

Erstnachweis einer Wirkortresistenz von Tauber Trespe (*Bromus sterilis*) gegenüber ACCase-Hemmern

*First record of target-site-resistance of poverty brome (*Bromus sterilis*) to ACCase inhibitors*

Dominik Dicke^{1*}, Jean Wagner², Eberhard Cramer³ und Manfred Kirchner⁴

¹Regierungspräsidium Gießen, Pflanzenschutzdienst Hessen, Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar,

²Plantalyt GmbH, Vahrenwalder Straße 269A, 30179 Hannover

³Regierungspräsidium Gießen, Pflanzenschutzdienst Hessen, Am Versuchsfeld 17, 34128 Kassel

⁴Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH), Honer Straße 49, 37269 Eschwege

*Korrespondierender Autor, dominik.dicke@rpgi.hessen.de



DOI 10.5073/jka.2014.443.039

Zusammenfassung

In einem Rapsfeld in Ost-Hessen wurden im Jahr 2011 Minderwirkungen von Graminiziden gegenüber Tauber Trespe (*Bromus sterilis*) auffällig. Der Standort wird seit über 25 Jahren nicht wendend bewirtschaftet und wies vor der Herbizidbehandlung eine starke Trespenverungrasung mit mehr als 1000 Pflanzen je m² auf. Sowohl Pflanzen von Tauber Trespe dieser Herkunft als auch eines Standortes in Ostwestfalen mit geringer Ungrasdichte (10 Pflanzen/m²) und ohne Resistenzverdacht wurden in Töpfen angezogen. Die Pflanzen wurden mit verschiedenen Herbiziden unterschiedlicher Wirkstoffklassen jeweils mit der vom Hersteller empfohlenen und der doppelten Aufwandmenge behandelt. Der Zeitpunkt der Applikation orientierte sich an den spezifischen optimalen Einsatzterminen der Herbizide. Die Wirkungsbonitur ergab deutliche Unterschiede in der Bekämpfungsleistung der Herbizide zwischen den Herkünften und den Aufwandmengen. Die Wirkung der Herbizide Agil und Focus Ultra war mit z.T. über 90 % in der ostwestfälischen Herkunft signifikant höher als in der osthessischen Herkunft, wo etwa ein Wirkungsgrad von 20-30 % erreicht wurde. Um dem Verdacht einer Target-Site Resistenz gegen ACCase-Inhibitoren nachzugehen wurde eine molekulargenetische Analyse von 7 polymorphen Stellen des ACCase-Gens in einzelnen Pflanzen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der hessischen Trespenpopulation eine Wirkort-Resistenz vorliegt, bei der Isoleucin an der Position 2041 durch Asparagin ersetzt wird (Ile2041-Asn).

Stichwörter: ACCase-Hemmer, Herbizide, Taube Trespe, Wirkortresistenz

Abstract

In 2011 reduced efficacy of grass weed herbicides to poverty brome (*Bromus sterilis*) was observed in oilseed rape on a site in East Hessen. The field was cultivated by using the ploughless tillage system more than 25 years. The site showed high densities of poverty brome (>1000 plants/m²) prior to herbicide treatment. Poverty brome seeds were collected in 2012 in the hessian oilseed rape field and from a site in East Westphalia, where poverty brome appeared at low densities (10 plants/m²) and was not suspected to resistance. The seeds were sown in to pots and plants cultivated. The plants were treated with two application rates (normal dose, double dose) with herbicides of different HRAC-classes. The time of treatment was adjusted to the best expectable treatment/efficiency conditions of the individual herbicides (see chapter 3). Clear differences in efficacy that were caused by herbicide, the origins of poverty brome and the dosages were recorded via visual rating eight weeks after spraying. The herbicides Agil and Focus Ultra were able to control about 90% of the poverty brome plants of the East Westphalia site origin. However, only 20-30% of the Hessian plants could be knocked out by the same herbicides. The ACCase-gene of single poverty brome leaf samples from the hessian site was analyzed after resistance assessment. A molecular genetic analysis on 7 variable positions identified target site resistance: Isoleucine (Ile) was replaced by asparagine (Asn) at position 2041.

