinkbug. *J.Chem. Ecol.* **26** (6), 1433-1445.
- Karlsson, M.F., G. Birgersson, A.M. Cotes Prado, F. Bosa, M. Bengtsson, P. Witzgall (2009): Plant Odor Analysis of Potato: Responses of Guatemalan Moth to Above- and Belowground Potato Volatiles. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 5903-5909.

## **Kupfer- und andere Schwermetalle in Hopfen- und Weinbergböden und ihre Auswirkungen auf die Bodenzönose**

Copper and other heavy metals in hop and vineyard soils and their effects on soil coenosis

Steindl, A., Strumpf, T., Riepert, F.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz,

Königin-Luise-Str. 19, 14195 Berlin

Kontakt: anna.steindl@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Hintergrund des Projektes sind Forderungen der EU, verlässliche Daten über das Ausmaß der Kupferbelastung in Sonderkulturböden zu generieren, um über eine weitere Zulassung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Landbau zu entscheiden.

Bei der Beprobung von 85 Reb- und 13 Hopfenlagen an konventionell und ökologisch bewirtschafteten Standorten wurden 2522 Einzelbodenproben von Prüf-, Referenz- (Brachen, wo früher Kupfer angewendet wurde) und Kontrollflächen, ohne anthropogen zugeführtes Kupfer zur Analyse der Kupfer-Gesamtgehalte im Königwasserextrakt und der pflanzenverfügbaren Kupfergehalte im  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Extrakt entnommen. Zusätzlich wurden Bodenparameter wie pH-Wert, C/N-Verhältnis, Bodenart etc. untersucht. Die Korrelation zwischen pflanzenverfügbaren und Gesamtkupfergehalten ist nicht sehr hoch, eventuell wegen der Vielzahl an Einfluss nehmenden Faktoren wie z.B. unterschiedliche Bodenparameter oder Kulturmaßnahmen. Ein aktuell laufendes Regenwurmmonitoring soll Aufschluss über mögliche Schädigungen des Bodenlebens geben.

Stichwörter: pflanzenverfügbares Kupfer, Sonderkulturen, Wein, Hopfen, Schwermetallanalyse, Risikoabschätzung, Monitoring

### **Abstract**

Background of the project are claims of the EU regulation to generate reliable data considering the extent of copper contaminations in soils of specialized crops in order to decide about copper restrictions in organic farming.

2522 single soil samples were collected on 85 vineyard and 13 hop areas with different management histories. Samples were taken from sites presently under cultivation, formerly cultivated sites and sites without anthropogenic copper contamination as control, indicating natural background values. In addition to Aqua Regia extraction for determining total copper contents, plant available copper contents were analyzed in  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  extraction. Soil parameters as pH-value, C/N ratio, soil type etc. were also analyzed. The correlation between plant available and total copper contents is not very high probably due to the broad range of relevant values e.g. soil parameters or cultivation measurements. An ongoing biological survey about the present status of earthworm populations will give information about possible impairments of soil coenosis.

Keywords: plant available copper, specialized crops, vine, hop, heavy metal analysis, risk assessment, monitoring

### **Einleitung und Zielsetzung**

Seit ca. 120 Jahren werden kupferhaltige Pflanzenschutzmittel in Sonderkulturen gegen pilzliche Erreger wie die Reben- (*Plasmopara viticola*) und Hopfenperonospora (*Pseudoperonospora humili*) eingesetzt. In Sonderkulturen wie Wein und Hopfen ist die Verfügbarkeit kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel, besonders im ökologischen Anbau, essentiell für die Bekämpfung von

Oomyceten. Wurden bis in die 60er Jahre noch bis zu 80 kg Kupfer pro Hektar und Jahr ausgebracht, sind es heute in ökologisch bewirtschafteten Sonderkulturen nur noch 3 – 4 kg Kupfer.

Eine Literaturstudie des JKI zeigt, dass die langfristige Anwendung von Kupfer zu erhöhten Bodengehalten geführt hat, die im Verdacht stehen, schädigend auf einige Arten von Bodenorganismen zu wirken. Kupfer reichert sich im Boden an und kann nicht abgebaut werden. Nur ein geringer Teil des Gesamtkupfers im Boden ist jedoch bioverfügbar. Eine abschließende Risikoabschätzung für den Lebensraum Boden, sowohl bezogen auf die betroffene Fläche in Deutschland, als auch hinsichtlich des Ausmaßes der Kupferanreicherung und der Schädigung des Bodenlebens ist auf der derzeitigen Datenbasis nicht möglich.

Die Aufnahme von Kupfer als Wirkstoff in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG steht im Spannungsfeld der Nutzen-Risikoabwägung und wurde daher befristet mit der Auflage vorgenommen, für eine Datenbasis zu sorgen, die eine abschließende Bewertung der Belastungssituation in den relevanten Kulturen ermöglicht und damit die Voraussetzung für eine Risikobetrachtung mit angemessenen Maßnahmen zur weiteren Verwendung schafft. Ziel des Projektes ist es daher, aktuelle Daten zu den Auswirkungen der Schwermetallgehalte in ökologischen Sonderkulturböden auf das Bodenleben zu erarbeiten.

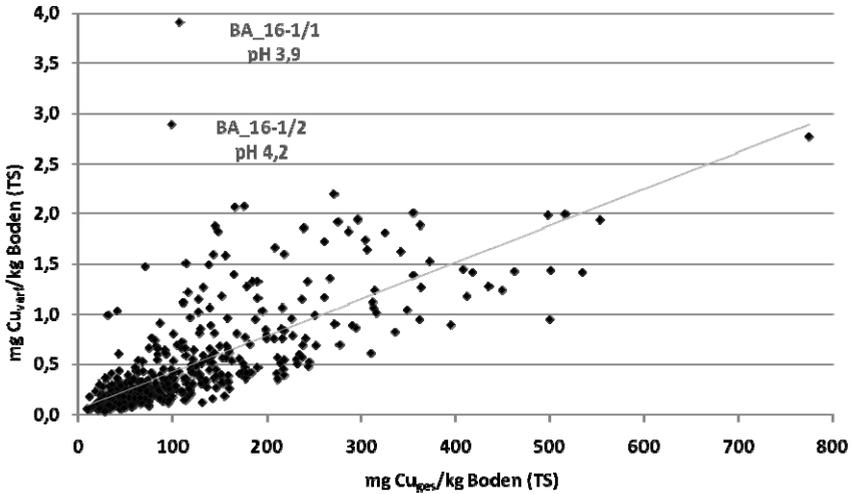
## Methoden

Die Probenahme erfolgte in allen deutschen Qualitätsweinbau- und Hopfenanbaugebieten. Es wurden 56 ökologisch und 29 konventionell bewirtschaftete Reblagen beprobt und 2086 Einzelbodenproben entnommen. Die Erhebung der Belastungsverteilung von 4 ökologisch und 9 konventionell bewirtschafteten Hopfenlagen lieferte 436 Einzelbodenproben. In Rücksprache mit den jeweiligen Betrieben wurden Prüfflächen, welche unter Bewirtschaftung stehen, Referenzflächen, welche früher mit Kupfer behandelt wurden und Kontrollflächen, wo niemals Kupfer angewendet wurde, untersucht. Auf jeder Fläche wurden diagonal 5 Proben der Bodentiefen 0-5 und 0-20 cm mit einem Pürckhauer entnommen (DIN 2004). Die Beprobungspunkte wurden für die Möglichkeit einer späteren Wiederfindung via GPS eingemessen. Die Laboranalysen zu den Gesamtgehalten orientieren sich an den Vorgaben des Bundes-Bodenschutzgesetzes (BBodSchG) (Anonym, 1998), das zur Vermeidung von Wachstumsbeeinträchtigungen bei Kulturpflanzen Vorsorge- und Prüfwerte für As, Cr, Pb, Cu, V und Zn vorsieht. Mittels eines IRIS Intrepid® ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) wurden die Schwermetallgesamtgehalte im Königswasserextrakt (DIN 1983) und die pflanzenverfügbaren Gehalte auf der Basis der Konzentrationen im  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Extrakt (DIN 1997) bestimmt. Weitere Bodenparameter wie pH-Wert, C/N-Verhältnis, Bodenart (VDLUFA 1991) etc. wurden ebenfalls ermittelt.

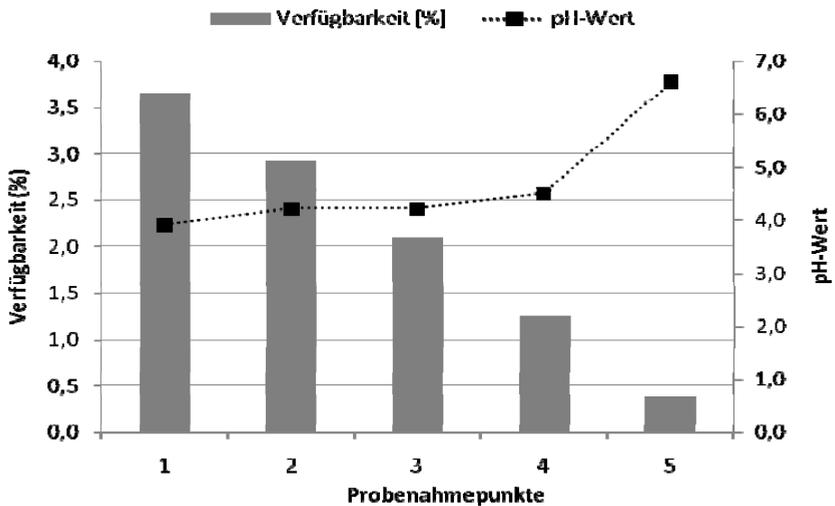
## Ergebnisse

Faktoren, wie Gesamtgehalte, Nutzungsdauer, Bodeneigenschaften oder Flächentyp können Einfluss auf pflanzenverfügbare Kupfergehalte haben. Der Korrelationskoeffizient zwischen bioverfügbaren und Gesamtgehalten liegt im Wein bei 0,7 (Abbildung 1), im Hopfen bei 0,4. Besonders im oberen Bereich der Gesamtgehalte weichen die empirischen Analyseergebnisse von der Regressionsgeraden ab. Es bleibt zu prüfen, ob es sich bei diesen Werten um „Ausreißer“ handelt und welche Ursachen dafür in Frage kommen. Die pH-Wert Ermittlung dieser Bodenproben ergab, dass bei niedrigen Boden pH-Werten, die Verfügbarkeit erhöht ist (Abbildung 2). Abbildung 3 zeigt, dass die Pflanzenverfügbarkeit des Kupfers regional stark schwanken kann. Die prozentuale Verfügbarkeit ist in Sachsen am höchsten. Der Prüfwert von 1 mg bioverfügbarem Cu/kg Boden wird auf keiner der beprobten Flächen, weder im Wein noch im Hopfen, überschritten. Erwartungsgemäß lässt die Bewirtschaftungsdauer ihren Einfluss auf die Menge an verfügbarem Kupfer auf einer Fläche erkennen. So veranschaulicht Abbildung 4,

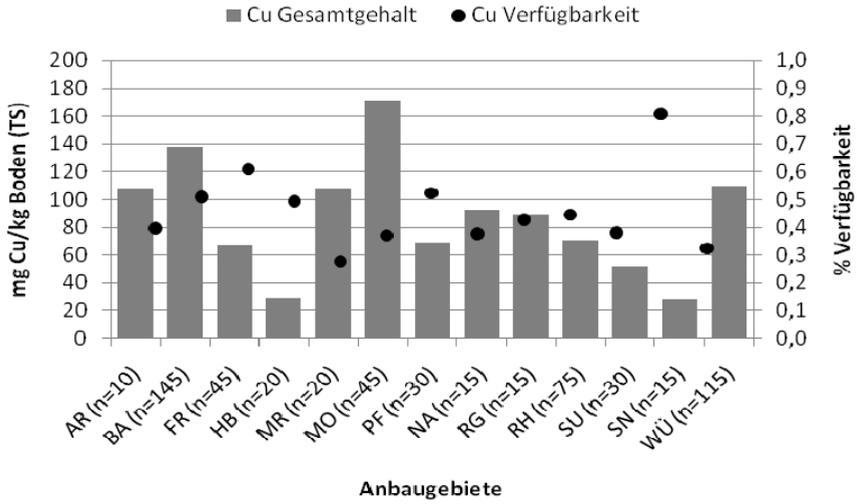
das eine lange Bewirtschaftungsdauer mit wiederholter Kupferanwendung zu einer Anreicherung an verfügbarem Kupfer führt. Neben Kupfer wurden weitere Schwermetalle wie As, Cr, Pb, V und Zink auf den Flächen gefunden, welche bei erhöhter Verfügbarkeit negative Effekte auf das Bodenleben haben können (Abbildung 5).



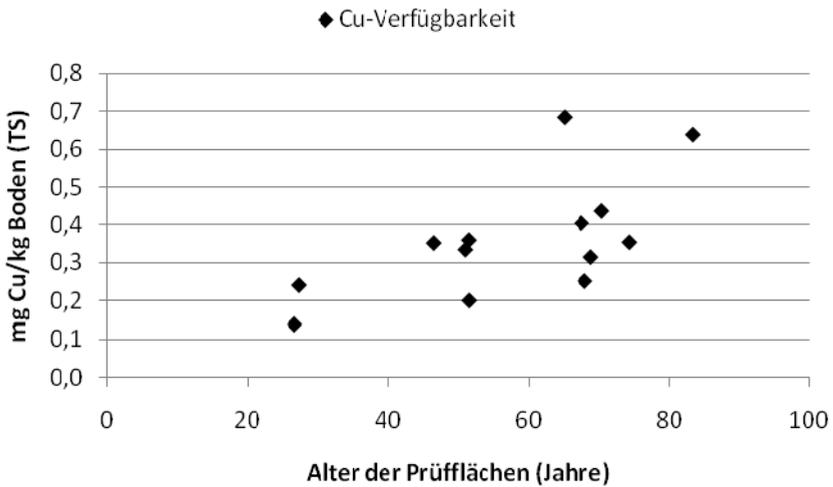
**Abb. 1** Korrelation zwischen Gesamt- und pflanzenverfügbaren Gehalten auf Prüfflächen im Wein ( $r=0,7$ ;  $n=578$ ).



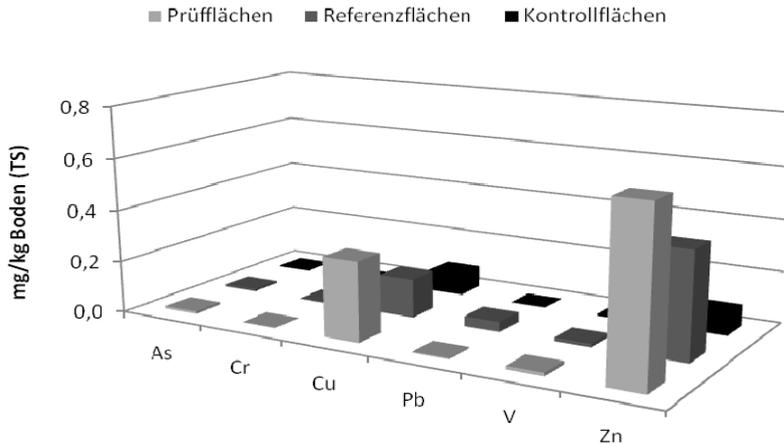
**Abb. 2** Abhängigkeit der Pflanzenverfügbarkeit vom pH-Wert des Boden bei den einzelnen Beprobungspunkten der Prüffläche BA\_16, Bereich Badische Bergstr.



**Abb. 3** Prozentuale Verfügbarkeit und Gesamtkupfergehalte in den unterschiedlichen Weinanbaugebieten.



**Abb. 4** Cu-Verfügbarkeit in Abhängigkeit des Alters der Prüfflächen ( $r=0,6$ ).



**Abb. 5** Pflanzenverfügbare Schwermetallgehalte (Mittelwerte) auf Prüf-, Referenz- und Kontrollflächen.

### Diskussion

Kupfer und andere Schwermetalle wurden aus unterschiedlichen Quellen, z.B. durch Holzschutzmittel, Insektizide, legierte und verchromte Metallstickel etc. auf landwirtschaftlichen Sonderkulturflächen eingetragen. Die pflanzenverfügbaren Schwermetallgehalte der Flächen liegen unterhalb des Prüfwertes und haben in derart geringen Konzentrationen keine negativen Einflüsse auf das Pflanzenwachstum. Die Verfügbarkeit von Schwermetallen, wie z.B. Kupfer, ist abhängig von der Bewirtschaftungsdauer der Flächen. Hinsichtlich der Kupferverfügbarkeit in unterschiedlichen Regionen wird deutlich, dass z. B. Qualitäts-weinbaugebiete mit relativ kurzer Bewirtschaftungshistorie, wie die Hessische Bergstraße oder Sachsen, wo während DDR Zeiten kein Kupfer auf Weinflächen ausgebracht wurde (Lyr, 2009) eine deutlich höhere, prozentuale Verfügbarkeit zeigen. Einige wenige Flächen weisen erhöhte, verfügbare Kupfergehalte bei geringem Gesamtgehalt auf. Ein Grund könnte der niedriger Boden pH-Wert der jeweiligen Flächen bzw. Probenahmepunkte sein, welcher sich positiv auf die Verfügbarkeit auswirken kann. Hier muss überlegt werden, ob eine Kalkung des Bodens zur Verringerung der Schwermetallmobilität und Begünstigung des Bodenlebens und Pflanzenwachstums im Allgemeinen beitragen könnte (Pesch 2006). Aus den gewonnenen analytischen Befunden ergeben sich Fragen nach den Ursachen der Unterschiedlichkeit der Bioverfügbarkeit in Bezug auf das jeweilige Schutzziel und die Eignung der verwendeten Extraktionsverfahren.

### Schlussfolgerungen

Die Verfügbarkeit von gealtertem Kupfer in Böden von Wein- und Hopfenanbauflächen sind nicht von einem Faktor abhängig, sondern können von den unterschiedlichsten Kriterien wie Bewirtschaftungsweise, pH-Wert oder Prüfflächenalter beeinflusst werden. Auch eine Kombination verschiedener Faktoren könnte Einfluss auf Schwermetallverfügbarkeiten haben. Lückenlose Informationen über die jeweilige Fläche, welche selten zur Verfügung stehen, da Flächen gepachtet oder erworben wurden, sind notwendig, um eine sichere Bewertung abgeben zu können. Die Vorbeprobungen waren Voraussetzung, um Flächen für eine Erhebung zur Abundanz und Artenvielfalt von Regenwurmpopulationen (DIN 2007) auszuwählen, welche ein wichtiger Baustein zur Realisierung der Richtlinie der Kommission 2009/37/EG vom 23. April 2009 (Auflage von Programmen zur Überwachung gefährdeter Gebiete durch Zulassungsinhaber) in Deutschland anzusehen ist.

Auf der Grundlage aktueller Daten zu den Gehalten und den beobachteten Auswirkungen kann dann eine verfeinerte Nutzen-Risikoanalyse durchgeführt und eine abschließende Entscheidung zum Verbleib oder zur Streichung kupferhaltiger Verbindungen im Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG getroffen werden.

### Literatur

- Anonym (1998): Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz -BBodSchG) vom 17. März 1998, BGBl. I S. 502
- DIN 38414 (1983): Aufschluss mit Königswasser zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Metallen. Teil 7, Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 19730 (1997): Bodenbeschaffenheit - Extraktion von Spurenelementen mit Ammoniumnitratlösung.
- DIN ISO 10381-4. (2004): Bodenbeschaffenheit - Probenahme - Teil 4: Anleitung für das Vorgehen bei der Untersuchung von natürlichen, naturnahen und Kulturstandorten
- DIN ISO 23611-1 (2007): Bodenbeschaffenheit – Probenahme von Wirbellosen im Boden – Teil 1: Handauslese und Formalinextraktion von Regenwürmern.
- Lyr, H. (2009): Persönliche Mitteilung.
- Pesch, J. (2006): Kalkung und Schwermetalle Rheinkalk KDI GmbH & Co. KG. <http://www.rheinkalk-kdi.de/File/Kalk-und-Schwermetalle.pdf>. Letzter Zugriff 21.01.2011.
- VDLUFÄ (1991): Methodenbuch, Band I. Die Untersuchung von Böden, A 5.1.1. VDLUFÄ-Verlag Darmstadt.

## **Dust in the Wind – Abdrift insektizidhaltiger Stäube – ein Risiko für Honigbienen (*Apis mellifera* L.)?**

Dust in the wind - drift of dust containing insecticides - a risk for honey bees (*Apis mellifera* L.)?

Georgiadis, P.-Th., Pistorius, J., Heimbach, U.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland,

Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig

Kontakt pablo.georgiadis@jki.bund.de; jens.pistorius@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Im Zuge des Forschungsprogramms des Bundes und der Länder Bayern und Baden-Württemberg zur Bekämpfung des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) fanden 2009 und 2010 großangelegte Versuche zur Staubabdrift während der Aussaat von Clothianidin-haltigem Winterraps- und Maissaatgut statt. Dabei wurden die Kontamination von benachbarten blühenden Bienenweidepflanzen und die Auswirkungen der Drift auf Einzelbienen und Bienenvölker untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Feldrandstrukturen bei Staubabdrift mit für Bienen hochtoxischen Wirkstoffen ein hohes Gefährdungspotential bieten. Weitere Erkenntnisse über die Wirkung der Staubexposition auf Bienenvölker in Abhängigkeit der Applikationsmenge an Staub (0,5 g a.i./ha und 2,0 g a.i./ha Clothianidin; a.i.= active ingredient) konnten aus zwei Halbfreilandversuchen mit gezielter manueller Applikation von praxisorientierten Mengen an Maisbeizstaub-Erd-Gemisch in *Phacelia* gewonnen werden.

Trotz relativ geringem Totenfall konnte nach Applikation von 2 g a.i./ha ein sichtbarer Effekt auf die Mortalität und Populationsentwicklung der Bienenvölker festgestellt werden, während die niedrige Konzentration gegenüber der Kontrollvariante keine Abweichungen aufwies.

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

### **Abstract**

In the course of the German *Diabrotica* research program funded by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer protection and the states of Bavaria and Baden-Wuerttemberg large-scale drift trials were conducted during the sowing of winter oilseed rape and maize seeds treated with Clothianidin in 2009 and 2010. In the process the contamination of adjacent flowering bee forage plants and the impact of dust drift on individual bees and colonies were examined.

The results show that primarily field edge structures are high risk areas for dust drift with highly toxic ingredients to bees. More data on the impact of exposure of dust on colonies depending on the application amount of dust (0.5 g a.i. / ha and 2.0 g a.i./ ha Clothianidin) were obtained from experimental approaches in tents with manual application of insecticide-loaded dust in *Phacelia*. Despite an overall low mortality, a visible effect on mortality of the colonies was detected for the higher concentration, whereas the low concentration compared with the untreated control showed no differences.

