

Nr. 92

Tagungsband

13. Wissenschaftliche Fachtagung
7. November 2001

***Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide
– Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien –**

14. Wissenschaftliche Fachtagung
5. Dezember 2001

**Schadverdichtungen in Ackerböden
– Entstehung, Folgen, Gegenmaßnahmen –**

Band 92

der Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Verantwortlich: Prof. Dr. H.-W. Dehne
Teil 1: *Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung in Getreide
Prof. Dr. G. W. Brümmer
Teil 2: Schadverdichtungen in Ackerböden

Verfasser: G. W. Brümmer, J. Brunotte, H. Buchenauer, W. Buchner, B. Cramer, H.-W. Dehne, F.M. Ellner, J. Frahm, H. Franken, G. Friedrich, M. Frielinghaus, U. Gierke, R. Horn, Z. Kang, G. Klingenhagen, M. Lebert, K. Lienemann, A. Meier, G. Meyer, T. Miedaner, J. Muthomi, E.-C. Oerke, G. Offenbächer, H. Petelkau, S. Sadowski, A. Schade-Schütze, W. Schmidt, B. Schneider, P. Schulze Lammers, K. Seidel, C. Sommer, H. Stahl, U. Steiner, J. Strätz, M. Tschepe

Gefördert durch: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen

Bonn 2002

ISSN 0943-9684

Konzept und redaktionelle Betreuung: Dr. S. Brenner

Gestaltung des Deckblatts: F. Gier

Druck und Bindung: Druck Center Meckenheim
Eichelnkampstr. 2, 53340 Meckenheim
www.druckcenter.de

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Teil 1: 13. Wissenschaftliche Fachtagung	
Einführung: <i>Fusarium</i>-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien – Introduction: <i>Fusarium</i> -infection and mycotoxin contamination of cereals – origin, consequences and strategies of avoidance H.-W. Dehne	1
Zur Analytik von <i>Fusarium</i>-Mykotoxinen Analytics of <i>Fusarium</i> Mycotoxine G. Offenbächer	4
<i>Fusarium</i>-Toxine in Getreide – Vorkommen und Vermeidungsstrategien Fusarium Toxine in grain - occurrences and avoidance strategies F.M. Ellner	14
Unterschiedliche Anbauintensitäten und <i>Fusarium</i>belastung Production intensity and <i>Fusarium</i> incidence G. Klingenhagen, J. Frahm	23
Auftreten und Bekämpfung von <i>Fusarium</i>-Arten im Rheinland Incidence and control of <i>Fusarium</i> species causing head blight in the Rhineland, Germany E.-C. Oerke, A. Meier, K. Lienemann, G. Meyer, J. Muthomi, A. Schade-Schütze, U. Steiner und H.-W. Dehne	32
Cytologische Studien zur Infektion und Ausbreitung von <i>Fusarien</i> in Weizenähren sowie zu Abwehrreaktionen in Ähren resistenter und anfälliger Weizensorten Cytological studies of infection and colonisation of Fusaria in wheat spikes and defence reactions in spikes of resistant and susceptible wheat cultivars H. Buchenauer und Z. Kang	45
Züchtungsstrategien zur Verringerung von Ährenfusariosen und Mykotoxingehalten bei Getreide Breeding strategies for reducing <i>Fusarium</i> head blight and mycotoxin content in cereals T. Miedaner und B. Schneider	55

Teil 2: 14. Wissenschaftliche Fachtagung

Einführung: Schadverdichtungen in Ackerböden**– Entstehung, Folgen, Gegenmaßnahmen –**

Introduction: Detrimental compaction in arable soils – formation, consequences, counter-measures

G. W. Brümmer

71

Die Verformung von Böden**– Ursachen und Folgen für eine nachhaltige Landnutzung**

Soil deformation – causes and consequences for a sustainable landuse

Rainer Horn

75

Die Grundzüge des Schad-Verdichtungs-Gefährdungs-Konzeptes (SVGK) und ein Anwendungsbeispiel

Concept of assessment of soil compaction risk and an example for realisation

M. Frielinghaus, H. Petelkau und K. Seidel

86

Beratung zur guten fachlichen Praxis zum Schutz des Bodengefüges – Ansätze, Strategien, offene Fragen

Consultation for protection of the soil structure - approaches, strategies, open questions

H. Stahl, W. Schmidt und U. Gierke

101

Penetrometermessungen zur Erfassung von Bodenverdichtungen, Befragung über Bodenverdichtungen und Bodenschutz in ausgewählten Regionen in NRW

Penetration resistance – Survey on soil compaction and soil protection in three North Rhine-Westphalia regions

G. Friedrich, S. Sadowski, B. Cramer und H. Franken

114

Möglichkeiten zur Verbesserung des Bodengefüges durch fruchtfolgetechnische Anbaumaßnahmen

Chances for the improvement of the soil texture by crop rotation

W. Buchner

125

Ein praxisorientiertes Konzept mit Lösungsansätzen und Ergebnissen zur Vorsorge gegen Bodenschadverdichtungen

A practice-oriented concept with solutions and results to the precaution against soil compaction

J. Brunotte, C. Sommer und M. Lebert

136

Bodenbelastung durch Rad- und Achslasten von Landmaschinen in der Zuckerrübenenernte

Soil load by axle and tire loads of sugar beet harvesters

P. Schulze Lammers, M. Tschepe und J. Strätz

150

Teil 1

***Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide
– Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien –**

13. Wissenschaftliche Fachtagung

7. November 2001

Landwirtschaftliche Fakultät
der
Universität Bonn

***Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien –**

Einführung

Fusarium-infection and mycotoxin contamination of cereals – origin, consequences and strategies of avoidance

Introduction to the workshop

H.-W. Dehne

Das Auftreten von Schadorganismen an Pflanzen führt meist zu erheblichen Reduktionen der Erntemenge, oft ist aber auch die Qualität des Erntegutes beeinträchtigt. Seitdem es im frühen Mittelalter im Getreidebau zu schweren Mutterkornepidemien kam, ist die Beeinträchtigung des Getreidequalität durch Mykotoxine bekannt und war lange Zeit eine Frage der Lebensmittelqualität und -sicherheit. Vor mehr als vier Jahrzehnten wurden die Aflatoxine als weitere Nahrungsmittelkontamination erkannt, die durch Pilzbefall an Lebensmitteln vor allem während der Abreife oder auch nach der Ernte entstehen. Deren Auftreten lässt sich durch geeignete Erntemethoden und Lagerungsbedingungen vermeiden.

Mykotoxine kommen sowohl in Getreide - einschließlich Mais - als auch in Getreideprodukten vor, die dann der Ernährung von Tieren und Menschen dienen. Die möglichen Folgen von Mykotoxinbelastungen, wie sie vor allem durch *Fusarium*-Arten hervorgerufen werden, haben in den letzten 3 Jahrzehnten, vor allem aber in den letzten Jahren zunehmend zu wissenschaftlichen und öffentlichen Diskussionen geführt.

Es handelt sich dabei um eine überaus komplexe Thematik, die ausgehend vom Getreideanbau, der sogenannten Urproduktion auf dem Acker, bis hin zu den Veredelungsprozessen während der Herstellung von Lebensmitteln, alle Aspekte der Nahrungskette berührt. Dazu zählt auch die Toxinbildung durch entsprechende Pilze ebenso wie deren Abbau und die Wirkung dieser Mykotoxine auf den Stoffwechsel von Pflanze, Tier und Mensch.

Ein besonderes Problem stellt dabei die Vielfalt der einzelnen *Fusarium*-Arten und die Tatsache dar, dass von diesen zahlreiche, sehr unterschiedliche Mykotoxine gebildet werden können. Beachtlich ist ferner die Tatsache, dass *Fusarium*-Spezies als Getreidepathogene im Verlauf der gesamten Vegetationsperiode im Bestand vorkommen und meist auch alle Teile der Getreidepflanzen besiedeln können. Problematisch für die Mykotoxinkontamination des Erntegutes ist aber letztlich nur der Befall der Getreideähre bzw. der Getreidekörner, der vor allem während der Blüte erfolgt.

Der Ährenbefall mit *Fusarium*-Arten und die daraus resultierende Mykotoxinbelastung ist in den vergangenen Jahren verstärkt beachtet worden (STACK, 2000) - nicht zuletzt auch auf Grund einer verbesserten Analytik bzw. der Möglichkeit auch geringere Toxinkonzentrationen noch zuverlässig nachweisen zu können. So sind in den verschiedenen Regionen und Ländern für das der Menge nach wichtigste *Fusarium*-Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) Richt- oder Grenzwerte in Getreide und Getreideerzeugnissen festgesetzt worden (CARDWELL et al, 2001). Für Mitteleuropa - ein Gebiet mit von Jahr zur Jahr stark schwankenden, im Durchschnitt aber noch moderaten Mykotoxinbelastungen - werden gegenwärtig mit 0.5 ppm in Getreide recht niedrige Grenzwerte angestrebt (Tab. 1). Hieraus leitet sich sicherlich auch ein entsprechender Handlungs- und Beratungsbedarf für die pflanzenbauliche Praxis ab.

Tab. 1: Richt- und Grenzwerte von Mykotoxinen in Getreide

Land	Toxin-Gehalte
Österreich	500 µg DON / kg Weizen und Roggen 750 µg DON / kg Durumweizen 60 µg Zearalenon / kg Weizen und Roggen
USA	2000 µg DON / kg Weizen, Weizenprodukte 1000 µg DON / kg fertige Weizenprodukte 4000 µg DON / kg Weizen als Futtermittel
ehemalige UdSSR	500 µg DON / kg Weizen 1000 µg DON / kg Durumweizen
Niederlande streben an	1000 µg DON / kg Weizen
Deutschland strebt an	500 µg DON / kg Brotgetreide 350 µg DON / kg Brot- und Backwaren, Bier

Die Gefahr einer Mykotoxinbelastung von Getreideerzeugnissen fand mittlerweile auch in der Öffentlichkeit entsprechende Beachtung: So führten allein hohe DON-Konzentrationen in Spaghetti in einem Testbericht zur Abwertung einzelner Erzeugnisse (Anonym, 2001). Das hohe Interesse der Konsumenten an unbelasteten Lebensmitteln spiegelt sich sicher auch in der Tatsache wider, dass dieser Beitrag wiederum zu den am häufigsten nachgefragten Artikeln des betreffenden Heftes im Internet zählte. Auch das BGVV (Bundesamt für den gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) warnte mit einer Pressemitteilung bereits im Jahr 2000 vor der Überschreitung möglicher Mykotoxingrenzwerte in Kindernahrung.

Die Problematik, die sich aus dem Auftreten von *Fusarium*-Mykotoxinen ergibt, beginnt mit der landwirtschaftlichen Produktionstechnik und betrifft nicht nur die menschliche Ernährung, sondern umfasst auch den Bereich der tierischen Erzeugung. Nachgewiesene Probleme ergeben sich vor allem in der Schweinehaltung. Andererseits können bestimmte pflanzenbauliche Produktionsverfahren das Auftreten von *Fusarium*-Mykotoxinen deutlich beeinflussen. Ziel der nachfolgenden Beiträge ist es, den derzeitigen Sachstand darzulegen, aber auch einen möglichen Handlungsrahmen aufzuzeigen.

Literatur

ANONYM, 2001: Spaghetti: Pasta und basta. Ökotest 7 (Juli), 16-18

CARDWELL, K.F., DESJARDINS, A., HENRY, S.H., MUNKVOLD, G., und J. ROBENS, 2001: Mycotoxins: The cost of achieving food security and food quality. APSnet Feature Story, 2001, 24 pages

STACK, R.W., 2000: Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. APSnet Plant Health Reviews 2000, 6 pages

Prof. Dr. H.W. Dehne
Institut für Pflanzenkrankheiten
Universität Bonn, Nussallee 9, D-53115 Bonn
e-mail: HW-Dehne@uni-bonn.de

Zur Analytik von *Fusarium*-Mykotoxinen

Analytics of *Fusarium* Mycotoxine

G. Offenbacher

1 Einleitung

Der Befall landwirtschaftlicher Erzeugnisse durch Pilze, welche toxische Substanzen - die Mykotoxine - bilden, ist ein weltweites Problem. Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte niederer Pilze, die meist unter dem Begriff Schimmelpilze zusammengefasst werden. Eine besondere Rolle spielen dabei diejenigen Pilzgifte, die bereits auf dem Feld gebildet werden. Zu den wichtigsten Vertretern dieser sogenannten Feldpilze zählen verschiedene Arten der Gattung *Fusarium*. *Fusarien*befall kann Schäden an den meisten Pflanzenorganen hervorrufen, wobei vor allem der Befall der Ähre als gravierend gilt. Infektionen von Getreidepflanzen führen zu erheblichen Ertragseinbußen und Qualitätsmängeln des Getreides. Außerdem können die *Fusarien* eine Vielzahl an Mykotoxinen bilden. Die am stärksten betroffenen Getreidearten sind Gerste, Mais und Weizen; diese Arten sind in Europa von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Die gebildeten Mykotoxine führen zu einer Kontamination von Futter- und Brotgetreide und stellen eine potentielle Gefährdung von Tier und Mensch dar.

Die nachfolgenden Ausführungen beschreiben die Erfahrungen unseres Laboratoriums bei der Bestimmung der relevanten Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln.

2 Stoffauswahl

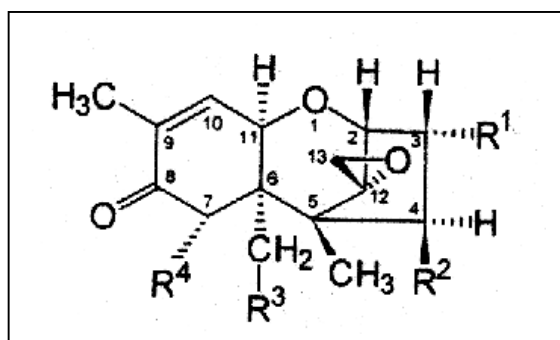
Die *Fusarien* bilden eine Vielzahl an Mykotoxinen. Diese lassen sich verschiedenen chemischen Stoffgruppen zuordnen. Die wichtigste Klasse sind die *Trichothecene* mit ca. 170 bisher bekannten Verbindungen. Die zweite Gruppe wird durch das Zearalenon (ZON) und seine Metabolite α - und β -Zearalenol repräsentiert. Eine weitere Gruppe beinhaltet die Fumonisine (KRSKA 1999).

Trichothecene stellen eine Familie von eng verwandten Sesquiterpenoiden dar. Die meisten besitzen eine Doppelbindung an der Position C-9,10, einen 12,13-Epoxydring und eine Anzahl an Hydroxyl- und Acetoxygruppen. In Abhängigkeit von der typischen funktionellen Gruppe werden sie in vier Typen (A-D) unterschieden. Die in Getreide natürlich vorkommenden *Trichothecene* können in Verbindungen vom weniger polaren Typ A und vom stärker polaren Typ B unterschieden werden. Die wichtigsten Mykotoxine vom Typ A sind das HT-2 Toxin und das T-2 Toxin. Ein typisches Merkmal der *B-Trichothecene* ist die Doppelbindung an C-9,10 und eine konjugierte Carbonylgruppe mit einer Ketogruppe an C-8. Wichtige Verbindungen vom Typ B sind das Deoxynivalenol (DON), das 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-AcDON), das 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-AcDON) und das Nivalenol (NIV) (Abb. 1).

Typ-A Verbindungen weisen eine höhere Toxizität auf als Typ B Verbindungen, wobei das T-2 Toxin die höchste Giftigkeit besitzt.

ZON (Abb.2) wird den Stoffen mit östrogenen Wirkung zugeordnet. Es konkurriert mit körpereigenen Östrogenen um die Bindung an Östrogenrezeptoren und vermittelt so dysregulierte Östrogenwirkungen, die sich klinisch im Hyperöstrogenismus manifestieren können (Schwellung und Rötung der Scham, Vergrößerung innerer und äußerer Geschlechtsorgane, insbesondere beim Schwein).

Pilzgifte aus der Gruppe der Fumonisine treten hauptsächlich in Mais und dessen Verarbeitungsprodukten auf. Futtermittelrechtliche Regelungen liegen bisher noch nicht vor.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH
Desoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH
3-Acetyl-DON	OAc	H	OH	OH
15-Acetyl-DON	OH	H	OAc	OH
Fusarenon X	OH	OAc	OH	OH

Abb. 1: Struktur der Thichothecene vom Typ-B

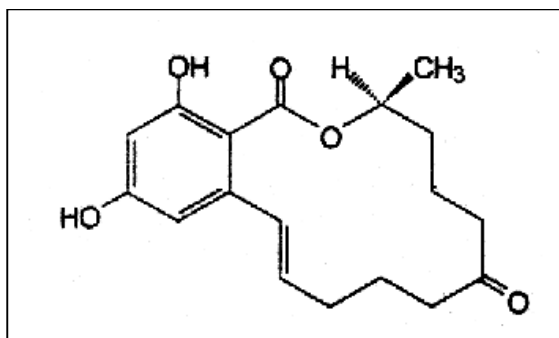


Abb. 2: Struktur von Zearalenon

Unter den Produktionsbedingungen in der Bundesrepublik Deutschland können Getreidebestände unterschiedlich stark mit Arten der phytopathogenen Pilzgattung befallen sein. Verschiedene *Fusarien*arten bilden die Mykotoxine DON und ZON, denen von der Häufigkeit des Auftretens und von den ermittelten Konzentrationen die größte Bedeutung in der Tierernährung zukommt. Besonders empfindlich reagieren Schweine. Rinder werden allgemein als unempfindlich gegen Mykotoxine angesehen, da in gewissem Umfang durch mikrobielle Umsetzungen in den Vormägen eine Entgiftung stattfindet. Hühner sind relativ unempfindlich gegen ZON, während die kritische Konzentration für DON durchaus im Bereich von in der Praxis erreichten Konzentrationen liegt. Bei akuter DON-Intoxikation stehen beim Schwein Erbrechen und Futterverweigerung bzw. in weniger akuten Fällen ein

Rückgang im Futtermittelverzehr und damit verbunden eine Verschlechterung der Zunahmen und Futtermittelverwertung im Vordergrund.

Nach bisherigem Kenntnisstand ist die Rückstandsbildung in Milch, Fleisch und Eiern unter praktischen Fütterungsbedingungen bei DON und ZON sehr gering. Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten hat im Jahr 2000 Orientierungswerte (ANONMYM 2000) ausschließlich unter dem Gesichtspunkt der Sicherung der Gesundheit und Leistung von Schwein, Rind und Huhn abgeleitet (Tabelle 1). Inzwischen werden auch für pflanzliche Lebensmittel Grenzwerte im Rahmen eines vorbeugenden Verbraucherschutzes diskutiert. Geplant sind Festlegungen für DON, ZON, Fumonisine und das Ochratoxin A in Speisegetreide, Getreideerzeugnissen und Säuglings- und Kleinkindernahrung. In anderen europäischen und außereuropäischen Ländern existieren bereits entsprechende Grenzwertfestsetzungen.

Tab. 1: Orientierungswerte für die Beurteilung der Gehalte von DON und ZON in Futtermitteln (§ 3 des Futtermittelgesetzes) von Schwein, Rind und Huhn (mg/kg; bei 88 % Trockensubstanz), bei deren Unterschreitung die Gesundheit und Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt wird.

		DON [mg/kg]	ZON [mg/kg]
Schwein	Prä-pupertäre Zuchtschweine	1,0	0,05
	Mastschweine, Zuchtschweine	1,0	0,25
Rind	Prä-ruminierend	2,0	0,25
	weibliches Aufzuchttrind	5,0	0,5
	Mastrind	5,0	- ¹
Huhn	Legehühner, Masthühner	5,0	- ¹

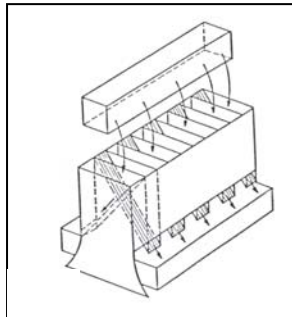
¹ nach derzeitigem Wissenstand keine Orientierungswerte erforderlich

3 Anforderungen an die Probenahme

Die Probenahme stellt einen kritischen Schritt im Gesamtablauf einer Untersuchung dar. Eine zweifelhafte Probenahme wirkt sich über den gesamten Untersuchungsprozess aus und kann auch durch eine nachfolgende einwandfreie Analytik nicht mehr korrigiert werden. In vielen Fällen hat das Untersuchungslabor keinen oder nur bedingten Einfluss auf die Probenahme. Daher wird die Problematik ausführlich hier angesprochen.

Die zu erwartenden Mykotoxingehalte liegen im Spurenbereich von Milligramm pro Kilogramm (mg/kg) bis Mikrogramm pro Kilogramm ($\mu\text{g/kg}$). Ein einzelnes Weizenkorn in einem Sack mit 50 Kilogramm Weizen entspricht 1 mg/kg. Der Gehalt von $1\mu\text{g/kg}$ entspricht einem Weizenkorn in der Ladung von zwei Güterwaggons. Dabei verteilen sich diese geringen Mengen nicht auf ein Einzelkorn, sondern inhomogen auf die gesamte Probe.

Zur Durchführung der Probenahme und Probenvorbehandlung liegen entsprechende Vorschriften der amtlichen Lebens- und Futtermittelüberwachung vor (ANONYM 1997). Eine aufwändige Probenahme wird von der DLG (ANONYM 1997) vorgeschlagen (Tabelle 2). Als einfaches Werkzeug zur Probenhomogenisierung wird der Riffelteiler empfohlen (Abb. 3). Diese Gerät kann auch bereits vor Ort verwendet werden.



In der Praxis wird ca. 1 kg Untersuchungsprobe angeliefert. Diese Menge wird vor dem Mahlen über einen Riffelteiler gegeben, vermahlen und dann eventuell nochmals geteilt. Bei speziellen Fragestellungen kommt auch ein rotierendes Probenkarussell zum Einsatz. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass diese Probenvorbereitung mit Arbeitsaufwand verbunden ist.

Abb. 3 : Riffelteiler

Tab. 2 : Empfehlung der DLG zur Probenahme von Getreide

- Schimmelpilze und deren Mykotoxine können in Nestern auftreten
- 7 bis 40 Einzelproben entnehmen
- Mindestmenge der Sammelprobe: 4 kg
- Geeignete Geräte verwenden (Schaufel, Stecher)
- Weitere Homogenisierung erfolgt durch das Untersuchungslabor
- Protokoll zur Probenahme beilegen

4 Analytik

4.1 Anforderungen an das Analyseverfahren

Eine aktuelle Übersicht zur Untersuchungsmethodik wurde von Krska et al erstellt (KRSKA et al. 2001, a, b). Grundsätzlich sind zur Bestimmung von DON und ZON sowohl Immunoaffinitäts-Tests (ELISA) als auch chromatographische Verfahren geeignet. Gemeinsam für beide Vorgehensweisen sind das Herstellen einer Messlösung durch Extraktion mit Lösungsmittel, mehrere Aufarbeitungsschritte und schließlich die Messung. Zur Auswahl des geeigneten Verfahrens werden verschiedene Kriterien herangezogen:

- Aussagekraft der Ergebnisse (Übersichtsanalyse oder Referenzmethode?)
- Nachweisstärke (Empfindlichkeit)
- Selektivität (Vermeiden von falsch positiven Befunden)
- Probenmatrix (z.B. Getreide, Mischfuttermittel)
- Validierung bezüglich
 - a) Statistischer Kenngrößen (Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit)
 - b) Robustheit (Einfluss der Laborumgebung)
 - c) Einfluss unterschiedlicher Probenmatrizes (z.B. Getreide, Mischfutter, Silage)
- Untersuchungskosten
- Bearbeitungszeit

4.2 ELISA

Immunoassays benötigen im Vergleich zu chromatographischen Methoden eine relativ geringe apparative Laborausstattung und einen vergleichsweise niedrigen Personalaufwand. Die Handhabung von Test-Kits ist relativ einfach und vor allem schnell durchzuführen. Bei den verwendeten Mykotoxin-Assays handelt es sich um kompetitive Enzymimmuntests. Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen das gesuchte Antigen beschichtet. Nach Zugabe des Antigens und des sogenannten Enzymkonjugats kommt es zur Bindung am Antikörper, und es findet eine Farbreaktion statt. Anhand dieser photometrisch quantifizierbaren Farbreaktion erhält man eine Kalibrierfunktion. Im kompetitiven Enzymimmuntest zeigen hohe Extinktionwerte an, dass ein gesuchtes Antigen in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden ist, Messwerte im unteren Bereich der Standardkurve zeigen dagegen hohe Gehalte an.

Die LUFA Bonn hat kommerziell erhältliche ELISA-Tests für DON (RIDASCREEN® FAST DON, 1999) und ZON (RIDASCREEN® FAST ZEARALENON, 1999) eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers können Mykotoxine in Cerealien, Malz und Futtermittel schnell und mit hoher Genauigkeit nachgewiesen werden. Die Bestimmungsgrenzen der ELISA-Tests betragen 0,11 mg/kg für DON und 0,05 mg/kg für ZON.

4.3 Chromatographische Verfahren

Zur Bestimmung von DON und ZON liegen viele chromatographische Methoden vor. Zum Einsatz kommen die Gaschromatographie (GC) mit Elektroneneinfang-Detektor (ECD) und massenspektrometrischen Detektoren (MS), die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit UV-Detektor (UVD), Fluoreszenz-Detektor (FD) und massenspektrometrischen Detektoren (LC-MS und LC-MS/MS).

Zur Bestimmung von ZON liegt ein validiertes VDLUFA-Verfahren für Getreide und getreidereiche Futtermittel vor (ANONYM 1993). Die Proben werden mit Chloroform extrahiert und einer zweifachen Flüssig-flüssig-Verteilung unterworfen. Die Bestimmung erfolgt mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. Bei manchen Futtermitteln wird ein zusätzlicher Reinigungsschritt an einer Festphase durchgeführt.

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens sieht den Einsatz von Immunoaffinitätssäulen als Reinigungsschritt vor (REUTTER 2001). Dabei wird die spezifische Wechselwirkung der ZON-Moleküle im Probenextrakt mit den in der Säule fixierten Antikörpern genutzt. Die Probenlösung wird aufgetragen, und es findet eine ähnliche Reaktion wie auf der ELISA-Platte statt. Das Mykotoxin wird vom Antikörper gebunden, während der Rest des aufgetragenen Materials die Säule passiert. Danach werden die gebundenen Toxine mit Methanol als Eluent durch Denaturierung der Antikörper aus der Säule freigesetzt. Man erhält auf diese Weise einen sehr reinen Extrakt, in dem ZON mittels HPLC und UV- bzw. Fluoreszenz-Detektion bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung von DON erfolgt die Extraktion mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser. Der Rohextrakt wird mit einer Mischung aus Aktivkohle, Aluminiumoxid und Celite gereinigt und anschließend einem zusätzlichen clean-up an einer Immunoaffinitätssäule unterworfen. Der Nachweis und die Bestimmung erfolgen mittels HPLC und UV-Detektion bei 220 nm. Die Bestimmungsgrenze beträgt 0,05 mg/kg. Die Methode wurde inzwischen in mehreren Ringversuchen der VDLUFA Fachgruppe Futtermittel an unterschiedlichen Getreide- und Mischfuttermittelproben erfolgreich validiert (ANONYM 2002).