Keywords: ACCase inhibitors, Herbicides, Poverty brome, Target site resistance

Einleitung

Seit einigen Jahren nimmt der Ungrasanteil am Gesamtspektrum der Begleitvegetation in den ackerbaulichen Kulturen zu, wie Beobachtungen der amtlichen Schaderregerüberwachung zeigen:

Die Betriebe wachsen an Fläche und nutzen vermehrt zeit- und arbeitssparende Bodenbewirtschaftungsverfahren (KASSAM und FRIEDRICH, 2010). Profis, die aus Gründen des Erosionsschutzes etc. ihren Boden konservierend und nicht wendend bewirtschaften, haben die

systembedingte Gefahr der zunehmenden Verungrasung im Blick und wirken dieser aktiv entgegen. Allgemein liegt der Hauptgrund des Pflugverzichts bei den Landwirten allerdings in der Ersparnis an Arbeit und Zeit (TEBRÜGGE und BÖHRESEN, 2001). Die Vermutung liegt nahe, dass längst nicht alle Praktiker, die auf den Pflug verzichten, das System auch konsequent durchdrungen haben und durch Fehler zunehmend Ungrasprobleme auf ihren Feldern heranzüchten. Hinzu kommt, dass im Herbst oft früh mit der Bestellung und Aussaat der Flächen begonnen wird, um überhaupt bis Vegetationsende fertig zu werden. Dadurch keimt der Hauptanteil der Ungräser im bereits gesäten Bestand. Darüber hinaus ist der Anteil der Winterungen in der Fruchtfolge aus wirtschaftlichen Gründen sehr hoch, sodass winterannuelle Ungräser, wie z. B. Ackerfuchsschwanz und Windhalm etc., innerhalb der Fruchtfolge bevorteilt werden. Wenn ackerbauliche Maßnahmen wie oben beschrieben erfolgen, ist die Verungrasung i.d.R. sehr stark und der gesamte Druck der Ungraskontrolle liegt allein auf der chemischen Bekämpfung durch Herbizide. Je höher der Ungrasdruck in den Flächen, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von natürlich vorkommenden resistenten Biotypen. In den letzten drei Dekaden sind bei den Herbiziden keine neuen Wirkstoffgruppen auf den Markt gekommen. Bei der Verwendung immer gleicher Wirkstoffgruppen, sei es durch eingeschränkte Fruchtfolgen, fehlendes Fachwissen, oder bedingt durch den Mangel an Wirkstoffgruppen, werden resistente Pflanzen herausselektiert und vermehren sich. In Hessen liegt der Fokus bei der Ungraskontrolle derzeit schwerpunktmäßig auf der Bekämpfung von Ackerfuchsschwanz, gefolgt von Windhalm. Seit 2008 wird die Resistenzsituation beim Ackerfuchsschwanz landesweit via Monitoring beobachtet und die Tendenz geht in die Richtung der Zunahme von Biotypen, die gegen ACCase und ALS-Hemmer resistent sind. Ebenso gibt es zunehmend Fälle von Windhalmresistenz gegenüber ALS-Hemmern. Zunehmend rückt jedoch auch die Taube Trespe (*Bromus sterilis*) ins Blickfeld, die besonders auf Standorten mit Minimalbodenbearbeitung beobachtet wird. Auf einem osthessischen Standort, der seit Jahren pfluglos bewirtschaftet wird und eine starke Trespenverungrasung mit über 1000 Pflanzen/m² aufweist, fielen im Jahr 2011 Trespen im Raps auf, die sich mit Herbiziden gegen Ungräser der Wirkstoffklasse A nicht mehr bekämpfen ließen. Der Verdacht auf Resistenz lag nahe und wurde überprüft, was im Folgenden beschrieben wird.