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

## Einleitung

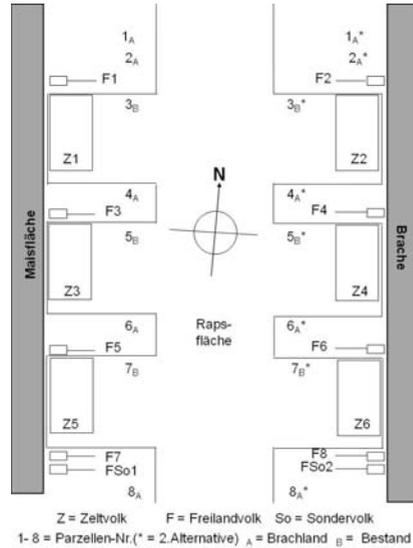
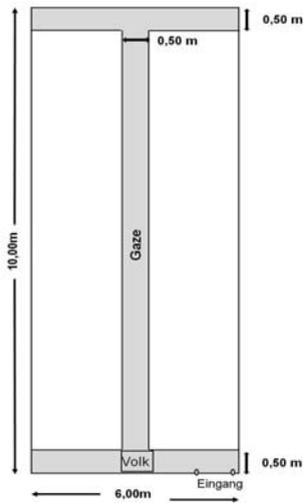
Abdrift von Neonikotinoid-haltigen Saatgutstäuben während der Maisaussaat Ende April 2008 führte in der Oberrheinebene in Baden-Württemberg und in Teilen von Bayern zur Kontamination von blühenden Bienenweidepflanzen und damit zur größten Bienenvergiftung in Deutschland seit 30 Jahren (Pistorius, Bischoff, Heimbach, 2009). Clothianidin wurde dort in erhöhter Aufwandmenge (Poncho Pro®, 1,25 mg a.i./Korn) zur Bekämpfung des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera* LECONTE) eingesetzt. Daher werden seit Anfang 2009 innerhalb des Bundesprojekts zur Bekämpfung des Westlichen Maiswurzelbohrers Untersuchungen zur verbesserten Expositionsabschätzung von Saatgutabrieb auf benachbarte Nicht-Zielflächen im Hinblick auf letale und subletale Effekte von insektizidhaltigen Stäuben von gebeiztem Mais auf Bienen (*Apis mellifera* L.) durchgeführt.

## Material und Methoden

In praxisnahen Abdriftversuchen wurden 2009 und 2010 hinsichtlich der Auswirkung der Beizstaubabdrift auf einzelne Bienen sowie ganzen Bienenvölkern vier verschiedene Ansätze betrachtet:

- Kleine, wind-durchlässige, mit Bienen besetzte Holzkäfige wurden in Abständen von 1, 3, 5, 10 und 20 m zum Feldrand der Drillfläche auf beiden Seiten der Ackerfläche aufgestellt und während des Drillvorgangs der Abdrift von Clothianidin-haltigen Beizstäuben direkt exponiert. Das Verhalten und der Totenfall der Bienen in den Versuchskäfigen wurden bis zur letzten Bonitur (48 Stunden nach dem Drillen) im Labor beobachtet und dokumentiert.
- Mit Futterlösung präparierte Petrischalen wurden in gleicher Weise aufgestellt, um die Deposition von Stäuben auf feuchten Blattoberflächen bzw. Honigtau benetzten Blättern zu simulieren und anschließend die Auswirkungen nach oraler Aufnahme des Futters durch Bienen zu untersuchen. Das Verhalten und der Totenfall der in den anschließenden Tests verwendeten Bienen wurden im Labor für 48 Std. beobachtet und dokumentiert.
- Je 3 Tunnelzelte (Abb. 1) mit Bienenvölkern wurden entlang der Drillfläche (Abstand = 0 m) sowie in 90 m Abstand aufgebaut sowie je 5 Völker wurden zusätzlich in 0 m, 90 m und 800 m Abstand im Freiland aufgestellt (Abb. 2). Die Bienenstöcke in den abgedeckten Zelten blieben bis zum Ende der Aussaat verschlossen, während die Bienen der Freilandvölker bereits beim Drillvorgang der Beizstaubabdrift ausgesetzt wurden. Anschließend wurde für 7 Tage die Flugaktivität, Verhaltensweise und die Populationsentwicklung der Bienenvölker und der Totenfall an Bienen dokumentiert. Außerdem wurden Proben an Pollen- und Nektarsammlern sowie an frisch eingelagertem Honig und Bienenbrot für die Rückstandsanalytik genommen.

Als blühende Nachbarkultur dienten Winterraps bzw. Ackersenf, welche bei der Aussaat von Maissaatgut (Poncho Pro® behandelt, Saatgut aus 2008, hohe Staubabriebwerte) bzw. Rapssaatgut (Elado® behandelt, mittlere Abriebwerte) mit entsprechenden Beizstäuben kontaminiert wurden. Für die Aussaat von Mais kam eine pneumatische Einzelkorn-Sämaschine (mindestens 90 % Driftreduktion durch Umrüsttechnik) und für Raps eine pneumatische Sämaschine zum Einsatz.



**Abb. 1** Skizze des Innenraumes eines Zeltes    **Abb. 2** Lageskizze der Versuchsvölker auf dem Feld

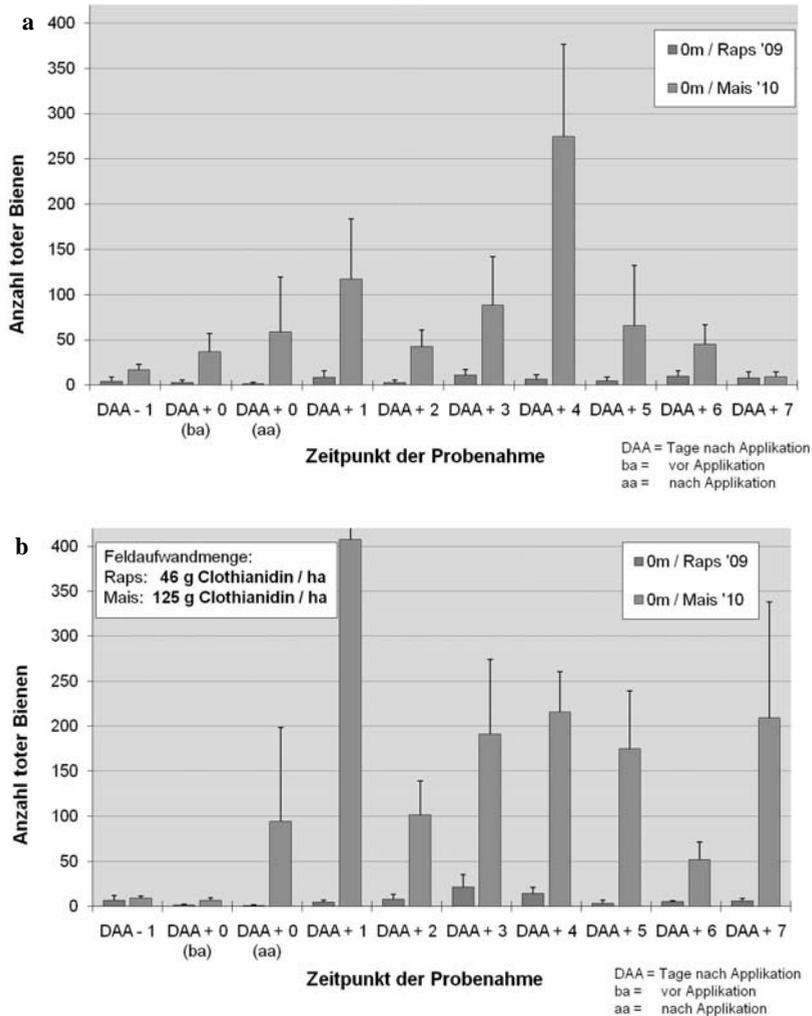
Weitere Erkenntnisse über die Wirkung der Staubexposition auf Bienenvölker durch gezielte manuelle Applikation eines Gemisches an Maisbeizstaub- verschiedener Korngrößen-fractionen (T1 = 0,5 g a.i./ha und T2= 2,0 g a.i./ha Clothianidin) mit LuFa 2.2-Boden konnten aus zwei Versuchsansätzen mit Phacelia in Zelten gewonnen werden. Hierbei wurden wie im Abdriftversuch für 7 Tage die Flugaktivität, Verhaltensweise und die Populationsentwicklung der Bienenvölker als auch der Totenfall an Bienen dokumentiert als auch Proben an Pollen- und Nektarsammlern sowie an frisch eingelagertem Honig und Bienenbrot für die Rückstandsanalytik genommen.

### Ergebnisse

Während der Expositionsversuch mit Bienen besetzter Holzkäfige keine Effekte bei der Mortalität der Bienen aufweist, zeigte sich im Honigwasser aus den Petrischalen ein deutlich erhöhter Wirkstoffgehalt an Clothianidin, was sich auch in einer deutlich erhöhten Mortalität im Fütterungstest niederschlägt.

Gegenwärtige Ergebnisse zeigen, dass bei Rapsaussaat über sämtliche Versuchsansätze keine Auswirkungen auf Bienen und Bienenvölker zu erwarten sind. Hingegen wurde nach der Maisaussaat im Freilandversuch 2010 eine behandlungsbedingt erhöhte Mortalität der Bienen festgestellt (Abb. 3).

In den Versuchsansätzen mit gezielter manueller Applikation zeichnet sich eine Tendenz zur leicht erhöhten Mortalität der Bienen bei einer Applikationsmenge 2,0 g a.i./ha Clothianidin ab.



**Abb. 1** Abdriftversuch mit kontaminiertem Mais- bzw. Winterrapsaatgut: a) Mortalität bei Freilandvölkern; b) Mortalität bei Zeltvölkern

## Diskussion

Der Käfigversuch weist in beiden Varianten eine sehr geringe Mortalität (< 5%) auf. Selbst bei direktem Einstäuben der direkt am Feldrand aufgestellten Bienen mit Driftstaub während des Drillvorganges wurde keine erhöhte Mortalität beobachtet.

Mit Rückständen bis zu 62,78 ng a.i./g im Honigwasser aus den kontaminierten Petrischalen des Abdriftversuchs, lässt sich die hohe Mortalität der Bienen im Fütterungstest (2 ml Honigwasser) erklären.

Jedoch stellt die Deposition von Stäuben und Wirkstoffrückständen in den präparierten Petrischalen und somit die hohe Wirkstoffkonzentration im Futter im Vergleich zur realen Exposition, selbst zu einer Honigtausimulation (punktuelleres Auftreten auf Blättern) eine Überexposition dar. Während die Mortalität der Freiland- als auch der Zeltvölker im Abdriftversuch mit gebeiztem Winterrapsaatgut im Rahmen des natürlichen Totenfalls lag,

wurde nach der Maisaussaat 2010 bereits in den ersten Stunden nach EA in den Freiland- und Zeltvölker ein deutlicher Anstieg der Mortalität beobachtet.

Die manuelle Ausbringung von Maisbeizstaub mit Lufa-Erde als Streckungsmaterial hat sich in dem Applikationsversuchen 2009 und 2010 als praktikabel erwiesen. Bei der Betrachtung der Ausbeute toter Bienen in der Totenfalle konnte in der Variante „LuFa - Boden + 2,0g ai/ha“ eine leicht erhöhte Mortalität festgestellt werden.

Für 2011 sind weitere Untersuchungen der Auswirkung von Beizstäuben auf die Populationsentwicklung von Bienenvölkern und potentielle subletale Effekte auf Bienen und Bienenbrut nach Applikation verschiedener Korngrößenfraktionen geplant. Zusätzlich soll das Abdriftverhalten von Beizstäuben verschiedener Kulturpflanzen in einem Windkanal ermittelt werden.

Danksagung: Die Arbeiten wurden über das Diabrotica-Forschungsprogramm aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) mitfinanziert.

### **Literatur**

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

## **Molekularbiologische Charakterisierung der Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels im Hinblick auf die Aromastoffproduktion in reifenden Früchten**

Molecular characterization of the lipoxygenase gene family in apple (*Malus domestica* Borkh.) contributing to the production of flavour compounds in ripening fruits

Vogt, J., Dunemann, F.

Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,  
Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst,  
Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden  
Kontakt: frank.dunemann@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Lipoxygenasen (LOXs) bilden wichtige Vorstufen für aromarelevante flüchtige Substanzen in reifen Früchten. Innerhalb des hier vorgestellten Projektes sollen Mitglieder der LOX-Genfamilie und deren Genprodukte im Kulturapfel umfassend identifiziert und charakterisiert werden. Es werden erste Ergebnisse aus bioinformatischen Sequenzuntersuchungen sowie zur PCR-basierten Klonierung vollständiger LOX-Gene des Apfels präsentiert. Das Projekt wird zum besseren Verständnis der Entstehung von Aromamustern bei Obstarten beitragen und über die Entwicklung eines funktionalen Markersystems für die Züchtung auch einen praktischen Anwendungsbezug besitzen.

Stichworte: Lipoxygenase, Aroma, Apfel (*Malus*)

### **Abstract**

Lipoxygenases (LOXs) are important enzymes that provide among others precursors for fruity volatiles in ripe apples. During the project presented in this paper, LOX gene family members and their gene products will be identified and characterized in the cultivated apple. The subsequent article introduces the scientific background and presents some initial results of bioinformatic sequence studies as well as from PCR-based full-length cloning of LOX genes. Available *Malus* databases are screened for LOX nucleotide sequences, putative LOX genes will be mapped, temporal and spatial expression patterns determined in different fruit stages and candidate genes functionally characterized. The data will finally be used to develop functional markers to support molecular breeding and to enable a more efficient documentation of biodiversity of aroma patterns in *Malus* gene bank accessions, apple cultivars and breeding material.

Keywords: lipoxygenase, aroma, apple (*Malus*)

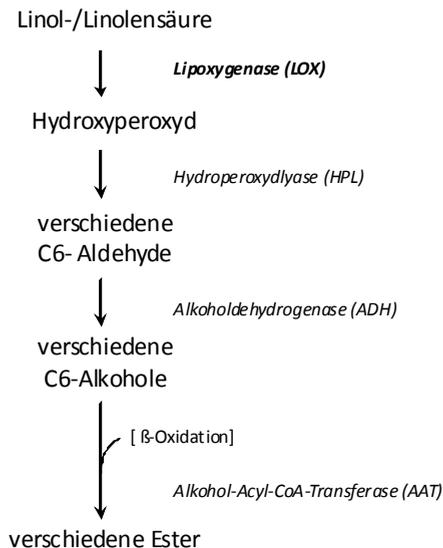
### **Einleitung und Zielstellung**

Das durch flüchtige Inhaltsstoffe bedingte Aroma des reifen Apfels ist ein wichtiges Fruchtqualitätsmerkmal und hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Vermarktungschancen einer Apfelsorte. Es handelt sich dabei um ein biochemisch und genetisch sehr komplexes Merkmal, welches bislang kaum durch gezielte züchterische Strategien zu bearbeiten war und stattdessen eher als "Zufallsprodukt" der Züchtung galt. Für den Apfelzüchter stellt die Einkreuzung von Resistenzen, z.B. gegen Schorf oder Feuerbrand, eines der Hauptzuchtziele bei der Entwicklung neuer Sorten dar. Der Konsument dagegen trifft seine Kaufentscheidung überwiegend aufgrund sortenspezifischer Fruchteigenschaften, wozu auch das Aroma gehört. Auch deshalb konnten in der Vergangenheit gezüchtete resistente Sorten einschließlich der in Dresden-Pillnitz gezüchteten Sorten der „Re“-Serie, wie z.B. Rewena oder Rebella, bis heute die etablierten Marktsorten, wie z.B. Royal Gala, Braeburn, Elstar oder Golden Delicious, nicht verdrängen.

Der typische Geschmack einer Apfelsorte entsteht vor allem durch das Zusammenspiel von Zucker- und Säuregehalt mit typischen Fruchtaromen. Letztere setzen sich aus verschiedenen Schlüsselkomponenten, wie flüchtigen Aldehyden, Alkoholen und Estern, zusammen, die je nach Sorte qualitativ und quantitativ variieren. Fruchttester mit hoher Aromarelevanz, wie z.B. Hexylazetat, Butylazetat und 2-Methyl-Butylazetat, können dabei mehr als 80% der aromasignifikanten Substanzen ausmachen (Altisent et al., 2009).

Die wichtigsten Aromastoffe des Apfels werden aus Primärmetaboliten über wenigstens vier verschiedene Biosynthesewege generiert (Schaffer et al., 2007), von denen zwei in die Bildung von Pflanzenestern involviert sind. Die Esterbildung aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure kann durch die enzymatische Wirkung von Lipoxygenasen und/oder durch  $\beta$ -Oxidation erfolgen, wobei Aldehyde wie Hexenal oder Hexanal und daraus entstandene Alkohole wesentliche Zwischenschritte darstellen ( ). Man geht mittlerweile davon aus, dass die Bereitstellung von Substraten im Vorfeld der Esterproduktion maßgeblich durch den Lipoxygenase-Stoffwechselweg beeinflusst wird.

Bei höheren Pflanzen wurden mittlerweile insgesamt weit mehr als 100 LOX-Gene als proteincodierende Sequenzen (coding sequences, CDS) oder Proteine beschrieben, die im Stoffwechsel sehr unterschiedliche Funktionen haben können. Die



**Abb. 1** Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg

Das namensgebende Enzym Lipoxygenase (LOX) katalysiert die erste Reaktion. Durch weitere enzymkatalysierte Reaktionen und Substrate aus anderen Stoffwechselwegen (z.B.  $\beta$ -Oxidation) entstehen am Ende verschiedene Pflanzenester (nach Schwab et al. 2008, vereinfacht).

Zahl der beteiligten LOX-Gene bei einzelnen Arten variiert zwischen fünf (*Arabidopsis thaliana* und Tomate) und kann bis zu etwa 20 (Sojabohne) oder noch mehr (Kartoffel) Familienmitglieder betragen. Auch beim Apfel wurden bereits mehrere LOX-Gene in Form von ESTs (EST, expressed sequence tag) beschrieben. Park et al. (2006) identifizierten anhand bioinformatischer Auswertung von EST-Banken des Apfels ein putativ in die Aromastoffsynthese involviertes LOX-Gen auf EST-Cluster MD187410, welches von Dunemann et al.

(2009) als Kandidatengen für einen bedeutsamen QTL-Cluster (QTL, quantitative trait locus) für diverse Esterkomponenten auf Chromosom 9 identifiziert wurde. Bei dem hier vorgestellten Projekt handelt es sich um ein von der DFG gefördertes Gemeinschaftsprojekt, an dem neben dem JKI-Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst (ZGO, Dresden-Pillnitz) auch das Institut für Biotechnologie der Naturstoffe der TU München (Prof. Dr. W. Schwab, D. Schiller) beteiligt ist. Das Ziel ist es, einen der entscheidenden Schritte bei der Aromastoffproduktion der Apfelfrucht in einem interdisziplinären Ansatz mit Hilfe von molekulargenetischen und biochemischen Verfahren zu untersuchen. Es soll dabei eine Charakterisierung von LOX-Genen vorgenommen werden, deren Produkte durch die Bereitstellung von Ausgangssubstraten maßgeblich die Bildung aromarelevanter Ester und damit das Aromamuster des reifen Apfels prägen. Am Ende des Projektes soll neben dem Erkenntnisgewinn bei grundsätzlichen Prozessen zur Entstehung von Aromamustern bei Rosaceen vor allem eine anwendungsbezogene Nutzung für neue züchterische Wege des "molecular breeding" beim Apfel stehen.

Im Folgenden werden erste Ergebnisse zur bioinformatischen Sequenzanalyse von Mitgliedern der LOX-Genfamilie des Apfels dargestellt sowie erste erfolgreiche Ansätze zur Klonierung von vollständigen LOX-Genen im *Malus*-Genom präsentiert.

## Material und Methoden

### Bioinformatische Untersuchungen

Für die homologie-basierte Suche nach LOX-Sequenzen wurde ein BLAST der „Apple Genome v1.0“- Sequenzdatenbank durchgeführt (Velaso et al., 2010). Als Suchsequenz wurden die von Schaffer *et al.* (2007) beschriebenen LOX-Sequenzen verwendet. Die Erstellung von Alignments wurde mit MUSCLE (Edgar, 2004) durchgeführt. Eine Identitätsmatrix wurde durch das Programm ClustalX 2.0.11 (Larkin et al., 2007) unter Standardeinstellungen errechnet. Ein Phylogramm ausgewählter LOX-Sequenzen inklusive der *bootstrap*-Werte wurde durch MEGA4 (Tamura et al., 2007) erstellt. Das erhaltene Phylogramm wurde durch den in MEGA4 implementierten Tree Explorer dargestellt.

Die Berechnung von Proteinstrukturmodellen der LOX-Genprodukte wurde mit SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006; <http://swissmodel.expasy.org>) durchgeführt. SWISS-MODEL ist eine web-basierte Umgebung zur Erzeugung von Strukturmodellen auf Basis von Protein-Struktur-Homologien. Es wurde die Option *automated mode* als Einstellung gewählt. Der *automated mode* prüft die PDB Datenbank automatisch auf die am besten geeignete Vorlage für die Berechnung. Als Vorlagen wurden die Strukturen „1k3“ und „1no3“ genutzt. Die eingegebenen Sequenzen waren zuvor durch Klonierung und Sequenzierung ermittelt worden.

Die Visualisierungssoftware für molekulare Strukturdaten, PyMol, wurde für die Darstellung der Modelle benutzt (Schrödinger, 2010). Die Werte für die mittlere quadratische Standardabweichung (root mean square deviation, RMSD) wurden durch den in PyMol implementierten *align*-Algorithmus berechnet.

### PCR-gestützte Klonierung vollständiger LOX-Gene

Das Pflanzenmaterial für die DNA-Isolierung wurde von der Sorte Golden Delicious aus der *Malus*-Genbank des ZGO (Dresden-Pillnitz) in Form von jungen Blättern entnommen. Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit dem Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex) durchgeführt.

Für die Amplifizierung von LOX-Gensequenzen wurden PCR-Primer auf Basis verschiedener bioinformatisch identifizierter LOX-Akzessionen der Golden Delicious-Genomsequenz erstellt und mit NetPrimer optimiert (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). Die bisher für die LOX-Genklonierung verwendeten Primer sind mit ihrer Sequenz und Annealingtemperatur in

Tabelle 1 aufgelistet. Die PCR wurde mit Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 3 min 93°C, 35x (30 sek 93°C, 30 sek Primerannealingtemperatur, 4 min 72°C), 10 min 72°C. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitex) aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigten Fragmente wurden für die Klonierung mittels des CloneJET™ PCR Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Vom Ligationsmix wurden 2,5 µl für die Transformation von 50 µl kompetenter *E. coli*-Bakterien des Stamms JM109 (Promega) verwendet.

Die Transformation wurde nach dem Protokoll des Herstellers der transformations-kompetenten Zellen durchgeführt. Zur Feststellung positiver Klone wurde eine Kolonie-PCR mit pJET1.2 Sequenzierprimern nach Protokoll des CloneJet-Kits durchgeführt. Von ausgewählten positiven Klonen wurde eine Plasmidisolierung mit dem Invisorb® Spin Plasmid Mini *Two* (Invitex) durchgeführt. Die Plasmide wurden durch die Firma Eurofins-MWG-Operon (Ebersberg) sequenziert. Aufgrund der Länge der klonierten Fragmente wurde ein Primerwalk auf Basis selbst erstellter Primer durchgeführt. Die Sequenzen der Primerwalk-Primer sind in dieser Arbeit hier nicht angegeben.