Bei gleicher Aufreinigung und nach einer zusätzlichen Derivatisierung kann das DON auch gaschromatographisch mittels ECD bzw. massenselektivem Detektor bestimmt werden. Dadurch lässt sich die Bestimmungsgrenze auf 0,02 mg/kg absenken.

5 ELISA und HPLC-Verfahren im Vergleich

Einige allgemeine Maßnahmen sind unabhängig vom gewählten Untersuchungsverfahren einzuhalten: Grundsätzlich sollte erfahrenes Laborpersonal die Analysen durchführen. Bei der Probenvorbereitung ist entsprechend sorgfältig vorzugehen; dies gilt besonders beim ELISA mit 5 g Einwaage. Zur Qualitätssicherung ist der regelmäßige Einsatz von Vergleichsproben mit bekanntem Gehalt (Positivprobe und Negativprobe) unerlässlich.

Zum Methodenvergleich wurden Proben nach den ELISA und den HPLC-Verfahren untersucht. Die Vorteile des ELISA der einfachen Handhabung kommen bei entsprechend großen Probenreihen zum Tragen, wogegen bei Einzelproben dieser Aspekt zurücktritt. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten ELISA bei Getreide vergleichbare Ergebnisse zu den HPLC-Verfahren liefern. Allerdings ist die Streuung der Einzelwerte beim ELISA größer. Daher geben wir die ELISA-Befunde von Getreide nur semiquantitativ in Ergebnisbereichen und nicht in exakten Zahlen an. Mit dieser Vorgehensweise ist eine Bewertung in drei Belastungskategorien verknüpft (Tab. 4, Tab. 5).

Tab. 4: Gehaltsbereiche und Bewertungsschema für DON (ELISA)

Mykotoxin	Deoxynivalenol (DON)			Orientierungswert (mg/kg)
	0	1	2	
Bereich	0	1	2	
mg/kg	< 0,33	0,33 – 1,0	> 1,0	
Bewertung	nicht bis gering belastet	mittel belastet	hoch belastet	1,0

Tab. 5: Gehaltsbereiche und Bewertungsschema für ZON (ELISA)

Mykotoxin	Zearalenon (ZON)			Orientierungswert (mg/kg)
	0	1	2	
Bereich	0	1	2	
mg/kg	< 0,05	0,05 – 0,15	> 0,15	
Bewertung	nicht bis gering belastet	mittel belastet	hoch belastet	0,05

Schwierigkeiten traten beim ELISA von Silagen und Mischfuttermitteln wie Schweinefutter auf. Hier lieferte der ELISA teilweise falsch positive Befunde. (Tab. 6, Tab. 7). Ein weiterer Nachteil des ELISA liegt in der hohen Bestimmungsgrenze für ZON von 0,05 mg/kg. Dieser Wert entspricht bereits dem Orientierungswert für Schweinefutter. Eine Differenzierung zwischen unbelasteten und mittel belasteten Proben ist somit nicht möglich. Eine Methodvalidierung liegt bisher nur für den Parameter DON in Getreidearten vor. Eine umfangreiche Bestätigung der allgemeinen Eignung für alle Futtermittel sowie Ergebnisse aus Ringversuchen stehen noch aus.

Tab. 6: Vergleichsuntersuchungen bei DON

Probenart	HPLC (mg/kg)	ELISA (mg/kg)
Weizen 1	1,7	> 1,0
Weizenkleie	0,6	0,33 - 1
Ganzpflanzensilage Weizen	0,6	> 1,0
Schweinefutter 1	< 0,1	<0,33
Schweinefutter 2	0,6	> 1,0
Schweinefutter 3	0,5	0,33 - 1
Schweinefutter 4	1,6	> 1,0

Tab. 7: Vergleichsuntersuchungen bei ZON

Probenart	HPLC (mg/kg)	ELISA (mg/kg)
Weizen 2	0,06	0,05 – 0,15
Triticale	0,02	0,05 – 0,15
Schweinefutter 5	0,01	< 0,05
Schweinefutter 6	0,02	> 0,15 (0,60)
Schweinefutter 7	0,29	> 0,15 (0,28)

Die HPLC-Verfahren haben sich in der täglichen Untersuchungspraxis bisher bewährt. Durch den Einsatz der Immunoaffinitätsäulen zur Extraktreinigung lassen sich auch schwierige Probenarten wie z.B. Schweinefutter, Silagen und überständiger Grasaufwuchs problemlos bearbeiten. Die Effizienz der Nachreinigung ist beispielhaft an einer Weizenprobe dargestellt (Abb. 4 – 6). Die HPLC-Verfahren des VDLUFA sind validiert und somit zur Beantwortung von Schiedsfragen geeignet. Im Fall von kritischen Gehalten wie z.B. Überschreitung von Orientierungswerten sowie bei der Bestimmung von Mischfuttermitteln empfehlen wir grundsätzlich den Einsatz der HPLC.

6 Ausblick

Derzeit wird zur Erfassung eines *Fusarien*befalls vorrangig die Bestimmung von DON und ZON mittels stoffspezifischer Einzelverfahren durchgeführt. Der Nachweis weiterer Verbindungen vom B-Typ wie z.B. von Metaboliten des DON (3-AcDON, 15-AcDON) oder von Nivalenol (NIV) erfordert die Weiterentwicklung der bestehenden Methoden. Nach Derivatisierung lassen sich mehrere Verbindungen gleichzeitig mittels der Gaschromatographie und massenselektiver Detektion oder mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung bestimmen. Auch die HPLC-MS/MS bietet interessante Ansätze. Ähnliche Überlegungen gelten auch für den Nachweis von HT-2 Toxin und T-Toxin. Ein universelles und leicht anwendbares Multiverfahren zur Erfassung aller relevanten *Fusarien*-

Mykotoxine (Typ-A und Typ-B *Trichothecene*, Zearalenon, Fumonisine) ist allerdings noch nicht in Aussicht. Bei den ELISA-Verfahren bedarf es noch einer Anpassung an die unterschiedlichen Probenmatrizes.

Von Geräteherstellern werden alternative Schnellmethoden ohne aufwändige Probenvorbereitung angekündigt (HOFNAGEL 2001). Diese Verfahren versprechen eine direkte Bestimmung aus der feingemahlten Probe mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIRS). Es bleibt abzuwarten, inwieweit diese Methoden zur Überprüfung der in der Bundesrepublik vorliegenden Belastungen und der geltenden Richtwerte geeignet sind.

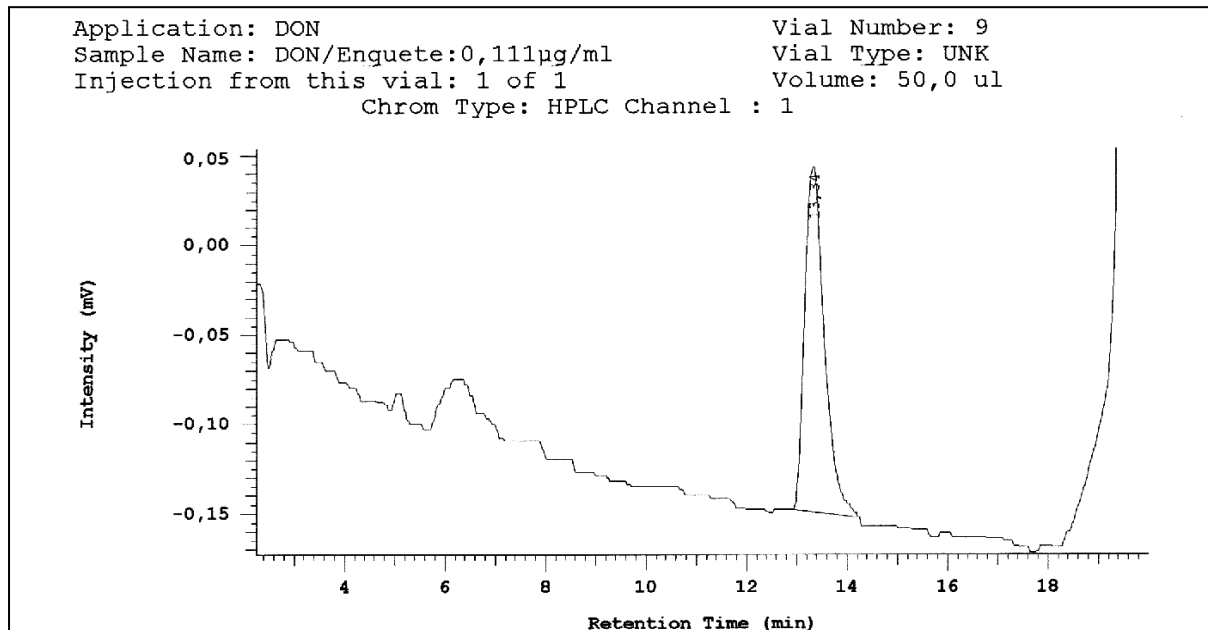


Abb.4: HPLC-Chromatogramm eines DON-Standards; $\beta(\text{DON}) = 0,4 \text{ mg/kg}$

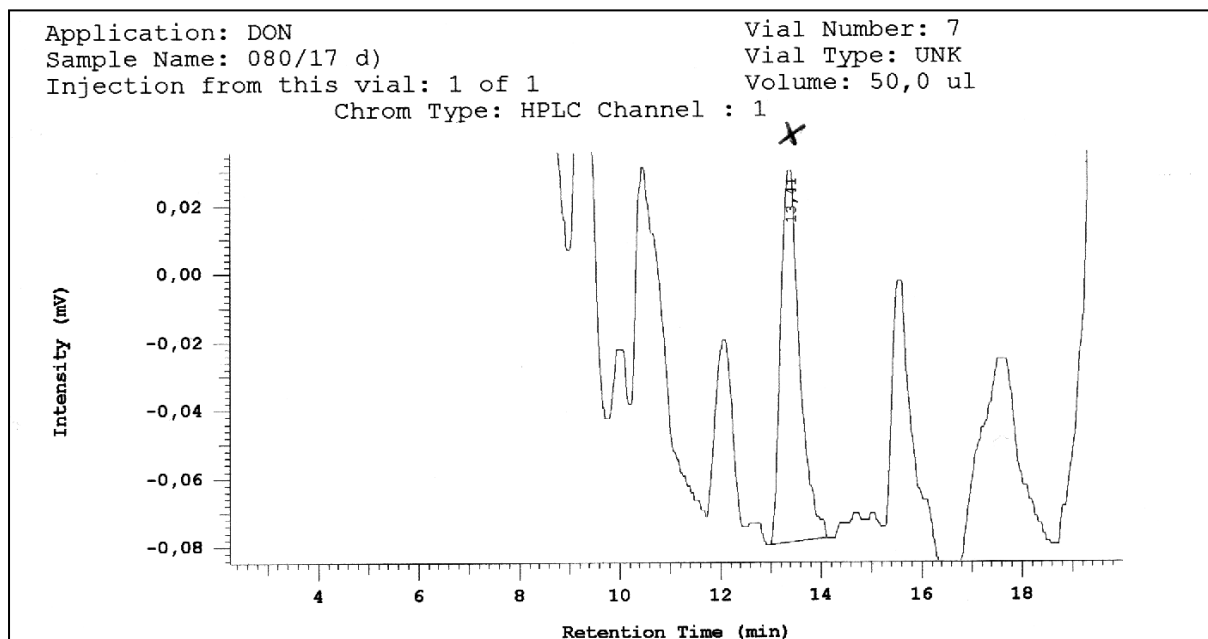


Abb.5: HPLC-Chromatogramm einer Weizenprobe (080/17); $\beta(\text{DON}) = 0,18 \text{ mg/kg}$; keine Reinigung an Immunoaffinitätssäule

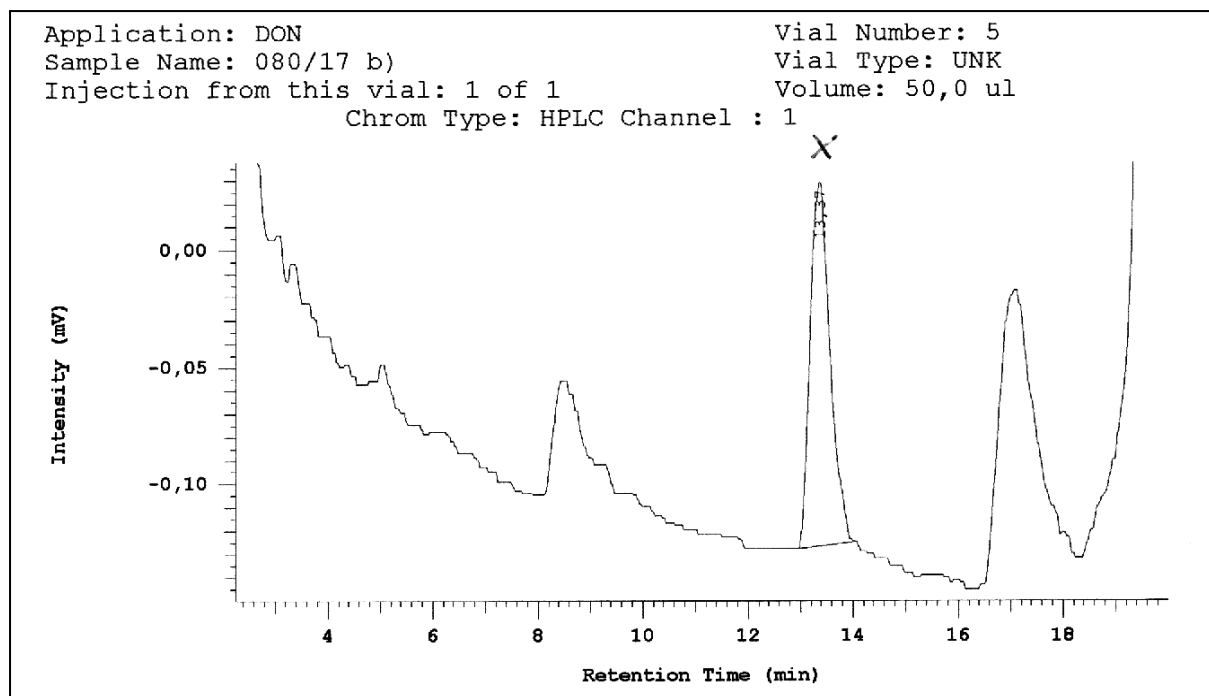


Abb. 6: HPLC-Chromatogramm einer Weizenprobe (080/17), β (DON) = 0,18 mg/kg; mit zusätzlicher Reinigung an Immunoaffinitätsäule

7 Zusammenfassung

Der Befall mit *Fusarien*pilzen verursacht erhebliche Ertragseinbußen und Qualitätsverluste bei Getreide. Das Deoxynivalenol (DON) als Vertreter der *Trichothecene* und das Zearalenon (ZON) stellen die wichtigsten Pilzgifte unter den vielen möglichen Mykotoxinen dar. Sie gelten als Leitverbindungen hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens, der ermittelten Konzentrationen und der toxikologischen Bewertung in der Tier- und Humanernährung. Zur Einstufung der Belastung von Futtermitteln in der Bundesrepublik Deutschland existieren Orientierungswerte, entsprechende lebensmittelrechtliche Grenzwerte sind in Vorbereitung. Zum Nachweis von DON und ZON in Getreide Futtermitteln stehen validierte und praxiserprobte HPLC-Methoden des VDLUFA zur Verfügung. Durch Verwendung der Immunoaffinitäts-Chromatographie werden Bestimmungsgrenzen von 0,05 mg/kg für DON und 0,01 mg/kg für ZON erreicht. Kommerziell erhältliche ELISA-Tests sind als Übersichtsverfahren (screening) für Getreideproben geeignet, der Einsatz an komplexen Matrices wie Mischfuttermitteln wird derzeit nicht empfohlen. Der Probenahme und Probenvorbereitung ist unabhängig vom ausgewählten Verfahren besondere Beachtung zu widmen.

8 Summary

The contamination of grain with *fusaria* causes decreases in harvest yield and quality. Deoxynivalenol (DON) as part of *Trichothecenes* and Zearalenon (ZON) are representing the most important fungal toxins among a lot of different mycotoxins. They are regarded as central parameters of the frequency of occurrence, determined concentrations and toxicological

valuation in human and animal nutrition. Orientation values are existing to determine the pollution of feedstuffs in the Federal Republic of Germany, equivalent limiting values in food stuffs are under preparation. Regarding the determination of DON and ZON in grain feedstuffs, there are validated and practically proofed HPLC methods of the VDLUFA available. By the use of immunoaffinity-chromatography the determination levels of DON reach 0.05 mg/kg and of ZON 0.01 mg/kg respectively. Commercially available ELISA tests are suitable as screening for grain samples. Their use in complex matrices like compound feed can not be advised at the moment. Independent from analytical methods it has to be paid additional attention on taking and preparation of samples.

7 Literatur

- ANONYM (1993): Bestimmung von Zearalenon. VDLUFA-Methodenbuch Band **III**, 16.9.1 VDLUFA-Verlag Darmstadt
- ANONYM (1997): L 1501/02-1. Amtl. Sammlung § 35 LMBG
- ANONYM (2000): Orientierungswerte für die Beurteilung der Gehalte an Deoxynivalenol und Zearalenon in Futtermitteln im Rahmen des § 3 des Futtermittelgesetzes. Schreiben des BELF vom 30.06.2000
- ANONYM (2000): Mykotoxine, Vermeiden statt Bekämpfen. DLG-Mitteilungen **8**, 13-17
- ANONYM (2002): Bestimmung von Deoxynivalenoln (DON). VDLUFA-Methodenbuch Band **III**, 16.12.1 VDLUFA-Verlag Darmstadt
- DÄNICKE S. (2001): Fusariumtoxine in der Tierernährung. Lohmann Information. **4**, 9-18
- HOFNAGEL H. (2001): Fusarien mit Infrarot erkennen. Agrarzeitung 05.05.2001, Beilage Ernährungsdienst
- KRSKA R. (1999): Analytik von Fusarium-Mykotoxinen in Europa. Nachr. Chem. Tech. Lab. **47**, 553
- KRSKA R., R. BAUMGARTNER A. R. JOSEPHS., (2001, a): The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. Fresenius J Anal. Chem. **369**, 469-476
- KRSKA R. A. R. JOSEPHS, (2001, b): The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B Trichothecene mycotoxins in cereals. Fresenius J. Anal. Chem. **371**, 285-299
- REUTTER M., (2001) VDLUFA, Fachgruppe Futtermittel, Ringversuch 300/M
- RIDASCREEN® FAST DON, 1999, Art. Nr. R5901: Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland
- RIDASCREEN® FAST ZEARALENON, 1999, Art. Nr. R5502: Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zearalenon, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland

Dr. Gustav Offenbacher

Landwirtschaftskammer Rheinland, Untersuchungszentrum Bonn-Roleber – LUFA

Siebengebirgsstr. 200, 53229 Bonn

gustav.offenbaecher@lwk-rheinland.nrw.de

***Fusarium*-Toxine in Getreide – Vorkommen und Vermeidungsstrategien**

Fusarium Toxine in grain - occurrences and avoidance strategies

F.M. Ellner

Getreide ist eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel für große Teile der Bevölkerung. Es kann sowohl im Feld als auch im Lager von einer Reihe wichtiger Schadpilze befallen werden. Auf dem Feld sind es vor allem Vertreter der Gattung *Fusarium*, wie z.B. *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* und *F. sporotrichoides*, die das Krankheitsbild der „partielle Taubährigkeit“ verursachen und zu erheblichen Ertrags- und Qualitätsverlusten führen können. In der Fähigkeit zur Bildung von Sekundärmetaboliten mit ausgewiesener Human- und Tiertoxizität begründet sich das Gefährdungspotential, das von diesen Pilzen ausgeht, und mit dem die Konsumenten belasteter Nahrungsmittel konfrontiert werden.

Die Versorgung der Bevölkerung mit gesunden Nahrungsmitteln ist die vorrangige Aufgabe der Landwirtschaft. Vor dem Hintergrund der vergangenen Probleme in der Nahrungsmittelproduktion kommt es auch darauf an, gesetzliche Rahmenbedingungen zu schaffen, die im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes Risiken minimieren, die von ungewünschten Substanzen in Nahrungsmitteln ausgehen können. Substanzen exogener Genese, wie Pflanzenschutzmittel, Additive, Düngemittel u. a. sind in den verschiedensten gesetzlichen Regelwerken auch international gut geregelt. Anders verhält es sich mit Substanzen, die im Wirkungsgefüge Pflanze/Pathogen entweder direkt von der Pflanze (z.B. Phytoalexine) oder vom Pathogen (z.B. Mykotoxine) gebildet werden und in die Nahrungskette eingehen können. Aufgrund der Häufigkeit des Auftretens und ihrer Toxikologie geht von Mykotoxinen eine nicht zu unterschätzende gesundheitliche Gefährdung für Mensch und Tier aus. Bisher gibt es keine einheitlich festgelegten Höchstmengen für *Fusarium*-Toxine in Getreide innerhalb der Europäischen Gemeinschaft und es ist nicht absehbar, wann mit deren Festsetzung zu rechnen ist. Deshalb wurde auf nationaler Ebene eine Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung vorgeschlagen. Die Änderungen betreffen Deoxynivalenol und Zearalenon in Speisegetreide, Getreideerzeugnissen und Teigwaren sowie Brot und andere Backwaren; die Fumonisine B1 und B2 in Mais und Maiserzeugnissen. In das nationale Regelwerk sollen auch Ochratoxin A in Kaffee und Trockenobst sowie Patulin in Apfelsaft, Apfelmus und Apfelkompott aufgenommen werden (Tab. 1).

Tab. 1: Vorgeschlagene Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung vom 2. Juni 1999 (BGBl.IS.1248) [Anlage 1]

Mykotoxin	Erzeugnis	Höchstmenge in oder auf Lebensmitteln in µg/kg
Ochratoxin	löslicher Kaffee	6
	Röstkaffee	3
	Trockenobst getrocknet	2
Deoxynivalenol / Zearalenon	Speisegetreide, Getreideerzeugnisse und Teigwaren	500 / 50
	Brot und andere Backwaren mit Getreidgehalt von mehr als 33 %	350 / 50
Summe der Fumonisine B1 und B2	Mais und Maiseerzeugnisse	500
	Cornflakes	100
Patulin	Apfelsaft, Apfelmus, Apfelkompott	25

Die Datenlage zum Vorkommen von Mykotoxinen in Getreide in Deutschland war und ist noch immer unzureichend. Das in Bayern seit 1989 durchgeführte Monitoring zum Auftreten von Deoxynivalenol (DON), dem am häufigsten vorkommenden Fusarium-Toxin in Getreide, ist der richtige Ansatz. Denn um die Belastungssituation annähernd einschätzen zu können und um Ableitungen für die Landwirte zu erarbeiten, ist ein großer Datenpool erforderlich. Deshalb erschien es notwendig ein Forschungsprogramm zu initiieren, das über mehrere Jahre Untersuchungen an Proben aus möglichst vielen Bundesländern Deutschlands gewährleistet, um einen größeren Überblick über das Vorkommen von Fusarium-Toxinen in Getreide zu erhalten. Mit Unterstützung der Landesanstalten, Pflanzenschutzämter, Pflanzenschutzmittelhersteller, Berater und Landwirte konnten aus den Ernten der Jahre 1998 bis 2000 über 880 Proben untersucht werden. 727 Proben entsprachen ihrer Genese nach den Anforderungen zur Implementierung in das Programm, d.h. alle notwendigen Informationen zur Charakterisierung der Probe waren vorhanden und es lag keine künstliche Infektion mit Fusarien vor. Um den Effekt verschiedener Einflussfaktoren bewerten zu können, wurden auch mehrere Proben eines Standortes in die Untersuchungen einbezogen, wenn sie sich in mindestens einem der folgenden Parameter unterschieden: Sorte, Bodenbearbeitung, Vorfrucht und Pflanzenschutz. Der Anteil einzelnen Bundesländer an der Gesamtprobenzahl über den Untersuchungszeitraum von 1998 – 2000 ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Anzahl der Getreideproben pro Bundesland und Jahr

Bundesland	1998	1999	2000
Schleswig-Holstein	7	10	12
Mecklenburg-Vorpommern	12	28	40
Nordrhein-Westfalen	7	25	11
Sachsen-Anhalt	12	39	38
Brandenburg	14	79	44
Thüringen	7	13	42
Rheinland-Pfalz	0	13	0
Hessen	10	18	39
Baden Württemberg	15	50	126

Es gelang nicht immer aus den Bundesländern eine dem Getreideaufkommen adäquate Probenanzahl mit repräsentativer Verteilung zu bekommen. Aber dem Ziel entsprechend können hinreichend genaue Aussagen über das Maß des Auftretens von Ährenfusariosen an Getreide und dem daraus resultierenden Vorkommen von Mykotoxinen im Erntegut abgeleitet werden.

In den Jahren 1999 und 2000 erfolgte eine Bestimmung der am Korn vorkommenden Fusarien. Das Artenspektrum war in beiden Jahre annähernd gleich, es traten aber zum Teil deutliche Unterschiede in der Befallshäufigkeit mit einzelnen Spezies auf. Während 1999 in 46 % der untersuchten Proben *F. poae* nachgewiesen werden konnte waren es im Jahr 2000 nur 26 %. Für *F. graminearum* war 1999 in 37% der Proben der Nachweis positiv und die Befallshäufigkeit stieg 2000 auf ca. 46 %. Damit war *F. graminearum* in diesem Jahr die dominierende Fusariumart. Ein hoher Prozentsatz der Proben war in beiden Jahren auch mit *F. avenaceum*, *F. culmorum* und *F. sporotrichoides* befallen (Tab. 3). Eine Nord/Süd-Verteilung zwischen *F. culmorum* und *F. graminearum* konnte nicht festgestellt werden, *F. graminearum* war in Proben aller Regionen mit annähernd gleicher Häufigkeit nachweisbar.

Mehr als 80 % der untersuchten Proben waren mit mehr als einer Fusariumart befallen und da mit Ausnahme von *F. avenaceum* alle untersuchten Arten in der Lage sind verschiedene Mykotoxine zu bilden, konnte mit dem Vorkommen mehrere Mykotoxine gerechnet werden. Wie Untersuchungen zum Vorkommen von Fusarium-Toxinen in 19 Ländern ergaben (Tanaka et al., 1988) und Resultate von mehreren Jahren aus Baden-Württemberg betätigten, sind Getreidekörner sehr häufig mit mehr als nur einem Mykotoxin belastet (Müller et al., 1997) und es sind vornehmlich DON, Nivalenol (NIV), 3(15)-Acetyl-Deoxynivalenol (AcDON) und Zearalenon (ZEA) sowie dessen Alkohole α - und β -Zearalenol nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden alle Proben auf diese Toxine hin untersucht, um auch Aussagen über Summenbelastungen treffen zu können. Proben mit hohem Befall durch *F. sporotrichoides* und *F. poae*, von denen angenommen werden konnte, das sie mit Typ A Trichothecene kontaminiert sein könnten, wurden des weiteren auch auf T2-Toxin, HT-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol untersucht.