Material und Methoden

Topfversuch

Im Jahr 2012 wurden auf einem Rapsfeld in Osthessen Samen der Tauben Trespe, welche in einem Herbizidversuch die dreifache vom Hersteller empfohlene Aufwandmenge des Herbizides Agil (3,0+3,0 l/ha) überlebt hatten, im Stadium der Totreife geerntet. Ebenso wurden Samen von Tauber Trespe eines ostwestfälischen Standortes geerntet, auf dem erstmalig Trespen auftraten. Die Samen beider Herkünfte wurden am 19.09.2012 getrennt in Töpfen ausgesät. Als Substrat wurde ein Ackerboden der Region um Wetzlar verwendet, der vorher gedämpft worden ist, um die im Boden vorhandenen Unkrautsamen abzutöten. Die Aussaatmenge betrug für jede Herkunft 20 Samen je Topf. Die Samen wurden mit einer dünnen Quarzsandschicht abgedeckt; der Topfinhalt wurde feucht gehalten.

Es wurde ein 6-fach wiederholter Wirksamkeitsversuch angelegt. Getestet wurden 2 Herkünfte, 7 Herbizide sowie 2 Aufwandmengen. Details zum Versuch sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Herbizidapplikationen erfolgten mit einer stationären Schachtnerspritze. Nach der Applikation wurden die Töpfe auf Tischen in einem dem Gewächshaus anschließenden Drahtkäfig im Freien platziert. Die Bewässerung erfolgte nach der Herbizidbehandlung „über Kopf“.

Tab. 1 Herbizide und Aufwandmengen des Wirksamkeitsversuches.**Tab. 1** *Herbicides and doses used in the efficacy experiment.*

Herbizide	Aufwandmenge (l, kg/ha) + FHS	
	Jeweils normal	Jeweils doppelt
Kontrolle(1)	0	0
Agil (2)*	1,0 + 1,0	2,0 + 2,0
Focus Ultra (3)*	2,5 + 1,0	5,0 + 2,0
Broadway (4)*	0,275 + 1	0,55 + 2
Atlantis (5)*	0,5 + 1,0	1,0 + 2,0
Attribut (6)*	0,1 + 1,0	0,2 + 2,0
Beflex (7)**	0,5	1
Select (8)*	0,5 + 1,0	1,0 + 2,0

*Behandlungstermin: 23.10.12 (BBCH 12-13); **Behandlungstermin Beflex: 28.09.12 (BBCH 00-09)
FHS=Formulierungshilfsstoff

Die Wirkungsbonitur erfolgte am 07.01.2013 und der erzielte Wirkungsgrad wurde für jeden Topf nach ABBOTT (1925) berechnet. Basis des jeweiligen Wertes in „Unbehandelt“ war das arithmetische Mittel aus der Anzahl der Pflanzen in den Kontrollen getrennt nach Herkünften.

Alle Daten der Wirkungsbonitur wurden als Blockanlage statistisch mit SAS 9.2 verrechnet. Die Ergebnisse werden unter Gliederungspunkt 3.1 mit Hilfe von Boxplotdiagrammen dargestellt.

Molekulargenetische Analyse

Für die molekulargenetische Analyse wurde Blattmaterial von fünf Trespen der osthessischen Herkunft verwendet, welche die Herbizidapplikation mit ACCase-Hemmern im Topfversuch überlebt hatten. Die molekulargenetische Analyse einer Wirkort-Resistenz gegen ACCase-Inhibitoren erfolgte in drei Schritten: der DNA-Extraktion aus getrocknetem Blattmaterial, einer PCR zur Amplifikation von Fragmenten der ACCase von *B. sterilis* und der SNP-Analyse von 7 polymorphen Positionen des ACCase-Gens mittels Pyrosequenzierung. Die Analyse erfolgte mit 20 mg getrocknetem Blattmaterial von individuellen Pflanzen, die nach Behandlung und nach Resistenzbewertung geerntet wurden. Aus dem Blattmaterial wurde die DNA mit einem kommerziell erhältlichen Kit präpariert. Mittels PCR wurden dann aus der Gesamt-DNA kurze DNA-Fragmente des ACCase-Gens vervielfältigt, die die Informationen der polymorphen Positionen enthielten. Als Grundlage für das Design von PCR und Pyrosequencing diente das ACCase-Gen von *Bromus secalinus* (NCBI-Eintrag AJ966448.1).