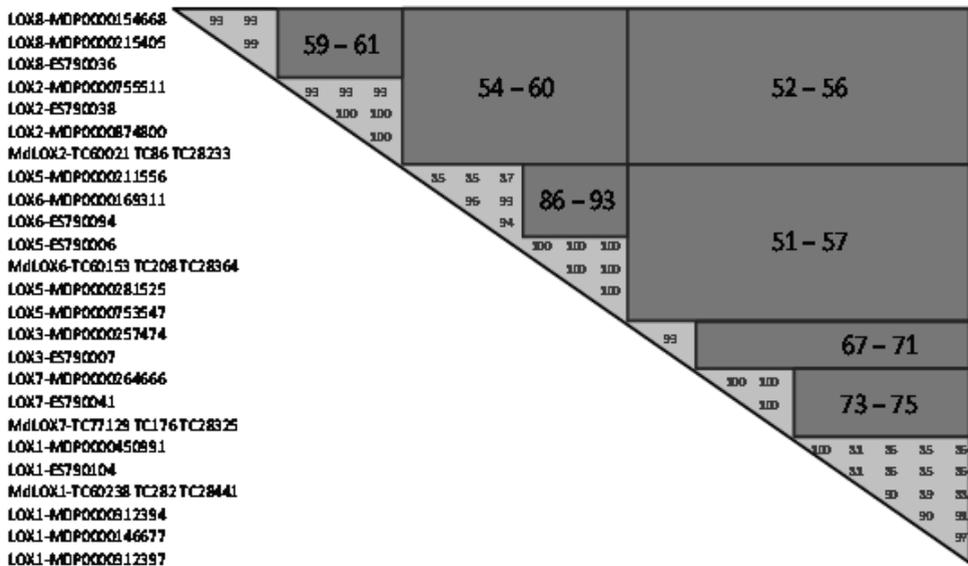
**Tab. 1** Primer für die PCR-Amplifizierung der Malus-LOX-Gensequenzen und die verwendete Annealingtemperatur

Primer	Primersequenz (5'-3')	Annealingtemperatur
lox1_for	tgaactttccatgcaaggttc	60 °C
lox1_rev	aaattgtgcaaatccagctt	60 °C
lox2_for	atcggggaattcggattcaaaattctcgac	60 °C
lox2_rev	atcatcggtagccccaccaccctcaaaata	60 °C
lox7_for	atctccggtaccacctttctctctgtaac	64 °C
lox7_rev	accacctctagacacgagtgaatacaatgtagac	64 °C
lox8_for_b	cttctgttactgtaaagcattaaac	55 °C
lox8_rev	tccgagcacagctatcatataga	55 °C

## Ergebnisse und Diskussion

Die kürzlich auf Basis der Apfelsorte Golden Delicious veröffentlichte vollständige Sequenz des *Malus*-Genoms (Velasco et al. 2010) wurde genutzt, um innerhalb der CDS-Sequenzdatenbank mittels BLAST nach Sequenzen zu suchen, die hohe Ähnlichkeit zu den von Schaffer et al. (2007) beschriebenen LOX-Genen (LOX1 bis LOX9) aufwiesen. Die Gene LOX4 und LOX9 wurden dabei nicht berücksichtigt, da LOX4 offensichtlich für eine andere Enzymgruppe codiert und LOX9 keinen offenen Leserahmen besitzt, also nicht funktionell zu sein scheint. Die erhaltenen Sequenzen wurden manuell überprüft, und nur jene mit annähernd der für LOX-ORFs (ORF, open reading frame, offener Leserahmen) typischen Länge von ca. 2,8 kb wurden in die weiteren Arbeiten einbezogen. Diese und die von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten LOX-ESTs wurden mit MUSCLE aligniert. Anschließend wurde mit dem Programm ClustalX eine Identitätsmatrix des Alignments berechnet (Abbildung 2). Innerhalb des durch das Programm MEGA4 erstellten Phylogramms (Abbildung 3) wird deutlich, dass einige der LOX-Sequenzen miteinander geclustert sind. Diese sind Mitglieder jeweils einer Gengruppe, genannt LOX1, LOX2, LOX3, LOX5/6, LOX7 und LOX8. Schaffer et al. (2007) beschrieben LOX5 und LOX6 als unterschiedliche Gene. Aufgrund der Daten aus der Identitätsmatrix (Abbildung 2) kann allerdings vermutet werden, dass diese zu einer gemeinsamen Gengruppe (LOX5/6) gehören, da sie sich mit einer Ähnlichkeit von 86% nur verhältnismäßig wenig voneinander unterscheiden. Auch Sequenzen, die zur LOX1-Gengruppe

zusammengefasst werden, haben untereinander eine recht hohe Ähnlichkeit von etwa 80%. Innerhalb der Gengruppen gibt es allerdings auch einige deutlich unterscheidbare Gene wie z. B. LOX8a und LOX8b.

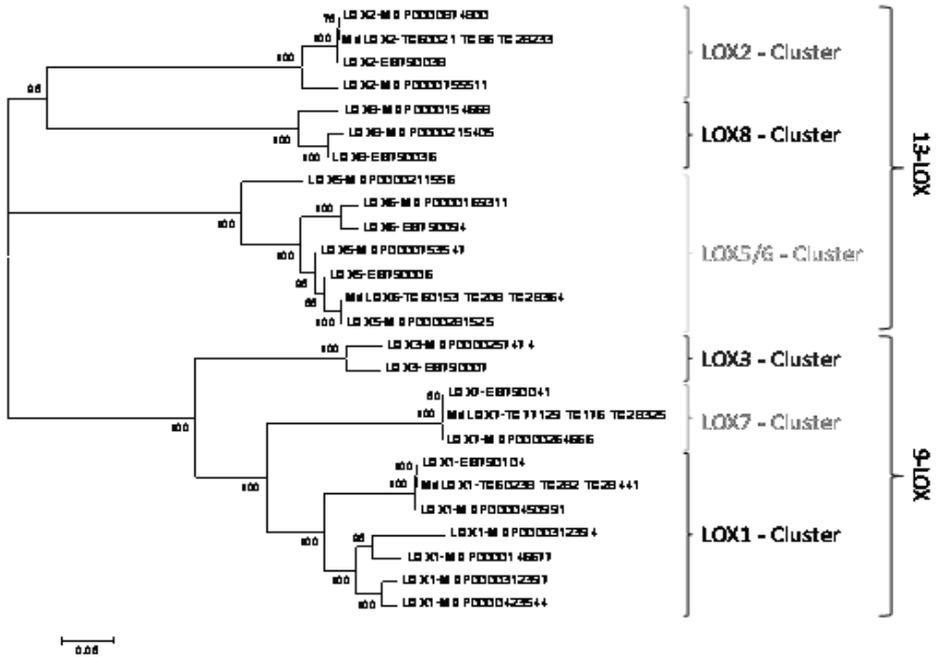


**Abb. 2** Schematische Matrix der Ähnlichkeitswerte in % der ausgewählten Sequenzen. Einbezogen sind die durch BLAST ermittelten LOX-Sequenzen der *Malus*-CDS-Datenbank, sowie die von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten ESTs.

Auch stellen einige der Gene vermutlich verschiedene allelische Varianten dar, die durch spezifische SNPs (SNP, *single nucleotide polymorphism*) gekennzeichnet werden können. Alle dargestellten Sequenzen gehören mit mehr als 50% Ähnlichkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit in die gleiche Genfamilie.

Lipoxygenasen bilden aus Linol- und Linolensäure Hydroperoxyderivate. Dabei werden die Fettsäuren entweder am C9-Atom oder am C13-Atom durch das Einfügen einer Peroxygruppe oxidiert. Die Enzyme werden folglich als 9-LOX oder 13-LOX bezeichnet (Feussner et al., 2001).

Die Substratspezifität der LOX-Proteine wird maßgeblich durch zwei Aminosäurepositionen in räumlicher Nähe des katalytischen Zentrums bestimmt (Hornung et al., 1999). 9-LOX besitzen an dieser Stelle Threonin, gefolgt von Valin. Bei 13-LOX ist Valin durch die Aminosäuren Phenylalanin oder Histidin ersetzt, deren Seitenketten besonders groß sind. An der vorangehenden Position können Threonin, Serin oder Cystidin stehen.



**Abb. 3** Phylogramm der durch BLAST gefundenen LOX-CDS inklusive der von Schaffer et al. (2007) und Park et al. (2006) identifizierten LOX-ESTs. Der *consensus*-Baum der ausgewählten LOXSequenzen aus *Malus x domestica* Borkh. verdeutlicht die Clusterung der Gengruppen LOX1, LOX3, LOX7 sowie von LOX2, LOX5/6 und LOX8. Die *bootstrap*-Werte für die Knoten sind angegeben. Die Gengruppen LOX1, LOX3 und LOX7 sind aufgrund ihrer Nukleotidsequenz 9-LOX-Mitglieder. Die Gengruppen LOX2, LOX5/6 und LOX8 gehören zur 13-LOX-Gruppe. Die Akzessionsnummern der Sequenzen sind in folgender Nomenklatur angegeben: TC = Tentative Cluster (DFCI apple gene index; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=apple>), ES = NCBI-GenBank-Akzessionsnummer (Schaffer et al., 2007) und MDP-Akzessionen aus CDS-Sequenzdatenbank (Apple Genome v1.0, Velasco et al., 2010).

**Tab. 2** Einordnung der LOX-Gengruppen in die bestehende Klassifikation aufgrund der Aminosäuren an der für die Stereospezifität relevanten Position und des Vorhandenseins eines Chloroplast-Transit-Signalpeptides

Gengruppe	Aminosäuren an Position für Stereospezifität	Vorhandensein eines Chloroplast-Transit-Signalpeptides
9-LOX		
LOX1	TV	Nein
LOX3	TV	Nein
LOX7	II	Nein
13-LOX		
LOX2	CF	Ja
LOX5/6	TF (selten SF/CF)	Ja
LOX8	SY/SF	Ja

Das Vorhandensein eines N-terminal am Protein angehängten Chloroplast-Transit-Signalpeptides ermöglicht eine weitere mögliche Klassifizierung von Lipoxygenasen (Feussner und Wasternack, 2002). Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, besitzen LOX2, LOX5/6 und LOX8 dieses Signalpeptid. LOX1, LOX3 und LOX7 besitzen dieses Peptid nicht.

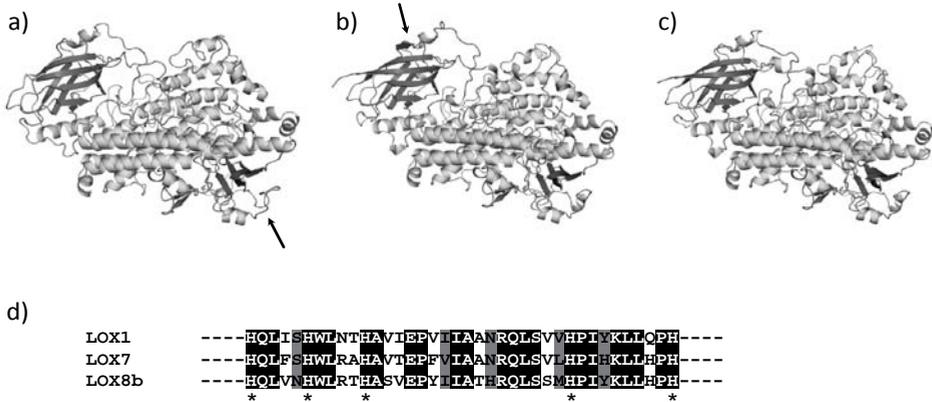
Auf Grundlage der bioinformatischen Sequenzvergleiche wurden zunächst die Gene LOX1 (MDP0000450991), LOX7 (MDP000264666) und LOX8b (MDP0000154668) für eine vollständige Klonierung ausgewählt. Das aus der LOX1-Gruppe ausgewählte Gen ist sehr wahrscheinlich mit jenem LOX-Gen identisch, welches bereits durch Dunemann et al. (2009) als Kandidatengen auf Chromosom 9 kartiert wurde und mit einer Reihe verschiedener QTLs für bedeutsame Fruchtester assoziiert war.

Die publizierten CDS-Sequenzen (MDP, *Malus x domestica* protein, Velasco et al., 2010) waren *in silico* aus genomischen Nukleotidsequenzdaten berechnet worden. Anhand dieser genomischen Sequenzdaten wurden Primer aus der 5'- und der 3'-untranslatierten Region der Gene erstellt. Die Gensequenz wurde durch PCR amplifiziert, das Amplifikat in einen Plasmidvektor kloniert und mit diesem anschließend *E. coli* transformiert. Auf die Präsentation von Nukleotidsequenzen der bereits klonierten und vollständig sequenzierten LOX-Gene LOX1, LOX7 und LOX8b (Gen-Nomenklatur noch vorläufig) wird an dieser Stelle verzichtet.

Ein wesentlicher Nachteil von bioinformatischen Methoden ist, dass Daten durch Computer generiert werden. Zweifellos sind Programme und Algorithmen den Naturgesetzen nachempfunden, allerdings ist deren Wahrheitswert stets kritisch zu betrachten. Die Verfügbarkeit von selbst generierten Sequenzierdaten gibt dem Wissenschaftler die Möglichkeit, Fehlerquellen auszuschließen oder deren Einfluss zu minimieren. Mit vertrauenswürdigen Nukleotidsequenzen können allerdings durch bioinformatische Programme sehr gute und wirklichkeitsnahe Ergebnisse generiert werden. Ein Beispiel dafür ist die Modellierung eines Proteins anhand seiner Aminosäuresequenz mittels des Computers durch eine Strukturvorlage.

In der RCSB protein data bank (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)) existieren Röntgenstrukturdaten zu pflanzlichen LOX-Proteinen. Das den Lipoxygenasen aus Apfel ähnlichste Protein ist Lipoxygenase-3 aus *Glycine max* (Sojabohne). Mithilfe dieser Referenzstruktur wurde durch SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) die wahrscheinliche Proteinstruktur der bereits sequenzierten Gene LOX1, LOX7 und LOX8b berechnet (Abbildung 4). Diese drei haben im Modell eine ähnliche Struktur, die allerdings an einigen Stellen leicht abweicht (siehe Pfeile an Helices rechts unten in Abb. 4a oder Helix links oben in Abbildung 4b). Ein objektiver Wert für diese Abweichungen ist die mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD, root mean square deviation). Dieser Wert wird auch in anderen statistischen Auswertungen genutzt. Die RMSD-Werte zwischen den Modellen und dem Modell und seiner Vorlage sind als Matrix in Tabelle 3 angegeben. Ein Wert von 0 Å entspricht exakter Übereinstimmung, Werte zwischen 1,0 und 3,0 Å werden als entfernte strukturelle Verwandtschaft interpretiert, Werte über 3,0 Å zeigen keine strukturelle Verwandtschaft zueinander. Werte von maximal 0,25 Å weisen die modellierten LOX-Proteine als eng miteinander verwandt aus.

Die Bereiche, die innerhalb des Proteinmodells liegen, sind stärker konserviert. In Abbildung 4d ist dies beispielhaft gezeigt. Abgebildet ist ein aus 38 Aminosäuren bestehendes Motif innerhalb der drei sequenzierten Gene LOX1, LOX7 und LOX8b. Schwarz bzw. grau unterlegt sind Positionen, an denen identische oder ähnliche Aminosäuren stehen. Innerhalb dieser Region liegen fünf konservierte Histidine (\*), die die Bindungsstellen des katalytisch wichtigen Eisenions sind (Steczko et al., 1992). Die hohe Konservierung innerhalb des Proteinmodells lässt vermuten, dass die Enzymaktivität der Genprodukte nicht eingeschränkt ist. Die Abweichungen an der Oberfläche von Proteinen müssen keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität haben.



**Abb. 4** Modelle der Genprodukte von LOX1 (a), LOX7(b) und LOX8b (c). Weithin abgebildet ist das in allen bekannten LOX-Proteinen stark konservierte Motiv von 38 Aminosäuren Länge (d). Die \* geben die für die Komplexierung des Eisen-Ions wichtigen Histidine an. Die Modelle wurden durch SWISS-MODEL errechnet. Als Vorlagen wurden die Strukturen lik3 (LOX1) und lno3 (LOX7, LOX8b) verwendet. Schwarz unterlegt sind gleiche Aminosäuren an der jeweiligen Position, grau unterlegt sind Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften.

**Tab. 3** Matrix von RMSD-Werten in Ångström der errechneten LOX-Proteinmodelle zueinander und zu deren jeweiliger Modellvorlage.

	LOX1	LOX7	LOX8b	Modellvorlage
LOX1	-	0,247	0,238	0,070
LOX7		-	0,039	0,086
LOX8b			-	0,086

**Ausblick**

Die dargestellten Ergebnisse stellen eine Momentaufnahme des im Juli 2010 begonnenen Forschungsprojektes dar. Daher können die präsentierten vorläufigen Ergebnisse nur einen Ausschnitt aus der Gesamthematik des Vorhabens demonstrieren.

Weitere Untersuchungen zur möglichst vollständigen Erfassung der Lipoxygenase-Genfamilie in *Malus x domestica* werden u. a. auch die Anwendung eines mit Hidden-Markov-Modellen arbeitenden Programms für Analysen der Golden Delicious-Sequenzdaten-bank einbeziehen. Weiterhin sollen Transkriptionsanalysen der identifizierten Gene und beim Projektpartner in München Untersuchungen zur heterologen Expression und Charakterisierung der LOX-Proteine folgen. Erst danach kann abgeschätzt werden, welche grundsätzlichen neuen Erkenntnisse und praktischen Anwendungen sich aus den Ergebnissen ableiten lassen. Eine mögliche Anwendung könnte die Entwicklung und von funktionalen LOX-Genmarkern auf SNP-Basis sein. Ein solches Markersystem könnte den Züchtungsfortschritt bei der erwünschten Kombination von Resistenz- und Fruchtqualitäts-eigenschaften erheblich effizienter gestalten.

Danksagung: Die beschriebene Arbeit wird gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Projekts DU180/5-1.

## Literatur

- Altisent, R, G. Echeverria, J. Graell, L. Lopez, I. Lara. (2009): Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of „Fuji“ apple. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4305-4312
- Arnold K., L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, 2006: The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.
- Dunemann, F., D. Ulrich, A. Boudichevs kaia, C. Grafe, W.E. Weber. (2009): QTL mapping of aroma compounds analyzed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Mol. Breeding* **23** (3), 501-521
- Edgar, R.C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32** (5), 1792-1797
- Feussner, I., H. Kühn , C. Wasternack. (2001): Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* **6** (6), 268-273
- Feussner, I., C. Wasternack. (2002): The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 275-297
- Hornung, E., M. Walther, H. Kühn, I. Feussner. (1999): Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (7), 4192-4197
- Larkin, MA, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez *et al.* (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** (21), 2947-2948
- Park, S., N. Sugimoto, M.D. Larson, R. Beaudry, S. Van Nocker. (2006): Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol.* **141** (3), 811-824
- Schaffer, R. J., E. N. Friel, E. J. F. Souleyre, K. Bolitho, K. Thodey, S. Ledger, J. H. Bowen, J. H. Ma, B. Nain, D. Cohen *et al.* (2007): A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* **144** (4), 1899-1912
- Schrödinger, L. L. C. ( 2010): The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Schwab, W., R. Davidovich-Rikanati., E. Lewinsohn. (2008): Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **54** (4), 712-732
- Steczko, J., G. P. Donoho, J. C. Clemens, J. E. Dixon and B. Axelrod. (1992): Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* **31** (16), 4053-4057
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. (2007): MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24** (8), 1596-1599
- Velasco, R., A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S. K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss *et al.* (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.), *Nat. Genet.* **42** (10), 833-839

## **Etablierung eines neuen Hybridsystems zur Züchtung von Möhren mit spezifischer Anbaueignung unter Trocken- und Salzstressbedingungen in Zentralasien**

Establishment of a new hybrid system for carrot breeding with enhanced drought and salt stress tolerance in Central Asia

Rode, A.<sup>1</sup>, Nothnagel, T.<sup>1</sup>, Kampe, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Erwin-Bauer-Str. 27, 06484 Quedlinburg

<sup>2</sup> satimex QUEDLINBURG Züchtersaaten GmbH, Groß Orden 19, 06484 Quedlinburg

Kontakt: A. Rode [andrea.rode@jki.bund.de](mailto:andrea.rode@jki.bund.de); E. Kampe [zucht@satimex.de](mailto:zucht@satimex.de)

### **Zusammenfassung**

Die Züchtung neuer Möhrenhybriden mit verbesserter Trocken- und Salzstresstoleranz kann einen nachhaltigen Beitrag zur Steigerung der Anbaufläche, höhere Ertragsstabilität und eine wesentliche Qualitätsverbesserung des Erntegutes leisten. Ziel des Projektes ist es ein neues Hybridsystem zu etablieren und geeignete Hybridpartner auf der Basis wissenschaftlicher Evaluierungsdaten zu selektieren. Zur Evaluation und Selektion von trocken- und salzstresstoleranten Möhren-Genotypen wurde ein Prüfverfahren in Topfkultur unter Klimakammerbedingungen entwickelt. Die Ergebnisse der ersten Versuche sollen vorgestellt werden.

Stichwörter: Möhren, Hybridsystem, Trocken- und Salzstresstoleranz

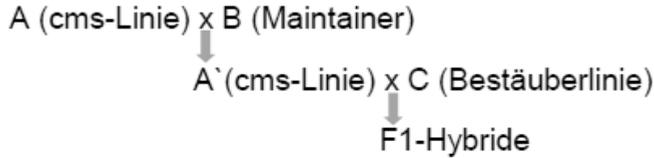
### **Abstract**

Plant breeding of a new carrot hybrid with an enhanced drought and salt stress tolerance may lead to a sustained increase the global carrot production, stabilization of yield and quality. It is the goal to establish a new hybrid system and to select suitable hybrid partners based on scientific evaluation. A laboratory test (climate chamber) was developed to evaluate and select carrot cultivars with salt stress tolerance. The results of the first experiments will be presented.

Keywords: carrot, hybrid, drought tolerance, salt stress tolerance

### **Einleitung und Zielsetzung**

Der kommerzielle Möhrenanbau weltweit nutzt weitgehend F<sub>1</sub>-Hybridsorten. Die entwickelten Hybridsorten beruhen alle auf der Bestäubungslenkung durch die cytoplasmatisch männliche Sterilität (cms). Nach intensiver Züchtungsforschung in den 1950-60er Jahren, nutzt die praktische Züchtung heute zwei cms-Systeme - zu einem das „*brown anther*“ System (cms<sup>b.a.</sup>), bei dem das sterilitätbedingende Cytoplasma aus verschiedenen Kulturmöhrensorten (*Daucus carota* ssp. *sativus*) selektiert wurde, sowie das „*petaloide*“ cms-System (cms<sup>pet</sup>), bei dem das Cytoplasma der Wildform *Daucus carota* ssp. *carota* verwendet wird. Bereits in den 1990iger Jahren konnten im Rahmen eines Evaluierungs-projektes in mehreren Wildformen der Möhre männlich sterile Pflanzen identifiziert werden. Durch ihre Selektion und wiederholte Rückkreuzung konnten weitere alloplasmatische cms-Linien entwickelt werden (Nothnagel et al. 2000). Zwei der alloplasmatischen cms- Systeme basierend auf den Cytoplasmen der Wildform *D.c. maritimus* (cms<sup>mar</sup>) und *D.c. gadecaei* (cms<sup>gad</sup>) sind nach dem bisherigen Kenntnisstand für die Herstellung neuer Hybridsorten geeignet. Im Rahmen des AIF-Projektes (Projektbeginn: 07.01.2010) werden zunächst potentielle Hybrideltern, die cms-Linie (A), Maintainer (B) und Bestäuber (C) evaluiert und vermehrt (Abbildung 1).