Tab. 3: Anteil wichtiger Fusariumarten am Gesamtbefall in Weizen
(n = Anzahl untersuchter Proben)

Spezies	1999	2000
F. poae	46 %	26 %
<i>F. avenaceum</i>	44 %	18 %
<i>F. graminearum</i>	37 %	46 %
<i>F. sporotrichoides</i>	16 %	11 %
<i>F. culmorum</i>	6 %	27 %
Fusarium ssp.	15 %	11 %
	n = 100	n = 50

Unabhängig vom Untersuchungsjahr war die Belastung der Proben sowohl mit den 3(15)Ac-DON als auch mit den Zearalenolen ausgesprochen gering und nur in Proben nachzuweisen, in denen hohe Konzentrationen an DON bzw. ZEA vorhanden waren. Auch die Typ A Trichothecene spielten eine sehr untergeordnete Rolle. Nur wenige der Verdachtsproben waren mit geringen Konzentrationen an HT-2 und T-2 belastet, deshalb soll hierauf nicht weiter eingegangen werden.

Die Belastung der Proben mit DON und ZEA ist in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Es ist deutlich, dass zwischen den Jahren erhebliche Unterschiede in den Mykotoxin-Konzentrationen auftreten. Das Jahr 1998 war durch hohe Niederschlagsmengen im Zeitraum der Getreideblüte gekennzeichnet, die dadurch entstandenen günstigen Bedingungen für die Infektion der Ähren mit Fusarien schlägt sich deutlich in höheren Toxinwerten nieder. Die mittlere Belastung der Proben mit 6,82 mg/kg DON und 0,52 mg/kg ZEA war sehr hoch. Ursache hierfür ist unter anderem die Anzahl Proben mit extremen Mykotoxin-Konzentrationen von bis zu 34,3 mg/kg für DON und 2,23 mg/kg für ZEA, die somit die vorgeschlagenen Höchstmengen um ein Vielfaches überstiegen (Ellner, 1999). Insgesamt lagen die Werte von 69 % bzw. 46 % der Proben über den Höchstmengen von DON bzw. ZEA. Auch die Anzahl ZEA positiver Proben lag in diesem Jahr mit 72 % weit über den der folgenden Jahre mit 5 % in 1999 und 27 % in 2000. Obwohl 2000 die mittlere DON Belastung wieder den Wert von 0,5 mg/kg überschritt, war die Toxinbelastung an den meisten Probenahmeorten eher gering (Ellner, 2000).

Tab. 4: Vorkommen von Deoxynivalenol in Getreide

Jahr	Probenanzahl (% positiv)	Max (mg/kg)	Mittel (mg/kg)	Höchstmengen- Überschreitungen* (%)
1998	84 (85)	34,3	6,82	69
1999	290 (45)	10,9	0,32	9
2000	353 (80)	6,6	0,63	24

* Höchstmengen gelten für Lebensmittel lt. Tab.1 nicht aber für Rohgetreide

Die Anzahl NIV positiver Proben war 1998 trotz des hohen Fusariumbefalls sehr niedrig (7 %). Auch die nachzuweisenden Konzentrationen lagen überwiegend unterhalb der Bestimmungsgrenze (60 µg/kg). In den Proben des Jahres 2000 waren schon 17 % mit NIV kontaminiert und diese Tendenz scheint sich fortzusetzen. In Anbetracht der höheren Toxizität von NIV gegenüber DON fordert dieser Aspekt eine stärkere Beachtung.

Tab. 5: Vorkommen von Zearalenon in Getreide

Jahr	Probenanzahl (% positiv)	Max (mg/kg)	Mittel (mg/kg)	Höchstmengen- Überschreitungen* (%)
1998	84 (72)	2,23	0,52	46
1999	290 (5)	0,07	0,01	3
2000	353 (27)	0,63	0,04	18

* siehe Tab. 4

Die Auswertung der Probenbegleitinformationen ergab eindeutige Hinweise auf besondere Risikofaktoren, die eine verstärkte Produktion von Mykotoxinen in Getreide bewirkten. Von besonderer Bedeutung ist das Wetter während der Blüte. Hohe Luftfeuchte resultierend aus Niederschlägen oder aus besonderen örtlichen Gegebenheiten wie Flussniederungen oder sonstige exponierte Lagen begünstigt die Infektion mit Fusarien im Ährenbereich und somit die Bildung von Mykotoxinen. Kennzeichnend für alle Jahre war, dass Proben mit besonders hoher Toxinbelastung von Feldern mit Vorfrucht Mais stammten. Vor allem bei reduzierter Bodenbearbeitung kommt es zu vermehrter Bereitstellung von Infektionsmaterial, das sich auf nicht verrotteten Pflanzenteilen bildet. Die reifenden Perithezien von *Gibberella zaeae*, der Hauptfruchtform von *F. graminearum*, entlassen die Ascosporen, die durch den Wind über weite Strecken und in hoher Anzahl verbreitet werden und somit einen hohen Infektionsdruck hervorrufen. Wendende Bodenbearbeitung und die damit verbundene Einarbeitung der Pflanzenreste führt zu einer deutlichen Reduktion der Mykotoxinbildung, was mit einigen

Beispielen in Tabelle 6 belegt wird. Es ist eindeutig zu erkennen, dass unter gleichen Standortbedingungen und unter Verwendung ein und derselben Weizensorte in den Varianten mit Vorfrucht Mais/Getreide und oder nichtwendender bzw. reduzierter Bodenbearbeitung die DON-Gehalte um ein Vielfaches höher liegen im Vergleich zu den Varianten mit weniger Risikofaktoren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Erkenntnissen aus Bayern, die Mais als Vorfrucht und reduzierte Bodenbearbeitung ebenfalls als wichtige Risikofaktoren beschreiben (Obst et al., 2000). Durch die Wahl der Vorfrucht kann der Landwirt somit erheblich das Risiko einer Mykotoxinbildung beeinflussen. Wo sich aus ökonomischen Zwängen eine befallsfördernde Vorfrucht nicht vermeiden lässt, kann durch eine ausreichende Bodenbearbeitung eine Risikominimierung erfolgen.

Tab. 6: Einfluss von Vorfrucht und Bodenbearbeitung auf die Bildung von Deoxynivalenol in Winterweizen*

DON (mg/kg)	Vorfrucht	Bodenbearbeitung	Sorte
3,4	Mais	Pfluglos	Ritmo
1,6	Mais	Pflug	Ritmo
0,04	Kartoffel	Pflug	Ritmo
4,2	Silomais	Pfluglos	Estica
1,2	WW	Pfluglos	Estica
2,1	WW	Pfluglos	Borenos
0,08	WW	Pflug	Borenos
4,1	Mais	Fräse	Flair
0,5	WW	Pflug	Flair
5,3	Mais	Mulchsaat	Flair
1,2	Mais	Pflug	Flair
0,64	Mais	Fräse	Petrus
0,29	Mais	Pflug	Petrus

*Varianten jeweils eines Standortes sind in Spalten zusammengefasst

Eine weitere wichtige Maßnahme zur Reduzierung des Mykotoxinrisikos ist die Wahl einer für den Standort geeigneten Getreidesorte. So führt der Anbau von Sorten mit einem hohen Resistenzgrad gegenüber Ährenfusariosen zu einer signifikant geringeren Mykotoxinbildung im Korn. Wie aus mehrjährigen Untersuchungen im Rahmen der Resistenzprüfung an verschiedener Winterweizensorten hervorgeht, ist unabhängig von der jeweiligen Reifegruppe

eine deutliche Korrelation zwischen der Fusariumanfälligkeit und dem DON-Gehalt nach künstlicher Inokulation mit *F. graminearum* zu erkennen ($r = 0,89^{**}$) (Mielke et al., 2000). Ein sortenspezifischer Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit gegenüber Ährenfusariosen und der Produktion von DON im Korn kann postuliert werden. Sorten die einen geringen Befall aufwiesen, wie Bussard, Petrus, Toni aus der mittleren Reifegruppe oder Xanthos und Rector aus der späten Reifegruppe, enthielten auch die niedrigsten DON-Konzentrationen. Die Sorten Hanseat, Ritmo und Kornett, die gemäß ihrer Einstufung nach der Liste des Bundessortenamtes als sehr anfällig beschrieben sind, waren am stärksten mit *F. graminearum* befallen und auch mit DON belastet (Abb. 1). Untersuchungen in Bayern zur Bewertung der Fusariumresistenz in Weizen erbrachten eine vergleichbare Rangfolge der Sorten hinsichtlich der DON-Gehalte bei ebenfalls guter Korrelation mit der optischen Befallsbonitur. Die Sorten Petrus und Bussard waren mit sehr geringen Mengen DON kontaminiert während Kornett, Ritmo und Hanseat die höchsten DON-Gehalte aufwiesen (Wosnitza, 2000).

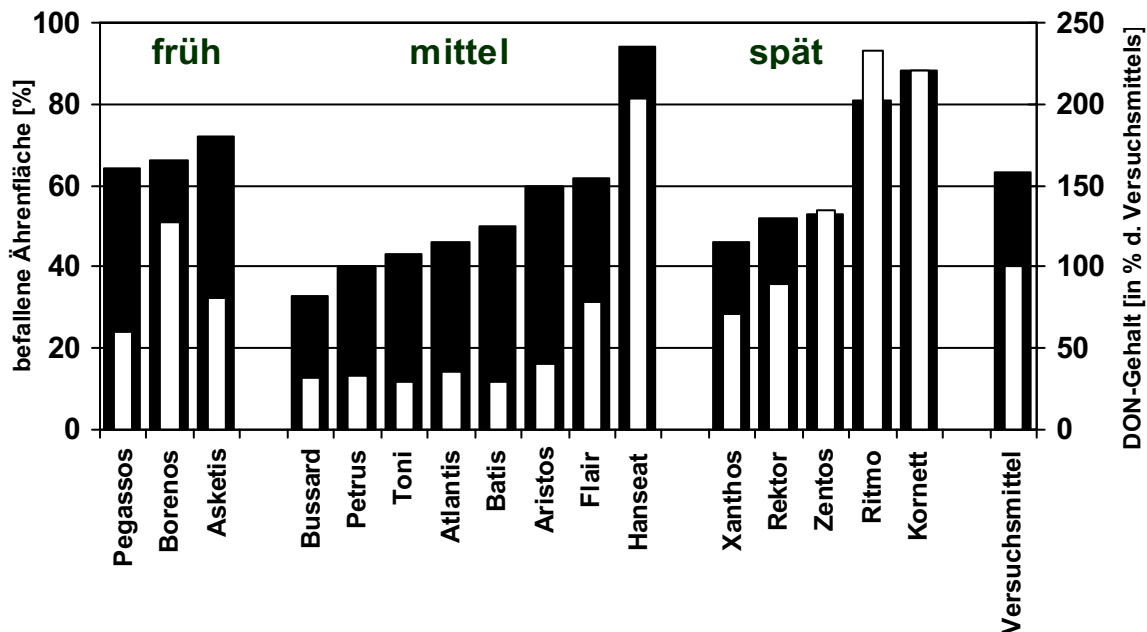


Abb. 1: Fusarium-Anfälligkeit und Deoxynivalenol-Gehalt im Korn ausgewählter Winterweizensorten aus Mielle et al.

Don-Gehalt des Vergleichsmittels = 24,6 mg/kg

Reifegruppen: früh, mittel und spät; ■ Befall □ Don-Gehalt

Mit dem Einsatz von Fungiziden verfügt der konventionell wirtschaftende Landwirt über eine direkte Möglichkeit auf eine Infektion mit Fusarien zu reagieren, um die Bildung von Mykotoxinen zu reduzieren bzw. zu verhindern. Zur Bekämpfung von Fusarien an Weizen sind in Deutschland die Mittel Folicur, Pronto Plus und Caramba zugelassen. Die Wirksamkeit der Mittel hängt sehr vom Anwendungszeitpunkt ab. Der Wirkungsgrad einer Behandlung ist um so größer, je näher diese am Zeitpunkt der Infektion erfolgt. Schon die Abweichungen um 2 Tage vom Optimum kann zu einem Wirkungsverlust von ca. 20 % führen (Suty und Mauler-Machnik, 1996). Die optimale Terminierung des Fungizideinsatzes in der Praxis ist aufgrund des kleinen Zeitfensters recht schwierig, zumal eine exakte

Bestimmung des Infektionszeitpunktes kaum möglich ist und auch dann noch weitere Faktoren Einfluss nehmen wie z.B. die Verfügbarkeit von Betriebsmitteln und Witterungsbedingungen. Der Einsatz der zugelassenen Mittel führt auch unter günstigen Bedingungen nicht zur vollständigen Bekämpfung der Ährenfusariosen.

In mehr als 40 Versuchen an unterschiedlichen Standorten Deutschlands konnte durch eine einmalige Behandlung zur Blüte jeweils mit der empfohlenen Aufwandmenge im Durchschnitt eine 50%ige Reduktion des Deoxynivalenol-Gehaltes in Winterweizen erreicht werden. Eine Differenzierung zwischen den Mittel Caramba, Pronto Plus oder Folicur hinsichtlich ihres Effektes auf den Fusariumbefall oder der Bildung von Mykotoxinen war nicht gegeben (Tab. 7).

Tab. 7: Reduktion von DON-Gehalt und Fusariumbefall in Winterweizen nach Applikation zugelassener Fungizide in Versuchen an mehreren Standorten

Behandlung	Anzahl Versuche	DON (%)	Ährenbefall (%)
Folicur (1,0 l/ha)	18	42	51
Pronto Plus (1,5l/ha)	12	57	62
Caramba (1,5 l/ha)	10	50	56

Es kann festgestellt werden, dass das Vorkommen von Mykotoxinen in Getreide wesentlich von der Witterung zur Blüte geprägt wird. Von besonderen Gefährdungslagen abgesehen, ist unter den bei uns vorherrschenden Wetterbedingungen mit einer eher geringen Belastung des Getreides mit Fusarium-Toxinen auf dem Feld zu rechnen. Unter konsequenter Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Maßnahmen zur Reduktion des Fusariumbefalls im Ährenbereich sollte es möglich sein die vorgeschlagenen Höchstmengen einzuhalten bzw. zu unterschreiten.

Literatur

- BAUER, G. (2000): Zur Analyse der Daten des Fusarium-Monitorings Bayern. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum*. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkunde und Pflanzenbau. (3), 33-38
- ELLNER, F.M. (1999): 1998 – Ein Jahr für Fusariumtoxine. In: Proceedings 21. Mykotoxin-Workshop, 1-4
- ELLNER, F.M. (2000): Occurrence of Fusarium toxins in the 1999's harvest. *Mycotoxin Research*, 16 (1), 21-25
- MIELKE, H.; RODEMANN, B.; BARTELS, G.; ELLNER, F. M. (2000): Ährenfusariosen im Weizenanbau. *Getreidemagazin*, 2, 104-108

- MÜLLER, H.M., REIMANN, J., SCHUMACHER, U. and SCHWADORF, K. (1997): Fusarium toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. *Natural Toxins* 5: 24-30
- OBST, A.; LEPSCHY, J., BECK, R., BAUER, G. and BECHTLE, A.: The risk of toxins by *Fusarium graminearum* in wheat – interactions between weather and agronomic factors. *Mycotoxin Research*, 16 A (1), 16-20
- SUTY, A. and MAULER-MACHNIK, A. (1996): New findings on the epidemiology of *Fusarium* ear blight on wheat and its control with tebuconazole. *BCPC Pest & Diseases*, 5B-, 511-516
- WOSNITZA, A.: Verbesserung der *Fusarium*-Resistenz-Bewertung bei Weizen. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum*. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkunde und Pflanzenbau. (3), 59-74

Dr. Frank Ellner
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Berlin
Email: F.Ellner@BBA.DE

Unterschiedliche Anbauintensitäten und Fusariumbelastung

Production intensity and *Fusarium* incidence

G. Klingenhagen, J. Frahm

1 Einleitung

Die Schwierigkeiten bei der Verwertung des 1998 aus dem Nordwestdeutschen Raum geernteten Futtergetreides führte zu einer starken Sensibilisierung gegenüber der Problematik echter Fusarien in Getreide.

Hinzu kam die besondere Problematik des Jahres 1998. Nach milder Winterwitterung waren die Bestände schon im Januar stark entwickelt. Frühlingshafte Witterung Mitte Februar, die demzufolge z.T. sehr frühzeitige Andüngung führte neben allgemein hohen N-min Werten zu sehr dichten und üppigen Beständen. Hohe Temperaturen im Mai bedingten in Kombination mit Niederschlägen ab der zweiten Mai-Dekade überdurchschnittliche N-Freisetzung in der Schossphase des Getreides. Dichte Bestände, hohe Nährstoffversorgung und feucht warme Witterung führten neben einem erhöhten Krankheits- und Lagerdruck auch zu verzögerter Abreife und je nach Sorte, Vorfrucht Bodenbearbeitung und Standort auch z. T. zu starkem Befall mit *Fusarium*.



Abb. 1: Ein häufig überhöhtes Stickstoffangebot führte 1998 in Kombination mit ungünstigen Witterungsbedingungen zu verzögerter Abreife. In lagernden Beständen war häufig ein erhöhter *Fusarium*-Befall festzustellen.

2 Material und Methoden

Die beschriebenen Freilandversuche zur Bekämpfung echter Fusariosen wurden in den Jahren von 1998-2001 an verschiedenen Standorten im Münsterland durchgeführt. Dabei handelte es sich am Standort Münster um Lehm- bzw. lehmige Tonböden mit Ackerzahlen von 50-58. Im Raum Coesfeld standen Eschböden mit guter Wasserführung und Ackerzahlen von 35-45 zur Verfügung. Die Jahresniederschlagsmenge der Standorte liegt bei etwa 680 mm.

Zur Erzielung eines ausreichenden Befallsdrucks, wurden die Versuche ausschließlich auf pfluglos nach Mais bestellten Flächen angelegt. Als Sorten mit hoher Anfälligkeit wurde Ritmo in einem Fall auch Contur angebaut. Die Anlage der Versuche erfolgte als Blockanlage mit vier Wiederholungen. Die Parzellengröße betrug 18 m² mit Ausmaßen von 10 m x 1,8 m. Anstehende Fungizidbehandlungen wurden mittels Parzellenspritze mit 300 l/ha Wasser und Flachstrahldüsen durchgeführt. Bei der Befallsermittlung wurde der Anteil der partiellen Weißährigkeit je Ähre in Prozent bestimmt und der Prozentsatz befallener Ähren geschätzt.

Die erste Bonitur fand nach dem ersten differenzierten Auftreten von Befallssymptomen etwa 14 Tage nach dem Behandlungstermin statt. Weitere Bonituren wurden dann im Abstand von etwa 10 Tagen durchgeführt. Die Ertragsermittlung, TKG und Feuchtigkeitsbestimmung erfolgte mit, für diese Parzellentechnik, geeigneten Geräten. Über den beim Dreschvorgang anfallen Ausschuss hinaus, wurde das Erntegut nicht weiter gereinigt bzw. abgeseibt.

Die Ermittlung der Toxingehalte nach ELISA bzw. HPLC erfolgte an einer Mischprobe aus den 4 Wiederholungen einer Versuchsvariante.

3 Ergebnisse

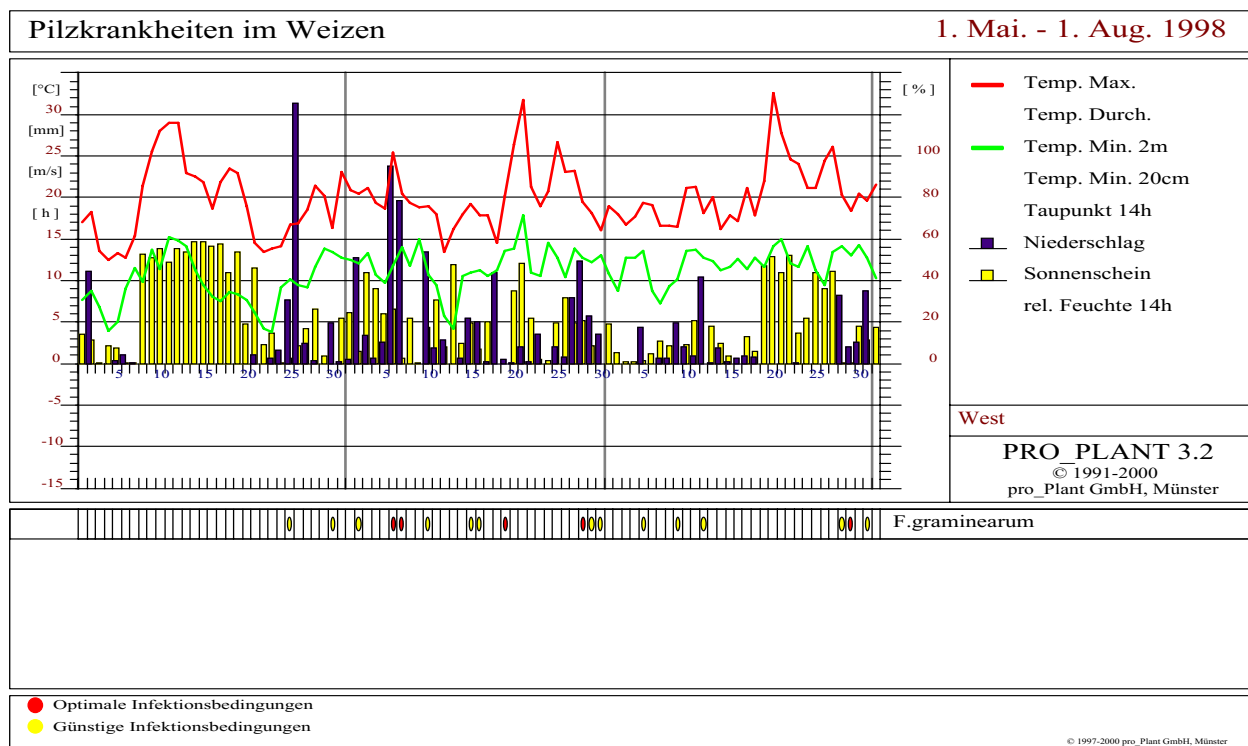


Abb. 2: Im Jahr 1998 herrschte wie schon beschrieben ein überdurchschnittlicher Infektionsdruck. Die Behandlungen wurden am Standort Münster praktisch einen halben Tag nach dem Hauptinfektionsereignis (5. und 6. Juni) durchgeführt. Am 20.

Juni war ein Wirkungsgrad von ca. 50 % durch den Einsatz von 1,0 l/ha Folicur gegen echte Fusariosen festzustellen. Durch den anhaltenden Infektionsdruck reduzierten sich anfängliche Effekte aber wieder. Zum zweiten Boniturtermin Anfang Juli war praktisch kein Unterschied mehr gegenüber der *Fusarium*-unbehandelten Parzelle zu erkennen was sich auch in den ermittelten DON-Werten widerspiegelte (Analyse nach ELISA-Verfahren).

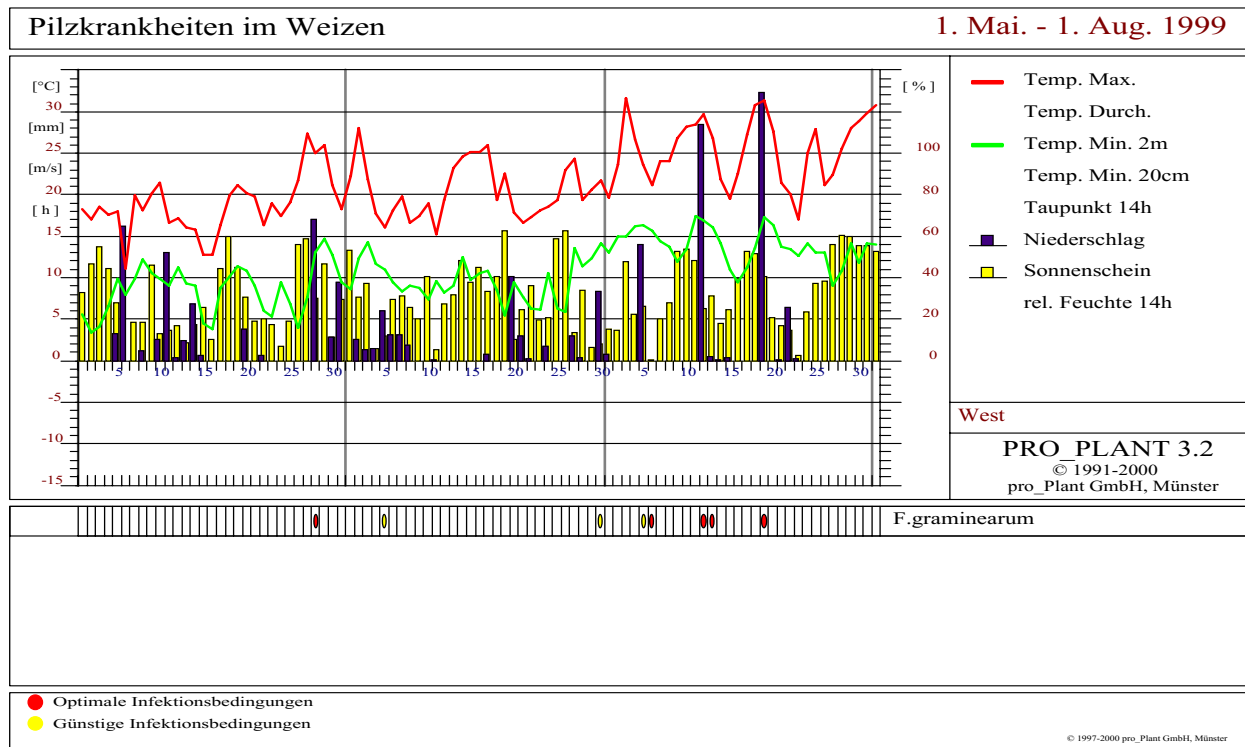


Abb. 3: Ein rel. geringer Infektionsdruck kennzeichnete das Jahr 1999. Hinzu kam, dass angekündigte, starke Niederschlagsereignisse nicht in dem Maße eintraten und die Behandlungstermine weitestgehend ins Leere liefen. Entsprechend gering waren die Effekte auf den Fusariumbefall. Durch die Behandlung mit Folicur wurde Befall mit Gelb- und Braunrost im Vergleich zur Kontrolle am Standort Münster besser kontrolliert. Am Standort Coesfeld ist der Weizen vorzeitig vertrocknet (Analyse nach ELISA – Verfahren).