Für die Amplifikation mittels PCR wurden verschiedene Sets von Primer-Paaren eingesetzt. Für die polymorphe Position 2041 wurden die Primer Fwd-Pyr-ACCCase2041_BROSS und Rew-Pyr-ACCCase2041_BROSS eingesetzt (Tab. 2). Das erwartete Fragment war 206 bp lang. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit einem kommerziellen Master-Mix Kit durchgeführt. Die Konzentration der Primer betrug 0,4 µM (jeweils) und als PCR-Template wurden 3 µl der DNA-Extrakte eingesetzt.

Tab. 2 Primer zur Amplifikation des ACCase-Abschnittes mit Sequenz der polymorphen Position Ile/Asn 2041.

Tab. 2 *Primer for amplification of ACCase fragments that contains the sequence for Ile/Asn 2041.*

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temp	Länge des PCR-Fragments
Fwd-Pyr-ACCCase2041_BROSS	TCCTCGTGCTGGCAAGT	54 °C	206 bp
Rew-Pyr-ACCCase2041_BROSS	GTGGGCAAAGACCTTTTGA		

Tab. 3 Primer zur Sequenzierung (Pyrosequencing) und Pipettierschema der Nukleotide (Sequence to analyze) im Pyrosequencingverfahren.

Tab. 3 *Primer for sequencing (Pyrosequencing) and pipetting scheme for nucleotides (sequence to analyze) that is used for pyrosequencing.*

Sequenzier-Primer	Sequenz (5'-3')	Sequence to analyze
Seq-ACCCase2041_BROSS	GCAAAGAGACCTTTTGAAGGA	RWTCTGCAG

Erläuterungen: R= Nukleotid in der Sequenz kann A oder G sein, W= A oder T

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler mit dem folgendem Temperatur-Profil gefahren: Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, danach 40 Zyklen (Denaturierung: 94 °C, 20 s, Annealing: Je nach PCR bzw. Primer-Kombination, für 2041 siehe Tabelle 2, 20 s und Elongation bei 72 °C für 20 s). Die PCR-Produkte wurden auf einem Pyrosequencer (PSQ 96MA) analysiert. Für die Sequenzierung wurde der Primer Seq-ACCCase2041_BROSS (Tab. 3) verwendet.

Das Verfahren für die sechs weiteren polymorphen Positionen war identisch. Für jede polymorphe Position wurden individuelle Primer-Kombinationen eingesetzt (nicht dargestellt). Nach PCR für die Positionen Ile/leu1781, Trp/Cys1999, Trp/Cys2027, Asp/Gly2078, Cys/Arg2088 und Gly/Ala2096 erfolgte eine Analyse mittels Pyrosequencing. Die Analyse der Proben am Pyrosequencer erfolgte nach Anleitung des Geräte-Vertreibers (Qiagen).

Ergebnisse

Ergebnisse des Topfversuches

Die Boxplotdarstellung (Abb. 1) zeigt die Ergebnisse des Topfversuches. Die Wirkungsbilanz ergab deutliche Unterschiede in der Bekämpfungsleistung der Herbizide zwischen den Herkünften und den Aufwandmengen.

Die Wirkungsspanne der Herbizide Atlantis WG und Attribut (40 – 60 % Wirkungsgrad) unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Herkünften. Eine Verdopplung der Aufwandmenge führte insgesamt nur zu leichten Wirkungsverbesserungen. Das Präparat Broadway erzielte in der ostwestfälischen Herkunft Wirkungsgrade um 80 %. Die ostthessische Herkunft wurde mit diesem Mittel nur zu 20 % bekämpft. Die Wirkung der Herbizide Agil und Focus Ultra war mit z.T. über 90 % in der ostwestfälischen Herkunft signifikant höher als in der ostthessischen Herkunft, wo etwa ein Wirkungsgrad von 20 – 30 % erreicht wurde. Eine Verdopplung der Aufwandmenge brachte bei Agil keinen Effekt, während diese Maßnahme bei Focus Ultra einen Anstieg von ca. 50 Prozentpunkten auf mehr als 70 % Wirkungsgrad nach sich zog.