**Abb. 1** Zuchtschema F1-Hybridzüchtung von Möhren

Dazu werden blütenbiologische, histologische, agronomische und molekularbiologische Daten erfasst und beurteilt. Die Selektion stabiler cms-Linien (A') sowie die Abschätzung der allgemeinen und der spezifischen Kombinationseignung der zur Verfügung stehenden Kreuzungspartner sind Evaluierungsschwerpunkte. Trocken- und Salzstress sind weltweit wichtige ertragseinschränkende Faktoren in der Pflanzenproduktion (Zörb, 2006). Die Versalzung des Bodens wird von der Konzentration und der Zusammensetzung der Salze bestimmt. Zu den dominierenden Ionen zählen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und sieben weitere. Diese Ionen sind in der Bodenlösung unterschiedlich löslich und pflanzenverfügbar. Von der Bewässerungsfläche des zentralasiatischen Bodens sind bereits mehr als 50 % von Versalzung betroffen (Shirokova et al., 2000). Laut Literaturangaben wird die Möhre als eine salzempfindliche Kultur beschrieben (Maas und Hoffmann, 1977). Ziel des ersten Projektjahres war die Methodenentwicklung zur Evaluierung der Salzstresstoleranz bei Möhren.

### Material und Methode

Zur Entwicklung des neuen Hybridsystems wurde zunächst eine Vorauswahl aus dem gesamten Möhrenzuchtmaterial der Firma satimex<sup>2</sup> getroffen. Die Selektion erfolgte hauptsächlich nach der Wurzelform (Chantenay Typ), der Wurzelfarbe (orange) und nach dem Ertragspotential. Von diesem satimex-Zuchtmaterial wurden 55 Genotypen als potentielle B- und C-Linien ausgewählt und in Topfkultur unter Gewächshausbedingungen (20 °C – 24 °C) kultiviert. Die potentiellen cms-Linien (A) und die bereits vorhandenen Maintainer (B) des JKI-Sortiments wurden vorselektiert und ebenfalls in Topfkultur angezogen (100 d). Alle Pflanzen wurden geerntet und nach Wurzelmerkmalen (Wurzelform, Wurzelfarbe) beurteilt. Für selektierte Einzelpflanzen folgte zur Induktion der generativen Entwicklungsphase eine Vernalisation (90 d, 5 – 6 °C) in der Klimakammer. In der generativen Phase wurden insgesamt 10 morphologische Boniturgrößen von allen Pflanzen erfasst. An jedem Genotyp der potentiellen cms-Linien (A) erfolgten blütenbiologische Untersuchungen. Mit ausgewählten Einzelpflanzen wurden im ersten Projektjahr manuelle Testkreuzungen vorgenommen.

Für eine Assoziationsstudie wurde eine Kollektion von insgesamt 125 Möhrenherkünften zusammengestellt. Sie umfasst die o.g. cms-Linien (A), Maintainer (B) der JKI-Kollektion sowie 55 potentiellen Bestäuber (C) aus dem satimex-Sortiment und Genotypen (C) aus der JKI-Genbanksammlung. Bei dem Material aus Genbanken handelt es sich um Genotypen aus insgesamt 19 Ländern. Diese Genotypen wurden im Gewächshaus angezogen und zu definierten ontogenetischen Stadien evaluiert. Weiterhin wurde Blattmaterial zur Identifikation von flüchtigen Inhaltsstoffen (volatiles) und Wurzelmaterial zur Analyse von nicht flüchtigen Inhaltsstoffen (non volatiles) entnommen. In der weiteren Projektplanung wird das Material auf Resistenz gegen *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina* getestet. Zur molekularen Charakterisierung der ausgewählten Möhrenlinien wurde nach der Methode von Roger und Bendich (1985) DNA aus Blattmaterial isoliert. Mit dieser DNA wird zur Abschätzung der genetischen Distanz eine genomweite Genotypisierung mit DArT-Markern (Diversity Arrays Technology Pty Ltd, Australien) vorgenommen.

Im ersten Projektjahr konnten methodische Vorversuche zur Evaluierung von Toleranz gegen Salzstress unter Klimakammerbedingungen mit Möhren durchgeführt werden. Auch Untersuchungen zur Keimfähigkeit von Möhrensamen in Salzmedium, Substratversuche (Perlit, Sand) und Vorversuche zur Länge des Stresszeitraums wurden durchgeführt (nicht dargestellt). Für alle Vorversuche sind einheitlich zwei Möhrensorten ausgewählt worden, eine moderne Hybridsorte (HS) und eine samenechte Zuchtlinie aus dem satimex-Sortiment (SAT-Linie). Innerhalb der zwei Versuche wurden die Salzkonzentrationen und der Beginn der Salzapplikation variiert. Eine Übersicht der gewählten Versuchsparameter zur Evaluierung der Salzstresstoleranz der zwei Vorversuche ist in Tab. 1 ersichtlich. Die varianzanalytische Auswertung mittels ANOVA und t-Test (LSD bei  $P \leq 0,01$ ) erfolgte mit dem Programm Systat 9 (Wilkinson, 1998).

## Ergebnisse

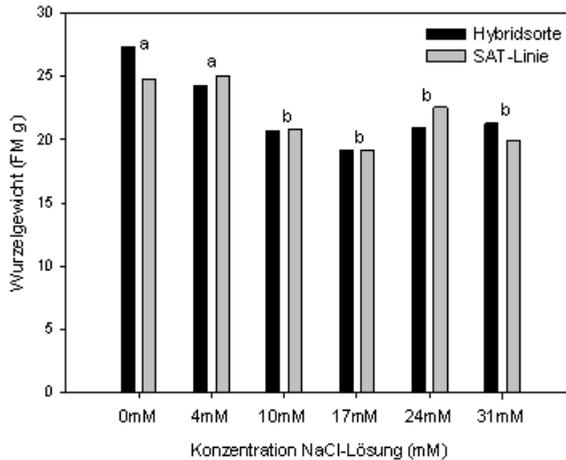
Zur Selektion geeigneter cms-Genotypen und Maintainer wurden 113 Pflanzen beurteilt (zehn Merkmale: Pflanzengröße, Wuchstyp, Blattfarbe, Doldenform, Blütenvorkommen, Blütenfarbe, Blühbeginn, Blühende, Erntedatum, Seneszenz). Mit dem selektierten Material wurden im Zeitraum des ersten Projektjahres 156 Testkreuzungen vorgenommen. Davon wurden zwölf Kreuzungen im Grundbeet ausgesät. Die abschließende Beurteilung dieser Testkreuzungen erfolgt nach der Vernalisation in der generativen Phase.

**Tab. 1** Übersicht der Versuchsparameter der Methodenentwicklung zur Evaluierung der Salzstresstoleranz der ersten zwei Vorversuche in der Klimakammer

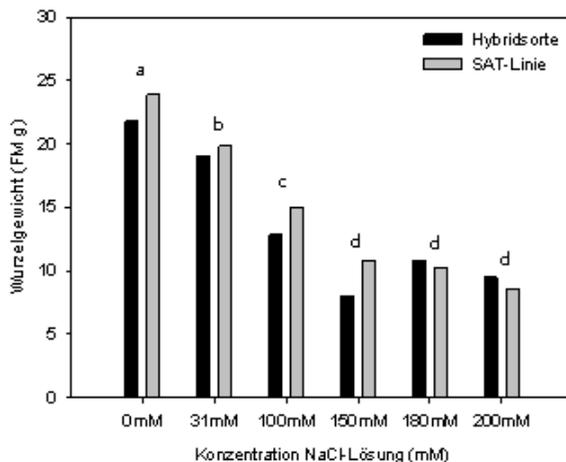
1. Vorversuch	2. Vorversuch
Klimakammer-Regime: 20 °C Tag/16 h, 15 °C Nacht/8 h, 60 % LF 15 Lux Einstrahlung 18x18 cm Töpfe; pro Variante/Genotyp n = 5, 10 Pflanzen pro Topf Gießzeitpunkt Mo./Mi.: 250 ml, Fr.: 300 ml	
Anzucht 68 Tage	Anzucht 46 Tage
Salzapplikation ab 68. Tag	Salzapplikation ab 47. Tag
Varianten Salzapplikation (NaCl):	Varianten Salzapplikation (NaCl):
0 mM	0 mM
4 mM	31 mM
10 mM	100 mM
17 mM	150 mM
24 mM	180 mM
31 mM	200 mM
Ernte am 110. Tag nach Aussaat	Ernte am 110. Tag nach Aussaat

Nach Auswertung der flüchtigen Inhaltsstoffe in Blatt und Wurzel, sowie den Ergebnissen der geplanten Resistenzversuche Mitte 2011 und der Auswertung aller agronomischen Daten können die ausgewählten 125 Möhrenlinien bewertet werden. Aus diesem Sortiment werden potentielle Hybridpartner basierend auf den Ergebnissen der Assoziationsstudie nach ihrer maximalen genetischen Distanz ausgewählt.

Für die Vorversuche zur Salzstresstoleranz wurde ein einheitliches Klimakammerregime gewählt (Tabelle 1). Die NaCl-Konzentrationen (4 - 31 mM) wurden im ersten Vorversuch noch moderat gewählt. Die Pflanzen wurden bis zum 66. Tag nach der Aussaat optimal mit Wasser versorgt. Im Anschluss wurden sie bis zur Ernte in definierter Höhe mit unterschiedlich hohen Salzkonzentrationen gegossen. In der Abbildung 2 ist exemplarisch der Einfluss der Salzapplikation auf das agronomische Merkmal (Wurzelgewicht FM in g) dargestellt. Dagegen hatten die Behandlungsstufen 10, 17, 24 und 31 mM im Vergleich zur Kontrolle und zur Variante mit 4 mM einen signifikanten Einfluss auf das Wurzelgewicht (Abbildung 2).



**Abb. 2** Einfluss der Salzapplikationsvarianten 0 - 31 mM NaCl-Lösung auf das Wurzelgewicht ( $n = 100$ ) der Hybridsorte und der satimex-Linie im ersten Vorversuch in der Klimakammer; Mittelwerte; signifikante Unterschiede sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet ( $P \leq 0,01$  LSD)



**Abb. 3:** Einfluss der Salzapplikationsvarianten 0 - 200 mM NaCl auf das Wurzelgewicht ( $n = 100$ ) der Hybridsorte und der satimex-Linie im zweiten Vorversuch in der Klimakammer; Mittelwerte; signifikante Unterschiede sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet ( $P \leq 0,01$  LSD)

Die Varianten 10, 17, 24, 31 mM waren untereinander nicht signifikant verschieden. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (HS, SAT-Linie) bezogen auf die Behandlungsstufen. Im zweiten Vorversuch wurden deutlich höhere Salzkonzentrationen gewählt (Abbildung 3). Der Beginn der Salzapplikation wurde im zweiten Versuch 21 Tage früher als im ersten Versuch gewählt.

Wie die Abbildung 3 verdeutlicht, ist ein hoch signifikanter Effekt der Salzapplikation bezogen auf das Wurzelgewicht (FM g) zu erkennen. So sind die drei Varianten mit 150, 180, 200 mM signifikant verschieden zu den Varianten mit 0, 31, 100 mM NaCl-Salzapplikation. Auch hier waren zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Beide Versuche wurden nach 110 Tagen geerntet.

## Diskussion

Seit den 1990iger Jahren dominieren Hybridsorten mit dem „*brown anther*“ System (cms<sup>b,a</sup>) sowie dem „*petaloide*“ cms-System (cms<sup>pet</sup>) den Weltmarkt. Eine neue cms-Quelle erweitert die genetische Basis und wirkt dem allgemeinen Trend der genetischen Erosion entgegen. Durch die langjährige Forschungsarbeit im Julius Kühn-Institut konnten schon früh männlich sterile Pflanzen selektiert und mit der Kulturmöhre rückgekreuzt werden (BC<sub>5</sub>–BC<sub>9</sub>). Damit entspricht der Phänotyp der entwickelten Linie wieder weitgehend dem der Kulturmöhre. Im Rahmen der Projektarbeit wurden die ersten Testhybriden erstellt. Die Stabilität der cms-Linien, der Maintainer und der potentiellen Hybridpartner werden umfangreich untersucht und bewertet. Die umfassende Bewertung der Testkreuzungen ist erst Mitte 2011 möglich. Auch wenn bisher noch keine Aussagen zur genetischen Kompatibilität und Leistungsfähigkeit der neuen cms-Quellen mit dem Möhren-Genpool von satimex möglich sind, so sind die ersten Ergebnisse sehr vielversprechend.

Ziel der Methodenentwicklung war es, morphologisch und pflanzenbaulich relevante Salzstressreaktionen der Möhre zu erfassen. Innerhalb des ersten Vorversuches (Salzkonzentration: 4, 10, 17, 24, 31 mM NaCl) wurden zwar signifikante Effekte der Salzapplikation auf das Wurzelgewicht nachgewiesen, jedoch scheinen die Effekte für ein effektives Screeningverfahren nicht ausreichend zu sein. Deshalb wurden die Salzkonzentrationen im zweiten Vorversuch (0, 31, 100, 150, 180, 200 mM) deutlich erhöht. Eine Ertragsreduktion von über 50 % in der höchsten Salzapplikationsstufe von 200 mM zur Kontrolle mit 0 mM ist nachweisbar. Die Variante 100 mM zeigte eine deutliche Signifikanz, welche für Selektionszwecke vermutlich ausreichend ist. Die beiden Genotypen (HS, SAT-Linie) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Im zweiten Versuch wurde deutlich früher (ab dem 47. Tag) mit der Applikation der Salzlösung begonnen, damit sollte der Einfluss des Applikationsbeginns auf das Wurzelgewicht überprüft werden. Vergleicht man die Varianten mit 31 mM sind in beiden Vorversuchen die Wurzelgewichte ähnlich. In weiteren Versuchen wird der Einfluss des Stresszeitraumes weiter untersucht werden. Da Salzstresstoleranz ein komplexes Merkmal ist sind weitere Untersuchungen zur Verifizierung der bisherigen eigenen Ergebnisse nötig und geplant. Erst nach Abschluss der Vorversuche kann die Effizienz der verschiedenen Methoden bewertet werden. Nachfolgend sollen hieraus artspezifische Toleranzparameter zur Bewertung der Genotypen entwickelt werden. Mit der nach abschließender Versuchsauswertung favorisierten Methode sollen 2011 die potentiellen Hybridpartner (Assoziationsstudie) hinsichtlich ihrer Salzstresstoleranz evaluiert werden. Innerhalb der Projektplanung ist weiterhin eine Methodenentwicklung zur Trockentoleranz der Möhre geplant.

**Danksagung:** Die Autoren danken der AIF für die Förderung des FuE-Projektes (ZIM-KOOP: 2241302MD9)

## Literatur

- Maas, E.V., Hoffmann, G.J. (1977): Crop salt tolerance – current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division, American Society of Civil Engineers **103**, 115-134
- Notnagel, T., Straka, P., Linke, B. (2000): Male sterility in populations of *Daucus* and the development of alloplasmic male-sterile lines of carrot. Plant Breeding **119**, 145-152
- Roger, S.O.; Bendich, A.J. (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant-tissues. Plant Mol. Biol. **5**: 69-76
- Skiroikova, Y., Forkutsa, I., Shara Futdinova, N. (2000): Use of electrical conductivity instead of soluble salts for soil salinity monitoring in Central Asia. Irrigation and Drainage Systems **14**, 199-205
- Zörb, C. (2006): Physiologische Strategien zur Entwicklung salzresistenter Mais- und Weizensorten. Habilitationsschrift Justus-Liebig-Universität Giessen, 1
- Wilkinson, L. (1998): Systat 9.0 for Windows. Statistics SPSS Inc., Chicago.

## Molekulare Verwandtschaftsanalyse von *Gaultheria*-Arten

Molecular distance analysis for *Gaultheria* species

Lehmann, C.<sup>1</sup>, Nehrlich, S.<sup>1,2</sup>, Budahn, H.<sup>1</sup>, Plaschil, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen,  
Institut für Züchtungsforschung an gartenbauliche Kulturen und Obst,  
Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg

<sup>2</sup>IPK-Genbank, Außenstelle Nord, Inselstraße 9, 23999 Insel Poel

Kontakt: Claudia.Lehmann@jki.bund.de

### Zusammenfassung

Das in Nordamerika beheimatete amerikanische Wintergrün (*Gaultheria procumbens* L.) wird auf Grund der auffälligen roten Scheinbeeren, der immergrünen Blätter und der guten Winterhärte als Herbstpflanzung in Deutschland immer beliebter. Seine Anfälligkeit gegenüber dem Pilz *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) erschwert jedoch zunehmend den Anbau. Nach der Resistenzevaluierung von *Gaultheria*-Arten soll durch Artkreuzung Resistenz oder Toleranz gegenüber *C. gloeosporioides* auf *Gaultheria procumbens* übertragen werden. Die Chance auf eine erfolgreiche Artkreuzung sinkt mit steigender genetischer Distanz drastisch. Deshalb sollen mit einer molekularen Distanzanalyse relativ eng verwandte *Gaultheria*-Wildarten ermittelt werden.

Stichwörter: *Gaultheria procumbens* L., *Colletotrichum gloeosporioides*, Distanzanalyse

### Abstract

*Gaultheria procumbens* L. originating from northern America is more and more popular on the German market because of its red berry-like fruits, its evergreen leaves and its good winter hardiness. Its great susceptibility for *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) made it more complicated in the last years to cultivate it in Germany. After an evaluation of resistance, the aim is to cross a wild species with *Gaultheria procumbens* to get a resistant cultivar. The chance for successful crosses between different species decreases with increased genetic distance. Therefore molecular distance analysis was made to identify wild species with relatively close relation to *Gaultheria procumbens*.

Keywords: *Gaultheria procumbens* L., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), distance analysis

### Einleitung und Zielsetzung

In Deutschland wachsen Bekanntheitsgrad und Beliebtheit von *Gaultheria procumbens*. Ein ernstes Problem ist jedoch die hohe Anfälligkeit gegen den Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*. Dieser verursacht das Absterben von Trieben, Verbräunungen sowie schwarze Läsionen am Stängelgrund. Der Pilz kann alle Altersstadien der Pflanze befallen. Besonders in Jungpflanzenbetrieben ist der Pilz deshalb ein großes Problem. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zeigt nur mäßigen Erfolg. Außerdem werden immer mehr Pflanzenschutzmittel vom Markt genommen. Deshalb besteht aus ökologischer und ökonomischer Sicht ein großer Bedarf für die Entwicklung *Colletotrichum*-resistenter *Gaultheria*-Arten. In der Sammlung von Wildarten und Kulturformen der Gattung *Gaultheria*, die im JKI gegenwärtig untersucht wird, fallen z.T. erhebliche morphologische Unterschiede auf. Das Material wird momentan auf seine Resistenzeigenschaften gegenüber dem Pathogen getestet.

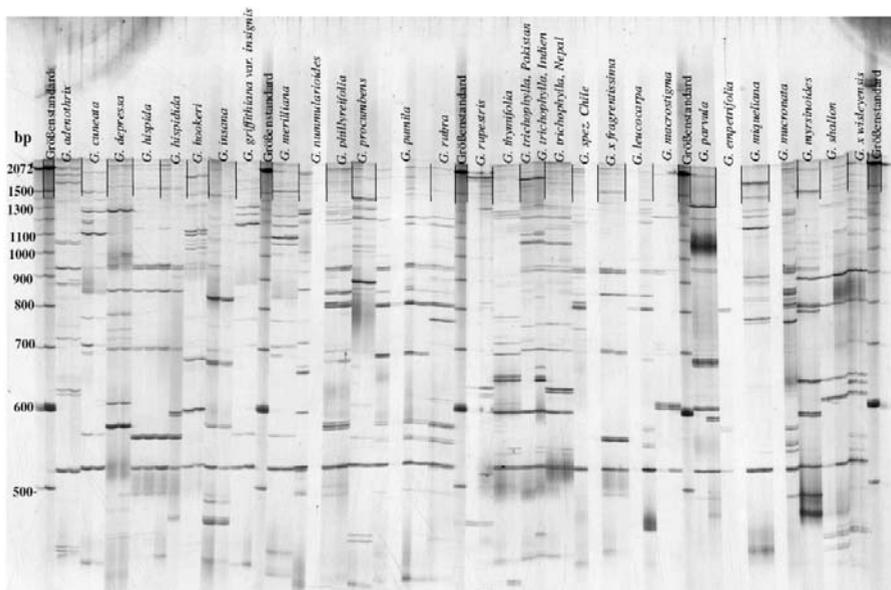
Bei weit voneinander entfernten Arten einer Gattung sind mit größerer Wahrscheinlichkeit ernsthafte Kreuzungsbarrieren zu erwarten. Deshalb sollte parallel zur Resistenzbonitur schon eine vergleichende Distanzanalyse mit molekularen Markern durchgeführt werden um geeignete Kreuzungspartner für *Gaultheria procumbens* zu identifizieren.

## Material und Methoden

Von 28 verschiedenen *Gaultheria*-Arten wurde jeweils an 2 Pflanzen frisches, vom Pathogen nicht befallenes Blattmaterial entnommen. Für die DNA-Isolation kam eine leicht modifizierte CTAB-Methode nach Rogers und Bendich (1985) zum Einsatz. Die isolierte DNA wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel visuell beurteilt, spektrophotometrisch quantifiziert und auf eine Konzentration von 8 ng/μl verdünnt.