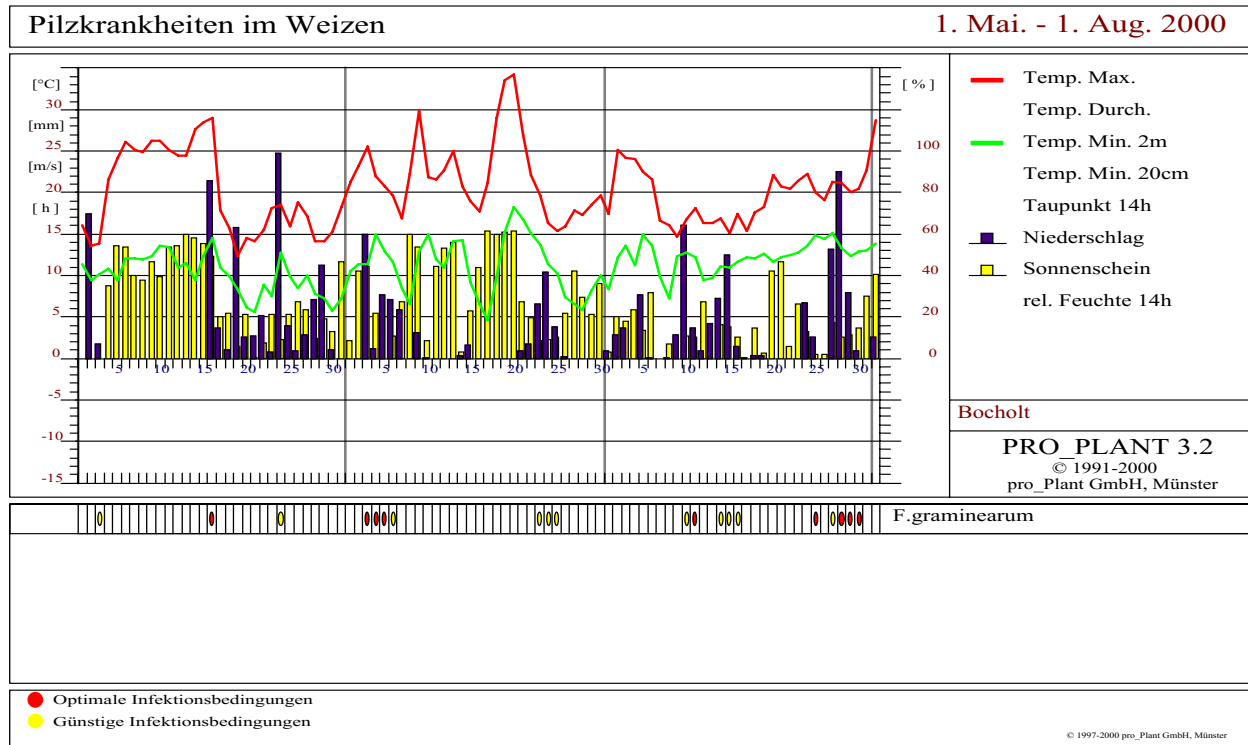


Abb. 4: Im Jahr 2000 war der Infektionsdruck rel. gering. In den pfluglos nach Mais bestellten Versuchen waren letztlich aber doch positive Effekte durch die Behandlungen am 05. und 08. 06. zu beobachten. Dennoch war das Befallsausmaß rel. gering. Erst mit Eintritt der günstigen Infektions- und Entwicklungsbedingungen ab der zweiten Julidekade kam es zu einem deutlichen Befallsanstieg (Analyse nach ELISA – Verfahren).

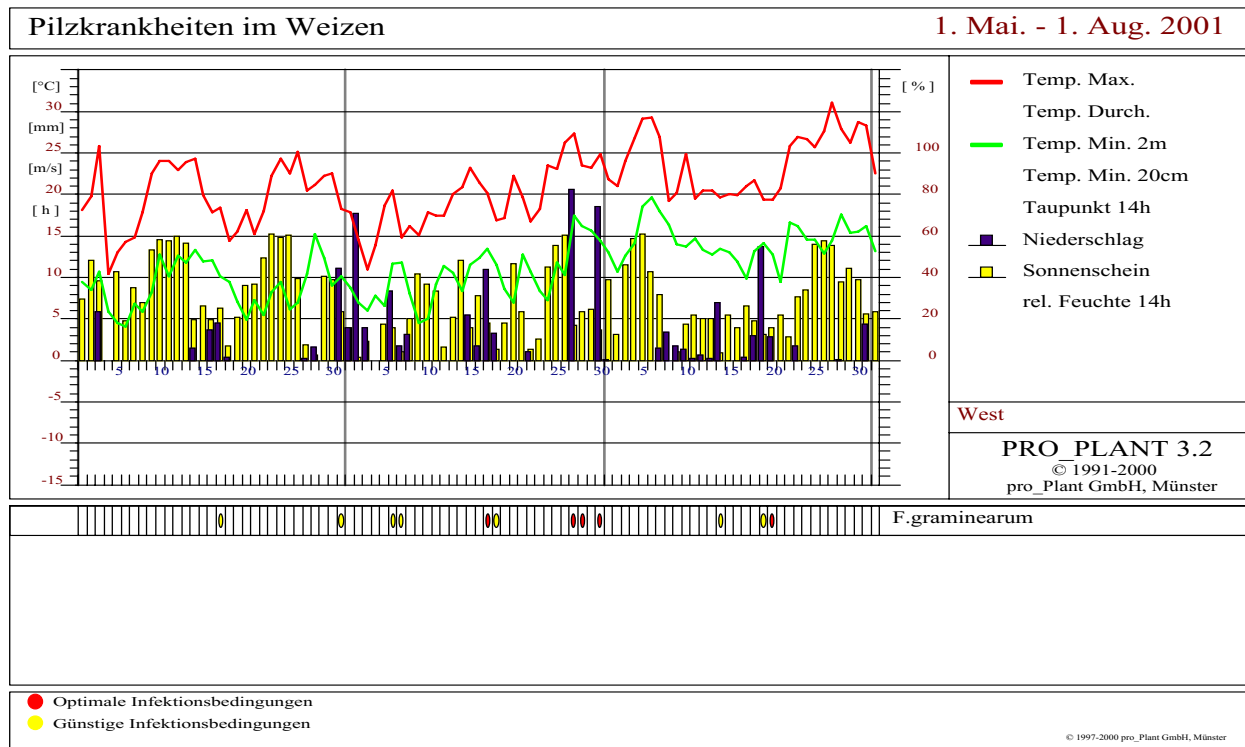


Abb. 5: In der Sorte Flair kam es im Jahr 2001 am Standort Münster zu keinem nennenswertem Befall. Anders am Standort Coesfeld. Auf einem schwarzen, tiefgründigen Eschboden, (schnelle Erwärmung, Feuchtigkeit-haltend) war, ein für das Jahr überdurchschnittlich starker Befall mit *Fusarium* festzustellen. Der Versuch lag in der Sorte Contur die pluglos nach Körnermais angebaut wurde. Als Erreger war nahezu ausschließlich *Fusarium graminearum* auf den befallenen Ähren festzustellen.

Durch die Behandlung am 05. Juni, zum Zeitpunkt der Blüte, konnten kaum Bekämpfungserfolge erzielt werden, was sich auf die zu kühlen Bedingungen für *Fusarium graminearum* Infektionen in diesem Zeitraum zurückführen lässt.

Das der Hauptinfektionstermin um den 15. Juni lag, ist neben den Witterungsbedingungen von einer weiteren Versuchsvariante abzuleiten. In dieser wurde zusätzlich zur Behandlung mit 1,5 l/ha Pronto Plus eine Tankmischung aus 0,3 l/ha Amistar + 0,3 l/ha Gladio am 13. Juni appliziert. Obwohl mit nur minimaler *Fusarium* Wirkung ausgestattet, war dies die einzige von insgesamt 9 Varianten, in der zwischenzeitlich ein, wenngleich geringer Effekt auf den *Fusarium* Befall zu beobachten war.

In diesem Versuch, der im folgenden mit weiteren Varianten dargestellt ist, ist die unbehandelte Kontrolle anders als bei den vorangegangenen Darstellungen nicht mit Mehltau- und Breitbandfungiziden behandelt, also komplett unbehandelt. Aufgrund eines starken Befalls mit Gelbrost kam es zu einer vergleichsweise schnellen Abreife der Kontrolle.

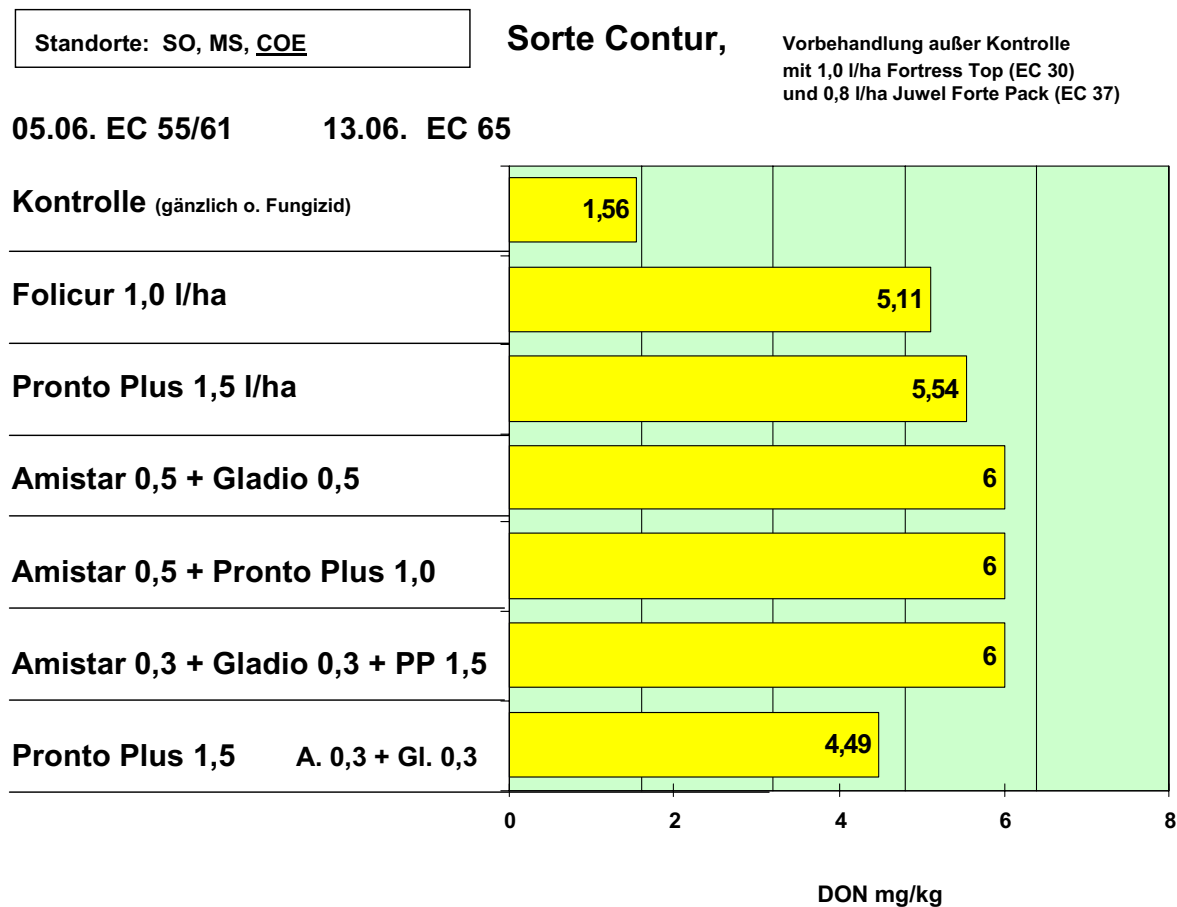


Abb. 6: Weitere Varianten zum unter Abb. 5 beschriebenen Versuch; Einfluss der Abschlussbehandlung auf den DON-Gehalt (COE 2001)

Die Tendenz, dass durch eine gute Krankheitskontrolle ohne fusariumwirksame Komponente das Fusariumrisiko unter entsprechenden Standort- und Witterungsbedingungen steigt, zeigte sich auch in Intensitätsversuchen, die in den Jahren 1999-2001 an den Standorten Altenberge (Münsterland) und Borgentreich (Warburger Börde) durchgeführt wurden.

In diesen Versuchen, in denen es in erster Linie um den Einfluss verschiedener Parameter auf die Abreife des Getreides ging, wurde in den Sorten Ritmo und Contur das Stickstoffangebot zwischen 175, 235 und 335 kg N/ha variiert. Auf die Faktoren Sorte und N-Angebot wurde dann ein unterschiedliches Fungizidprogramm gesetzt. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde eine Einmalbehandlung mit 0,75 l/ha Pronto Plus + 0,7 l/ha Amistar in EC 37/39 mit zwei Doppelbehandlungen verglichen. Die Doppelbehandlungen wurden in EC 37/39 und in EC 51/55 durchgeführt. Die erste Doppelbehandlung bestand aus 2x 1,5 l/ha Opus Top, in der zweiten wurde, aufbauend auf die Einmalbehandlung zusätzlich 1,0 l/ha Amistar zum zweiten Behandlungstermin appliziert.

Im Jahr 1999 erfolgte am Standort Altenberge, die Abschlussbehandlung vor möglichen Fusariuminfektionen am 26. Mai (siehe auch Abb. 4). Da nach Raps bestellt wurde (nach Pflugfurche, Vorvorfrucht Wintergerste) und auch stärkere Inokulumquellen in räumlicher Nähe zum Versuch fehlten, war der Befallsdruck gering.

Die ermittelten Toxingehalte der unbehandelten Kontrollen lagen zwischen 0,55 und 0,8 mg DON je kg Getreide. Auffällig war der Anstieg der DON-Werte durch die Fungizidbehandlungen auf bis zu 1,8 mg DON je kg Getreide (siehe Abb. 7).

Der geringe Einfluss der N-Düngung ist durch die hohe Mineralisationsrate des Standortes im Versuchsjahr zu erklären, die die geplante N-Differenzierung überlagerte.

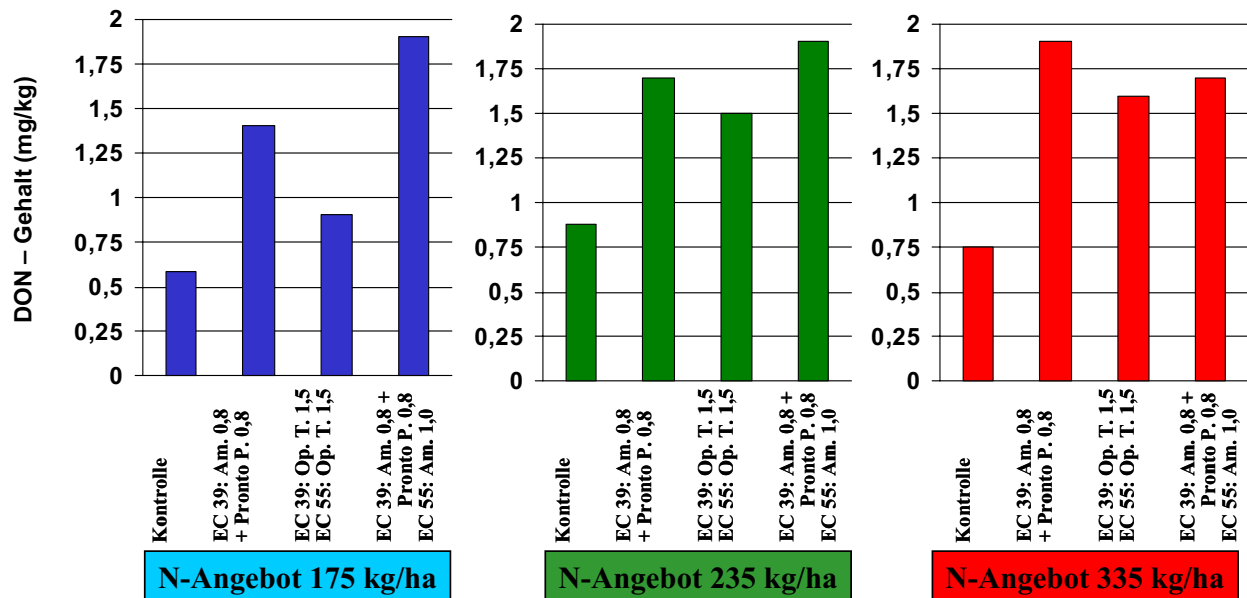


Abb. 7: Einfluss der Produktionsintensität auf den DON-Gehalt nach der Ernte (Sorte: Ritmo, Altenberge 1999/2000)

Im Versuchsjahr 2000/2001 waren die Mineralisationsbedingungen am Versuchsstandort äußerst ungünstig, das erhöhte N-Angebot führte zu abzusichernden Mehrerträgen und zu einer sichtbar verzögerte Abreife. Aufgrund eines ausbleibenden Fusariumdrucks, waren so gut wie keine Unterschiede im DON-Gehalt in Abhängigkeit von Düngung und Fungizideinsatz festzustellen.

Die besondere Bedeutung von Mais als Inokulumquelle und Möglichkeiten der Reduzierung durch eine Förderung der Strohrotte zeigt der folgende Versuch in dem durch das Kleinhäckseln und Eingrubbern der Stoppelrest der DON-Gehalt im Gegensatz zur Direktsaat halbiert werden konnte. Durch diese Maßnahmen konnte in diesem Versuch selbst die phytosanitäre Wirkung des Pfluges übertroffen werden.

DON-Gehalt (mg/kg) - Bodenbearbeitung/Sorte/Fungizid 2000/2001

Vorvorfrucht: WW / Vorfrucht: Körnermais,
Behandlung am 7.6. in EC 61

Fungizide: EC 30 Fortress Top 0,75 l/ha
EC 33 Juwel Forte 0,8 + 0,2 l/ha

T1: Behandlung am 1.6. In EC 51

mit Opus Top 1,25 l/ha

T2: Behandlung am 7.6. in EC 61

mit Pronto Plus 0,9 l/ha + Caramba 0,7 l/ha

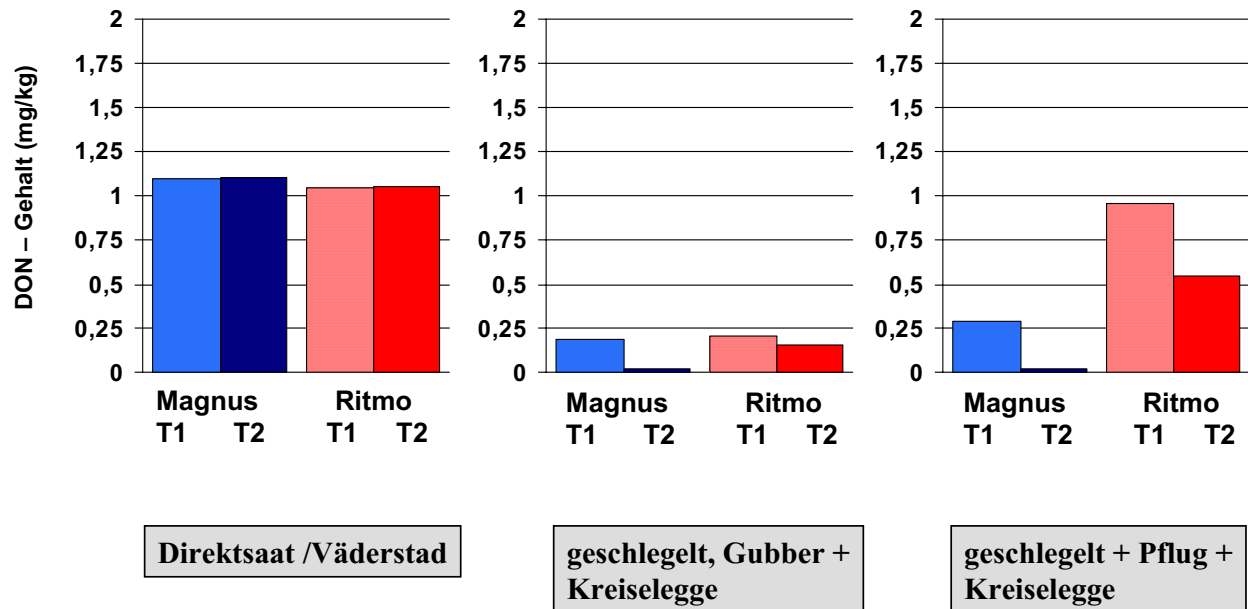


Abb. 8: Einfluss von Saatverfahren, Sorte und Fungizidbehandlung auf den Toxingehalt von Winterweizen.

3 Diskussion

Die Probleme, die durch die Toxinbildung Echter Fusariosen bei der Verwertung von belastetem Getreide bestehen, sind hinlänglich bekannt. Bedingt durch die rel. lange Zeit in der Infektionen möglich sind (Beginn Ährenschieben bis zur Abreife des Getreides) OBST (1993), und dem differenzierten Auftreten der unterschiedlichen, toxinbildenden Fusariumerreger MEIER und OERKE (2000), sind die Einflussmöglichkeiten durch den Einsatz von Fungiziden auf absehbare Zeit gering. Somit stehen pflanzenbauliche Faktoren wie Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Kultur bzw. Sortenwahl und eine maßvolle Produktionsintensität zur Problemminimierung im Vordergrund. Neben den im Beitrag dargestellten Ergebnissen, zeigen auch Untersuchungen von AUFHAMMER et al. (1999) bzw. MEIER und OERKE (2000), das mit zunehmender Produktionsintensität in Abhängigkeit von Jahreswitterung, Standortfaktoren und Sorteneinfluss das Fusariumrisiko steigt.

Da die Produktionsintensität (u. a. notwendiger Einsatz von Wachstumsregler- Fungizid- und Insektizidmaßnahmen) neben Sorte und Witterungsverlauf ganz wesentlich vom pflanzerverfügbaren Stickstoffangebot abhängt, ist eine Optimierung desselben ein maßgeblicher Faktor bei der Fusariumvorbeuge.

Zusammenfassung

In der Zeit von 1995-2001 wurden an unterschiedlichen Standorten in Westfalen-Lippe verschiedene Feldversuche zur gezielten Fusariumbekämpfung durchgeführt. Bei isolierten Infektionsereignissen war mit zeitnahen Behandlungen von z.B. 1,0 l/ha Folicur eine Reduzierung von Fusarium und DON (Deoxynivalenol) Befall um ca. 40-60 % zu erzielen. Bei infektionsfernen Behandlungen bzw. in Jahren mit anhaltendem Infektionsdruck waren die Bekämpfungserfolge gering. In Einzelversuchen war der DON-Gehalt gegenüber unbehandelten Varianten erhöht. Dies zeigt sich besonders bei Fungizidabschlussbehandlungen ohne ausreichend wirksame Fusariumkomponente. Hohe Produktionsintensität bedingt durch verzögerte Abreife ein erhöhtes Fusariumrisiko.

Summary

Different field-trials with the aim to control Fusarium were done in Westfalia in the years 1995-2001. Fusarium and DON (Deoxynivalenol) could be reduced by 40-60 %, if the application was done near to isolated infection periods. As fungicide, Folicur with the rate of 1.0 l/ha was used.

Terminating too early or too resulted in poor control. The same true in years with long infection periods. In some cases even an increase of DON in comparison to untreated control could be obtained. Especially when the last fungicide application was done without active compounds against Fusarium.

Because of a longer ripening period, there is a higher risk of Fusarium in intensive production systems.

Literatur

- AUFHAMMER, W., HERMANN, W., KÜBLER, E., LAUBER, U. und SCHOLLENBERGER, M. (1999): Ährenbefall mit *Fusarium graminearum* und Mykotoxingehalt des Korngutes von Winterweizen, -triticale und -roggen in Abhängigkeit von Sorte und Anbauintensität. Pflanzenbauwissenschaften **3**, 32-39.
- MEIER, A., OERKE, E.-C. (2000): Möglichkeiten der Bekämpfung von *Fusarium spp.* und *Microdochium nivale* an Weizen durch Fungizide. Deutsche Pflanzenschutztagung 2000, **376**, 86.
- OBST, A. (1993): Krankheiten und Schädlinge des Getreides. Gelsenkirchen-Buer, 16-21.

Günter Klingshagen, Dr. Johann Frahm
Referat für Landbau und Pflanzenschutz (RLP Münster) der Landwirtschaftskammer
Westfalen-Lippe
Postfach 5980, 48135 Münster
eMail: rlp@lk-wl.nrw.de

Auftreten und Bekämpfung von *Fusarium*-Arten im Rheinland

Incidence and control of *Fusarium* species causing head blight in the Rhineland, Germany

E.-C. Oerke, A. Meier, K. Lienemann, G. Meyer, J. Muthomi,
A. Schade-Schütze, U. Steiner und H.-W. Dehne

1 Einleitung

Der Befall von Weizenähren mit phytopathogenen Pilzen aus der Gattung *Fusarium* kann zu erheblichen quantitativen Ertragsverlusten führen, in vielen Regionen stellt aber die mit dem Kornbefall verbundene Kontamination des Erntegutes mit Mykotoxinen das größere Pflanzenschutzproblem dar. Mykotoxine sind niedermolekulare Sekundärmetabolite von Pilzen, die bei Säugetieren akute oder chronische Vergiftungen hervorrufen und damit die Eignung des Getreides als Nahrungs- und Futtermittel erheblich einschränken können. Die Mykotoxinbelastung der Körner variiert in Abhängigkeit von Standort und Jahr erheblich, da der Befall sowohl von den Witterungsbedingungen, insbesondere den Niederschlägen zur Zeit der Weizenblüte, als auch von verschiedenen pflanzenbaulichen Faktoren sowie den auftretenden Pathogenarten bzw. -isolaten maßgeblich beeinflusst wird. Die Zusammenhänge zwischen den Symptomen an den Ähren einerseits und dem Anteil befallener Körner im Erntegut bzw. deren Belastung mit für Mensch und Tier toxischen Metaboliten andererseits sind daher variabel.

2 Pathogen-Arten und Mykotoxine

Weizenähren können von einer Vielzahl von *Fusarium*-Arten sowie von *Microdochium nivale* befallen werden, deren taxonomische Differenzierung in Tabelle 1 zusammengefasst ist. Aggressivere Arten wie *F. culmorum* und *F. graminearum* verursachen häufig eine partielle Taubährigkeit, bei den anderen Arten beschränken sich die Symptome eher auf die befallenen Körner bzw. Spelzen. In einigen Anbaugebieten treten aufgrund des Klimas bzw. des Fruchtwechsels einzelne Arten bevorzugt bzw. fast ausschließlich auf (PARRY *et al.* 1995) – so begünstigt die Vorfrucht Mais das Auftreten von *F. graminearum* (BECK *et al.* 1997, SUTY und MAULER-MACHNIK 1995), in kühleren Regionen ist dagegen *F. culmorum* stärker vertreten (BECK 1995), in Nordwesteuropa breiten sich seit einiger Zeit vor allem *F. avenaceum* und *F. poae* aus (BOTALLICO 1998). In mehrjährigen Untersuchungen an verschiedenen Standorten im Rheinland war das Spektrum der *Fusarium*-Arten am Erntegut sehr breit (Abb. 1): Bei einer Befallshäufigkeit zwischen 4 % und mehr als 50 % waren *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* und *F. sporotrichioides* die häufigsten Arten, wobei an einigen Standorten einzelne Arten – auch über mehrere Jahre hinweg – dominierten, die Witterung während der Weizenblüte aber z.B. 1998 auch zu einem verstärkten Befall mit *F. graminearum* führte. Im Rheinland muss daher von einem Mischbefall der Ähren mit einem *Fusarium*-Komplex ausgegangen werden, zu dem vor allem

im organischen Landbau oft noch Befall mit *Microdochium nivale* kommt; die durch dieses Pathogen verursachten Symptome können makroskopisch nicht von denen der *Fusarium*-Arten unterschieden werden.

Tab. 1: Am Komplex der Ährenfuarirose des Weizens in Europa beteiligte phytopathogene Pilze: Anamorph, Teleomorph und Sporenformen.