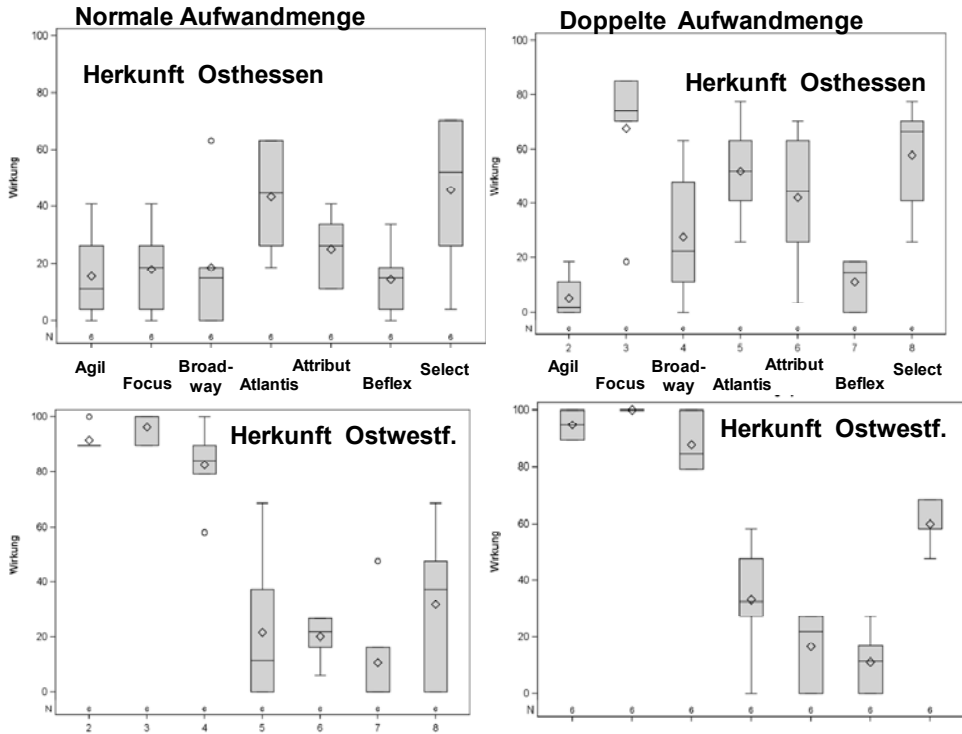


Abb. 1 Wirkung unterschiedlicher Herbizide in zwei Herkünften von Tauber Trespe.

Fig. 1 Efficacy of different herbicides in two origins of poverty brome.

Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse

In allen fünf Blattproben zeigten die Positionen Ile/leu1781, Trp/Cys1999, Trp/Cys2027, Asp/Gly2078, Cys/Arg2088 und Gly/Ala2096 die Wild-Typ Allele und damit keine Wirkort-Resistenz an den entsprechenden Positionen. Im Fall von Ile/Asn2041 konnte jedoch in allen 5 Proben das Allel Asn2041 und damit eine Wirkort-Resistenz nachgewiesen werden. In zwei Proben trat diese zusammen mit dem Wild-Typ Allel auf (heterozygote Pflanzen). In den drei übrigen Pflanzen wurde das Allel reinerbig (homozygot) nachgewiesen (Abb. 2).

In den Pyrogrammen aus Abbildung 2 ist das Ergebnis für ein Ile2041 Allel (links) und ein Asn2041 Allel (rechts) im jeweils grau unterlegten Bereich dargestellt. Pyrosequencing ist eine quantitative Technik: Die Höhe des Peaks ist proportional zu der Sequenz. Befinden sich zwei identische Nukleotide hintereinander, steigt der Peak auf die doppelte Höhe eines einfachen Peaks an. Als Referenz dienen die Peaks der Sequenz außerhalb des gelb markierten Bereichs. Der gelb markierte Bereich ist der Bereich, in dem eine Variation erwartet wird, falls eine Wirkort-Resistenz vorliegt.