Es wurde eine Variante der RAPD-Analyse angewandt, die Doppelprimer (dp)RAPD-Analyse, wie von Budahn et al. (2008) beschrieben. Durch die Kombination von jeweils 2 Dekamerprimern können auf einem Gel mehr Fragmente analysiert werden, die dazu noch in einem günstigeren Längenbereich (kleinere Amplifikate) liegen. Die verwendeten Dekamerprimer waren:

OPA 07 5'-GAAACGGGTG-3'+ OPA 08 5'-GTGACGTAGG-3'  
 OPA 09 5'-GGGTAACGCC-3'+ OPA 10 5'-GTGATCGCAG-3'  
 OPA 17 5'-GACCGTTGT-3'+ OPA 18 5'-AGGTGACCGT-3'  
 OPB 01 5'-GTTTCGCTCC-3'+ OPB 02 5'-TGATCCCTGG-3'  
 OPB 05 5'-TGCGCCCTTC-3'+ OPB 06 5'-TGCTCTGCCC-3'  
 OPB 07 5'-GGTGACGCAG-3'+ OPB 08 5'-GTCCACACGG-3'  
 OPB 09 5'-TGGGGGACTC-3'+ OPB 10 5'-CTGCTGGGAC-3'  
 OPB 11 5'-GTAGACCCGT-3'+ OPB 12 5'-CCTTGACGCA-3'



**Abb. 1** Elektrophoretische Auftrennung der dpRAPD-Amplifikation OPA 17 + OPA 18 von 28 *Gaultheria*-Arten (jeweils Doppelbestimmung)

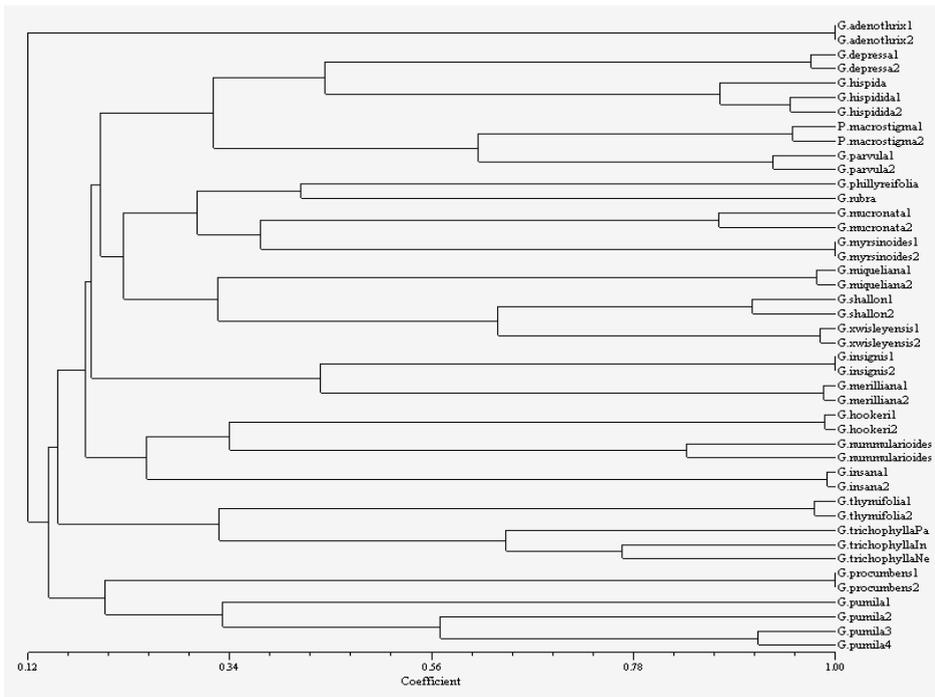
Die Amplifikate wurden mit dem gleichen Volumen Probenladepuffer versetzt, denaturiert, auf ein 4 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel (SequigenGT, Bio-Rad, 50 cm Trennstrecke) geladen, für zwei Stunden bei 50 °C und 100 W aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Größenmarker wurde die 100 bp ladder der Firma Invitrogen verwendet.

Von den ursprünglich 28 verwendeten *Gaultheria*-Arten konnten sechs Arten nicht in der Distanzanalyse berücksichtigt werden, da nach PCR dieser Proben zu häufig keine Amplifikate vorhanden waren.

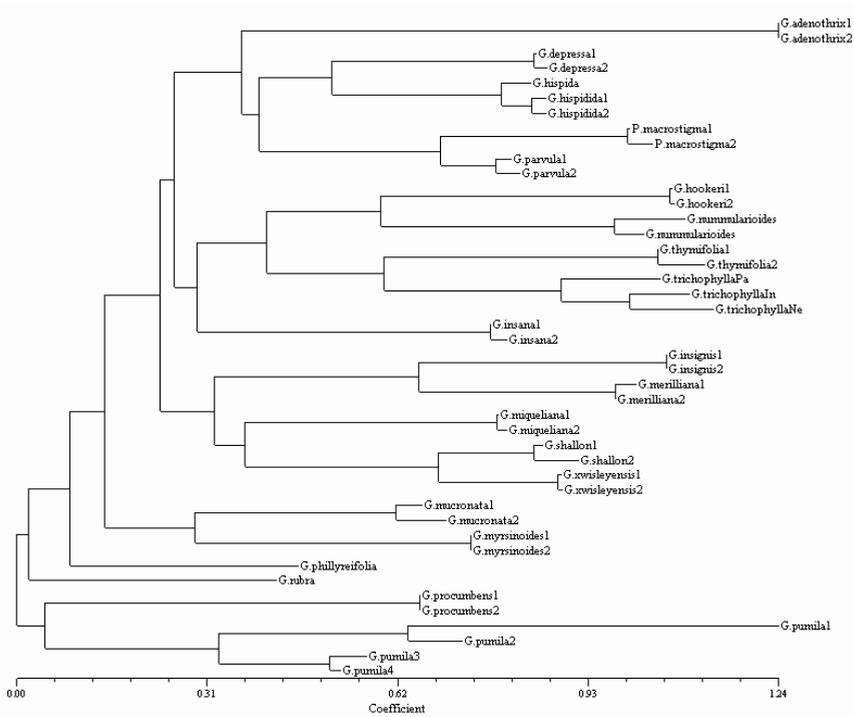
### Ergebnisse

Für die Distanzanalyse wurden ausschließlich freiliegende und starke Banden verwendet. Auf den acht PAA-Gelen wurden 596 Banden identifiziert und ausgewertet, die diesen Anforderungen entsprachen (Abbildung 1).

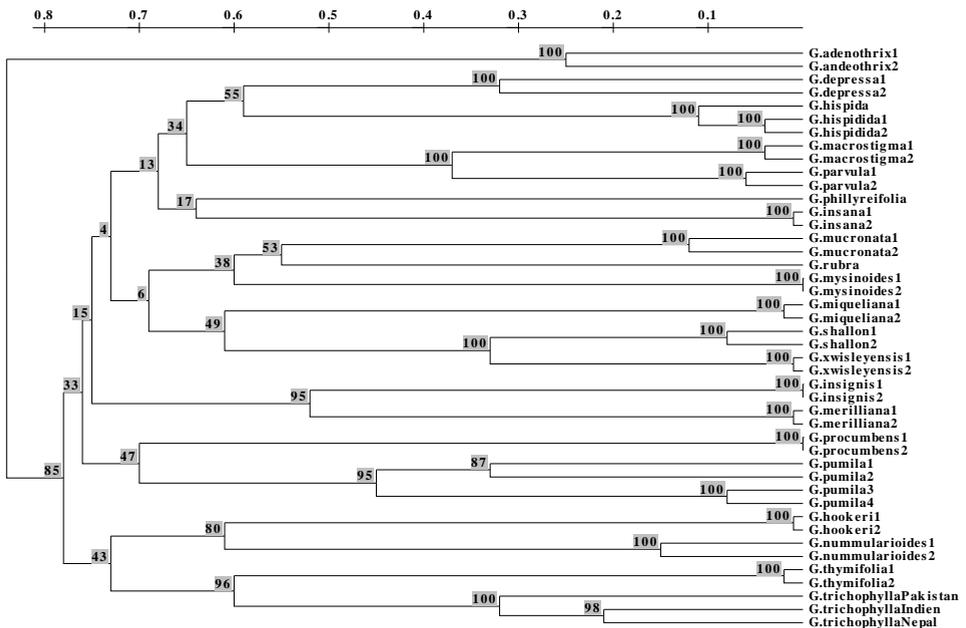
Diese wurden in einer 1/0-Matrix erfasst und mit dem NTSYSpc Programm Version 2.2 und dem Treecon 1.3b Programm ausgewertet. Die Verrechnung mit NTSYSpc erfolgte mit der Sequential Agglomerative Hierarchical Nested cluster analysis (SAHN-Methode) (Abbildung 2) und mit der Neighbor Joining (NJ)-Methode (Abbildung 3). Mittels Treecon 1.3b Programm wurde ein Dendrogramm erstellt (Abbildung 4). In den Abbildungen 2 und 3 wird die Ähnlichkeit angegeben, das heißt, hohe Werte bedeuten eine große Ähnlichkeit. In Abbildung 4 wird eine Distanz angegeben, das heißt niedrige Werte bedeuten eine große Ähnlichkeit. Die beiden Proben einer Art sind in aller Regel sehr ähnlich. Einige Arten zeigen in allen drei Dendrogrammen eine erhöhte Ähnlichkeit zueinander auf, was auf eine nahe Verwandtschaft schließen lässt. Diese sind als konsistente Gruppen (Tabelle 1) aufgelistet.



**Abb. 2** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach der SAHN Methode im NTSYSpc Programm



**Abb. 3** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach der NJ Methode im NTSYSpc Programm



**Abb. 4** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach dem Treecon 1.3b Programm

**Tab. 1** Konsistente Gruppen von *Gaultheria*-Arten ermittelt aus den Distanzanalysen

Gruppennummer	<i>Gaultheria</i> -Arten
1	<i>G. hispida</i> , <i>G. hispidida</i> , <i>G. depressa</i> , <i>G. macrostigma</i> , <i>G. parvula</i>
2	<i>G. miqueliana</i> , <i>G. x wisleyensis</i> , <i>G. shallon</i>
3	<i>G. griffithiana</i> var. <i>insignis</i> , <i>G. merilliana</i>
4	<i>G. procumbens</i> , <i>G. pumila</i>
5	<i>G. nummularioides</i> , <i>G. hookeri</i>
6	<i>G. trichophylla</i> Pakistan, <i>G. trichophylla</i> Indien, <i>G. trichophylla</i> Nepal, <i>G. thymifolia</i>
7	<i>G. mucronata</i> , <i>G. myrsinoides</i>

## Diskussion

Die beiden Pflanzen jeder *Gaultheria*-Art weisen eine hohe Übereinstimmung auf. Dagegen ist anhand der Ähnlichkeits-Koeffizienten deutlich zu erkennen, dass die genetische Entfernung der Arten zueinander relativ hoch ist. Damit sind Schwierigkeiten bei einem angestrebten Artkreuzungsprogramm zu erwarten. Bei einer möglichen Wiederholung des Experimentes sollten weitere Akzessionen innerhalb *Gaultheria procumbens* mit einbezogen werden um die große Distanz zu den Wildarten bewerten zu können.

Als genetisch am engsten verwandte Art zu *Gaultheria procumbens* konnte *Gaultheria pumila* ermittelt werden. Diese wurde in allen verwendeten Rechenmodellen als am engsten verwandte Art ermittelt und wäre demnach ein geeigneter Kreuzungspartner. Ergebnisse zu Resistenz/Anfälligkeit von *Gaultheria pumila* gegenüber dem Pathogen liegen noch nicht vor. Für eine detaillierte Abstufung der Verwandtschaftsverhältnisse zu anderen *Gaultheria*-Arten müssten Untersuchungen mit bedeutend mehr Markern durchgeführt werden.

Danksagung: Die vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse sind Teil des Kooperationsprojektes „Erschließung neuer Resistenzquellen in der Gattung *Gaultheria* gegen den Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*“ (FK22814101506) gefördert durch das BMELV innerhalb der Innovationsförderung (Projekträger BLE) in Zusammenarbeit mit der Gartenbau Holz GbR, Weeze.

## Literatur

Budahn, H., O. Schrader, H. Peterka (2008):  
Development of a complete set of disomic  
rape-radish chromosome addition lines.  
*Euphytica* **162**, 117-128.

Rogers, S. O., A. J. Bendich. (1985): Extraction  
of DNA from milligram amounts of fresh,  
herbarium and mummified plant-tissues.  
*Plant Mol. Biol.* **5**, 69-76.

## **Auftreten von *Plasmodiophora brassicae* als Erreger der Kohlhernie im Winterrapsanbau in Europa sowie Identifizierung, Charakterisierung und molekulare Kartierung neuer Kohlhernieresistenzgene aus genetischen Ressourcen**

European monitoring of *Plasmodiophora brassicae* as the causal agent of clubroot disease in oilseed rape and phenotyping and molecular mapping of new resistance genes derived from genetic resources

Lüders, W.<sup>1</sup>, Abel, S.<sup>1</sup>, Friedt, W.<sup>2</sup>, Kopahnke, D.<sup>3</sup>, Ordon, F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Limagrain GmbH, Griewenkamp 2, 31234 Edemissen

<sup>2</sup>Justus-Liebig-Universität Giessen, Ludwigstraße 23, 35390 Gießen

<sup>3</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz,

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Kontakt: wolfgang.lueders@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Der Erreger der Kohlhernie (*Plasmodiophora brassicae*) gewinnt im europäischen Rapsanbau an Bedeutung und mittlerweile werden stark kontaminierte Flächen v.a. in Nord- und Nordostdeutschland sowie in einigen Regionen Frankreichs und Englands mit zunehmender Tendenz nachgewiesen. Starke Unterschiede in der Virulenz je nach Herkunft sind zwar bekannt, aber bisher kaum untersucht und werden daher in einem Monitoringverfahren anhand von 2 Differentialsortimenten unter kontrollierten Bedingungen detailliert analysiert. Die Kohlhernie ist aufgrund des Fehlens einer Bekämpfungsmöglichkeit mit Fungiziden und der Tatsache, dass für den praktischen Anbau aktuell nur eine einzige rassenspezifische Resistenz in agronomisch anbauwürdigen Rapsorten zur Verfügung steht, besonders problematisch. Ziel ist es daher bisher weitgehend ungenutzte Resistenzen aus genetischen Ressourcen, z.B. Steckrübensorten, in spaltenden Populationen (RILs & DHs) zu kartieren und eng gekoppelte Marker zu entwickeln mit deren Hilfe entsprechende Resistenzen effektiv in adaptierte Rapsorten eingelagert werden können.

Stichwörter: Kohlhernie, Virulenzanalyse, pflanzengenetische Ressourcen

### **Abstract**

Clubroot caused by the obligate biotrophic protist *Plasmodiophora brassicae* is a serious soil-borne disease of cruciferous crops. It causes galls on roots leading to premature death of the plant. Currently, due to the raise of oilseed rape cultivation within the last decades the number of contaminated fields is increasing. The hot spots of clubroot infestation in Europe are mainly located in Northern Germany, France and in the UK. Because numerous populations and races, respectively, are known, differences in pathogenicity are being explored under greenhouse conditions. The main problem is the longevity of resting spores in the soil, the lack of reasonable control measures and that up to now only one race specific resistance is incorporated in adapted cultivars. Therefore, with the aid of segregating populations (RILs and DHs) previously unutilized resistance genes identified in genetic resources like rutabaga cv's (*B. napus* ssp. *napobrassica*) are being mapped as a prerequisite for an efficient breeding for resistance.

Keywords: clubroot disease, virulence analysis, plant genetic resources

## Einleitung

Bei dem Erreger der Kohlhernie (*Plasmodiophora brassicae*) handelt es sich um einen pilzähnlichen obligat biotrophen Protisten, welcher Pathogenität gegenüber den meisten Brassica-Arten besitzt und aufgrund seiner Biologie standorttreu ist und somit nicht durch Wind, sondern nur durch Verfrachtung von Bodenpartikeln, z.B. bei Bodenerosion, Anhaftung an landwirtschaftlichem Gerät oder durch Oberflächenabfluss, verbreitet wird (Diederichsen et al. 2009). Mit der Zunahme der Rapsanbaudichte in den letzten Jahrzehnten gewinnt die Kohlhernie in Deutschland und Europa an Bedeutung. Stark kontaminierte Flächen werden v.a. in Nord- und Nordostdeutschland, aber auch in einigen Regionen Frankreichs, Englands und in weiteren Teilen Europas mit zunehmender Tendenz nachgewiesen. Der Befall verursacht im Wurzelbereich der Rapspflanzen die Ausbildung von knollenartigen, knotig verdickten Gallen, welche zu erheblicher Beeinträchtigung bzw. zur Zerstörung der Wurzeln und Leitgefäße führen. Die Nährstoff- und Wasserversorgung wird in hohem Maße beeinträchtigt, so dass es zunächst zur Welke der Blätter und im weiteren Verlauf zum Absterben der befallenen Pflanzen kommt. In jedem Jahr entstehen durch die Kohlhernie massive Schäden im Winterrapsanbau bis hin zum Totalausfall der Kultur. Aufgrund der Persistenz des Erregers im Boden, welcher in Form von Dauersporen ohne zwischenzeitliche Vermehrungsmöglichkeit bis zu 20 Jahre lang nachweislich infektiös bleiben, ist die Kohlhernie besonders problematisch. Bekämpfungsmöglichkeiten mit Hilfe von Fungiziden sind nicht bekannt. Somit ist der Anbau von Winterraps auf kontaminierten Flächen bzw. auf Risikoflächen nachhaltig nur möglich, wenn resistente Sorten zur Verfügung stehen. Momentan steht für den praktischen Anbau nur eine einzige rassenspezifische Resistenz in der Hybridrapsorte 'Mendel' zur Verfügung. Eine Verbesserung des Resistenzniveaus in zugelassenen Sorten, d.h. die Erfassung der genetischen Variabilität und die Überführung wirksamerer Resistenzgene in adaptiertes genetisches Material dient der zukünftigen Ertragssicherung und ist aus ökologischen und ökonomischen Gründen für die Landwirtschaft unverzichtbar.

## Material und Methoden

Starke Unterschiede in der Virulenz des Erregers *Plasmodiophora brassicae* je nach Herkunft sind zwar bekannt, aber bisher kaum untersucht. Daher wurden zunächst unterschiedliche Virulenzen in europaweit auf Rapsanbauflächen gesammelten Isolaten identifiziert. Die Charakterisierung dieser Isolate erfolgte mit Hilfe des European Clubroot Differential Set/ECD (Buczacki et al. 1975) und des INRA-Differentials (Somé et al. 1996) in einem Gewächshaus nach Glory und Manzanares-Dauleux (2005) an jeweils 10 Pflanzen eines Genotyps. Die Bonitur des Befalls wurde sieben Wochen nach Inokulation anhand einer fünfstufigen Skala nach Somé et al. (1996) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwölf Genotypen der Art *Brassica napus* als potenzielle Resistenzdonoren untersucht. Die Resistenz vermittelnden Genotypen wurden als Kreuzungs-eltern zum Aufbau von Kartierungspopulationen (DH und RIL) eingesetzt.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Identifikation von Pathogen-Rassen wurden europaweit Isolate von 15 Standorten gesammelt und charakterisiert. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass der ECD-Pathogenitätswert für die Art *Brassica rapa* kaum variiert. Das bedeutet, dass sich die untersuchten Isolate gegenüber den unterschiedlichen im ECD enthaltenen *B. rapa*-Genotypen als nicht virulent erwiesen und bis auf eine Ausnahme nur die als anfälliger Standard dienende Chinakohlsorte 'Granaat' Befall zeigte. Bei *B. napus* sowie *B. oleracea* hingegen traten größere Unterschiede im Pathogenitätswert auf. Dementsprechend variierte der durch die verschiedenen Isolate hervorgerufene Wurzelbefall in den *B. napus*- und *B. oleracea*-Sortimenten deutlich

stärker. Außerdem konnten sechs von acht Pathotypen des INRA-Differentials identifiziert werden (Tabelle 1).

**Tab.1** Charakterisierung der Kohlhernie-Isolate nach ECD-Pathogenitätswert und INRA-Pathotyp (eine Wiederholung)

Isolatherkunft	ECD-Pathogenitätswert			INRA-Pathotyp
	<i>Brassica rapa</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica oleracea</i>	
Flemming, Dänemark	17	31	12	P1
Vojens, Dänemark	16	31	12	P1
Aberdeen, Schottland	17	31	28	P1
Montrose, Schottland	16	15	29	P2
Tiebensee, Schleswig-Holstein	16	3	14	P6
Hoisdorf, Schleswig-Holstein	16	31	31	P1
Groß Schwiesow, Mecklenburg-Vorpommern	16	31	30	P1
Ortenberg, Hessen	16	14	31	P3
Mudau, Baden-Württemberg	16	3	14	P6
Niederhummel, Bayern	16	6	4	P3
Kozmice, Tschechische Republik	16	14	3	P3
Oizon, Frankreich	16	14	12	P3
La Bohalle, Frankreich	16	3	30	P6
Paimpol, Frankreich	16	2	4	P4
St. Pol du Léon, Frankreich	16	2	12	P4

Eine klare Differenzierung im Auftreten der Pathotypen in bestimmten Regionen ist nicht erkennbar. Dennoch lässt sich eine Häufung des Vorkommens des Pathotyps P1 im nordeuropäischen Raum feststellen. Diese Ergebnisse sind allerdings als vorläufig zu betrachten, da sie bisher nur auf einer Wiederholung der Pathogenitätstests beruhen. Weitere phänotypische Untersuchungen dienen dazu, das Befallsverhalten potenzieller Resistenzdonoren gegenüber verschiedenen Isolaten zu erfassen. Dabei erwiesen sich einige Rapssorten, wie z.B. 'Brutor', 'Nevin' und 'Tosca' oder die Steckrübensorten 'Invitation', 'Lomond', 'Marian', 'Sparta' und 'Wilhelmsburger' als resistent gegenüber den getesteten Isolaten und sind dementsprechend für die Verwendung als Kreuzungseltern bei der Erstellung von Kartierungspopulationen in den Fokus gerückt.

## Literatur

- Buczacki, S.T., H. Toxopeus, P. Mattusch, T.D. Johnston, G.R. Dixon, L.A. Hobolth (1975): Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach, Trans. Br. Mycol. Soc. 65 (2), 295-303.
- Diederichsen, E., M. Frauen, E. Linders, K. Hatakeyama, M. Hirai (2009): Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops, J Plant Growth Regul 28, 265–281.

Glory, P., M. Manzanares-Dauleux (2005): Test de Criblage en Conditions Contrôlées pour la Résistance à *Plasmodiophora brassicae* chez les Brassica, Méthodes d'appréciation du comportement variétal vis-à-vis des bioagressurs, Numéro spécial du Cahier des Techniques, 111-114.

Somé, A., M.J. Manzanares, F. Laurens, F. Baron, G. Thomas, F. Rouxel (1996): Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates, Plant Pathol **45**, 432-439.

## **Regulierung von Rapsschädlingen im ökologischen Winterrapsanbau durch den Einsatz naturstofflicher Pflanzenschutzmittel sowie durch den Misanbau mit Rüben**

Organic Control of Oilseed Rape Pests through Natural Pesticides and Mixed Cultivation with Turnip Rape

Ludwig, T.<sup>1</sup>, Jansen, E.<sup>3</sup>, Trost, B.<sup>4</sup>, Mayer, J.<sup>4</sup>, Kühne, S.<sup>1</sup>, Böhm, H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Strategien und Folgenabschätzung im Pflanzenschutz, Stahnsdorfer Damm 81, 14532 Kleinmachnow,

<sup>2</sup>Johann Heinrich von Thünen-Institut, Trenthorst 32, 23847 Westerau,

<sup>3</sup>Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstr. 42, 10115 Berlin,

<sup>4</sup>Hochschule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde (FH),

Friedrich-Ebert- Str. 28, 16225 Eberswalde

Kontakt: Tobias.Ludwig@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Es wurde das schädlingsreduzierende Potential einer Raps-Rübenmischsaat (10 % Rübenanteil) mit dem einer Raps-Reinsaat verglichen. Zusätzlich kamen naturstoffliche Präparate wie Natur-Pyrethrum (Spruzit<sup>®</sup> Neu), Spinosad (SpinTor), SiO<sub>2</sub>/Sonnenblumen-Öl und gespritztes Gesteinsmehl zum Einsatz. Der Raps der Mischsaat wurde stärker mit Stängelrüsslern (*Ceutorhynchus* spp.) befallen als der Raps der Reinsaat. Die Herabsetzung der Rapsglanzkäferzahlen (*Meligethes aeneus*) auf dem Raps der Mischsaat wurde durch die schnellere Entwicklung und damit höhere Attraktivität des Rübens verursacht. Die schnellere Entwicklung des Rübens ist ein wesentlicher Faktor für eine Reduktion der Rapsglanzkäfer in der Rapskultur. Die Applikation von Natur-Pyrethrum und Spinosad hatte keinen regulierenden Einfluss auf die Stängelrüssler, Spinosad war das einzige Mittel, welches eine Regulierung der Rapsglanzkäferzahlen nach sich zog.