Anamorph <i>Fusarium</i>	Teleomorph	Konidienform		Chlamydo- sporen
		Makro-K.	Mikro-K.	
<i>F. avenaceum</i>	<i>Gibberella avenacea</i>	lang, dünn	selten, 0–3 Sept.	-
<i>F. crookwellense</i> ¹	- ²	mit Fußzelle	-	• ³
<i>F. culmorum</i>	-	kompakt	-	•
<i>F. equiseti</i>	<i>Gibberella intricans</i>	sichelförmig	selten, 1–3 Sept.	•
<i>F. graminearum</i>	<i>Gibberella zeae</i>	Fußzelle, zylind.	-	selten
<i>F. poae</i>	-	selten, 3–5 Sept.	kugelig	•
<i>F. sporotrichioides</i>	-	3–5 Septen	kugel-/spindelf.	•
<i>F. sambucinum</i>	<i>Gibberella pulicaris</i>	kurz, gestaucht	-	•
<i>F. tricinctum</i>	<i>Gibberella tricincta</i>	mit Fußzelle	zitronenförmig	•
<i>Microdochium nivale</i>	<i>Monographella nivalis</i>	1–3 Septen	-	-

¹ Synonym *F. cerealis*,

² nicht bekannt bzw. nicht vorhanden,

³ vorhanden

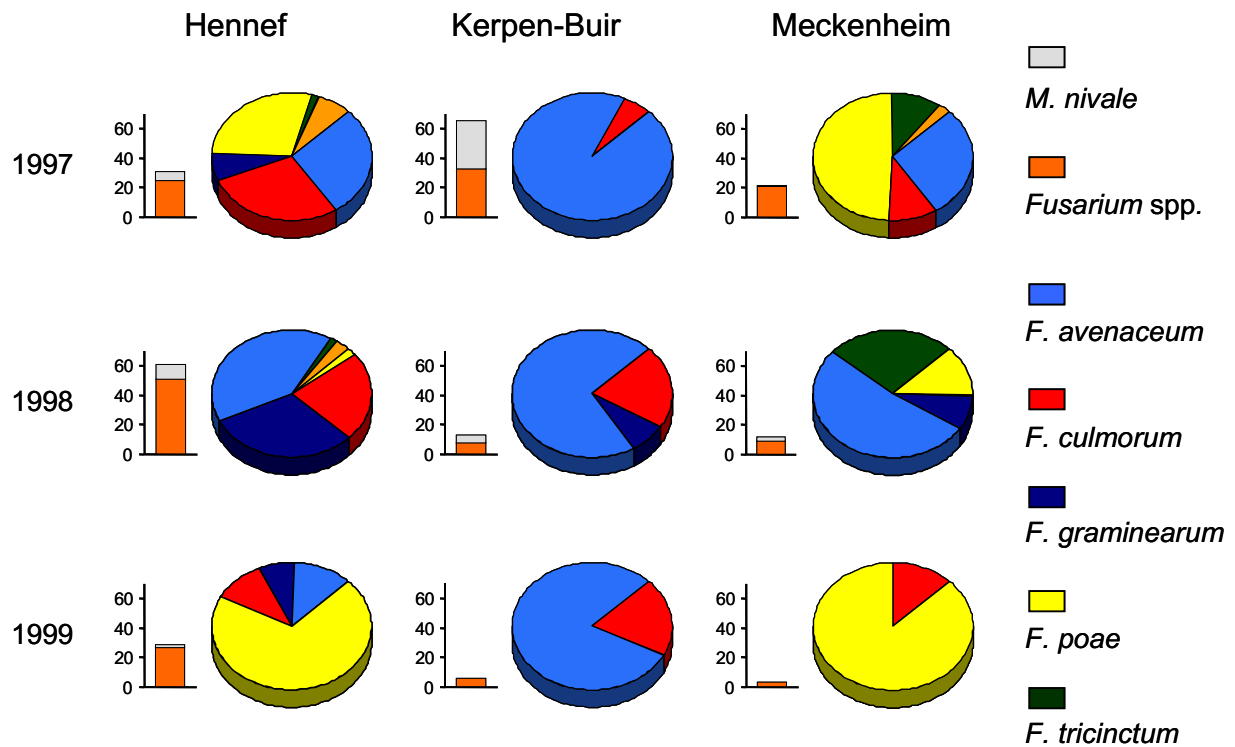


Abb. 1: Befallshäufigkeit von *Fusarium*-Arten und *Microdochium nivale* an Weizenkörnern und Spektrum der auftretenden *Fusarium*-Arten im integrierten Anbau im Rheinland in den Jahren 1997-99.

Während für *M. nivale*, den früher fälschlicherweise als *Fusarium nivale* bezeichneten Erreger des Schneeschimmels, keine Mykotoxine bekannt sind, ist das Spektrum der von den verschiedenen *Fusarium*-Arten gebildeten toxischen Sekundärmetabolite sehr groß; Tabelle 2 zeigt nur einen Ausschnitt der häufigsten Mykotoxine, deren toxikologische Relevanz aber z.T. noch nicht geklärt ist. Neben den Fumonisin, die vor allem von *Fusarium*-Arten an Mais gebildet werden, gehören einige Vertreter der Trichothecene vom B-Typ zu den bekanntesten Toxinen, von denen Deoxynivalenol (DON) sehr häufig nachgewiesen worden ist und z.T. als Leittoxin angesehen wird. Andere Trichothecene wie das Nivalenol (NIV) oder das T2-Toxin sind aber für Säugetiere um den Faktor 10 – 15 toxischer als DON (MILLER *et al.* 2001).

Tab. 2: Von *Fusarium*-Arten gebildete Mykotoxine.

Trichothecene:	A-Trichothecene:	T2-Toxin, HT2-Toxin, Scirpenol, Diacetoxy-scirpenol, Neosolaniol, etc.
	B-Trichothecene:	Deoxynivalenol (DON), 3- bzw. 15-Acetyl-DON, Nivalenol (NIV), 4-Acetyl-NIV, Fusarenon X, etc.
Zearalenone:	Zearalenon (ZEA), Zearalenole	
Fumonisine:	Fumonisin B ₁ , B ₂ , B ₃	
Moniliformin		
Fusarin C		
etc.		

Tab. 3: Palette der von verschiedenen *Fusarium*-Arten an Getreide gebildete Mykotoxine (verändert nach DESJARDINS und PROCTOR 2001).

<i>Fusarium</i> -Art	Trichothecene	Zearalenone	Fumonisine	Moniliformin	Fusarine	zyklische Peptide
F. avenaceum	○ ¹		○	●	●	●
F. culmorum	●	●			●	
<i>F. crookwellense</i>	●	●			●	○
<i>F. equiseti</i>	●	●	○	●	○	○
<i>F. graminearum</i>	●	●	○		●	
<i>F. moniliforme</i>			●	◆	●	○
<i>F. poae</i>	●		○		●	
<i>F. sambucinum</i>	●		○		●	●
<i>F. sporotrichioides</i>	●		○		●	
F. subglutinans			◆	●	●	●
<i>F. tricinctum</i>	○				●	●

¹ ○ keine Produktion nachgewiesen, ◆ Produktion durch einige Isolate, ● Produktion verbreitet

Die Palette der Toxine, die von den an Getreide auftretenden *Fusarium*-Arten gebildet werden können, ist äußerst vielfältig (Tabelle 3). Trichothecene werden von vielen an Weizen beschriebenen Arten produziert, DON, das aufgrund seiner Phytotoxizität auch die Aggressivität der Pathogene beeinflusst, wird aber nur von *F. culmorum* und *F. graminearum* gebildet und kann daher nur bei Vorherrschen dieser beiden Arten als Leittoxin für den Mykotoxingehalt von Kornproben angesehen werden. *F. poae* kann dagegen NIV und A-Trichothecene bilden, für *F. avenaceum*, die häufigste *Fusarium*-Art im Rheinland, ist die Produktion von Moniliformin, Fusarinen und zyklischen Peptiden, über deren Toxizität wenig bekannt ist, beschrieben. Die anderen im Rheinland an Weizen auftretenden Arten können neben verschiedenen A- und B-Trichothecenen vor allem auch Zearalenone produzieren.

Nicht nur die *Fusarium*-Arten unterscheiden sich im Spektrum der gebildeten Sekundärmetabolite, vielmehr variieren Spektrum und Menge der Mykotoxine auch zwischen den Isolaten einer Art z.T. erheblich. Für *F. culmorum* aus dem Rheinland wurden z.B. sowohl DON-bildende wie auch NIV-bildende Isolate beschrieben, wenige Isolate bildeten beide Toxine (Muthomi *et al.* 2000). Die Aggressivität der Isolate - gemessen als Reduktion des Tausendkorngewichtes der inokulierten Weizenpflanzen - war mit der produzierten DON-Menge korreliert.

Untersuchungen an jeweils mehr als 10 Winterweizensorten am Standort Hennef ergaben für die Jahre 1997 und 1998 durchschnittliche Trichothecen-Gehalte von 400 – 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, daran hatten neben DON und dessen Derivaten 3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON Nivalenol und HT2-Toxin einen Anteil von ca. 20 % bzw. < 5 %. Der Gesamtgehalt des Erntegutes blieb damit im Durchschnitt unter einem möglichen Grenzwert für DON von 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ für Speisegetreide. Über den Gehalt an weiteren Mykotoxinen, vor allem solchen, die von *F. avenaceum* und *F. poae* gebildet werden, liegen keine Ergebnisse vor. Für viele dieser Sekundärmetabolite fehlt zudem eine toxikologische Bewertung, die Voraussetzung für eine Bewertung des Befalls mit diesen *Fusarium*-Arten.

3 Einflussfaktoren auf Befall und Mykotoxingehalt

Das Auftreten des *Fusarium*-Befalls der Ähre wird maßgeblich durch die Witterung, insbesondere durch Niederschläge zur Zeit der Weizenblüte, bestimmt. Die Körner können auch noch zu späteren Entwicklungsstadien befallen werden, wobei *F. graminearum* und *F. avenaceum* offenbar stärker vom Stadium der höchsten Anfälligkeit zur Zeit der Blüte abhängig sind als *F. culmorum* und *F. poae* (A. Meier, unveröff.). Neben den kaum beeinflussbaren Witterungsbedingungen wirken sich aber auch pflanzenbauliche Maßnahmen auf den Ährenbefall aus bzw. lassen sich für eine Befallsprävention nutzen. Dies sind bekanntermaßen vor allem die Vorfruchtwirkung von Mais als wichtiger Wirtspflanze für viele *Fusarium*-Arten, insbesondere *F. graminearum* (= *Gibberella zae*), sowie die Bodenbearbeitung. Eine Wirtspflanzenart als Vorfrucht und eine nicht-wendende Bodenbearbeitung, bei der Ernterückstände auf der Bodenoberfläche verbleiben, fördern das Überleben der *Fusarium*-Arten an den organischen Partikeln und damit das Inokulumpotenzial in der nachfolgenden Weizenkultur (Abbildung 2). Dagegen reduziert Kartoffel als Vorfrucht bzw. eine Bodenbearbeitung mit dem Pflug den organischen Anteil im Boden und damit das Befallsrisiko durch die *Fusarium*-Arten. Der Ährenbefall lag nach Kartoffeln bei 1,5 %, nach Weizen bei 0,5 % bzw. 13 %.

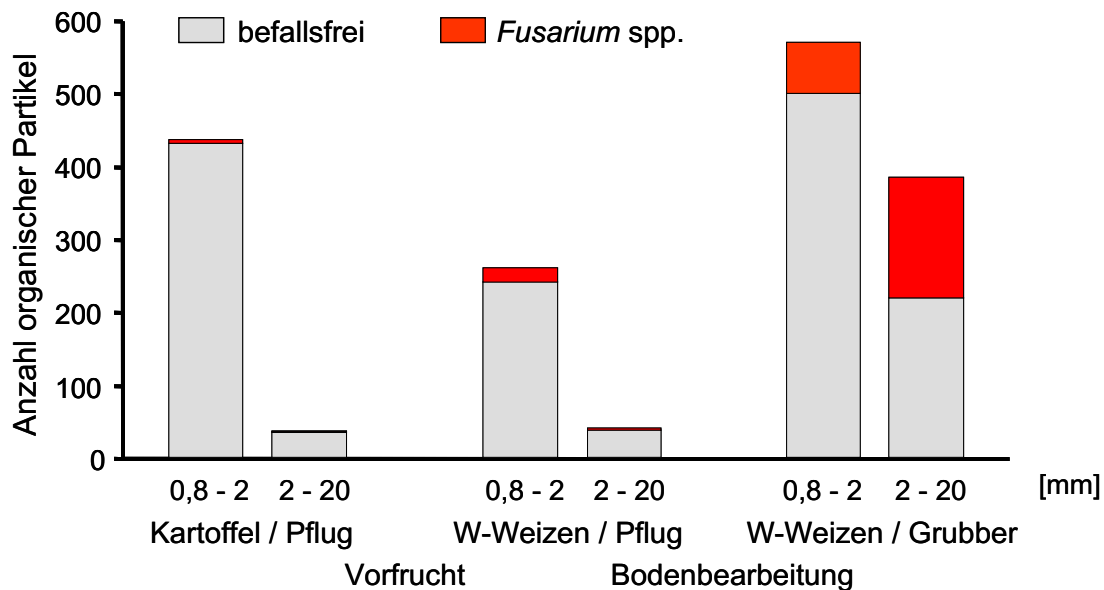


Abb. 2: Einfluss von Fruchtwechsel und Bodenbearbeitung auf das Inokulumpotenzial von *Fusarium* spp. an den organischen Partikeln im Boden (Fraktion 0,8 – 2 mm bzw. 2 – 20 mm, Hennef 1999).

Die Intensität des Anbaus kann sich ebenfalls auf den Ährenbefall mit *Fusarium*-Arten und die Mykotoxinbelastung der Körner auswirken. In mehrjährigen Felderhebungen ohne zusätzliche Inokulation der Pathogene förderten eine höhere Stickstoff-Düngung und die Verwendung von Wachstumsregulatoren und Blattfungiziden den Befall durch eine höhere Bestandesdichte, die kürzere Halmlänge, ein verändertes Mikroklima im Bestand, die bessere Blattgesundheit und/oder eine längere Abreife (Abbildung 3). Im Mittel der zwölf Sorten nahm die Befallshäufigkeit der Körner um mehr als 100 %, der DON-Gehalt um 30 % zu. Die geringere Anbauintensität und eine vielgliedrige Fruchtfolge sind wahrscheinlich auch die wichtigsten Gründe für die im Durchschnitt der Jahre geringere Belastung von Weizen aus dem organischen Anbau. In einem zweijährigen Vergleich am Standort Hennef erreichte die Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. an den Körnern im organischen Anbau lediglich 30 % der Werte im integrierten Anbau ohne gezielte Maßnahmen gegen einen Ährenbefall; die DON-Belastung der Körner lag bei 30 – 50 % (Abbildung 4). Eine Applikation von Azol-Fungiziden zur Zeit der Vollblüte (BBCH 65) konnte im integrierten Anbau vor allem den DON-Gehalt der Körner deutlich reduzieren, sodass die Mykotoxinbelastung im Bereich der Körner aus organischem Anbau, 1998 bei starkem Befallsdruck sogar unter diesen Werten lag.

Die Sortenwahl kann dazu beitragen, den Ährenbefall mit *Fusarium*-Arten zu minimieren. Zwar sind derzeit weltweit (voll-)resistente Weizensorten nicht vorhanden, in der Bundessortenliste variiert die Sorteneinstufung zwischen 2 und 8 (ANONYM 2000). Von den etwa 80 aufgeführten Sorten weisen sieben – vor allem Neuzüchtungen – eine Bewertung von 2 oder 3 (wenig anfällig) auf, nur für neun Genotypen liegt die Einschätzung bei 6 oder höher. Mehrjährige Erhebungen in den Landessortenversuchen an zwei Stanorten im Rheinland deuten zwar auf eine gewisse Variabilität der *Fusarium*-Resistenz der Sorten – auch aufgrund von Genotyp x Umwelt-Interaktionen? – hin, sie belegen aber auch die genetisch fixierten Unterschiede zwischen den Züchtungen, die, soweit möglich, noch stärker von den Anbauern genutzt werden sollten (Abbildung 5).

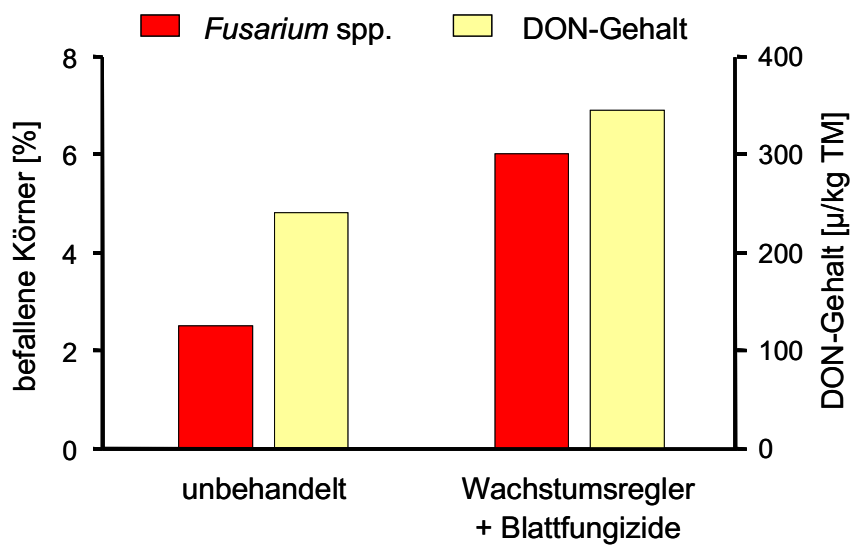


Abb. 3: Einfluss der Anbauintensität auf den durchschnittlichen *Fusarium*-Befall und Deoxynivalenol-Gehalt von 12 Weizensorten (Hennef 1999, A. Meier, unveröff.).

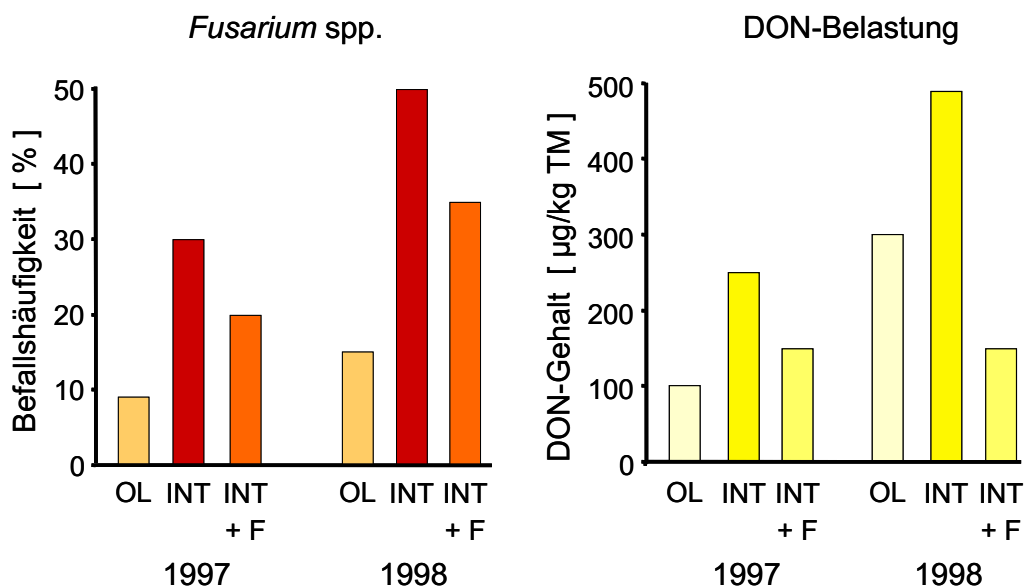


Abb. 4: *Fusarium*-Befallshäufigkeit und Deoxynivalenol-Gehalt von Weizenkörnern aus organischem (OL) und integriertem Anbau (INT) mit (+ F) und ohne Azolbehandlung zur Zeit der Blüte (A. Meier, unveröff.).

4 Einfluss von Fungiziden

Wie bereits gezeigt, führt die Verwendung von Blattfungiziden und die damit verbundene weitgehende Gesunderhaltung des Blattapparates des Weizens sowie der Einsatz von Wachstumsregulatoren zu einer leichten Zunahme des Ährenbefalls durch *Fusarium*-Arten, was auch durch eine - gegenüber mit Blattpathogenen befallenen Pflanzen - längere Abreife

erklärt werden kann. Für eine direkte Bekämpfung des Ährenbefalls mit den mykotoxinbildenden *Fusarium*-Arten haben sich die Azol-Fungizide Metconazol und Tebuconazol als geeignet erwiesen, wenn sie zur Zeit der Weizenblüte im Zeitraum von etwa zwei Tagen vor bzw. nach der Infektion appliziert werden können. *In vitro* hemmen sie vor allem das Myzelwachstum von *Fusarium* spp., während *M. nivale* als weiteres Pathogen an Weizenähren eine deutlich geringere Sensitivität aufweist.

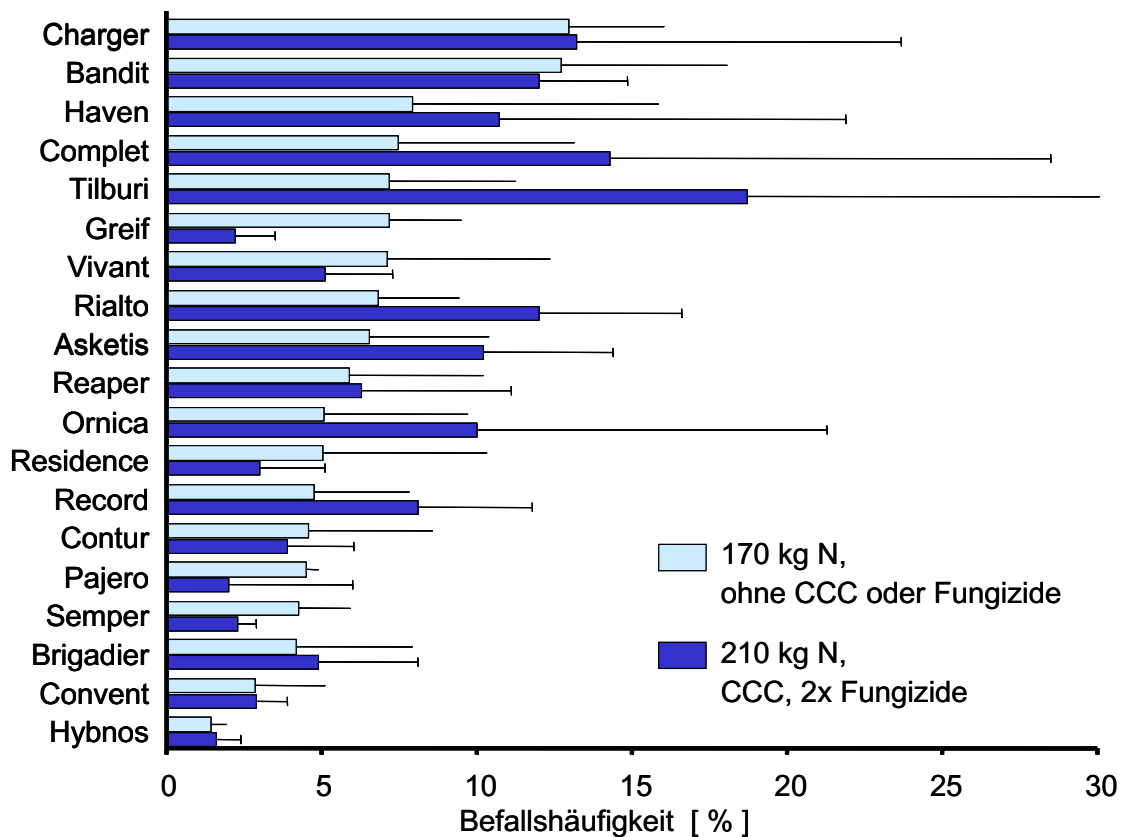


Abb. 5: Einfluss der Sorte auf die *Fusarium*-Befallshäufigkeit von Weizenkörnern in Abhängigkeit der Anbauintensität: Mittelwerte und Standardabweichungen für den Befall an den Standorten Kerpen-Buir (1998, 1999) und Neukirchen-Vluyn (2000, K. Lienemann, unveröff.).

In der landwirtschaftlichen Praxis wird der Zeitpunkt der Blüten- bzw. Ähreninfektion durch *Fusarium* spp. durch die Niederschlagsereignisse nach dem Ährenschieben bestimmt: In den meisten Fällen muss von einem kontinuierlich vorhandenen Inokulumpotenzial ausgegangen werden, was bei wiederholten Niederschlägen eine optimale Terminierung einer Fungizidanwendung ebenso wie die durch Regen feuchten Bestände selbst erschwert. In dreijährigen Untersuchungen an drei Standorten lag die Befallshäufigkeit der Körner bei durchschnittlich 25 %. Eine einmalige Applikation der Azolfungizide Metconazol und Tebuconazol mit der empfohlenen Aufwandmenge zur Zeit der Blüte erbrachte im Mittel der Versuchsjahre nur eine geringe Reduktion der Befallshäufigkeit um 10 – 20 %, die DON-Belastung der Körner konnte dagegen um 50 - 60 % gesenkt werden (Abbildung 6). Diese positive Wirkung konnte auf die Reduktion der DON-produzierenden *Fusarium*-Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* zurückgeführt werden, welche aber nur einen Anteil von 17 % am gesamten Kornbefall hatten. Die Wirksamkeit von Fungiziden auf den

Mykotoxingehalt des Ernteguts ergibt sich aus I) der Wirkung auf die Häufigkeit und Intensität der Besiedlung der Körner durch die verschiedenen *Fusarium*-Arten und / oder II) der Wirkung auf die Toxinbildung je Pilzbiomasse bzw. die Zusammensetzung und Sekretion der gebildeten Mykotoxine.

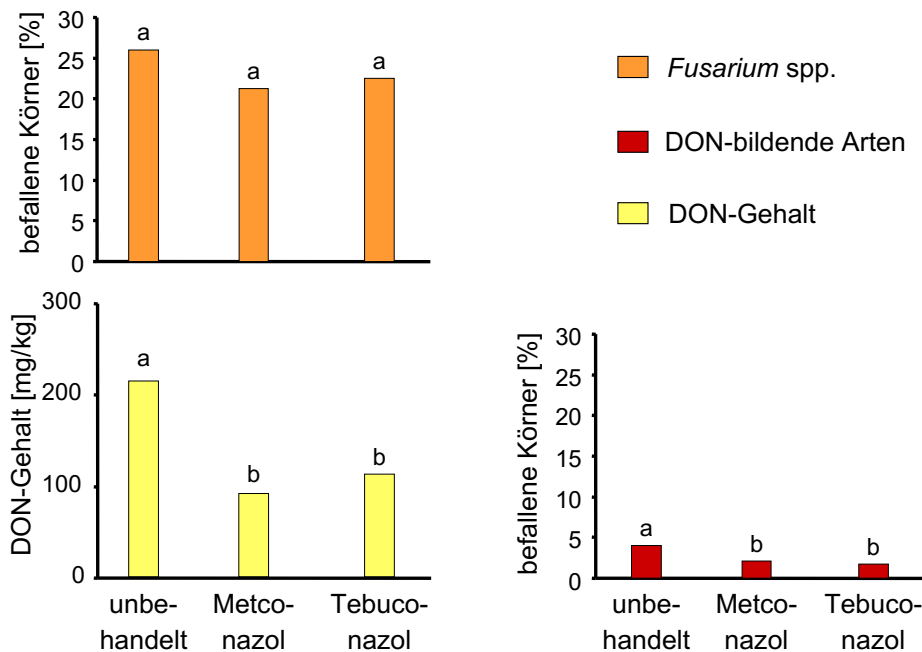


Abb. 6: Einfluss einer einmaligen Applikation von Azolfungiziden zur Zeit der Weizenblüte auf die Befallshäufigkeit aller *Fusarium*-Arten (oben) bzw. der DON-bildenden *Fusarium*-Arten (unten rechts) an Weizenkörnern sowie deren DON-Gehalt (unten links); Mittelwert von dreijährigen Untersuchungen an drei Standorten, 1997-99 (A. Meier, unveröff.). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,05$)

Die Wirksamkeit der Azol-Fungizide gegenüber den verschiedenen *Fusarium*-Arten erwies sich als unterschiedlich. Während die Befallshäufigkeit der DON-produzierenden Arten *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* um 30 – 50 % reduziert werden konnte, erreichte die Wirksamkeit gegenüber den anderen Arten z.T. deutlich geringere Werte (Abbildung 7). In Untersuchungen in den Jahren 1999 und 2000 an acht Standorten lag die Wirksamkeit der Azole gegenüber der vorherrschenden Art *F. avenaceum* bei einer einmaligen Applikation zu BBCH 65 sogar im negativen Bereich, nur eine zweite Behandlung zu BBCH 71 ermöglichte einen ausreichenden Schutz der Ähren (LIENEMANN *et al.* 2002).