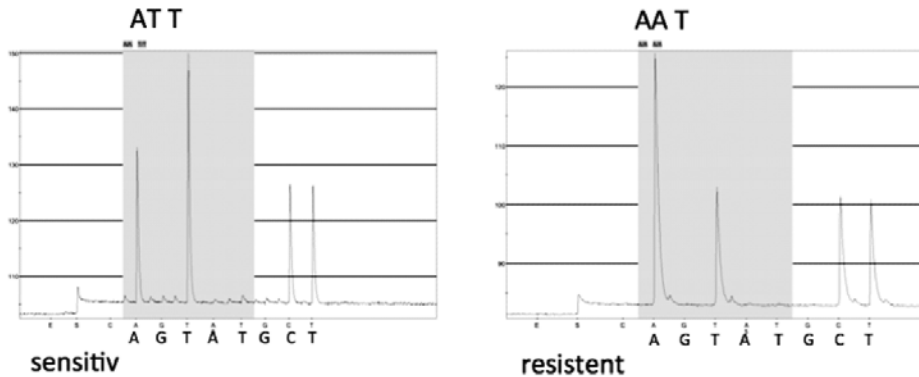


Abb. 2 Pyrogramme von sensitiven und resistenten Pflanzen der Tauben Trespe an der Position 2041 der ACCase.

Fig. 2 Pyrograms of sensitive and resistant plants of poverty brome at position 2041 of ACCase.

In der folgenden Abbildung 3 ist die Position Ile/Asn2041 dargestellt. An der Position 2041 im Protein ACCase führt ein Austausch von Isoleucin (Ile) durch Asparagin (Asn) zu einer Wirkort-Resistenz.

sensitive Pflanze (Ile2041)

... GGA - **ATT** - CTG ... DNA-Sequenz
 ... Gly - **Ile** - Leu ... Aminosäure
 ... 2040 - 2041 - 2042... Position im Protein ACCase

resistente Pflanze (Asn2041)

... GGA - **AAT** - CTG ... DNA-Sequenz
 ... Gly - **Asn** - Leu ... Aminosäure
 ... 2040 - 2041 - 2042... Position im Protein ACCase

Abb. 3 Sequenz des ACCase Allels der sensitiven und resistenten Pflanzen an der korrespondierenden Stelle 2041 im Protein und abgeleitete Aminosäuren. Erläuterungen: Asn= Asparagin, Ile= Isoleucin, Leu= Leucin, His= Histidin, erste Zeile: DNA-Sequenz, zweite Zeile: Aminosäuresequenz im Protein, dritte Zeile: Nummer der Aminosäurenposition im Protein.

Fig. 3 Sequence of ACCase of sensitive and resistant plants at the corresponding site of 1781 in the protein and derived amino acids. Explanation: Asn= asparagine, Ile= Isoleucine, Leu= Leucine, His= Histidine. First line: DNA sequence, second line: Amino acid sequence of protein, third line: numbering of amino acids.

Diskussion

Durch diese Untersuchung konnte weltweit erstmals eine Resistenz von Tauber Trespe gegenüber ACCase-Hemmern nachgewiesen werden. Das Auftreten einer Resistenz in hetero- und homozygoter Form führt bei diploiden Pflanzen wie *Bromus sterilis* zu einem Auftreten von drei verschiedenen Genotypen im Acker: Sensitive, mischerbig (heterozygot) resistente und reinerbig (homozygot) resistente Pflanzen. Die Ausprägung von homo- und heterozygoter Resistenz ist noch wenig erforscht. Bekannt ist, dass die Allele der ACCase co-dominant vererbt werden. Das bedeutet, dass in heterozygoten Pflanzen beide Allele, die des sensitiven Typs und des resistenten Typs, ausgeprägt werden. Eine Wirkort-Resistenz basierend auf einem Asn2041 Allel wurde zum ersten Mal 2003 für Ackerfuchsschwanz (*A. myosuroides*) und Weidelgras (*Lolium rigidum*) beschrieben (DELYE *et al.*, 2003). Sie bewirkt vor allem eine Resistenz gegen ACCase-Hemmer aus