Stichwörter: Raps, Rüben, naturstoffliche Pflanzenschutzmittel

### **Abstract**

A mixed cropping system of rapeseed and 10 % turnip rape as trap crop was compared with oilseed rape in pure stand to demonstrate the reduction of infestation by insect pests. Furthermore the application of bio-pesticides like pyrethrum/rape oil (Spruzit<sup>®</sup> Neu), spinosad (SpinTor), SiO<sub>2</sub>/sunflower oil and stone powder/water was tested. Oilseed rape showed a higher infestation by stem weevils (*Ceutorhynchus* spp.) in the mixed cropping system compared to rapeseed in pure stand. The reduction of the pollen beetle (*Meligethes aeneus*) on the rapeseed buds resulted from higher attractiveness of turnip rape as a consequence of advanced growth. The faster development of turnip rape seems to be the important key of successful pollen beetle regulation. The application of Spruzit<sup>®</sup> Neu and SpinTor against *Ceutorhynchus* spp. had no effect, SpinTor was the only agent that caused a reduction of the pollen beetle.

Keywords: rapeseed, turnip rape, natural pesticides

### **Einleitung und Zielsetzung**

Im ökologischen Rapsanbau kommt es häufig zu deutlichen Ertragsverlusten durch tierische Schaderreger, da entsprechend wirksame Pflanzenschutzkonzepte nicht zur Verfügung stehen. Daraus resultiert eine geringe Anbaufläche von Ökoraps in Deutschland (2008: 2300 ha), die den steigenden Bedarf nach diesem Rohstoff nicht decken kann. Vor diesem Hintergrund läuft seit Ende 2008 ein dreijähriges Forschungsvorhaben, finanziert durch das Bundesprogramm Ökologischer Landbau. Die Versuche wurden auf den nach EU-Ökorichtlinien zertifizierten Versuchsflächen (Kontrollnr.: D-ST-043-48291) des Julius Kühn-Institutes in Dahnendorf (Land

Brandenburg, Sandlöß sL, 48 Bodenpunkte, 587 mm mittlerer Jahresniederschlag) angelegt. Untersucht wurde die schädlingsreduzierende Wirkung des Rübens als Fangpflanze in Mischanbau mit Raps im Vergleich zum Reinanbau von Raps. Weiterhin wurden naturstoffliche Pflanzenschutzmittel zur Schädlingsregulierung getestet. Zielorganismen waren insbesondere die Stängelrüssler (SR, *Ceutorhynchus* spp.) und der Rapsglanzkäfer (RGK, *Meligethes aeneus*).

**Tab. 1** Pflanzenschutzvarianten am Standort Dahnsdorf, SR Stängelrüssler (*Ceutorhynchus* spp.), RGK Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus*)

2009	BBCH	2010	BBCH	Schaderreger
(1) Unbehandelte Kontrolle	-	(1) Unbehandelte Kontrolle	-	-
(2) 8 l ha <sup>-1</sup> NaturPyrethrum	50–51	(2) 0,2 l ha <sup>-1</sup> Spinosad	19–20	SR
(3) 8 l ha <sup>-1</sup> NaturPyrethrum	50–51	(3) 0,2 l ha <sup>-1</sup> Spinosad	19–20	SR
0,2 l ha <sup>-1</sup> Spinosad	57	0,2 l ha <sup>-1</sup> Spinosad	53–59	RGK
(4) 8 l ha <sup>-1</sup> NaturPyrethrum	50–51	(4) 0,2 l ha <sup>-1</sup> Spinosad	19–20	SR
12 kg ha <sup>-1</sup> SiO <sub>2</sub> &	57	12 kg ha <sup>-1</sup> Gesteinsmehl	53–59	RGK
12 l ha <sup>-1</sup> Sonnenblumenöl				

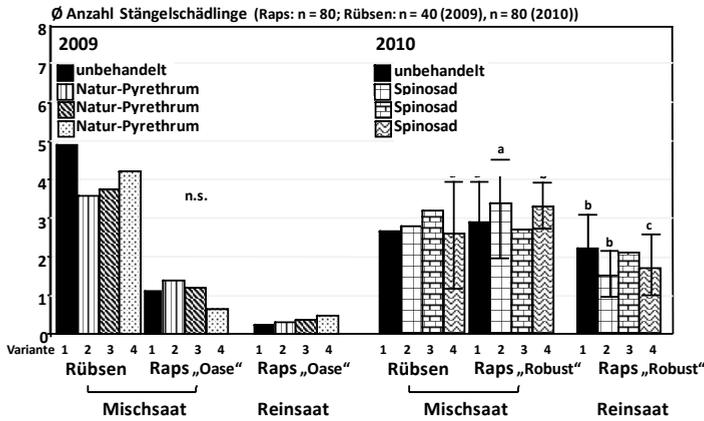
## Methoden

Zwei Versuchsflächen standen jeweils 2009 und 2010 zur Verfügung. Auf der einen wurde eine Rapsreinsaat, Sorte 'Oase' (2009), 'Robust' (2010), auf der anderen eine Raps-Rüben-Mischsaat mit einem Anteil von 10 % Rüben („Largo“, 00-Qualität) etabliert. Die Parzellen wurden in vierfacher Wiederholung angelegt (Saatstärke 70 Körner je m<sup>2</sup>). Die Parzellen (34 x 25 m (Rein-); 26 x 25 m (Mischsaat)) wurden in vier Pflanzenschutzvarianten unterteilt (Tabelle 1). Zur Festlegung des Spritztermins wurden Schadschwellen aus dem integrierten Landbau bzw. der Flughöhepunkt der Schadinsekten (Gelbschale) zu Grunde gelegt. Die Erfolgsbonitur der Pflanzenschutzmaßnahmen gegen die SR erfolgte durch die Befallsdichtermittlung anhand von 20, im mittleren Bereich aus jeder Parzelle zufällig entnommener Raps-/Rübenpflanzen. Dazu wurde der Haupttrieb aufgeschnitten, die Larven gezählt und unter dem Mikroskop taxonomisch bestimmt. Die Befallsdichtermittlung der RGK erfolgte von Beginn der Flugzeit bis zum Anfang der Blüte durch Zählung der Käfer an 50, (2009 beim Rüben 10) im mittleren Bereich jeder Parzelle zufällig ausgewählten Raps/Rüben-hauptinfloreszenzen. Die Ernte erfolgte am 21. Juli 2009 und am 30. Juli 2010 mit einem Parzellenmähdrescher.

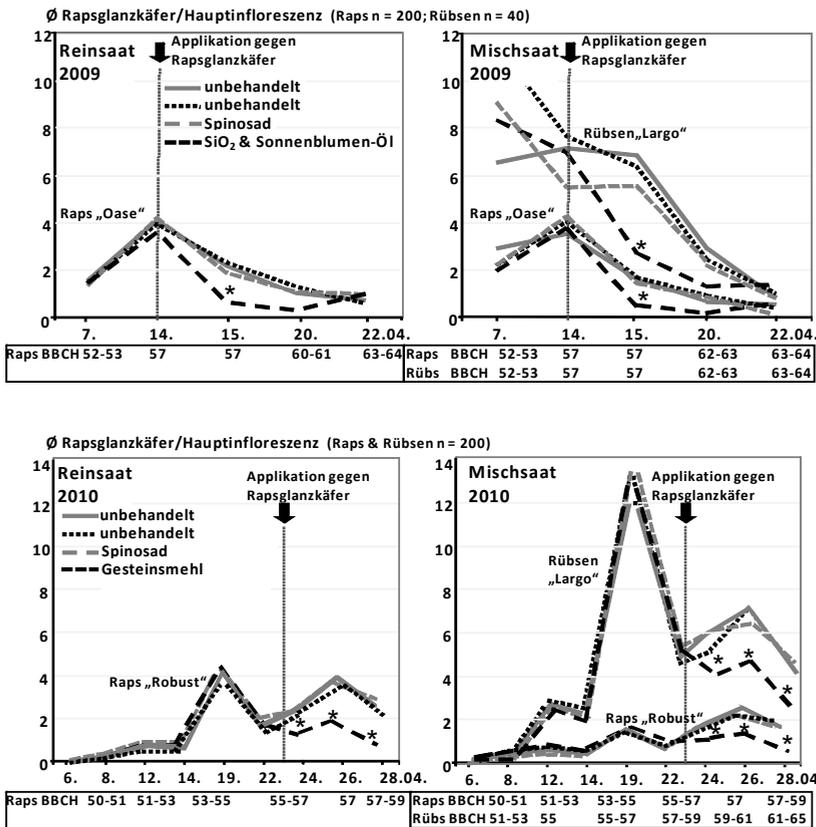
## Ergebnisse

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass der Rüben in der Mischsaat gegenüber der Rapsorte „Oase“ 2009 einen bis zu fünfmal höheren Befall mit Stängelschädlingen aufwies. Dies führte jedoch nicht zu der erhofften Ablenkung von der Rapskultur. Der Raps der Mischsaat war stärker mit Stängelschädlingen befallen als der Raps der Reinsaat. Signifikanzen ergaben sich aufgrund der starken Streuung der Werte nicht. 2010 konnte in der Mischsaat ein etwa gleich starker Befall von Rüben und Raps „Robust“ beobachtet werden. Wie 2009 war auch 2010 der Raps der Mischsaat stärker mit Stängelschädlingen befallen als der Raps der Reinsaat. Für drei der vier Varianten ließ sich dies auch statistisch absichern. Spruzit<sup>®</sup> Neu erbrachte 2009 keine signifikante Reduktion der Befallszahlen, teilweise fanden sich mehr SR in den Applikationsvarianten, das gleiche galt 2010 für die Applikation mit SpinTor. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass 2009 in der Mischsaat der Rüben besonders im frühen Knospenstadium stärker von RGK besiedelt wurde als der Raps. Mit fortschreitender Entwicklung schwächte sich dieser Effekt ab, war zumeist jedoch signifikant. Die Bevorzugung des Rübens führte zu keinem Unterschied der Befallsstärke zwischen dem Raps der Misch- verglichen mit dem der Reinsaat. Der Rüben wies keinen phänologischen Vorsprung gegenüber der Rapsorte „Oase“ auf. Im Jahr 2010 kam es zu einer signifikanten Bevorzugung des Rübens durch die RGK gegenüber dem Raps „Robust“ in der Mischsaat. Zeitweise befanden sich hier mehr als zehnmals so viele

Käfer. Dies hatte eine signifikante Absenkung der Käferzahlen auf dem Raps der Mischsaat im Vergleich zum Raps der Reinsaat zur Folge.



**Abb. 1** Einfluss der Anbau- und Pflanzenschutzmittelvariante auf den Befall mit *Ceutorhynchus* spp.; n.s. = nicht signifikant für  $\alpha = 5\%$  Wilcoxon Test



**Abb. 2** Zeitlicher Verlauf des Befalls mit *Meligethes aeneus* in Abhängigkeit der Anbau- und Pflanzenschutzmittelvarianten; \* = signifikant für  $\alpha = 5\%$  Wilcoxon Test

2010 war der phänologische Vorsprung des Rübens deutlich erkennbar. Die Regulierung der Rapsglanzkäfer erbrachte 2009 für die Variante SpinTor eine deutliche, teils signifikante, für die Variante Kieselgur (SiO<sub>2</sub>) mit Sonnenblumenöl eine tendenzielle Reduktion der Käferzahlen. Der Wirkungsgrad (Abbott) lag bis 6 Tage nach Applikation bei bis zu + 78 % (SpinTor) sowie + 21 bis - 33 % (SiO<sub>2</sub> & Sonnenblumenöl). Die Variante SpinTor bewirkte 2010 erneut eine deutliche und signifikante, die Variante Surround<sup>®</sup> keine Reduktion der Käferzahlen. Der Wirkungsgrad betrug bis 6 Tage nach Applikation bis zu + 68 % (SpinTor) bzw. + 8 bis - 19 % (Surround<sup>®</sup>).

### **Diskussion**

Die Raps-Rübenmischsaat führte in beiden Versuchsjahren zu einer Erhöhung der SR in dem Raps der Misch- verglichen zu dem der Reinsaats. Die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen dies (Strauch 2009, Büchs und Katzur, 2004). Die Bevorzugung des Rübens durch die RGK hat nur dann eine befallsmindernde Wirkung auf den Raps, wenn der phänologische Vorsprung des Rübens gegenüber dem Raps mehrere Tage beträgt, wie der Vergleich der beiden Versuchsjahre verdeutlicht. Spruzit<sup>®</sup> Neu und SpinTor bewirkten keinen reduzierenden Effekt auf die SR. Die Regulierung des RGK war nur mit SpinTor erfolgreich, die Wirkungsgrade von deutlich über 70 % sind mit denen konventioneller Spritzmittel zu vergleichen. Das alternativ getestete Gesteinsmehl und SiO<sub>2</sub> mit Sonnenblumenöl erzielten keinen befallsmindernden Effekt. Ein repellenter Effekt ließ sich anhand des Schadensausmaßes (ausgebildete Stielchen in den Schotenständen) nicht nachweisen. Möglicherweise war die Konzentration von 12 kg ha<sup>-1</sup> zu niedrig, in der Schweiz wurden mit 25 kg deutliche Wirkungen festgestellt (Breitenmoser, 2008).

### **Schlussfolgerungen**

Nach den bisherigen Ergebnissen kann der Mischanbau mit Rüben zur Regulierung der Rapsschädlinge nicht empfohlen werden. Selbst wenn ein reduzierender Effekt bei den RGK möglich ist, steht dem ein stärkerer Befall mit SR gegenüber, die nach aktuellem Stand nicht mit einer gezielten Applikation bekämpft werden können. Die Applikationen gegen RGK führten zu keinen Ertragsvorteilen und wenn, dann waren diese zu gering, um die Kosten der Applikation auszugleichen. Für die Praxis bleibt die Empfehlung, eine frühblühende Rapssorte zu verwenden und den Rapsbestand optimal zu führen (Unkrautregulierung, Düngung), damit das enorme Kompensationspotential der Rapspflanze ausgeschöpft werden kann.

### **Literatur**

- |   |   |
|---|---|
| Breitenmoser A. (2008): Bekämpfung des Rapsglanzkäfers im Biolandbau. Semesterarbeit, Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft (SHL).   | Strauch S. (2010): Regulierung des Rapsglanzkäfers im ökologischen Landbau. Untersuchungen zum Einfluss von Rüben als Fangpflanze. Vdm Verlag Dr. Müller. |
| Büchs W., Katzur K. (2004): Cultivation techniques as means to control pests in organic oilseed rape production. Intergrated Protection in Oilseed Crops. IOBC/wprs Bulletin Vol. 27 (10), 225-236. |   |

## Entwicklung und Anwendung molekularer und informatorischer Werkzeuge für das genetische Monitoring bei Wildrüben.

Development and application of molecular and bioinformatic tools for the genetic monitoring of wild beets.

Enders, M., Frese, L., Nachtigall, M.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Kontakt: matthias.enders@jki.bund.de

### Zusammenfassung

Wildlebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK) sind wirtschaftlich wichtige pflanzen-genetische Ressourcen (PGR) für die Pflanzenzüchtung. Ein Konzept, solche PGR im natürlichen Habitat (*in situ*) zu erhalten, ist das genetische Schutzareal. Durch diese Technik ist es möglich, innerartliche Vielfalt zu erhalten und die Entstehung neuer Diversität zu ermöglichen. Das Konzept des genetischen Schutzareals wird an der Gattung *Beta* im Rahmen des vom Julius Kühn-Institut koordinierten EU-Projekts AEGRO angewendet, erprobt und weiterentwickelt. *B. patula* (Ait.) (BP) und *B. vulgaris* (L.) *maritima* (Arcang.) (BVM) werden dabei als Modellarten genutzt. Beide Spezies sind wichtige PGR für die Zuckerrübenzüchtung. BP ist eine seltene und gefährdete Art mit einem sehr begrenzten Verbreitungsgebiet. Im Gegensatz dazu ist BVM weitverbreitet und kommt u. a. an den Küsten Westeuropas vor. In Folge des globalen Klimawandels wird eine nach Norden gerichtete Migrationsbewegung dieser Unterart erwartet. Basierend auf den durch vorliegende Arbeit geschaffenen Grundlagen soll zu einem späteren Zeitpunkt die Auswirkung dieser Migrationsbewegung auf die genetische Diversität ermittelt werden.

Insgesamt wurden 557 Einzelpflanzen von 14 Sammelorten mit jeweils 25 SSR-Markern (Simple Sequence Repeat Marker) untersucht. Zusätzlich wurde eine Datenbank zur Unterstützung des genetischen Monitorings modelliert und implementiert, um die erhobenen Labor- und Felddaten in strukturierter und gut dokumentierter Form für die Auswertung von Zeiterien langfristig in hoher Qualität verfügbar zu halten. Erstmals wird die geographische Verteilung der genetischen Diversität von BP beschrieben und eine Empfehlung für die Ausweisung eines genetischen Schutzareals für BP gegeben. Auch das Wissen um die geographische Verteilung genetischer Diversität bei BVM wurde weiter vertieft.

Stichworte: Wildrüben, SSR-Marker, wildlebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK), genetisches Schutzareal

### Abstract

Crop Wild Relatives (CWR) are an economically important plant genetic resource (PGR) for plant breeding. One strategy to conserve PGR in the natural habitat (*in situ*) is the genetic reserve technique. This approach protects the existing intraspecific diversity and allows, in contrast to the *ex situ* approaches, the emergence of new diversity. The genetic reserve conservation technique will be tested in practice with the genus *Beta* within the framework of the EU project AEGRO. *B. patula* (Ait.) (BP) and *B. vulgaris* (L.) *maritima* (Arcang.) (BVM) are used as models. Both species are important resources for sugarbeet breeding. BP is a rare and endangered species with a very limited habitat. In contrast, BVM is widespread along the shores of Western Europe. This subspecies is expected to migrate in a northward direction as a consequence of the global climate change. The impact of this migration on the genetic diversity will be examined in future analyses and will establish a basis for future research.

A total of 557 plants from 14 sampling plots were analysed using 25 SSR markers (Simple Sequence Repeat markers). Additionally, a database was modeled and implemented to support the genetic monitoring by storing and post-processing all laboratory and field data in a well documented and structured way. This makes the data available for the analysis of time series. For the first time the geographic pattern of genetic diversity in the wild beet BP was described and decision criteria for the establishment of a genetic reserve for BP were postulated. The knowledge of geographic patterns of genetic diversity in the wild beet BVM was consolidated as a baseline for further investigations on the potential influence of climate changes and the corresponding geographic range shift on genetic diversity.

Keywords: Wild beet, SSR markers, Crop Wild Relatives (CWR), genetic reserve conservation technique

### **Einleitung**

Die zum Genpool (Harlan und de Wet, 1971) einer Kulturart zugehörigen Wildarten werden als wild lebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK) bezeichnet. Sie sind eine wirtschaftlich bedeutende pflanzengenetische Ressource (PGR) für die Pflanzenzüchtung (Maxted *et al.*, 2008). Genetische Schutzareale (genetic reserve conservation technique, Maxted *et al.*, 1997) gelten als ein Verfahren zur Erhaltung von PGR in situ, also am natürlichen Standort. Dieser Ansatz sichert vorhandene innerartliche Diversität und ermöglicht – im Gegensatz zu Ex-situ-Verfahren – die Entstehung neuartiger genetischer Variabilität. Bei der Entwicklung eines solchen Verfahrens sind die bislang nicht sicher vorhersehbaren Auswirkungen des Klimawandels, die damit verbundenen Veränderungen der Lebensräume sowie die daraus resultierenden Prozesse wie genetische Erosion und Migration zu berücksichtigen.

Das Konzept des "Genetischen Schutzareals" wird im Rahmen des vom JKI koordinierten EU-Projekts AEGRO u. a. an der Gattung *Beta* praxisnah getestet. *B. patula* (Ait.) (BP) und *B. vulgaris* (L.) ssp. *maritima* (Arcang.) (BVM) dienen dabei als Modellarten. Beide Arten sind wichtige genetische Ressourcen der Zuckerrübenzüchtung. Darüber hinaus unterscheiden sie sich durch sehr unterschiedliche Verbreitungsmuster. BP weist ein kleines Verbreitungsareal auf und erscheint damit experimentell geeignet, den Arbeitsablauf zur Etablierung eines genetischen Schutzareals zu erproben. Hingegen ist BVM unter anderem entlang der Atlantikküste Westeuropas weit verbreitet. Zusätzlich scheint sich diese Unterart seit ca. 150 Jahren entlang der Ostseeküste auszubreiten (Driefen, 2003). Seit 2004 ist sie auch auf einer russischen Insel südlich von Finnland anzutreffen (Glazkova, 2006). Die Unterart *maritima* ist deshalb geeignet, die Folgen einer Verschiebung von Arealgrenzen und damit verbundener Migrationsprozesse auf die innerartliche Diversität zu untersuchen.

Die Ziele vorliegender Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Für die Art BP und die Unterart BVM war eine genetische Diversitätsanalyse durchzuführen. Für BP sollte für die Ausweisung eines genetischen Schutzareals notwendige Datengrundlage geschaffen werden. Für die Unterart BVM sollen die gewonnenen Erkenntnisse in späteren Untersuchungen genutzt werden, um das Konzept des genetischen Schutzareals weiter zu verbessern. Weiterhin sollte eine Datenbank entwickelt werden, die speziell auf die Anforderungen eines genetischen Monitorings angepasst ist.

### **Material und Methoden**

Für die Art BP wurde an sieben Sammelorten Blattmaterial von insgesamt 242 Pflanzen vom portugiesischen Projektpartner (M. Pinheiro de Carvalho, Universität Funchal, Madeira) gesammelt, getrocknet und zum Julius Kühn-Institut gesendet. Alle Sammelorte liegen auf zwei Schären nahe Madeira (Portugal) und wurden mithilfe von GPS-Geräten georeferenziert. Zusätzlich wurden 20 sympatrisch vorkommende BVM Pflanzen als Vergleichsgruppe

gesammelt. Für BVM wurde an ebenfalls sieben Sammelorten an der dänischen Ostseeküste und auf der Insel Fehmarn Blattmaterial von insgesamt 315 Pflanzen durch L. Frese (JKI) und G. Poulsen (Nordische Genbank) gesammelt und ebenfalls getrocknet und nach Deutschland versendet. Auch diese Sammelorte wurden georeferenziert; für fünf dieser sieben Sammelorte sind zusätzlich Einzelpflanzenkoordinaten vorhanden.