Da einerseits Azole nur eine geringe Wirkung gegen *Microdochium nivale* als Verursacher von typischen Befallssymptomen an der Ähre aufweisen, andererseits die gegenüber diesem Erreger sehr wirksamen, gegenüber *Fusarium*-Arten aber weitgehend unwirksamen Strobilurin-Fungizide in den letzten Jahren – nicht zuletzt wegen ihrer ertragssteigernden Nebenwirkungen auf die Pflanzen (BECK und OERKE 2000, BECK *et al.* 2002, GROSSMANN und RETZLAFF 1997) – im westeuropäischen Weizenanbau weite Anwendung gefunden haben, wurden die Auswirkungen von Strobilurin-Fungiziden auf *Fusarium*-Befall und DON-Gehalt von Weizen unter verschiedenen Anbaubedingungen erfasst. Dabei konnte die gute Wirkung von Azoxystrobin gegen *M. nivale* bestätigt werden.

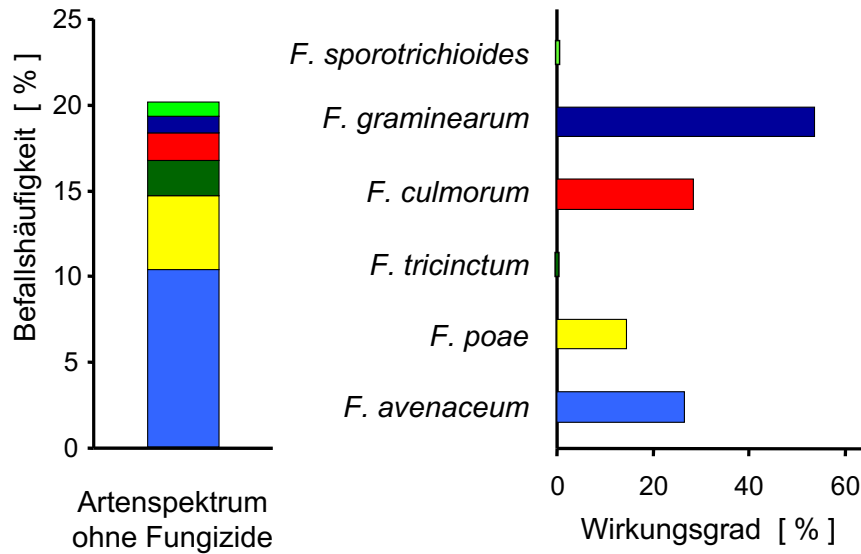


Abb. 7: Wirksamkeit einer einmaligen Applikation von Azol-Fungiziden zur Zeit der Weizenblüte auf die Befallshäufigkeit der an den Weizenkörnern auftretenden *Fusarium*-Arten; Mittelwert von Untersuchungen an drei Standorten, 1997-99 (A. Meier, unveröff.).

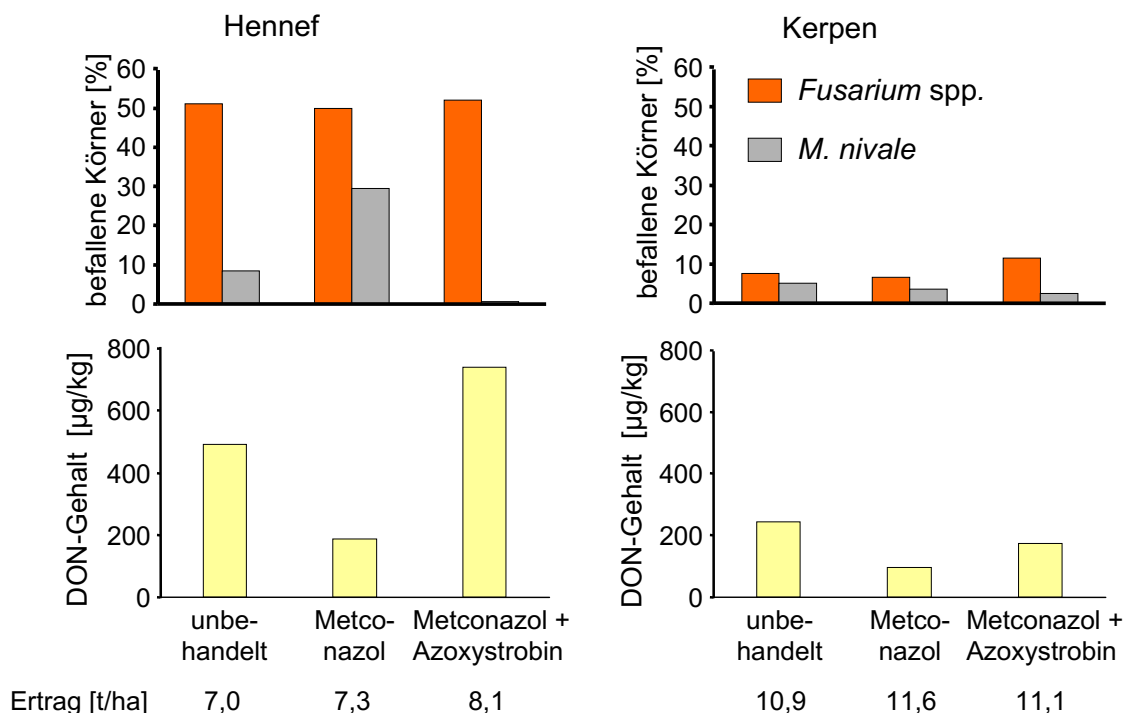


Abb. 8: Einfluss von Azoxystrobin als Mischpartner eines Azol-Fungizids auf *Fusarium*-Befall und Deoxynivalenol-Belastung von Weizenkörnern an zwei Standorten im Rheinland, 1998 (A. Meier, unveröff.).

Die Auswirkungen auf die *Fusarium*- bzw. Mykotoxinbelastung der Körner variierten dagegen zwischen einer leichten Reduktion bis zu einer deutlichen Steigerung, insbesondere des DON-Gehaltes (Abbildung 8); dieser negative Effekt war bei einer deutlichen

Ertragssteigerung durch Azoxystrobin zu beobachten. In anderen Untersuchungen konnte die große Variabilität in der Wirkung von Strobilurinen auf *Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung der Körner bestätigt werden (LIENEMANN *et al.* 2002), eine permanente Steigerung durch Strobilurine war nicht zu verzeichnen. Die Unterschiede in den Auswirkungen dürften vor allem auf den verschiedenen Anwendungsterminen bzw. Aufwandmengen der Fungizide, aber auch auf Unterschieden in der Mikroflora der behandelten Weizenähren beruhen.

5 Bewertung

Der *Fusarium*-Befall von Weizenähren und die damit verbundene Mykotoxinbelastung des Ernteguts wird vor allem durch Niederschlagsereignisse nach dem Ährenschieben bestimmt und ist daher kaum vorhersagbar. Das Befallsrisiko kann aber durch eine weit gestellte Fruchtfolge, zumindest den Verzicht von Mais als direkter Vorfrucht, eine Bodenbearbeitung, die zu einem schnellen Abbau von Ernterückständen in der obersten Bodenschicht führt, sowie die Wahl einer (teil-)resistenten Sorte deutlich verringert werden. Im integrierten Anbau sollte zusätzlich die befallsfördernde Wirkung einer hohen Stickstoffdüngung und der Verwendung von Wachstumsregulatoren beachtet werden, ebenso die nur eingeschränkte Wirksamkeit von Azolfungiziden für eine direkte Bekämpfung zur Zeit der Blüte (Abbildung 9). Im organischen Landbau, wo dem Frühbefall des Weizens mit *Microdochium nivale* aufgrund des fehlenden Beizschutzes eine erhebliche Bedeutung zukommt, hat die Sortenwahl eine noch größere Bedeutung für die Befallsprävention, die auch durch eine intensive Kontrolle der Unkräuter als weiterer Inokulumquelle für *Fusarium*-Arten unterstützt werden kann (MEIER *et al.* 2002).

Insbesondere in Anbaugebieten wie dem Rheinland, wo der Ährenbefall aufgrund der klimatischen und pflanzenbaulichen Vorgaben durch einen Komplex von *Fusarium*-Arten verursacht wird, muß neben DON das Auftreten und die Bedeutung der von den verschiedenen Patho-genarten gebildeten anderen Mykotoxine stärkere Beachtung finden.



Abb. 9: Bewertung der Einflussmöglichkeiten auf das Auftreten von *Fusarium* spp. an Weizenähren bzw. die durch sie verursachte Mykotoxinbelastung im integrierten Weizenanbau.

6 Zusammenfassung

In mehrjährigen Untersuchungen im Rheinland traten an den Körnern von Winterweizen vor allem *Fusarium avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* und *F. sporotrichioides* auf. Die Befallshäufigkeit variierte in Abhängigkeit von Standort und Umweltbedingungen zwischen weniger als 5 % und mehr als 50 %; in allen Fällen wurde der Befall durch zwei oder mehr *Fusarium*-Arten verursacht. Die Mykotoxinbelastung variierte ebenfalls deutlich, wobei die Belastung mit Deoxynivalenol (DON) im dreijährigen Mittel der Jahre 1997-99 unter $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ blieb. Daneben konnten weitere Trichothecene nachgewiesen werden, andere Mykotoxine wurden nicht erfasst.

Der *Fusarium*-Befall wird vor allem durch Niederschlagsereignisse nach dem Ährenschieben bestimmt, das Befallsrisiko kann aber durch die Fruchtfolge, die Art der Bodenbearbeitung, die Sortenwahl und die Anbauintensität beeinflusst werden. *Fusarium*-Befall und DON-Belastung der Körner blieben im organischen Anbau meistens geringer als im integrierten Anbau, wo die Anwendung von Wachstumsregulatoren, eine hohe Stickstoffdüngung und die durch die Bekämpfung von Blattkrankheiten verlängerte Abreife einen höheren Kornbefall ermöglichten.

Eine gezielte *Fusarium*-Bekämpfung mit Azol-Fungiziden zur Zeit der Blüte reduzierte die DON-Belastung der Körner stärker als den *Fusarium*-Gesamtbefall, u.a. da die Wirkstoffe gegen die DON-bildenden Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* eine höhere Wirksamkeit aufwiesen als gegen die anderen *Fusarium*-Arten. Eine einmalige Fungizidapplikation als alleinige Gegenmaßnahme reichte meistens für eine wirksame Bekämpfung der Pathogene und die Gewährleistung eines hohen Qualitätsstandards des Ernteguts nicht aus.

7 Summary

Investigations from 1995-2000 on the incidence of *Fusarium* head blight revealed that *Fusarium avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* and *F. sporotrichioides* are the predominant species infecting wheat kernels in the Rhineland, Germany. Depending on the experimental site and environmental conditions the frequency of infection varied from less than 5 % infected kernels to more than 50 %. In all instances head blight was caused by two or more *Fusarium* species. The mycotoxin contamination of kernels varied considerably, however, the deoxynivalenol (DON) content averaged less than $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the period 1997-99. In grain samples other trichothecenes than DON were also detected by LC-MSMS, other mycotoxins were not covered in these studies.

The infection of spikelets by *Fusarium* spp. largely depends on spells of rainfall after ear emergence, however, the sources of inoculum and, therefore, the risk of head blight infections may be influenced by crop rotation, type of soil preparation, choice of variety and cropping intensity. Head blight incidence and DON contamination of kernels was generally lower in wheat grown under organic farming conditions than in wheat grown under integrated management strategies where the use of plant growth regulators, higher nitrogen fertilisation and the longer grain filling period of wheat due to the control of leaf pathogens by fungicides favoured ear infections by *Fusarium* species.

In experiments on the targeted control of head blight, the DON content of kernels was reduced more efficiently by the application of azole fungicides at full flowering (GS 65) than the total incidence of *Fusarium* spp. on kernels, probably due to a higher efficacy of these fungicides in the control of the DON-producing species *F. culmorum* and *F. graminearum* than in the control of the other species. A single fungicide treatment at GS 65 as the only

measure for the control of *Fusarium* head blight often proved to be insufficient to guarantee high quality standards of grain quality.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden aus Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken der Landwirtschaftskammer Rheinland für ihre Kooperation.

Literatur

- ANONYM (2000): Beschreibende Sortenliste – Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte. Bundessortenamt, Landbuch-Verlag Hannover.
- BECK, C., KOCH, H., OERKE, E.-C., und DEHNE, H.-W. (2000): Einfluß von Strobilurinen auf die Physiologie und Ertrag von Winterweizen. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw. Berlin-Dahlem **376**, 479.
- BECK, C., OERKE, E.-C., and DEHNE, H.-W. (2002): Effect of strobilurins on the yield formation of wheat - influence of variety and environmental conditions. in: PE Russel & H-W Dehne (eds.): Modern fungicides and anti-fungal compounds. 13th International Symposium May 13 – 17, 2001, Castle of Reinhardsbrunn/Friedrichroda, Thuringia Germany (submitted).
- BECK, R. (1995): Vorkommen und Bedeutung von Mykotoxinen im Getreide und in Mahlprodukten. Die Mühle + Mischfuttertechnik **132**, 130-131.
- BECK, R., LEPSCHY, J., und OBST., A. (1997): Fusarien schon im Herbst aufs Korn nehmen. DLZ 9/97.
- BOTTALICO, A. (1998): *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin in Europe. J. Plant Pathol. **80**, 85-103.
- DESJARDINS, A.E., and PROCTOR, R.H. (2001): Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. p 50-69 in: B.A. SUMMERELL, J.F. LESLIE, D. BACKHOUSE, W.L. BRYDEN, and L.W. BURGESS (eds.): *Fusarium* – Paul E. Nelson Memorial Symposium, APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- GROSSMANN, K., and RETZLAFF, G. (1997): Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). Pesticide Science **50**, 11-20.
- LIENEMANN, K., MEIER, A., OERKE, E.-C., STEINER, U. and DEHNE, H.-W. (2002): Control of *Fusarium* head blight in wheat. in: PE Russel & H-W Dehne (eds.): Modern fungicides and anti-fungal compounds. 13th International Symposium May 13 – 17, 2001, Castle of Reinhardsbrunn/ Friedrichroda, Thuringia Germany (submitted).
- MEIER, A., BIRZELE, B., OERKE, E.-C., STEINER, U., KRÄMER, J., and DEHNE, H.-W. (2002): Significance of different inoculum sources for the *Fusarium* infection of wheat ears. Mycotoxin Research (submitted).

- MILLER, J.D., APSIMON, J.W., BLACKWELL, B.A., GREENHALGH, R., and TAYLOR, A. (2001): Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. p 310-320 in: B.A. SUMMERELL, J.F. LESLIE, D. BACKHOUSE, W.L. BRYDEN, and L.W. BURGESS (eds.): *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul.
- MUTHOMI, J.W., SCHÜTZE, A., DEHNE, H.-W., MUTITU, E.W., and OERKE, E.-C. (2000): Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. - J. Plant Dis. Prot. **107**, 113-123.
- PARRY, D.W., JENKINSON, P., and MCLEOD, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathol. **44**, 207-238.
- SUTY, A., et MAULER-MACHNIK, A. (1995): Les fusarioses de l'épi du blé. Activité du tébuconazole sur la forme sexuée d'un des principaux pathogènes. Phytoma – La défense des Végétaux 476.

E.-C. Oerke, A. Meier, K. Lienemann, G. Meyer, J. Muthomi,
A. Schade-Schütze, U. Steiner und H.-W. Dehne
Institut für Pflanzenkrankheiten
Universität Bonn, Nussallee 9, D-53115 Bonn
e-mail: ec-oerke@uni-bonn.de

Cytologische Studien zur Infektion und Ausbreitung von Fusarien in Weizenähren sowie zu Abwehrreaktionen in Ähren resistenter und anfälliger Weizensorten

Cytological studies of infection and colonisation of Fusaria in wheat spikes and defence reactions in spikes of resistant and susceptible wheat cultivars

H. Buchenauer und Z. Kang

Weizenpflanzen der Sorten Agent, Arina und Frontana wurden in 12 l Gefäßen in der Vegetationshalle kultiviert, und im Entwicklungsstadium Mitte Blüte (EC 65) wurden die Ähren entweder durch Besprühen mit einer Sporensuspension (10^5 Konidien ml^{-1}) von *Fusarium culmorum* oder durch Einzelährcheninokulation inokuliert, wobei 10 μl einer Konidien suspension zwischen Deck- und Vorspelze pipettiert wurde. Nach der Inokulation wurden die Ähren in Plastiktüten in einer feuchten Atmosphäre eingetütet und die Pflanzen 2 Tage in einer Klimakammer inkubiert (16 h Beleuchtung bei 23 °C, 8 h Dunkelheit bei 18 °C). Anschließend wurden die Plastiktüten entfernt und die Pflanzen wieder in der Vegetationshalle aufgestellt.

Zu bestimmten Terminen (z.B. 6 und 12 h sowie 1, 2, 3, 5 und 8 Tage) nach der Inokulation wurden die inokulierten Ährchen geerntet und die einzelnen Gewebe wie Deck-, Hüll- und Vorspelze sowie Fruchtknoten und Ährenspindel für licht-, raster- und transmissions-elektronenmikroskopische Studien aufgearbeitet. Die cytologischen, ultrastrukturellen und immuno-cytochemischen Methoden wurden in verschiedenen Publikationen ausführlich beschrieben (KANG und BUCHENAUER 1999, 2000a, b).

In den bisherigen Arbeiten wurde zunächst der Infektionsverlauf und die Ausbreitung von *F. culmorum* in den Ähren der anfälligen Weizensorte Agent untersucht. Sechs bis 12 Stunden nach Inokulation waren die Makrokonidien mit mehreren Keimschläuchen ausgekeimt. Deutliche Unterschiede in der weiteren Pathogenentwicklung wurden auf der äußeren und inneren Oberfläche der Ährchen festgestellt. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Studien ergaben, dass sich *F. culmorum* auf der Außenseite der Deck- und Hüllspelzen nur spärlich entwickelte und nicht in der Lage war, von außen die Ährengewebe zu penetrieren. Hyphen in der Nähe des Randes auf der Außenseite der Deck- und Hüllspelzen strebten zum Spelzenrand, um über den Rand auf die Innenseite der Spelzen zu gelangen. Im Inneren der Ährchen entwickelte der Pilz ein dichtes Hyphengeflecht (Abb. 1). Die unterschiedliche Entwicklung von *F. culmorum* auf der Außenseite und im Inneren der Ährchen ist vermutlich auf physikalische und chemische Eigenschaften (z.B. ausgeprägtere Wachsschichten auf der Außenseite der Deck- und Hüllspelzen) sowie unterschiedliche Umweltbedingungen (z.B. Feuchtigkeit) zurückzuführen.

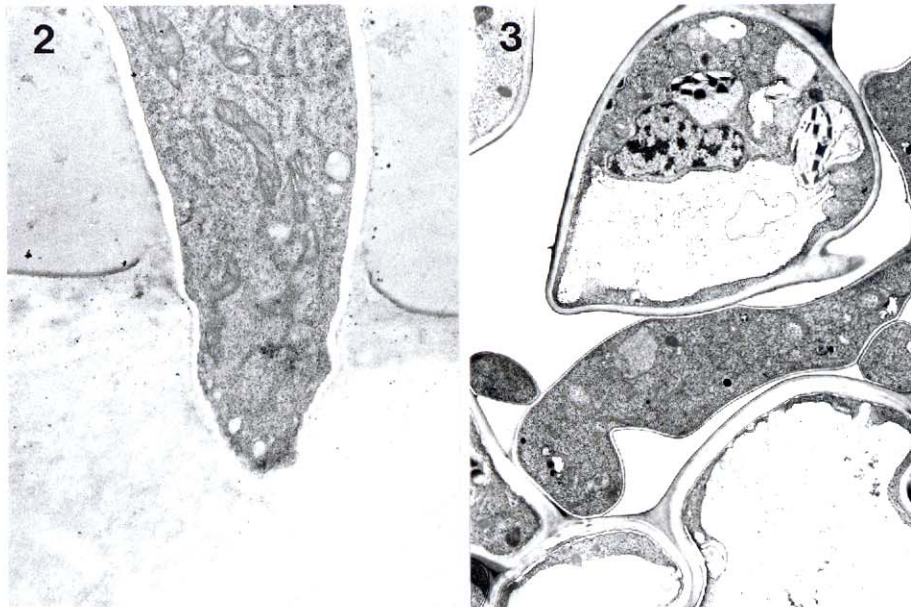
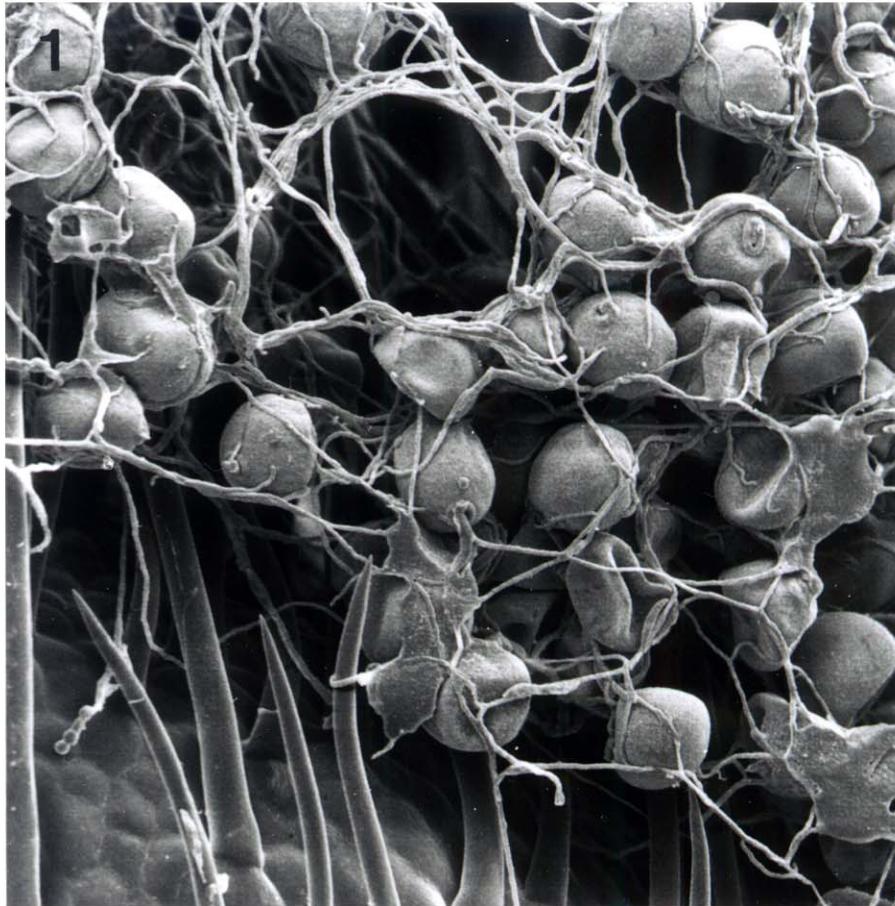


Abb. 1: Hyphen von *F. culmorum* zwischen den Pollenkörnern und auf den Härchen des Fruchtknotens, 2 Tage nach Inokulation (dpi)

Abb. 2: *F. culmorum* dringt über einen Penetrationskeil in die Epidermiszellwand der Deckspelze ein, 36 hpi

Abb. 3: Interzellulär sich ausbreitende Hyphe in der Deckspelze, 2 dpi

Nachdem sich der pilzliche Erreger im Inneren der Ährchen in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation ausreichend etabliert hatte, nahmen einige Hyphen engen Kontakt mit der Innenseite der Deck- und Vorspelze sowie der Oberfläche des Fruchtknotens auf, und durch Ausscheidung von Kutinasen wurden Wachs- und Kutinschichten unterhalb der Hyphen aufgelöst. Etwa 36 h nach der Inokulation wurden von den Hyphen Infektionshyphen entwickelt, die mit Hilfe eines Penetrationskeils die Epidermiszellwände der Wirtsgewebe direkt penetrierten (Abb. 2). Gelegentlich wurde auch ein Eindringen von *F. culmorum* durch die Stomata festgestellt. Nach der Penetration breitete sich das Pathogen häufig interzellulär aus (Abb. 3). Die Wirtszellen, die an die interzellulär sich ausbreitenden Hyphen angrenzten, wiesen deutliche Veränderungen auf: wie z.B. Ablagerungen von elektronendichtem Material zwischen Zellwand und Plasmalemma sowie in den Vakuolen. Die Chloroplasten waren stark angeschwollen. Auch wurden Veränderungen in den Wirtszellen im Vorfeld der Besiedlung des Gewebes durch die Hyphen nachgewiesen. Mit fortschreitender Inkubationszeit breiteten sich die Hyphen sowohl inter- als auch intrazellulär aus (Abb. 4) und 4 Tage nach Inokulation traten an den Deckspelzen der infizierten Ährchen die ersten sichtbaren Symptome in Form von wasserdurchdrungenen braunen Flecken in Erscheinung. Nach dieser Inkubationszeit hatten die Hyphen von *F. culmorum* auch die Basis der Deck- und Vorspelzen sowie des Fruchtknotens erreicht und begannen in die Ährchenachse vorzudringen. Von hier aus wurden zum einen die Seitenährchen besiedelt und zum anderen strebten die Hyphen zur Ährenspindel, die etwa 5 Tage nach Inokulation in anfälligen Weizengenotypen (z.B. Agent) besiedelt wurde. In der Ährenspindel breiteten sich die Hyphen vorwiegend basipetal sowohl inter- als auch intrazellulär in den Gefäßbündeln und im Parenchymgewebe aus (Abb. 5, 6). Während der Besiedlung wurden in den Zellen der Ährenspindel ebenfalls deutliche Veränderungen hervorgerufen wie Degeneration des Zytoplasmas und der Zellorganellen, Abbau der Wirtszellwände und Ablagerungen von elektronendichtem Material an den Gefäßwänden (KANG und BUCHENAUER 2000a).