der Gruppe der FOPs (z. B. Clodinafop, Fenoxaprop). Die DIMs (z. B. Cycloxydim, Clethodim) sind weniger stark betroffen bzw. sind die Resistenzgrade sehr gering. Es ist daher anzunehmen, dass vor allem FOPs die Resistenz in diesem Biotyp von Tauber Tresse selektiert haben. Die geringe Wirkung gegen Propaquizafop und die leichtere Minderwirkung gegen Cycloxydim in den Topfversuchen in diesem Beitrag belegen diese Aussage. Allerdings muss noch eine genaue Quantifizierung der Resistenz gegen die verschiedenen Wirkstoffe der ACCase in Dosis-Wirkungs-Studien durchgeführt werden. Ebenfalls ist eine Untersuchung auf ALS-Resistenz in Arbeit.

Die resistenten Pflanzen wurden auf einem Feld gefunden, in dem sich über Jahre durch einen hohen Anteil an Winterungen in der Fruchtfolge in Kombination mit pflugloser Bewirtschaftung viele Trespen ansiedeln konnten. Dadurch war die Wahrscheinlichkeit von natürlich auftretenden resistenten Biotypen von vorne herein erhöht. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, wie wichtig es ist, durch die richtigen ackerbaulichen Maßnahmen den Ungrasbesatz niedrig zu halten. LUTMAN et al (2013) berichten, dass durch den Einbau von Sommerungen bzw. den Einsatz des Pfluges die Ungrasdichte im Vergleich zum ausschließlichen Anbau von Winterungen um 88 % bzw. im Vergleich zu nicht wendenden Kultivierungsmethoden um 69 % reduziert werden kann. Die Verschiebung des Saattermins auf den Zeitraum Ende Oktober bis Anfang November kann den Ungrasdruck bis zu 50 % senken. Vor dem Hintergrund der Entwicklungen in England, wo Herbizide gegen Ackerfuchsschwanz kaum bis keine Wirkung mehr zeigen (MOSS et al., 2007), sollte beim Ungrasmanagement daher zukünftig verstärkt ein Schwerpunkt auf die ackerbaulichen Maßnahmen gelegt werden. Ansonsten werden sich Resistenzen von Ungräsern sehr zügig weiter ausbreiten, denn neue chemische Lösungen sind auf absehbare Zeit nicht in Sicht, da die Entwicklung von Herbiziden mit neuen „modes of action“ seit langer Zeit stagniert (LUTMAN et al., 2013).

Literatur

- ABBOTT, W. S., 1925: A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**, 265-267.
- DELYE, C., X.-Q. ZHANG, C. CHALOPIN, S. MICHEL und B. POWLES, 2003: An isoleucine residue within the caboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-CoA carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiology* **132**, 1716-1723.
- KASSAM, A., T. FRIEDRICH und R. DERPSCH, 2010: Conservation Agriculture in the 21st Century: A Paradigm of Sustainable Agriculture. European Congress of Conservation Agriculture, Madrid, October 2010. www.fao.org/ag/ca/CA-Publications/ECAF_congress_Madrid_2010.pdf.
- LUTMAN P. J. W., S.R. MOSS, S. COOK und S. J. WELHAM, 2013: A review of the effects of crop agronomy on the management of *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* **53**, 299-313.
- MOSS S. R., S.A.M. PERRYMAN und L. V. TATNELL, 2007: Managing herbicide-resistant black grass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. *Weed Technology* **21**, 300-309.
- TEBRÜGGE, F. und A. BÖHRENSSEN, 2001: Farmers' and experts' opinion on no-tillage in West-Europe and Nebraska (USA). In: Garcia Torres, L., L. Benites and A. Martinez Vilela: Conservation agriculture, a worldwide challenge. First World Congress on conservation agriculture, Madrid, Spain, 1-5 October, 2001. Volume 1: keynote contributions 2001, 61-69.