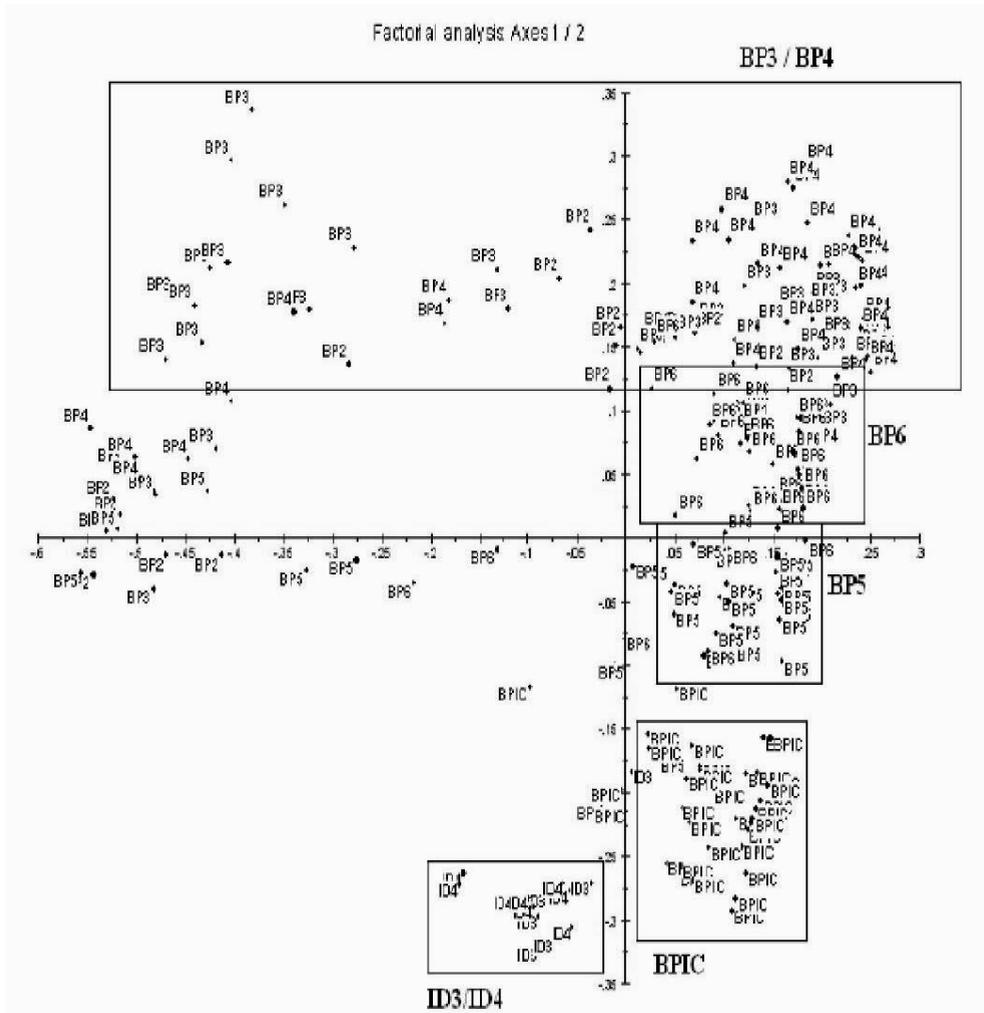
Am Julius Kühn-Institut wurde aus dem Blattmaterial die genomische DNA durch eine nach Dorokhov (1997) modifizierte Minipräparation extrahiert. Um die genetische Struktur aufzuklären, wurden 25 SSR-Marker (Cureton et al., 2002; McGrath et al., 2007; Laurent et al., 2007, Richards et al., 2004, KWS Saat AG, zu Forschungszwecken) eingesetzt. Die Amplikons wurden elektrophoretisch getrennt und über einen dual Laser DNA Fragmentanalyser (LiCor 4300) detektiert. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit weiteren Labor- und Felddaten in einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Monitoring-Datenbank abgespeichert und durch den Einsatz zusätzlich programmierter Module vorverarbeitet. Das Resultat dieser Vorverarbeitung sind einzelne Dateien, die als direkte Eingabe für unterschiedliche Programme zur statistischen Analyse und Verrechnung dienen.

Zum Einsatz kamen die Programme „Darwin“ (Perrier und Jacquemoud-Collet, 2006) und „Phylip“ (Felsenstein, 1989) zur Visualisierung der Daten, die Statistik-Software „SAS“ (Anonym, 2002) zur Berechnung wichtiger Kenngrößen wie z. B. der beobachteten bzw. erwarteten Heterozygotie ( $H_o$ ,  $H_e$ ), dem PIC-Wert sowie zum Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Zur weiteren Aufklärung der genetischen und geographischen Struktur wurden die Programme „FStat“ (Guodet, 2001), „Geneland“ (Guillot *et al.*, 2005) sowie „GDA“ (Lewis und Zaykin, 2001) eingesetzt.

## Ergebnisse

Bei der geographischen Struktur der genetischen Diversität von BP zeigt sich deutlich die Abgrenzung der mit ID3 bzw. ID4 bezeichneten BVM-Pflanzen, die sympatrisch mit den BP-Pflanzen der Sammelorte BP3 bzw. BP4 vorkommen (Abbildung 1).

Auch die Pflanzen des Sammelortes BPIC grenzen sich deutlich ab. Dieser Sammelort ist der einzige Sammelort auf der sehr isoliert liegenden Schäre „Ilhèu Chão“. Alle anderen Sammelorte (BP1 bis BP6) liegen gemeinsam auf der Schäre „Ilhèu do Desembarcadouro“. Die Pflanzen dieser Sammelorte können nur grob in Cluster eingeteilt werden, die den jeweiligen Sammelorten zugeordnet werden können. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch eine Populationsstrukturaufklärung unterstützt. Durch diese werden Populationen gebildet, die entweder nur Pflanzen eines Sammelortes oder Pflanzen von mehreren, aber benachbarten, Sammelorten enthalten (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das Wissen über die geographische Struktur genetischer Diversität bei BVM im Baltischen Raum weiter vertieft. So konnte u. a. festgestellt werden, dass die im Kalundborg-Fjord lokalisierte Population von BVM genetisch klar von den anderen untersuchten Populationen abgetrennt ist. Dies ist besonders hervorzuheben, da in diesem Vorkommen Resistenzgene gegen das „beet necrotic yellow vein virus“ (BNYVV) gefunden wurden (Frese 2002). Die festgestellten Strukturen sind jedoch allein über die geographische Lage der Sammelorte zueinander nicht ausreichend erklärbar.



**Abb. 1** Faktorenanalyse von *Beta patula* (Ait.). Durch die Achsen 1 und 2 erklärte Varianz: 42,48 %

Zur Entwicklung der Monitoring-Datenbank wurde das Datenbankmanagementsystem MS Access (Microsoft® Office Access 2007 SP2 MSO) genutzt. Das Datenbankschema ist in Abbildung 2 dargestellt. Zusätzlich wurden verschiedene Visual Basic for Application (VBA) Module für die Verarbeitung und Aufbereitung der Daten implementiert und in das Framework der Datenbank integriert. Auf Anfrage kann eine aktuelle Version der Datenbank vom Autor zur Verfügung gestellt werden.

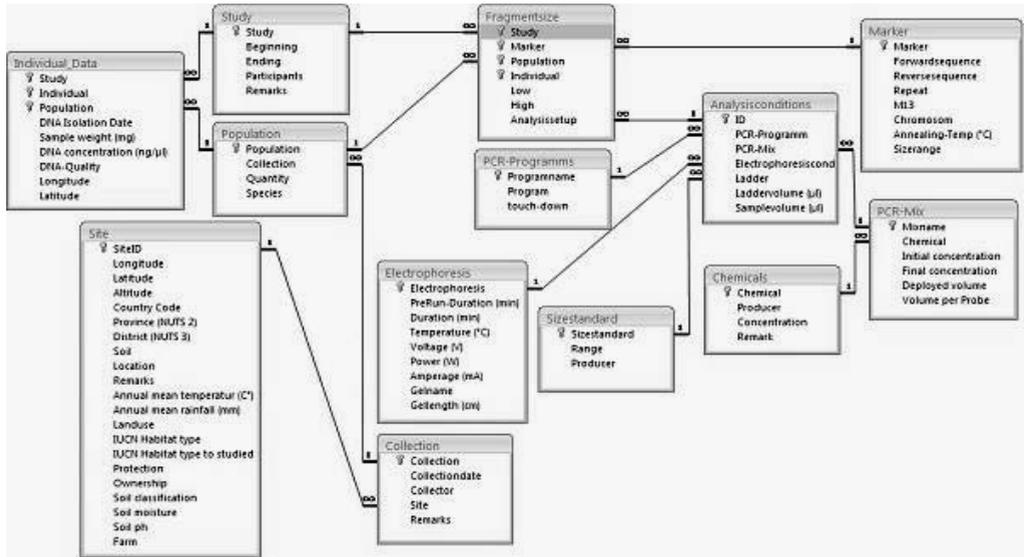


Abb. 2 Datenbankschema der Monitoring-Datenbank

## Diskussion

Aus den vorliegenden Analysen kann geschlossen werden, dass kein regelmäßiger Austausch von genetischem Material zwischen den sympatrisch vorkommenden BP- und BVM-Pflanzen besteht, obwohl diese kreuzungskompatibel miteinander sind (Letschert, 1993). Dies kann durch unterschiedliche Blühzeitpunkte bedingt sein (Letschert, 1993). Weiterhin wurde durch die Analyse der genetisch-geographischen Struktur die Grundlage für eine Empfehlung zur Ausweisung eines genetischen Schutzareals für PB geschaffen.

Für BVM sind weitere Untersuchungen nötig, da die geographische Struktur genetischer Diversität für diese Unterart neben der geographischen Lage der Sammelorte auch durch weitere Faktoren beeinflusst werden kann. So könnten Meeresströmungen einen Einfluss ausüben, weil die Samen von BVM auch nach der Einwirkung von Salzwasser keimfähig bleiben und sich BVM somit potentiell auch über große Entfernungen entlang von Meeresströmungen ausbreiten kann (Tjebbes, 1933).

Mit der Datenbank zur Unterstützung des genetischen Monitorings wurde ein informatorisches Werkzeug geschaffen, das für unterschiedliche Pflanzenarten eingesetzt werden kann, um Daten aus Zeitreihenmessungen persistent zu speichern, was von außerordentlicher Bedeutung für ein genetisches Monitoring ist.

## Literatur

- Anonym (2002): SAS software, Version 9.1 of the SAS System for Windows XP. Copyright © 2002-2003 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. Product or service names are registered trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Dorokhov, D.B., E. Klocke (1997): A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Genet.* **33**, 358–365.
- Driessen, S. (2003): *Beta vulgaris* subsp. *maritima* an Deutschlands Ostseeküste – Kartierung, genetische und physiologische Charakterisierung und ihre Rolle als Kreuzungspartner für transgene Zuckerrüben, Dissertation, RWTH Aachen.
- Felsenstein, J. (1989): PHYLIP - Phylogeny Inference Package. *Cladistics* **5**, 164–166.
- Cureton, A.N., J.M. Burns, B.V. Ford-Lloyd, H. J. Newbury (2002): Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow between sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. *Mol. Ecol. Notes*, **2** (4), 402–403.
- Frese, L. (2002): Combining Static and Dynamic Management of PGR: A Vase Study of *Beta* Genetic Resources, In: Engels J.M.M., V. R. Rao, A. H. D. Brown, M. T. Jackson (Eds.) *Manag. Plant Genet. Divers.* 133–147.
- Glazkova et al. (2006): A new species to the flora of Russia. *Botanicheskii zhurnal*, **91**, 34–45.
- Goudet, J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3), Available from <http://www.unil.ch/izjedisplayerea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Guillot, G., F. Mortier, A. Estoup (2005): Geneland: a computer package for Landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 712–715.
- Harlan, J.R., J.M.J. De Wet (1971): Towards a rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon* **20**, 509–517.
- Laurent, V., P. Devaux, T. Thiel, F. Viard, S. Mielordt et al. (2007): Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries an GenBank ESTs to map the sugar beet genome. *Theor. Appl. Genet.* **115** (6), 793–805.
- Letschert, J.P.W. (1993): *Beta* section *Beta*, biogeographical patterns of variation and taxonomy. Wageningen Agricultural University Papers, 1–153.
- Lewis, P.O., D. Zaykin (2001): Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data, Version 1.0 (d16c), Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html> (Website Stand: 21.10.2010).
- Maxted, N., J.G. Hawkes, B.V. Ford-Lloyd, J.T. Williams (1997): A practical model for *in situ* genetic conservation. In: Maxted, N., B.V. Ford-Lloyd, J.G. Hawkes (Eds.), *Plant Genetic Conservation – The in situ approach*, Chapman & Hall, London.
- Maxted, N., S.P. Kell, B.V. Ford-Lloyd (2008a): Crop Wild Relative Conservation and Use: an Overview, In: Maxted, N., B. V. Ford-Lloyd, S. P. Kell, J. M. Iriondo, M. E. Dulloo, J. Turok (Eds.), *Crop Wild Relative Conservation and Use*.
- McGrath, J.M., D. Trebbi, A. Fenwick, L. Pannella, B. Schulz, V. Laurent, S. Barnes, C. Murray (2007): An Open Source First-Generation Molecular Genetic Map from a Sugarbeet x Table Beet Cross an its extension to Physical Mapping. *Crop Sci.* **47**, Supplement 1, 27–44.
- Perrier, X., J.P. Jacquemoud-Collet (2006): DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin> (Website, Stand 21.10.2010).
- Richards, C.M., M. Brownson, S. E. Mitchell, S. Kresovich, L. Panella (2004): Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Mol. Ecol. Notes* **4** (2), 243–245.
- Tjebbes, K. (1933): The wild beets of the North Sea region. *Botanical Notiser*, 305–315.

## **Etablierung einer Methode zur Phänotypisierung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) resistenz in der Weinrebe (*Vitis spec.*)**

Development of a method for phenotyping Black Rot (*Guignardia bidwellii*) resistance on grapevine (*Vitis spec.*)

Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen

Kontakt: friederike.rex@jki.bund.de, Tel: 0049-(0)6345-41-127

### **Zusammenfassung**

Der Erreger der Schwarzfäule *Guignardia bidwellii* wurde im 19. Jahrhundert aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt. Seit 2002 wird der Ascomycet vermehrt in deutschen Weinanbaugebieten beobachtet und führt gebietsweise zu erheblicher Ertragsminderung. Dies gibt Anlass, in Zukunft Schwarzfäule resistente Reben zu züchten. Für die Züchtung ist eine Methode erforderlich, um eine große Anzahl an Reben schnell und zuverlässig bezüglich ihrer Anfälligkeit gegen die Schwarzfäule zu charakterisieren. Vorgestellt wird ein Verfahren der Phänotypisierung der Resistenz in der Rebe, sowie die Durchführung der Bonitur und deren Ergebnisse. Die Bonituren sind darauf ausgerichtet, Daten zu erheben, die für genetische Analysen (hier QTL) verwendbar sind. Letztendlich werden molekulare Marker entwickelt, die eng mit dem Merkmal Schwarzfäule Resistenz gekoppelt sind und daher in der Züchtung zur Frühselektion von Reben verwendet werden können.

Stichwörter: Schwarzfäule, Weinrebe, Züchtung

### **Abstract**

Black Rot of grapevine is caused by the Ascomycet *Guignardia bidwellii*. The pathogen was introduced from North America to Europe in the 19<sup>th</sup> century. Since 2002 increased effects of the disease have been noticed, causing significant yield losses in the region of Mosel and infections in all German wine-growing regions. For that reason, it is important to breed Black Rot resistant grapevine cultivars. A method has been developed to characterize lots of vines in a fast and reliable way concerning their susceptibility. First data have been collected and can be used for genetic analysis (here QTL). The aim of the project is to develop a molecular marker correlating with Black Rot resistance which can be used to select juvenile plants and therefore supporting the breeding of resistant cultivars.

Keywords: Black Rot, Grapevine, Breeding

### **Einleitung**

Die Rebkrankheit Schwarzfäule wird durch den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala und Ravaz hervorgerufen. Das ursprünglich in Nordamerika beheimatete Pathogen wird in Frankreich seit 1885 beobachtet. In den deutschen Weinanbaugebieten war es bislang weitgehend unbedeutend. Seit 2002 tritt jedoch ein verstärkter Befall vor allem im Anbaugebiet Mosel auf und verursacht teils erhebliche Schäden (Molitor, 2009; Lipps & Harms, 2004).

Ebenso wie bei den Mehltaupilzen finden sich Resistenzen gegen die Schwarzfäule in amerikanischen Wildarten, nicht aber in der europäischen Kulturrebe *V. vinifera*. Für Mehltairesistenzen konnten bereits molekulare Marker entwickelt (Akkurt et al., 2007; Fischer et al., 2004; Akkurt et al., 2007) und erfolgreich für die Frühselektion von Resistenzeigenschaften eingesetzt werden (Eibach et al., 2007).

Im Rahmen dieses Projektes wird die Basis der Mehltapilzresistenzen um den Erreger der Schwarzfäule erweitert. Dafür steht die Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' zur Verfügung. Für diese Population wurde die Unterlagssorte und Arthybride 'Börner' (V. riparia x V. cinerea) als Resistenzträger mit dem anfälligen Zuchtstamm V3125 ('Trollinger' x 'Riesling') gekreuzt. Die Individuen der Kreuzungspopulation spalten bezüglich der Resistenz gegen die Schwarzfäule auf. Um das Resistenzverhalten für die Kreuzungseltern und jedem Nachkommen zu ermitteln, wurde ein Resistenztest etabliert.



**Abb.1:** Das Schadbild der Schwarzfäule auf Blättern und Beeren der Weinrebe.

Mit der Evaluierung der Population und der bereits veröffentlichten genetischen Karte (ZHANG et al., 2009) wurden die Grundlagen für QTL-Berechnungen geschaffen, mit denen die Loci im Genom, die für die Resistenz entscheidend sind, lokalisiert werden. Letztendlich soll im Rahmen des FDW-geförderten-Projektes (Forschungsring des Deutschen Weinbaus) ein molekularer Marker, der mit der Schwarzfäule Resistenz korreliert und für moderne Selektionsverfahren in der Rebenzüchtung eingesetzt werden kann, entwickelt werden.

### **Material und Methoden**

Die Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' umfasst etwa 200 Individuen, welche aus den Jahren 1998 und 2001 vom Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof stammen und dort gepflanzt sind. Zusätzlich wurden für die Versuche Topfreben aus Stecklingsvermehrung verwendet.

Für die Infektionsversuche wurde das Isolat Mo05 (Mosel 2005) des Erregers der Schwarzfäule *Guignardia bidwellii* verwendet. Dieses wurde vom DLR Neustadt zur Verfügung gestellt, ebenso wie die Methoden zur Kultivierung und Sporengewinnung (Jailloux, 1992; Molitor, 2009). Das Pathogen wurde auf Hafermehl-Agar im Klimaraum bei Dauerlicht mit 50% Schwarzlicht bei 25°C kultiviert (C. Hoffmann, JKI Siebeldingen, pers. Mitteilung) und die Sporensuspension zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Passage gewonnen (Caltrider, 1961). Die Inokulation durch Aufsprühen erfolgte mit einer Konzentration von 104 - 105 Sporen/ml, die zuvor mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Für die Infektionsversuche wurden von der gesamten Kreuzungspopulation durch vegetative Vermehrung Topfreben angezogen. Betrachtet wurden drei Reben je Genotyp, um eine Wiederholung zu gewährleisten. Die anfällige Sorte 'Müller-Thurgau' diente als Kontrolle. Die Topfreben wurden im Klimaraum infiziert und unter Plastikfolien über Nacht bei 25°C inkubiert. Die erste Bonitur erfolgte nach 14 Tagen und eine weitere nach 21 Tagen. Die Bonitur erfolgte als Abschätzung des Verhältnisses der befallenen Blattfläche zur Gesamtblattfläche. Die Infektion der Kreuzungspopulation im Freiland fand auf natürlichem Wege statt. Der Befall der Blätter wurde in vier Klassen bonitiert (0 = kein Befall bis 4 = starker Befall).

### Ergebnisse

Die Kultivierung des Pilzes wurde erfolgreich gemäß Caltrider (1961) und Molitor (2009) am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof etabliert. Der hemibiotrophe Pilz kann dauerhaft kultiviert und die Sporensuspension bis zu 14 Tagen bei 4°C gelagert werden. Zusätzlich wurde ein Isolat von befallenen Blättern im Freiland am Geilweilerhof (Gf10) gewonnen, welches eine zehnfach höhere Sporulationsaktivität zeigt.

Im Jahr 2009 wurden in Vorversuchen an Topfreben 60 Genotypen der Population V3125 x 'Börner' in dreifacher Wiederholung bonitiert. In diesen bewährte sich der Modus der Bonitur, der innerhalb eines Genotyps zu vergleichbarem Befall führte. Die Bonituren zeigten, dass die Nachkommen der Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' bezüglich der Anfälligkeit gegen Schwarzfäule segregieren.

In der Saison 2010 wurden die Versuche auf die komplette Kreuzungspopulation erweitert und die Reben in drei unabhängigen Durchgängen im Klimaraum infiziert und bonitiert. Der erste Durchgang wurde mit dem Isolat Mo05 durchgeführt, die weiteren Wiederholungen mit einer Mischung aus diesem Isolat und dem neuen Isolat Gf10. Somit stehen insgesamt neun Datenpunkte für jeden Genotyp zur Verfügung. Zusätzlich wurde der natürliche Befall der Kreuzungspopulation im Freiland bonitiert.

### Diskussion und Perspektive

Mit der Kultivierung und Lagermöglichkeit des Pathogens ist die Grundlage für Versuche an Topfreben geschaffen worden. Durch die zusätzliche Verwendung des stärker sporulierenden Isolats Gf10 konnten die Versuche vereinfacht werden. Die Topfreben der Kreuzungspopulation wurden in einer Saison in drei Wiederholungen infiziert und bonitiert. Gleichzeitig konnte 2010 der Befall der Genotypen auch im Freiland bonitiert werden. Nach dem ersten Versuch im Klimaraum zeigte sich, dass sich die befallenen Genotypen im Freiland teilweise nicht mit den befallenen Genotypen der Versuche im Klimaraum deckten. Diese Ergebnisse glichen sich jedoch an, nachdem das Isolat Gf10 verwendet wurde. Im Jahr 2011 erfolgt eine erneute Bonitur der Datensätze. Die phänotypischen Daten werden für QTL-Analysen eingesetzt, die genetische Karte der Population in den betreffenden Bereichen verfeinert und letztendlich molekulare Marker entwickelt, die mit der Resistenz gegen die Schwarzfäule gekoppelt sind und in der Züchtung verwendet werden können.

### Literatur

- Akkurt, M., L. Welter, E. Maul, R. Töpfer, E. Zyprian. (2007): Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* **19**: 103-111.
- Caltrider P. (1961): Growth and Sporulation of *Guignardia Bidwellii*. *Phytopathology* **51**: 860.
- Eibach R, E. Zyprian, L. Welter, R. Töpfer. (2007): The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* **46**: 120-124.