In ultrastrukturellen Studien konnte mit Hilfe von Enzym-Gold- und Immunogold-Markierungstechniken die Beteiligung von extrazellulären Enzymen wie Zellulasen, Xylanasen und Pektinasen am Abbau der Hauptzellwandbestandteile während der Infektion und Ausbreitung von *F. culmorum* in den Wirtsgeweben nachgewiesen werden. Die ausgeprägten Veränderungen in den Wirtszellwänden und der Mittellamelle der Deckspelze, des Fruchtknotens und der Ährenspindel gingen mit deutlich verminderten Bindungsstellen für goldmarkierte Enzyme bzw. Antikörper einher (Abb. 7, 8, 9, 10). Diese Studien deuten darauf hin, daß *F. culmorum* während der Penetration und Besiedlung der Weizenähren zellwanddegradierende Enzyme in hoher Aktivität ausscheidet. Veränderungen der Wirtszellwände traten bereits vor der Hyphenbesiedlung auf, wodurch die Ausbreitung des Pathogens im Wirtsgewebe wesentlich erleichtert wurde (KANG und BUCHENAUER 2000b). Darüber hinaus war von Interesse, die Produktion von Trichothecenen durch *Fusarium culmorum* und deren Lokalisierung im infizierten Ährengewebe während der Penetration und des Infektionsprozesses und in den frühen Stadien der Besiedlung des Wirtsgewebes zu verfolgen. Hierzu wurde ein Verfahren zur Immunogold-Markierung der wasserlöslichen Trichothecen-Verbindungen entwickelt. Die Trichothecentoxine waren bereits während der Penetration des Pilzes in der Wirtszellwand und insbesondere um den Penetrationskeil angereichert (Abb. 11).

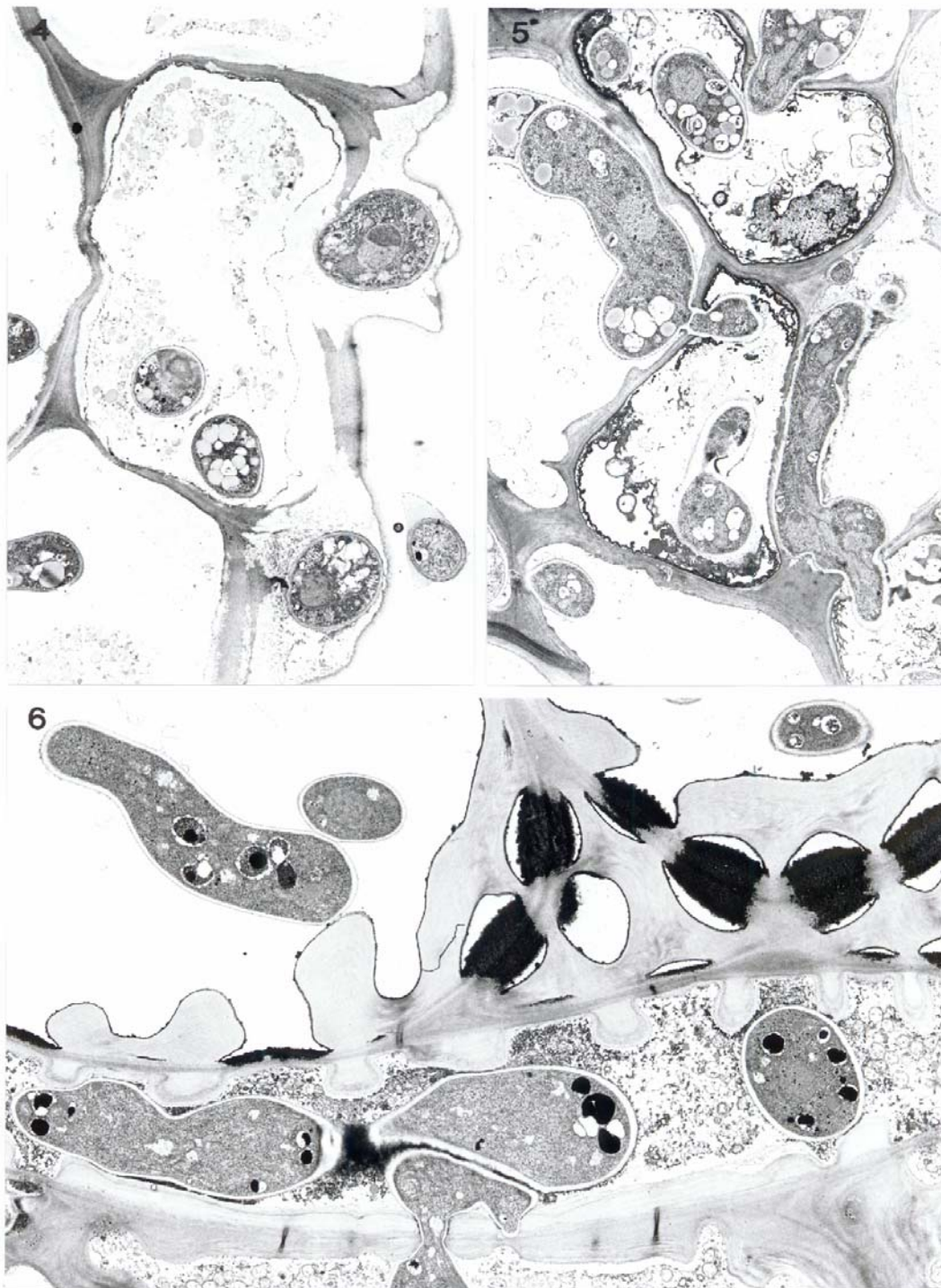


Abb. 4: Hyphen von *F. culmorum* breiten sich inter- und intrazellulär im Fruchtknoten aus, 4 dpi

Abb. 5: Querschnitt durch das Phloem der Ährenspindel, 5 dpi. Hyphen breiten sich zwischen den Parenchymzellen und der Siebröhre aus.

Abb. 6: Querschnitt der Ährenspindel, 6 dpi. Hyphen wachsen in Xylemgefäßen und Parenchymzellen. Die Primärwand der Gefäße ist elektronendichter und elektronendichte Ablagerungen befinden sich auf der inneren Oberfläche der Gefäßwände

Die Ergebnisse zeigten ferner eine enge Beziehung der Anreicherung der Toxine DON und 3-A-DON und den pathologischen Veränderungen der Wirtszellen sowie der Symptomentwicklung. In den Zellen der Wirtsgewebe wurden die Toxine im Cytoplasma, in den Chloroplasten und im Plasmalemma, in der Zellwand, in den Vakuolen und manchmal in Assoziation mit dem endoplasmatischen Reticulum und den Ribosomen nachgewiesen (Abb. 12). Nachdem die Hyphen die Ährenspindel erreicht und sich innerhalb und außerhalb der Gefäßbündel ausgebreitet hatten, wurden Toxine in den Xylemgefäßen und Phloemsiebröhren detektiert. Die Ergebnisse zeigten ferner, daß die Toxine in den Gefäßen sowohl in akropetaler als auch basipetaler Richtung transloziert wurden, und sie konnten in Teilen der Ähre nachgewiesen werden, die vom Pilz nicht besiedelt waren. Aufgrund der erzielten Resultate kann angenommen werden, daß die vom Pathogen ausgeschiedenen Trichothecen-Toxine an der Pathogenese beteiligt sind, indem sie möglicherweise aufgrund ihrer Interaktion mit Ribosomen der Wirtszellen die Proteinsynthese und damit postinfektionelle Abwehrreaktionen in den infizierten Wirtsgeweben hemmen (KANG und BUCHENAUER 1999).

Außerdem wurden die Reaktionen der Weizenähren resistenter und anfälliger Sorten auf die Infektion mit *F. culmorum* mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie bei Anwendung von Immunogoldmarkierungsmethoden vergleichend untersucht. Hinsichtlich der Penetration des Pathogens in das Ährengewebe traten zwischen resistenten und anfälligen Sorten keine Unterschiede auf. Während bei den in die Untersuchungen einbezogenen Sorten keine Hinweise für eine Penetrationsresistenz vorlagen, unterschieden sich die Sorten deutlich in der Ausbreitungsresistenz. Während in der anfälligen Sorte Agent *F. culmorum* die Ährenspindel etwa 5 Tage nach Einzelährcheninokulation erreichte, benötigte das Pathogen in den resistenten Sorten Arina und Frontana hierfür 8 bis 10 Tage nach Einzelährcheninokulation. Studien zu morphologischen Resistenzfaktoren ergaben, daß die anfällige Sorte Agent auf den Pilzbefall kaum Abwehrstrukturen entwickelte (Abb. 13), während die resistenteren Sorten Arina und Frontana auf die Fusariuminfektion rasch und intensiv mit der Errichtung struktureller Abwehrkomponenten wie Bildung von ausgeprägten Zellwandablagerungen und Papillen reagierten (Abb. 14, 15). In den Zellwänden infizierter Gewebe wurden erhebliche Unterschiede in der Markierungsdichte des Lignins zwischen den resistenten Sorten und dem anfälligen Kultivar festgestellt. In der anfälligen Sorte nahm der Ligningehalt in den Zellwänden infizierter Gewebe nur leicht im Vergleich zu den nicht inokulierten Geweben zu. Demgegenüber wurde Lignin in den Wirtszellwänden infizierter Gewebe der resistenteren Sorten im Vergleich zu den nicht inokulierten Geweben stark angereichert. Auch wurden im Verteilungsmuster der Trichothecene in den Geweben der resistenten und anfälligen Sorten keine deutlichen Unterschiede nachgewiesen. Allerdings enthielten die Gewebe der resistenten Sorten auch schon in frühen Infektionsstadien niedrigere Markierungsdichten als die der anfälligen Sorte (KANG und BUCHENAUER 2000c).

Die bisher durchgeführten Studien ergaben, daß die gegenüber Ährenfusariosen resistenteren Sorten in der Lage sind, Abwehrreaktionen während der Penetration und Ausbreitung von *F. culmorum* zu entwickeln. Auch die geringeren Anreicherungen von DON und seinen acetylierten Derivaten in den infizierten Geweben resistenter Sorten erlauben möglicherweise stärkere Abwehrreaktionen gegenüber dem Pathogen.

In ersten Untersuchungen zu biochemischen Resistenzfaktoren konnte gezeigt werden, daß die resistente Sorte Frontana deutlich höhere Gehalte an freien phenolischen Verbindungen in den Hüll-, Deck- und Vorspelzen bereits vor der Inokulation mit *F. culmorum* als die anfällige Sorte Agent aufwies. Darüber hinaus reagierte das Spelzengewebe der resistenten Sorte

Frontana 2 Tage nach Inokulation mit einem deutlichen Anstieg an p-Cumarsäure im Vergleich zu den entsprechenden nicht inokulierten Ährgeweben. Diese Studien deuten auf eine Beteiligung phenolischer Verbindungen an der Resistenz der Sorte Frontana gegenüber Ährenfusariosen hin (SIRANIDOU et al. 2002).

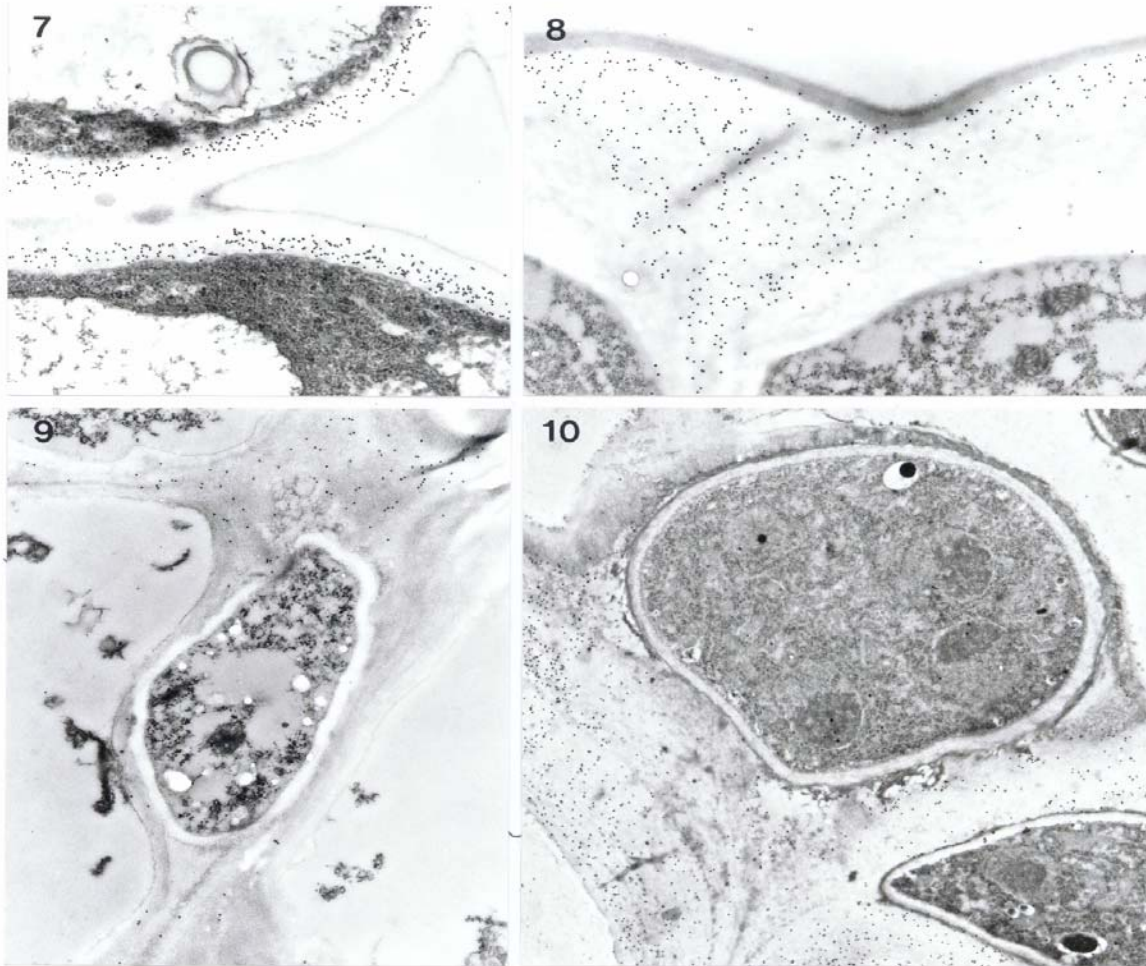


Abb. 7: Cytochemische Markierung der Zellulose mit Zellulase-Goldmarkierung der nicht inokulierten Kontrolle. Die innere Zellwand der Parenchymzelle des Perikarp weist eine dichte Markierung mit Goldpartikeln auf, während auf der äußeren Zellwandschicht und im Bereich zwischen zwei Zellen keine nennenswerte Markierung auftrat.

Abb. 8: Immunogoldmarkierung von Pektin mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers JIM7 in der Epidermiszelle des Fruchtknotens der nicht inokulierten Kontrolle. Der Bereich zwischen den Zellen und die äußeren Wandschichten wiesen eine starke Goldmarkierung auf, während die inneren Wandschichten nicht markiert waren.

Abb. 9: Immunogoldmarkierung von Pektin in infizierten Siebröhren der Ährenspindel, 5 dpi. Das Wachstum der Hyphe in der Mittellamelle führte zu einer starken Reduktion der Goldpartikel in der Wirtszellwand.

Abb. 10: Cytochemischer Nachweis der Zellulose in der äußeren Epidermiszellwand des infizierten Fruchtknotens, 3 dpi. Die Wirtszellwand um die Hyphe war aufgelockert, und die Dichte der Goldpartikel über der Zellwand um die Hyphe war stark vermindert.

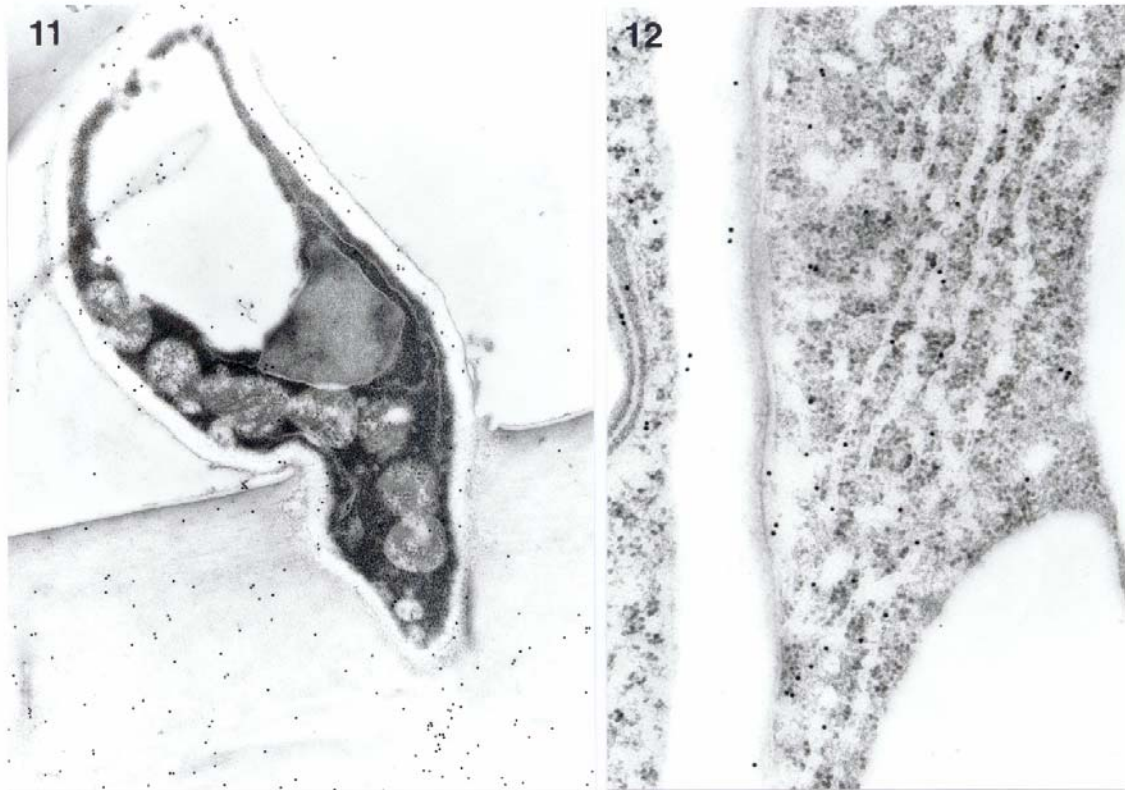


Abb. 11: Immunogoldlokalisierung des Trichothecentoxins DON in der Epidermiszellwand der Deckspelze, 36 h nach Inokulation. Eine Anreicherung von Goldpartikeln wurde in der Zellwand und besonders um den Penetrationskeil von *F. culmorum* nachgewiesen.

Abb. 12: Epidermiszelle des Fruchtknotens, 2 dpi. Goldpartikel, die DON detektierten, traten über der Zellwand, dem Cytoplasma, dem endoplasmatischen Reticulum und den Ribosomen auf

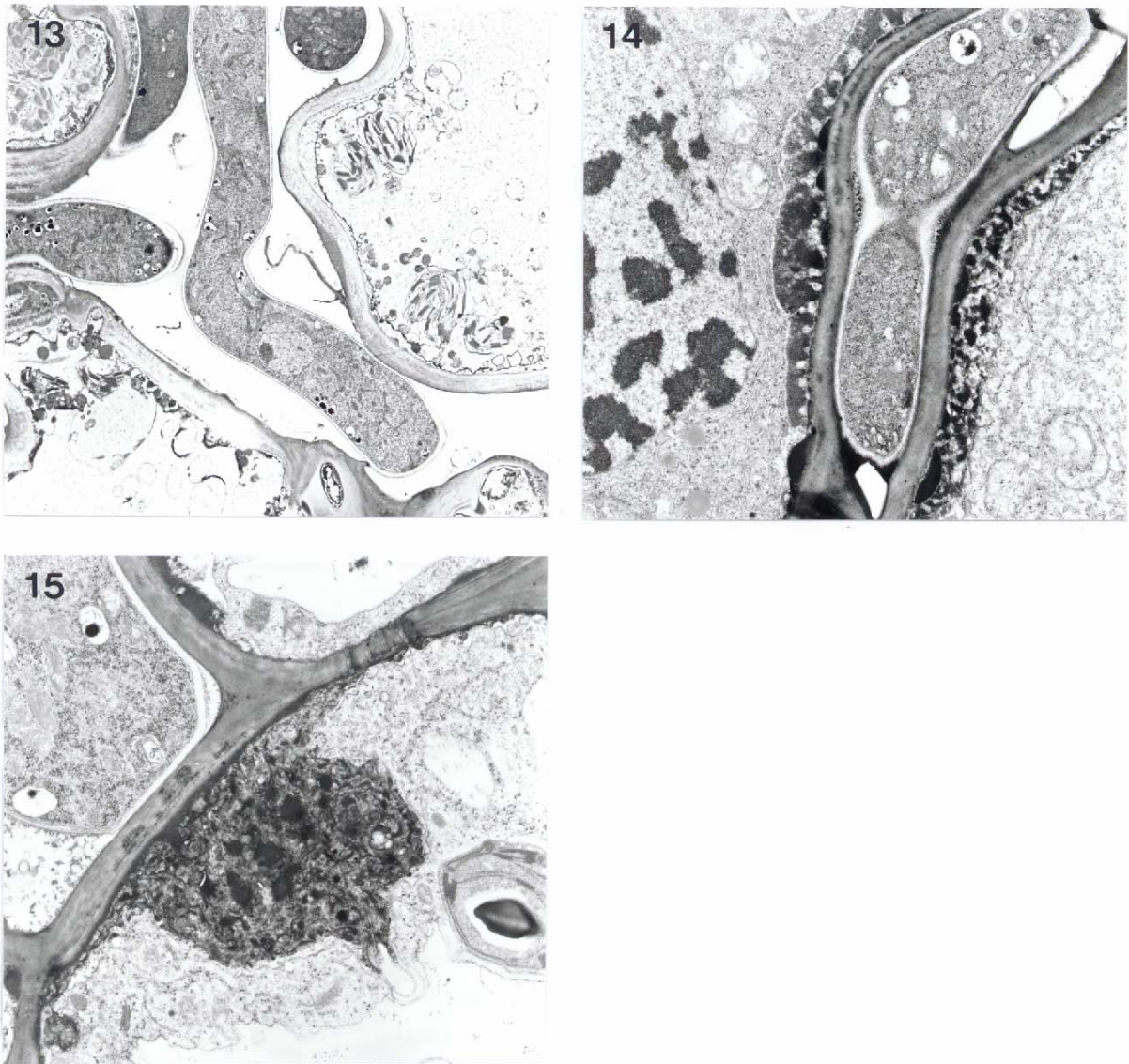


Abb. 13: Hyphen von *F. culmorum* wuchsen zwischen Rindenzellen der infizierten Ährenspindel der anfälligen Weizensorte Agent, 5 dpi. Das Wirtszytosplasma und Organellen (Chloroplasten) sind degeneriert und die Wirtszellwand in der Nähe der Hyphe teilweise abgebaut. Das Plasmalemma zeigt ebenfalls deutliche Veränderungen

Abb. 14: Eine Hyphe zwischen zwei Wirtszellen der Deckspelze der Sorte Arina, 3 dpi. Ausgeprägte Zellwandauflagerungen wurden zwischen Wirtszellwand und Plasmalemma gebildet, und elektronendichtes Material war auf der Oberfläche der Hyphe nachweisbar

Abb. 15: Infizierte Deckspelze der Sorte Frontana, 3 dpi. Eine große Papille wurde in der Wirtszelle gegenüber dem Penetrationsversuch der Pilzhyphe entwickelt.

Zusammenfassung

Der Infektionsprozeß von *Fusarium culmorum* und die Ausbreitung des Pilzes im Ährgewebe wurde nach Einzelährcheninokulation raster- und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Während der inter- und intrazellulären Besiedlung traten in den Wirtszellen deutliche Veränderungen wie Degeneration des Zytoplasmas, der Zellorganellen, Abbau der Wirtszellwände und Ablagerungen von elektronendichtem Material zwischen Zellwand und Plasmalemma auf. In ultrastrukturellen Studien wurde mit Hilfe von Enzym-Gold- und Immunogold-Markierungstechniken die Beteiligung von extrazellulären Enzymen wie Zellulasen, Xylanasen und Pektinasen am Abbau von Hauptzellwandbestandteilen während der Infektion und Ausbreitung von *F. culmorum* in den Ährgeweben nachgewiesen. Die Lokalisierungsstudien von Trichothecenen ergaben, daß die Toxine bereits in frühen Stadien der Infektion im Wirtsgewebe nachweisbar waren. Vergleichende Untersuchungen zu Reaktionen der Weizenähren resistenter und anfälliger Sorten zeigten, daß die Ausbreitung des Pilzes in Ähren resistenter Sorten deutlich verzögert war. Die resistenten Sorten reagierten im Vergleich zur anfälligen rasch und intensiv mit der Errichtung struktureller Abwehrkomponenten. In ersten Studien zu biochemischen Resistenzfaktoren wurden deutlich höhere Gehalte an freien phenolischen Verbindungen in der resistenten Sorte Frontana nachgewiesen als in der anfälligen Sorte Agent.

Summary

The infection process of *Fusarium culmorum* and colonisation of the fungus in the spike tissues after single spikelet inoculation was studied by scanning and transmission electron microscopy. During the inter- and intracellular spreading of the fungus marked alterations in the host cells were observed, such as degeneration of cytoplasm, cell organelles, degradation of host cell walls and deposition of electron dense material between cell wall and plasma lemma. Enzyme- and immunogold labelling techniques revealed involvement of extracellular enzymes like cellulases, xylanases and pectinases in degradation of the main cell wall components during infection and colonisation of *F. culmorum* in the spike tissues. Localisation studies of trichothecenes showed that toxins could be detected in host tissue already at early stages of infection. Comparative studies on reactions of wheat spikes of resistant and susceptible cultivars revealed that spreading of the fungus was clearly retarded in spikes of the resistant cultivars. The resistant cultivar responded earlier and more intensively with the development of structural defence constituents. Preliminary studies on biochemical resistance factors showed significantly higher contents of free phenolic compounds in the resistant cultivar Frontana than in the susceptible cultivar Agent.

Literatur

- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (1999): Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* **55**, 275-288
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (2000a): A cytological and ultrastructural study on the infection process of *Fusarium culmorum* on wheat spikes. *Mycological Research* **104**, 1083-1093
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (2000b): Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *J. Phytopath.* **148**, 263-275
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (2000c): Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Phys. Mol. Pl. Pathol.* **57**, 255-268
- SIRANIDOU, E., KANG, Z. und BUCHENAUER, H. (2002, im Druck): Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *J. Phytopath.*

Prof. Heinrich Buchenauer und Prof. Z. Kang
Institut für Phytomedizin
Otto-Sander-Str. 5, Universität Hohenheim, 70593 Stuttgart
hbuchen@uni-hohenheim.de

Züchtungsstrategien zur Verringerung von Ährenfusariosen und Mykotoxingehalten bei Getreide

Breeding strategies for reducing *Fusarium* head blight and mycotoxin content in cereals

T. Miedaner und B. Schneider

1 Einleitung

Ährenfusariosen, verursacht vor allem durch *Fusarium culmorum* und *F. graminearum*, sind als Krankheitserreger bei Getreide schon seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Sie verursachen Ertragsausfälle, Qualitätseinbußen und erhöhte Mykotoxingehalte im Erntegut. Beide *Fusarium*-Arten bilden dasselbe Spektrum an Toxinen. Die wichtigsten sind die Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und seine acetylierten Derivate 3- bzw. 15-Acetyl-DON, Nivalenol (NIV) und das Östrogenderivat Zearalenon. Praktisch alle geprüften *F. culmorum*- und *F. graminearum*-Isolate waren in der Lage, zumindest eines der genannten Toxine zu produzieren (GANG et al. 1996, MIEDANER et al. 2000, MUTHOMI et al. 2001). Dabei scheinen DON-Produzenten aber kein NIV und umgekehrt NIV-Produzenten nur unwesentliche Mengen an DON zu produzieren. Aufgrund der hohen Frequenz an Mykotoxinbildnern ist bei jedem natürlichen Befall mit entsprechend hohen Mykotoxingehalten im Erntegut zu rechnen.