- Fischer B. M., I. Salakhutdinov, M. Akkurt, R. Eibach, K. J. Edwards, R. Töpfer, E. M. Zyprian. (2004): Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 501-515.
- Jailloux F. (1992). Invitro Production of the Teleomorph of *Guignardia-Bidwellii*, Causal Agent of Black Rot of Grapevine. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **70**: 254-257.
- Lipps H. P., M. Harms. (2004): Schwarzfäule - ein neues Problem im deutschen Weinbau. *Die Winzer-Zeitschrift* 19[6], 28-29.
- Molitor D. (2009): Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben. Dissertation
- Zhang J. K., L. Hausmann, R. Eibach, L. J. Welter, R. Töpfer, E. M. Zyprian. (2009): A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa' x 'Riesling') x rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* x *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 1039-1051.

## Die Bedeutung sekundärer Pflanzenstoffe bei der Vergrämung von Wühlmäusen

The repelling effect of secondary plant compounds against voles

Fischer, D.<sup>1/2</sup>, Prokop, A.<sup>2</sup>, Mattes, H.<sup>3</sup>, Wink, M.<sup>4</sup>, Jacob, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung, Toppheideweg 88, 48161 Münster

<sup>2</sup>W. Neudorff GmbH KG, An der Mühle 3, 31860 Emmerthal

<sup>3</sup>Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Landschaftsökologie, AG Biozönologie, Robert-Koch-Str. 26, 48149 Münster

<sup>4</sup>Universität Heidelberg, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB),

Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg

Kontakt: daniela.fischer@jki.bund.de

### Zusammenfassung

Wühlmäuse, insbesondere Schermäuse (*Arvicola spec.*) und Feldmäuse (*Microtus arvalis*), sind seit jeher als Schädner bekannt. Sie befallen landwirtschaftliche und kleingärtnerisch genutzte Flächen und verursachen dort mitunter beträchtliche Pflanzenschäden. Herkömmliche Bekämpfungsmethoden wie Rodentizide und Schlagfallen können zwar Schäden durch Wühlmäuse minimieren, stellen aber auch Risiken für Nichtzielorganismen dar. Bislang auf dem Markt vertriebene Vergrämungsmittel und -geräte, der Anbau bestimmter Pflanzenarten, das Einbringen von bodenlosen Flaschen und die Anwendung anderer „Hausmittel“ brachten hingegen bislang nicht den erwünschten Erfolg.

Deshalb wurde von 2007 bis 2010 in einem von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Gemeinschaftsprojekt des Julius Kühn-Instituts, der Firma Neudorff GmbH KG und dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg an der Entwicklung eines nachhaltigen Pflanzenschutzverfahrens zur Abwehr von Wühlmäusen gearbeitet. Im Fokus stand die Abwehr und Vertreibung der Wühlmaus von Kulturflächen durch Repellentien auf Basis sekundärer Pflanzenstoffe. Dabei wurde darauf geachtet, dass das fertige Produkt anwenderfreundlich, umweltschonend und toxikologisch unbedenklich ist. Zudem sollten die Pflanzenstoffe problemlos erhältlich und kostengünstig sein. Ein wirkungsvolles Vergrämungsmittel könnte in der Zukunft nicht nur Schäden reduzieren, sondern auch den Einsatz von Schlagfallen und Rodentiziden deutlich minimieren. Die Risiken für Nichtzielorganismen könnten gleichzeitig verringert werden. Im Projekt wurden die Wühlmäuse mit verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen konfrontiert die unter anderem geruchlich vergrämend auf die Wühlmäuse wirken sollten.

Dazu konnten Schermäuse in einem T-Labyrinth zwischen einer mit einem Pflanzenstoff „bedufteten“ Testbox und einer „unbedufteten“ Kontrollbox wählen. Die Substanzen galten als repellent, wenn die Schermäuse sich deutlich weniger in der Testbox aufhielten. In dieser Versuchsreihe wurden vier pflanzliche Stoffe gefunden, die vergrämend wirkten. Sie gehören zu den Pflanzenfamilien Piperaceae (Mann-Whitney-U-Test,  $p=0,005$ ), Rutaceae ( $p=0,006$ ), Geraniaceae ( $p=0,046$ ) und Amaryllidaceae ( $p=0,046$ ). Diese Stoffe wurden anschließend in Kombination getestet, jedoch ohne einen gesteigerten Vergrämungseffekt festzustellen. Die Wirkung der zwei effektivsten Pflanzenstoffe (Piperaceae und Rutaceae) werden derzeit an Schermäusen und Feldmäusen in Gehege- und Freilandversuchen überprüft. Die Stoffe werden dabei als Schaum oder Spray in die Gänge der Wühlmäuse appliziert.

Stichwörter: *Arvicola spec.*, Feldmaus, Geruchsstoffe, *Microtus arvalis*, Repellent, Schermaus, sekundäre Pflanzenstoffe, T-Labyrinth, Vergrämung, Wühlmaus

## Abstract

Voles, especially water voles (*Arvicola spec.*) and common voles (*Microtus arvalis*), are known as pest voles. They cause enormous damage in agriculture, horticulture, orchards and home gardens. Traditional methods, for example rodenticides and kill traps to combat voles, could effectively minimize the damage, but put non-target organisms at risk. Currently available means such as the growing of special plants, placing broken glass bottles in the soil and other household remedies to repel voles are often ineffective.

Based on the need for sustainable measures to combat vole damage a cooperative project (Julius Kühn-Institute, Neudorff GmbH KG, Institute for Pharmacy and Molecular Biotechnology of the University Heidelberg) funded by the Federal Agency for Agriculture and Food aims to develop a vole repellent. Focus was the deterrence of voles with secondary plant compounds. The product should be user-friendly, environmental friendly and non-toxic. Furthermore, the plant species required for obtaining the active substance have to be widely available and their production sustainable. The identification of an effective and sustainable vole repellent could not only help reducing damage to crops but also minimise the use of kill traps and rodenticides.

In this project voles were exposed to various secondary plant metabolites to study their repulsive olfactory effect on the animals. The effect of volatile substances on water voles was tested in a T-maze. The voles could choose between a test box including a test substance and a control box without odour. The extracts were considered to be a potential repellent if the test box was avoided most of the time. Four plant substances repelled water voles. They belong to the plant families of Piperaceae (Mann-Whitney-U-test,  $p=0.005$ ), Rutaceae ( $p=0.006$ ), Geraniaceae ( $p=0.046$ ) and Amaryllidaceae ( $p=0.046$ ). Combinations of these substances did not significantly increase the repelling effect compared to the use of single substances. The two most effective single substances (Piperaceae and Rutaceae) are currently being tested in enclosure and field trials with water voles and common voles. Recent results of these trials testing the effect of a burrow application with foam and spray carriers will be presented.

Keywords: *Arvicola spec.*, common vole, deterrent, *Microtus arvalis*, odour, repellent, secondary plant compounds, T-maze, water vole, vole

## **Ausbreitungsdynamik von Feldmäusen in Agro-Ökosystemen**

Dispersal dynamics of common voles in agro-ecosystems

Leukers, A.<sup>1,2</sup>, Jacob, J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Landschaftsökologie,  
Robert-Koch-Str. 26-28, 48149 Münster

<sup>2</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,  
Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Arbeitsgruppe Wirbeltierforschung,  
Toppeideweg 88, 48161 Münster  
Kontakt: Angela.Leukers@jki.bund.de

### **Zusammenfassung**

Feldmäuse (*Microtus arvalis*) breiten sich von Refugien (z.B. Ackerrandstreifen) auf Ackerflächen aus und können dadurch vor allem bei hohen Abundanzen signifikante Ernteverluste in Land- und Forstwirtschaft verursachen. Bei Massenvermehrungen können mehr als 1.000 Individuen pro Hektar auftreten. Gegenmaßnahmen könnten sich räumlich und zeitlich gezielt auf sehr kleine Areale (Refugien, Grenzflächen) beschränken, wenn es gelingt, die Feldmäuse rechtzeitig an der Ausbreitung zu hindern. Damit könnten massiver Befall und resultierende Pflanzenschäden verringert werden. Gleichzeitig würde die Aufrechterhaltung kleiner, von Mäusen besiedelten Rückzugsflächen der Nahrungsversorgung einer Vielzahl von Beutegreifern dienen. Für das Verständnis der Ausbreitungsdynamik und für die Entwicklung gezielter und umweltschonender Gegenmaßnahmen sind fundierte Kenntnisse der dem Dispersionsdruck zugrunde liegenden Prozesse eine wichtige Voraussetzung.

In diesem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Projekt wird deshalb untersucht, welche Umweltfaktoren den Dispersionsdruck beeinflussen und nach welchem Verteilungsmuster die Ausbreitung auf dem Acker erfolgt. Auf dieser Basis sollen geeignete Methoden für ein nachhaltiges Feldmaus-Management entwickelt werden.

Als experimentelles, reproduzierbares Untersuchungsdesign wurden auf Versuchsflächen in Sachsen-Anhalt Grünlandflächen um Windkraftanlagen ausgewählt, von denen aus angrenzende Ackerflächen von Feldmäusen besiedelt werden. Seit Oktober 2009 werden monatlich mittels Fang-Wiederfang-Serien Populationsentwicklung und Dispersionsdruck von den Refugien auf den Acker gemessen. Die Wiederfangwahrscheinlichkeit pro Individuum innerhalb einer Fangserie liegt bei ca. 50 %.

Der Winter 2009/10 war durch eine langanhaltende Schneedecke geprägt und resultierte in einem verzögerten Beginn der Vegetationsperiode in 2010. Mindestens 30% der Frühjahrspopulation 2010 stammte aus Überwinterern. Im Mai setzte die Reproduktion ein, im Juni/Juli fand ein Turnover statt. August 2010 vervierfachte sich die Population sprunghaft, hochgerechnet entsprach die Populationsdichte in den Refugien maximal 750 Tiere pro ha. Es wurde Radio-Telemetrie eingesetzt, um die Ausbreitungsdynamik für einzelne Individuen zu untersuchen. Alle besenderten Tiere kehrten innerhalb von zwei Tagen ins Refugium zurück. Durch den Einsatz einer ferngesteuerten Mikrodrohne wurde die Feldmausaktivität auf dem Acker beobachtet, um ein mögliches Verteilungsmuster der Population analysieren zu können. Entsprechend der Telemetrie-Ergebnisse konnte keine Feldmausaktivität auf dem Acker festgestellt werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Populationsgröße in den Refugien noch weiter ansteigen kann, bevor es zu einer Abwanderung auf Grund des Dispersionsdrucks kommt. Auch die Feldbewirtschaftung (schwarzer Acker im Winter, Grubbern bzw. Pflügen) könnte einen Einfluss auf die Feldmausaktivität auf dem Acker haben.

Die Untersuchungen zum Dispersionsdruck und zur Ausbreitungsdynamik werden in 2011 fortgesetzt. Abschließend sollen verschiedene Management-Methoden getestet werden (Barrierezäune und -furchen, Fangwannen), die eine Ausbreitung der Feldmäuse aus den Refugien minimieren und so möglicherweise die Befallsdichte auf landwirtschaftlichen Nutzflächen reduzieren können.

Stichwörter: *Microtus arvalis*, Dispersionsdruck, Ausbreitungsmuster

### **Abstract**

At high abundances, common voles (*Microtus arvalis*) can cause significant losses in agriculture and forestry, because they can disperse from refuges (e.g. field edges) to arable land. Preventing voles from dispersing from refuges to the field is useful to minimise infestations and crop damage. Sound knowledge about the key environmental factors triggering the dispersion pressure is required for understanding dispersal patterns and to allow timely action. Management actions could be conducted more targeted in space and time and would be ecologically and economically more effective. At the same time, small areas with sufficient vole abundance can be maintained because voles are an important food source for a variety of predators.

This study, funded by the German Federal Environmental Foundation, aims to investigate which distribution patterns of voles occur at field-refuge-boundaries as a basis to develop appropriate methods for sustainable vole management.

Field sites for this study are located between Magdeburg and Halle in Saxony-Anhalt, Germany. The circular grassland areas below wind energy plants, from which common voles invade fields, are used as replicated experimental refuges. Since October 2009, population parameters and dispersion pressure have been measured monthly. Recapture probability within a trapping session was about 50 %. A stable population in March 2010 indicated good winter survival. Reproduction activity started in May; a population turnover could be detected in June/July. A considerable population increase in August led to an extrapolated vole density in the refuges of up to 750 individuals per hectare. However, radio-telemetry and aerial pictures revealed no distribution onto the fields so far.

A further increase of the refuge population may be necessary before dispersion pressure leads to migration. The analysis of dispersal dynamics will be continued and appropriate management methods will be tested in the last year of the study.

Keywords: common vole, dispersion pressure, dispersal patterns

## Zusammenhang zwischen Mikrohabitatstrukturen, Nahrungsverfügbarkeit und Abundanz von Waldnagern

The impact of microhabitat structures and food availability on the abundance of forest rodents  
Kühn, K.<sup>1,2</sup>, Reil, D.<sup>1</sup>, Imholt, C.<sup>1</sup>, Mattes, H.<sup>2</sup>, Jacob, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen,  
Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, AG Wirbeltierforschung,  
Toppheideweg 88, 48161 Münster

<sup>2</sup>Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Landschaftsökologie,  
AG Bioökologie, Robert-Koch-Str. 26-28, 48149 Münster  
Kontakt: katarina.kuehn@uni-muenster.de

### Zusammenfassung

Zur Untersuchung kleinräumiger Habitatnutzung von Waldnagern wurden in drei Wäldern in Nordrhein-Westfalen, Kreis Coesfeld, in 70x70 m großen Untersuchungsplots Habitatparameter aufgenommen und die Nagerabundanz mit Hilfe mehrfängiger Lebendfallen erfasst. In den Plots wurde die Bodenbedeckung (%), die Höhe der Bodenbedeckung (cm), die Deckung der Strauchschicht (%), sowie die Anzahl der Bäume und das Totholzvorkommen (%) kartiert. Die Erfassung erfolgte im Frühjahr, Sommer und Herbst 2010. Lediglich für die Rötelmaus (*Myodes glareolus*) zeigte sich eine leicht positive Korrelation ( $R^2 = 0,19$ ) der Deckung der Strauchschicht (%) im Frühjahr/ Herbst auf die Abundanz der Mäuse (Anzahl gefangener Individuen). Die Mikrohabitatstrukturen im Wald sind vermutlich zu kleinräumig verteilt, um sich direkt auf die Abundanz auszuwirken.

Die Populationsgröße der Waldnager ist zudem u.a. vom Nahrungsangebot abhängig. So können hohe Abundanzen von Waldnagern mit einer Mast von bestimmten Forstbäumen im Vorjahr korreliert sein. Mastjahre sind Jahre in denen Waldbäume eine außergewöhnlich starke Samenproduktion zeigen. Mastjahre sind wahrscheinlich klimatisch bedingt, weshalb auch deren Frequenz Schwankungen unterliegen kann. Das Wetter während der Sommermonate im Vorjahr muss warm und trocken gewesen sein, um im darauffolgenden Jahr die Fruktifikation der Buche (*Fagus sylvatica*) zu fördern (Gruber 2003). Starke Regenfälle im Frühjahr desselben Jahres, sowie Frostereignisse und Hagelstürme haben dagegen einen negativen Einfluss auf die Blüte und anschließende Samenproduktion (Övergaard et al. 2007). Mastjahre können bei Waldnagern zur Verlängerung der Fortpflanzungsperiode bis in den Winter hinein, sowie zu einer verringerten Wintersterblichkeit und somit zu hohen Abundanzen im folgenden Jahr führen (Pucek et al. 1993; Tersago et al. 2009).

In Niedersachsen lagen über einen Zeitraum von 16 Jahren (1993-2009) Zeitserien über die Abundanzentwicklung der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) und über die Buchenfruktifikation vor (Datenquelle: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt). Es konnte gezeigt werden, dass in 100 % der Fälle ein positiver Trend der Fruktifikation der Buche (*Fagus sylvatica*) im Vorjahr und eine positive Wachstumsrate der Rötelmauspopulation im darauffolgenden Jahr übereinstimmten. Ebenso stimmten in 75 % der Fälle ein negativer Trend der Fruktifikation im Vorjahr und eine negative Populationsentwicklung der Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) im nachfolgenden Jahr überein.

Für Nordrhein-Westfalen lagen Zeitserien über die Populationsdynamik von Erdmaus (*Microtus agrestis*) und Feldmaus (*Microtus arvalis*), sowie Daten über Mastjahre der Buche (*Fagus sylvatica*) über einen Zeitraum von 15 Jahren (1989-2004) vor (Datenquelle: Landesbetrieb Wald und Holz Nordrhein-Westfalen). Hier stimmten nur bei 38 % ein positiver/ negativer Wachstumstrend der Population und ein positiver/ negativer Trend der Fruktifikation im Vorjahr überein. Diese im Vergleich zur Situation bei der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) geringe Übereinstimmung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Erdmaus (*Microtus agrestis*) und Feldmaus (*Microtus arvalis*) eher auf Jungwuchs- und Aufforstungsflächen vorkommen, wo die

Arten im Nahrungsspektrum weniger auf Baumsamen angewiesen sind als Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) und Buchenmasten eine geringere Rolle spielen dürften (Niethammer und Krapp 1978, 1982; Bäumler 1981; Rooney und Hayden 2002).

Zusammenfassend wurde bei der Analyse auf einer kleinräumigen Ebene nur ein geringer Einfluss der Mikrohabitatstrukturen auf die Abundanzverteilung von Waldnagern gezeigt werden. Regional konnte dagegen ein deutlicher Zusammenhang zwischen Nahrungsverfügbarkeit (Mastjahre bei Buchen) und Waldnagern, insbesondere der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) dargestellt werden.

Stichwörter: Habitatstrukturen, Buchenmast, *Myodes glareolus*, *Apodemus spec.*

### Abstract

The aim of this study was to investigate small-scale habitat use of forest rodents. Therefore, habitat parameters and abundance of forest rodents were monitored in 70x70 m study plots, which were located in North Rhine-Westphalia, Germany. During live trapping in spring, summer and autumn 2010, habitat structure (ground cover [%], vegetation height of herb level [cm], shrub cover [%], dead wood cover [%], number of trees) was recorded. Analyses of abundance data (number of captured individuals) showed that only the number of bank voles (*Myodes glareolus*) was slightly positively correlated with shrub cover (%) in spring/ fall ( $R^2 = 0,19$ ). Probably, micro-habitat structures in forests are too small-scaled to have a direct impact on rodent abundance.

The population size of forest rodents also depends on food availability. High abundance of forest rodents can be correlated to masting of forest trees when seed production is at peak. Mast years are probably dependent on climatic conditions, hence their frequency fluctuates. The fructification of trees may be promoted by warm and dry summer months in the previous year (Gruber 2003). Heavy rains in the spring of the present year, frost events and hailstorms have a negative influence on flowering and tree seed production (Övergaard et al. 2007). High tree seed production can extend the forest rodents' breeding period until winter and reduce winter mortality, which may lead to an increase of the abundance of forest rodents in the following year (Pucek et al. 1993; Tersago et al. 2009).

In Lower Saxony, Germany, the abundance fluctuation of bank voles (*Myodes glareolus*) during 16 years (1993-2009) was correlated to masting years of beech (*Fagus sylvatica*), (Data source: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt). High beech fructification in the previous year and a positive population growth rate of bank voles (*Myodes glareolus*) in the following year were to 100 % positively correlated. Similarly, lower fructification was followed by a year with negative population growth of the bank voles (*Myodes glareolus*) in 75 % of the cases.

In North Rhine-Westphalia population dynamics of field vole (*Microtus agrestis*) and common vole (*Microtus arvalis*) were compared to beech masting years over a period of 15 years (1989-2004), (Data source: Landesbetrieb Wald und Holz Nordrhein-Westfalen). Here, positive as well as negative relations of growth rate and preceding fructification correlated in only 38 % of the cases. This was probably linked to the habitat preferences (afforestation and young stands areas) of field vole (*Microtus agrestis*) and common vole (*Microtus arvalis*), where beech masts are less important. Additionally, these two species are less dependent on beech seeds than bank voles (*Myodes glareolus*) (Niethammer and Krapp 1978, 1982; Bäumler 1981; Rooney and Hayden 2002).

In summary, on a small-scale level only a small influence of microhabitat structure on the abundance of forest rodents was shown. However, a clear link between food availability (mast years of beech trees) and bank voles (*Myodes glareolus*) was identified at regional scale.

Keywords: habitat structure, beech mast, *Myodes glareolus*, *Apodemus spec.*

Diese Studie wird durch das Umweltbundesamt im Rahmen des Umweltforschungsplanes des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (FKZ 3710 63 401, Koordinator: Dr. Jens Jacob) und durch das Robert Koch-Institut (FKZ 1362/1-924, Koordinator: PD Dr. Rainer G. Ulrich) unterstützt.

## Literatur

- Bäumler, W. (1981): Zur Verbreitung, Ernährung und Populationsdynamik der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) und der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) in einem Waldgebiet der Bayrischen Alpen. Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz **54** (4), 49-53.
- Fitzgerald, B. M., M. G. Erford, B. J. Karl. (2004): Breeding of house mice and the mast seeding of southern beeches in the Orongorongo Valley, New Zealand. New Zealand Journal of Zoology **31**, 167-184.
- Gruber, F. (2003): Steuerung und Vorhersage der Fruktifikation bei der Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) für den Standort Zierenberg 38A und den Level I Flächen von Hessen durch die Witterung. Allgemeine Forst und Jagdzeitung **174** (4), 67-79.
- Niethammer, J., F. Krapp, F. (Hg.): Handbuch der Säugetiere Europas. Nagetiere I., Band 1 Wiesbaden, Akademische Verlagsgesellschaft 1978, 476 S.
- Niethammer, J.; Krapp, (Hrsg.): Handbuch der Säugetiere Europas. Nagetiere II, Band 2/1 Wiesbaden, Akademische Verlagsgesellschaft, 1982, 649 S.
- Övergaard, R., P. Gemmel, M. Karlsson. (2007): Effects of weather conditions on mast year frequency in beech (*Fagus sylvatica*) in Sweden. Forestry **80** (5), 555-565.
- Pucek, Z., W. Jedrzejewski, B. Jedrzejewska, M. Pucek. (1993): Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Bialowieza National Park) in relation to weather, seed crop, and predation. Acta Theriologica **38** (2), 199-232.
- Rooney, S., T. J. Hayden. (2002): Forest Mammals - Management and Control. Dublin, COFORD, 77 S.
- Tersago, K., R. Verhagen, A. Servais, P. Heyman, G. Ducoffre, H. Leirs. (2009): Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. Epidemiology and Infection **137** (2), 250-256.

## Veröffentlichungen des JKI

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

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

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

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

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

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

Anschrift für **Tauschsendungen**:

Please address **exchanges** to:

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

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

Informationszentrum und Bibliothek

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Königin-Luise-Straße 19

D-14195 Berlin, Germany

E-Mail: [ib@jki.bund.de](mailto:ib@jki.bund.de)