Seit etwa zwanzig Jahren sind Ährenfusariosen in Mitteleuropa auf dem Vormarsch, seit 1991 verursachen sie im mittleren Westen der USA regelmäßig großflächige Epidemien, die Ertragsausfälle von 8 bis 50% bewirken (MCMULLEN et al. 1997). Ursachen für die Zunahme von Schadenswahrscheinlichkeit und -ausmaß sind vor allem: Vorfrucht Mais, in Kombination mit nicht-wendender, pflugloser Bodenbearbeitung zur Nachfrucht Weizen und feuchtwarmer, strahlungsarmer Witterung während der Getreideblüte (BECK et al. 1997).

Spezialfungizide, wie Metconazol und Tebuconazol, reduzieren bei Weizen den Ährenbefall zwischen 30 und 90%. Sie haben jedoch Wirkungslücken bei anderen Weizenpathogenen (z.B. *Drechslera tritici-repentis*) und sind am effizientesten bei einer Applikation innerhalb von 24-36 Stunden vor bzw. nach der Inokulation. Eine solche prophylaktische Anwendung ist im Rahmen einer nachhaltigen, umweltschonenden Landwirtschaft nur noch in Ausnahmefällen empfehlenswert. Durch Verarbeitungsprozesse wie Mahlen, Backen, Kochen, oder andere Maßnahmen kann der DON-Gehalt um höchstens 50% des Ausgangsgehaltes reduziert werden. Deshalb betrifft eine Epidemie mit Ährenfusariosen die gesamte Wertschöpfungskette der Produktion: Vom Landwirt über die Mahl-, Back- und Futtermittelindustrie bis hin zum Verbraucher. Nur ein integriertes Konzept unter Einbeziehung aller pflanzenbaulichen, pflanzenzüchterischen und phytomedizinischen Maßnahmen zur Vermeidung des Pilzbefalls bereits auf dem Feld kann die Mykotoxinproblematik mittel- und langfristige lösen.

Es besteht eine sehr enge genetische Korrelation zwischen der Resistenz von Roggen und Weizen gegenüber *F. graminearum* und *F. culmorum*, so dass die Inokulation einer der

beiden Arten ausreichend ist. Für die Entwicklung einer optimalen Züchtungsstrategie im Hinblick auf die Verminderung des *Fusarium*-Befalls bei Roggen und Weizen liegen umfangreiche Daten vor (Review bei MIEDANER 1997, MESTERHÁZY et al. 1999). In der vorliegenden Studie werden neue Daten zur Vererbung der Resistenz referiert, danach soll vor allem auf alternative Züchtungsstrategien zur Verbesserung der *Fusarium*-Resistenz von Weizen eingegangen werden, wobei moderne biotechnologische Maßnahmen in die Überlegungen einbezogen werden.

2 Genetische Grundlagen der Resistenz bei Weizen, Triticale und Roggen

Die Resistenz gegen Ährenfusariosen ist komplexer Natur. Es spielen dabei morphologische und physiologische Komponenten eine Rolle (Abb. 1). Kurzstrohigkeit, kompakte Ähren und Begrannung fördern den Befall mit Ährenfusariosen, wobei es aber auch innerhalb dieser Gruppen signifikante genetische Variation gibt (MESTERHÁZY 1995).

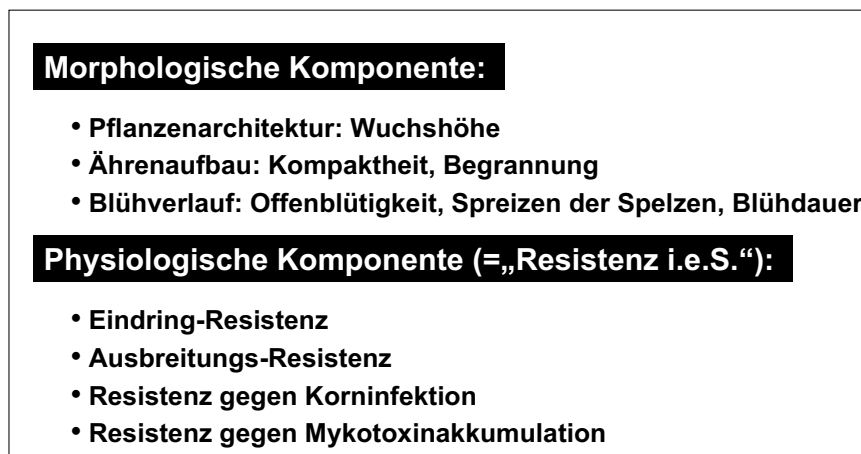


Abb. 1: Komponenten der Resistenz gegen Ährenfusariosen

Bei der Prüfung von 54 aktuellen deutschen Winterweizensorten fand sich ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zwischen Ährenbefall und Kurzstrohigkeit (HARTL et al. 2001). Dabei traten aber auch Sorten mittlerer Länge mit guter *Fusarium*-Resistenz auf. Der Einfluss von morphologischen Faktoren auf die Resistenz ist besonders ausgeprägt bei natürlichem Befall bzw. der Verwendung von künstlich infizierten Getreidekörnern, die im Frühjahr auf den Boden gestreut werden und dann sekundär Ährenbefall bewirken. Für den Züchter kommt es jedoch darauf an, die eigentliche physiologische Resistenz zur Selektion auszunutzen. Dies ermöglicht weitgehend die mehrmalige Besprühung der Ähren mit einer Konidien suspension eingestellter Dichte während der Getreideblüte (Abb. 2). Dabei muss jeder Genotyp zumindest einmal zur Zeit seiner Vollblüte inokuliert werden. Die visuelle Ährenbonitur erwies sich in allen Studien als das am einfachsten festzustellende und zuverlässigste Resistenzmerkmal (MIEDANER 1997). Es kann so zwar nicht zwischen Eindring- und Ausbreitungsresistenz unterschieden werden, es werden aber beide Komponenten kumulativ erfasst. Die Resistenz gegen Korninfektion ist bisher nur in einzelnen Fällen berichtet worden, eine solche gegen Mykotoxinakkumulation ist gegeben, wenn Sorten ähnlicher Befallsstärke signifikant unterschiedliche Mykotoxingehalte besitzen (MESTERHÁZY 1995).

Inokulation:	<ul style="list-style-type: none"> • Gedrillte Mikroparzellen (0,25 - 1,2 m²) • <i>Fusarium-culmorum</i>-Isolate • Mehrmalige Sprüh-Infektion während der Blüte • 0,5 - 1 x 10⁶ Konidien/ml • Mehrere Umwelten (Orte, Jahre)
Merkmal:	<ul style="list-style-type: none"> • Mehrmalige visuelle Ährenbonitur auf Parzellenbasis (1=kein Befall, 9=100% Befall) • Verwendung des arithmetischen Mittels
DON-Analyse:	<ul style="list-style-type: none"> • GC/MS nach Schollenberger et al. 1998; • Nachweisgrenze (künstl. erhöht): 700 µg/ml • ELISA (r-biopharm GmbH, Darmstadt): 200 µg/ml

Abb. 2: Durchführung von künstlichen Infektionen mit Ährenfusariosen

Eine signifikante genetische Variation der quantitativen Resistenz gegen Ährenfusariosen findet sich in vergleichbarer Größenordnung sowohl in Genotypsortimenten als auch in Zuchtpopulationen von Weizen, Triticale und Roggen (Tab. 1). Aufgrund der hohen Bedeutung der Genotyp-Umwelt-Interaktion ist die Prüfung in mehreren Umwelten (Orte, Jahre) unerlässlich. Die hohe Heritabilität, die bei mehrortigen Versuchen mit künstlicher Inokulation erzielt werden konnte, verspricht einen hohen Selektionserfolg.

Tab. 1: Variationskoeffizienten (%) und Heritabilitäten für die Ährenbonitur von Weizen-, Triticale- und Roggenlinien mit Inokulation von *Fusarium culmorum* in mehreren Umwelten (FG = Freiheitsgrade)

Getreideart	FG	Anzahl Umwelten	Variationskoeffizient (%)			Heritabilität
			Genotyp (G)	G x Umwelt	Fehler	
Weizen	76	4	11,8 **	7,6 **	11,6	0,83
Triticale ^a	99	6	14,1 **	7,7 **	2,0	0,89
Roggen	218	4	13,9 **	8,4 **	10,9	0,86

** Signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%.

^a Daten aus Oettler und Wahle (2001).

Für den Züchter entscheidend ist die genetische Variation, die innerhalb einer Kreuzung freigesetzt wird. Um diese zu untersuchen, wurden Roggen- und Weizenlinien unterschiedlicher Resistenz miteinander gekreuzt, zweimal geselbstet und die Nachkommenschaften auf ihre Resistenz gegen Ährenfusariosen in mehreren Umwelten geprüft. Abbildung 3 zeigt die Ährenbonitur der Nachkommen zweier Kreuzungen, die in beiden Fällen annähernd einer Normalverteilung entsprechen.

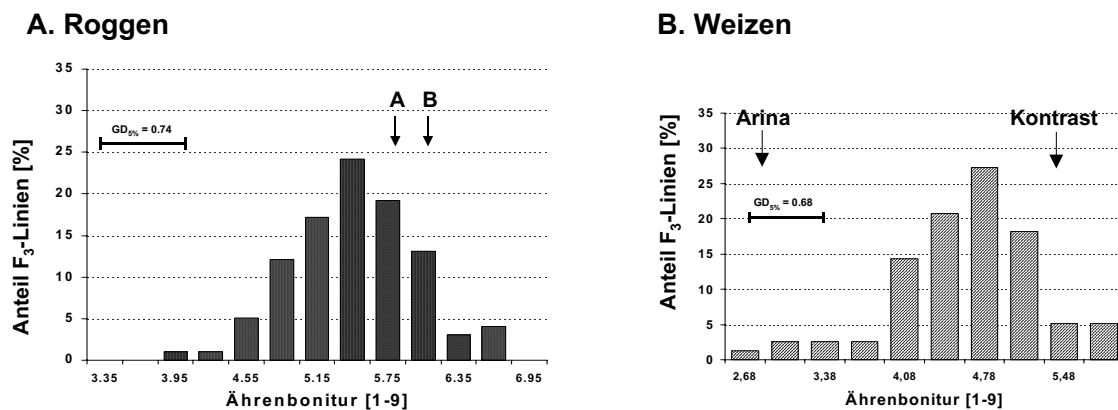


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der Ährenbonitur von 99 bzw. 77 Nachkommen einer Roggen (anfällig x anfällig)- bzw. Weizenkreuzung (resistent x anfällig) nach Inokulation mit *Fusarium culmorum* in je vier Umwelten; die Pfeile zeigen die jeweilige Leistung der Eltern ($GD_{5\%}$ = Grenzdifferenz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

Beim Roggen wurden zwei hochanfällige Linien (A, B) miteinander gekreuzt (Abb. 3A). Entsprechend war das Mittel der Nachkommen anfällig. Ein gewisser Anteil der Nachkommen zeigte jedoch eine Resistenz, die signifikant höher war als die des weniger anfälligen Elters A. Diese Transgression lässt auf eine additive Vererbung der Resistenz schließen. Offensichtlich enthielten beide Eltern trotz ihrer hohen Anfälligkeit einige Resistenzallele, die sich unterschieden. Es entstanden Rekombinanten, in denen sich positiven Allele beider Eltern vereinten. Transgressionen erleichtern dem Züchter die Arbeit, da er immer wieder auch anfällige Eltern kreuzen muss, die in anderen wichtigen Eigenschaften überlegen sind.

Beim Weizen wurde eine der resistentesten mit einer hoch anfälligen Sorte gekreuzt (Abb. 3B). Die Nachkommen zeigten ebenfalls eine quantitative Verteilung der Ährenbonitur, ihr Mittel entsprach dem Elternmittel. Auch dies weist auf eine additive Vererbung mehrerer Resistenzgene hin. Rund 10% der Nachkommenschaft zeigte eine ähnlich hohe Resistenz wie der resistentere Elter Arina. In diesem Teil der Nachkommenschaft kann der Züchter dann zusätzlich auf die anderen 25 agronomischen, Qualitäts- und Resistenzeigenschaften selektieren, die in der Beschreibenden Sortenliste verzeichnet sind (BSL, 2001). Dieses Beispiel zeigt, dass eine sehr große Population nötig ist, um aus einer solchen Ausgangskreuzung einen sortenfähigen Kandidaten zu entwickeln, der zusätzlich die gute *Fusarium*-Resistenz des Elters Arina trägt. Deshalb war der realisierte Zuchtfortschritt für Resistenz gegen Ährenfusariosen bei Winterweizen in der Vergangenheit recht gering (Abb. 4). Im Vergleich zur Mehlauresistenz konnte im selben Zeitraum (11 Jahre) ein nur halb so grosser Zuchtfortschritt erzielt werden. Trotzdem gibt es heute drei Sorten mit der bisher besten Ausprägungsstufe von 2 (Centrum, Romanus, Petrus) auf der Skala von 1-9 (s. Abb. 2); 17% aller derzeit zugelassenen Winterweizensorten besitzen eine Resistenz gegen Ährenfusariosen von 2-3 (BSL, 2001). Leider machen diese Sorten zusammen nur 12% der Vermehrungsfläche im Bundesgebiet aus, während die drei derzeit am weitesten verbreiteten Sorten (Drifter, Flair, Ritmo), die mittel- bis hochanfällig gegen Ährenfusariosen (Note 5 bzw. 7) sind, rund ein Drittel der Fläche einnehmen. Der Grund für die geringere Verbreitung

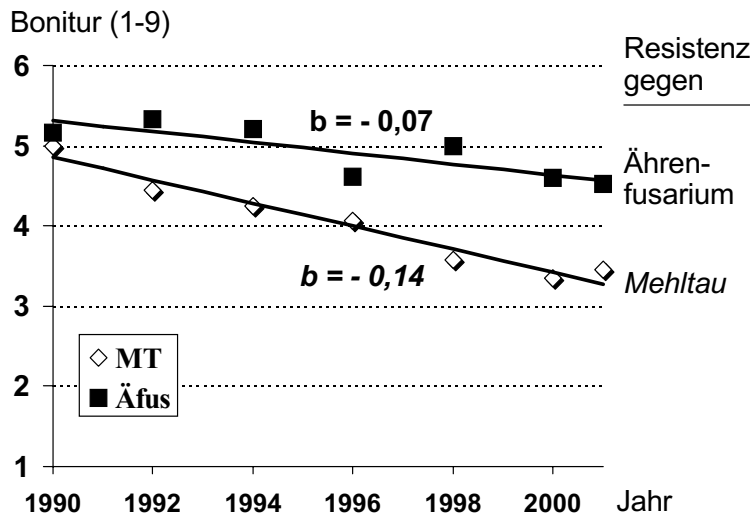


Abb. 4: Realisierter Zuchtfortschritt bei Winterweizen für die Resistenz gegen Ährenfusariosen im Vergleich zur Mehltaresistenz im Zeitraum 1990-2001 (Daten aus BSL, 1990-2001)

der resistenteren Sorten ist vor allem ihrer geringeren Ertragsfähigkeit, größeren Pflanzenlänge und höheren Lagerneigung zuzuschreiben.

Allerdings ist es dann nicht verwunderlich, dass es bei ungünstigen Witterungsbedingungen und dem ausreichenden Vorhandensein von Inokulum, z.B. durch Maisvorfrucht und/oder nicht-wendende Bodenbearbeitung, zu Epidemien mit Ährenfusariosen kommen kann, wie zuletzt im Jahr 1998 und - in verringertem Maße - im Jahr 2000.

Über die Vererbung des Mykotoxin-Gehaltes von Weizen und Roggen liegen bisher wenig Informationen vor. Obwohl beide Getreidearten in ähnlichem Ausmaß von *F. culmorum* geschädigt werden, lag der DON-Gehalt im Erntegut über sechs Umwelten bei Weizen durchschnittlich doppelt so hoch wie bei Roggen (MIEDANER et al. 2001). Aktuelle Vererbungsstudien beider Getreidearten zeigten, dass der DON-Gehalt prinzipiell ähnlich wie die Ährenbonitur vererbt wird (MIEDANER et al., unveröff.). Dieselben Kreuzungsnachkommenschaften wie in Abbildung 3 dargestellt, ergaben auch für den DON-Gehalt eine quantitative Verteilung mit vorwiegend additiver Vererbung. Die Heritabilität des DON-Gehaltes war jedoch etwas geringer, weil die Genotyp x Umwelt-Interaktions- und Fehlervarianzen deutlich höher als für die Ährenbonitur lagen. Dies erschwert die Selektion und lässt auf einen geringeren Selektionserfolg für DON-Armut schließen.

Die Vollkosten für eine DON-Analyse sind sehr hoch; sie betragen derzeit bei Durchführung einer Gaschromatographie mit nachgeschaltetem Massenspektrometer (GC/MS) rund DM 600,-, bei einer Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) rund DM 120,- und bei einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) immer noch rund DM 40,- je Probe. Deshalb wäre es für die züchterische Selektion eine große Erleichterung, wenn das Ausmaß der Ährenschiädigung bei künstlicher Infektion einen Rückschluss auf die im Erntegut gebildeten DON-Mengen zuließe. Wir haben deshalb bei Roggen und Weizen in mehreren Versuchsserien die Korrelation zwischen beiden Merkmalen geprüft (Tab. 2). In allen Fällen war die genetische Variation für Ährenbonitur und DON-Gehalt signifikant. Zwischen beiden Merkmalen bestand eine mittlere bis hohe phänotypische Korrelation. Da die DON-Gehalte einer höheren Genotyp x Umwelt-Interaktion und einem höheren Fehler unterliegen als die Ährenbonitur, führt die genotypische Korrelation, die beide maskierenden Effekte ausschaltet, zu deutlich höheren Werten. Für den Züchter heißt dies, dass ein deutlicher biologischer Zusammenhang zwischen Ährenbonitur und DON-Gehalt des Erntegutes besteht. In frühen Generationen, wo große Versuchsumfänge geprüft werden müssen, genügt deshalb eine alleinige Selektion auf Symptome. Damit wird indirekt auch auf geringeren DON-Gehalt

ausgelesen. Um die volle Variation im Zuchtmaterial auszuschöpfen, sollte in späteren Generationen zusätzlich der DON-Gehalt im Erntegut bestimmt werden.

Tab. 2: Mittelwerte für Ährenbonitur und DON-Gehalt sowie Korrelationskoeffizienten zwischen beiden Merkmalen für mehrere Serien von Roggen- und Weizenmaterial

Getreideart Material	Anzahl		Mittelwert		Korrelationskoeffizient	
	Geno- typen	Umwelt	Ähren- bonitur (1-9)	DON- Gehalt (mg kg ⁻¹)	Phäno- typisch	Geno- typisch
<u>Roggen:</u>						
Testkreuzungen 1	25	2	2,90	17,1	0,66 **	0,88 **
Testkreuzungen 2	39	2	3,76	26,7	0,55 **	0,70 **
Testkreuzungen 3	76	2	3,20	11,8	0,60 **	0,70 **
Linien	219	4	4,98	61,1	0,78 **	1,00 **
<u>Weizen:</u>						
Linien	76	4	5,26	55,0	0,81 **	0,91 **

** Signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%.

++ Schätzwert größer als das doppelte seines Standardfehlers.

3 Züchtungsstrategien zur Verbesserung von Resistenz und DON-Armut

Die Ergebnisse der Vererbungsstudien der Resistenz gegen Ährenfusariosen und DON-Gehalt lassen bei Roggen und Weizen einen deutlichen Selektionserfolg erwarten. Es stellt sich für den Züchter die Frage, mit welchem Verfahren er eine Verbesserung beider Merkmale anstrebt. Dazu bieten sich derzeit folgende Möglichkeiten: (1) Selektion im Rahmen der Sortenentwicklung, (2) Rekurrente (wiederkehrende) Selektion, (3) Einkreuzung exotischer Resistenzquellen.

Eine Selektion im Rahmen der herkömmlichen Sortenentwicklung beinhaltet lediglich zusätzliche Resistenzprüfungen gegen Ährenfusariosen in geeigneten Generationen. Bei hoher Priorität dieses Zuchtziels in der Weizenzüchtung kann bereits in der F₃-Generation begonnen werden, bei geringerer Priorität bietet sich die F₅-Generation an, wo erstmalig wiederholte Leistungsprüfungen stattfinden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine Umstellung des derzeitigen Zuchtverfahrens erforderlich ist, die Resistenz gegen Ährenfusariosen kommt "nur" als zusätzliches Merkmal hinzu. Es kann jedoch lediglich beim Vorhandensein ausreichend hoher Resistenzen in sortenfähigem Material erwartet werden, in einem Schritt zulassungsfähige Sorten mit guter Resistenz gegen diese komplex vererbte Krankheit zu erreichen. Ist dies nicht der Fall, dann bietet sich eine Rekurrente Selektion an, um im Vorfeld der Sortenentwicklung („pre-breeding“) vorwiegend die Resistenz gegen Ährenfusariosen zu verbessern (Abb. 5).

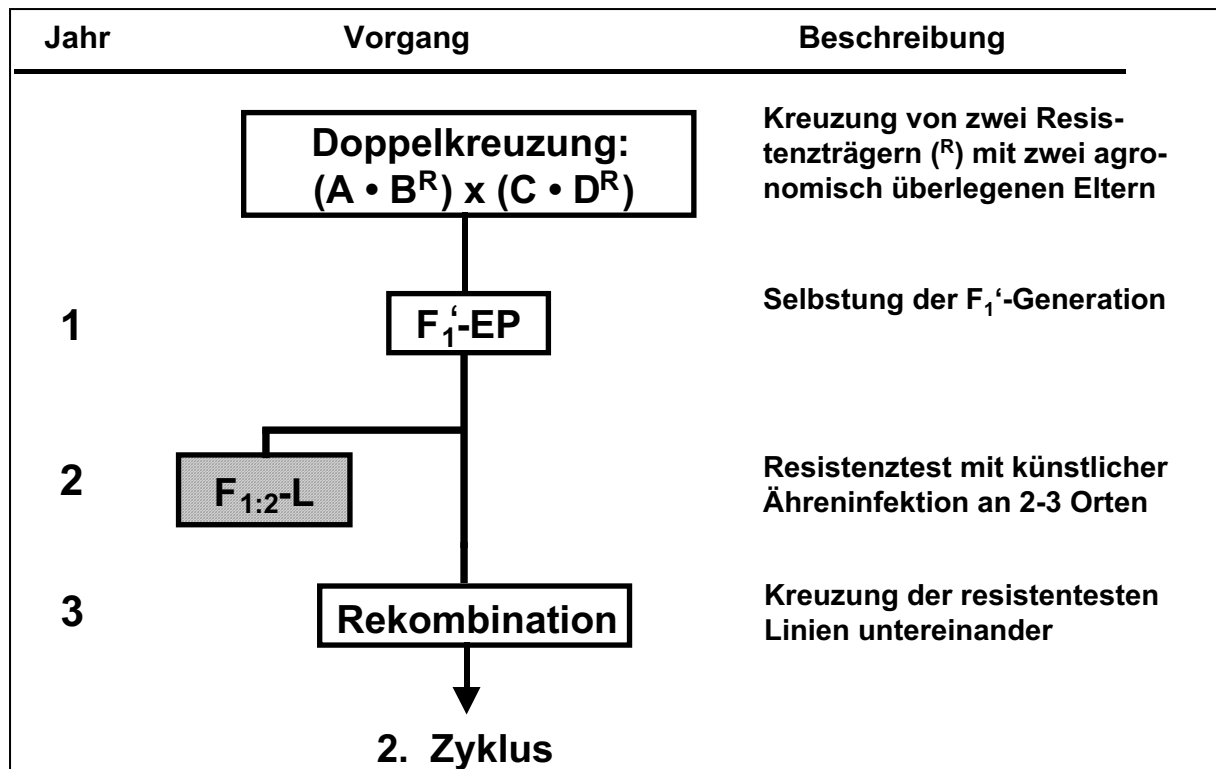


Abb. 5: Beginn einer Rekurrenten Selektion auf Resistenz gegen Ährenfusariosen

Zu Beginn einer Rekurrenten Selektion (RS) werden geeignete Resistenzträger mit hochartragreichen, zulassungsfähigen Sorten gekreuzt. Um mehrere unterschiedliche Resistenzquellen gleichzeitig zu nutzen, bieten sich komplexe Kreuzungen, wie z.B. eine Doppelkreuzung, an. Die entstehende F₁' spaltet für die elterlichen Merkmale und wird einzelpflanzenweise geselbstet, um aus F₁ abgeleitete F₂-Linien zu erhalten (F_{1:2}-L). Der Ertrag einer F₁'-Einzelpflanze reicht i.d.R. für die Prüfung der Nachkommen mit insgesamt vier bis fünf Drillreihen aus, die auf geeignete Weise auf Orte bzw. Wiederholungen aufgeteilt werden sollten. Dies ist die erforderliche Mindest-Prüfintensität, um den großen Genotyp x Umwelt-Interaktionen zu begegnen. Die gesamte Population von ca. 600-1.200 Nachkommen wird durch künstliche Infektion geprüft (s. Abb. 2). Da sich die Blühzeitpunkte der einzelnen Linien naturgemäß stark unterscheiden, sollte jeweils die gesamte Population drei- bis viermal während der Blüte inokuliert werden. Die Verwendung von selbstfahrenden, kleineren Feldspritzen hat sich zu diesem Zweck hervorragend bewährt. Sie ermöglichen einen hohen Durchsatz bei maximaler Spritzgenauigkeit. Neben der Selektion auf Resistenz empfiehlt sich in dieser Generation eine Negativselektion auf andere hoch heritable Merkmale, wie Blüh- und Reifezeitpunkt, Wuchshöhe, Ähren- und Kornausbildung, Resistenz gegen Mehltau und Gelbrost. Die besten Linien werden im Folgejahr gekreuzt (rekombiniert), um einen neuen Selektionszyklus zu starten. Dabei kann in einem praktischen Zuchtprogramm auch neues, auf Ährenfusariosen vorgeprüftes Material in die Rekombination einfließen, um die Population im Hinblick auf andere agronomische Merkmale, vor allem Kornertrag und Backqualität, auf hohem Niveau zu halten. Da Resistenz und verringerte DON-Akkumulation durch mehrere Genen vererbt werden, deren Allele jeweils weitgehend additiv zusammenwirken, sollte es durch Rekurrente Selektion effizient möglich sein, die Widerstandsfähigkeit von Weizen und Roggen im adaptierten Genpool deutlich zu steigern.

Die Einkreuzung exotischer Resistenzquellen wird erforderlich, wenn das sortenfähige Material überwiegend hochanfällig ist, wie etwa derzeit in den USA und Kanada. Unter diesen Bedingungen zeigt eine Rekurrente Selektion nur einen sehr geringen Selektionsfortschritt. Weltweit sind vor allem chinesische Sorten (z.B. ‚Sumai 3‘), sowie je eine japanische (‚Nobeokabozu‘) und argentinische Sorte (‚Frontana‘) als besonders resistent gegen Ährenfusariosen beschrieben (MESTERHÁZY et al. 1999). Sie zeigen auch bei hohem Infektionsdruck nur sehr geringe DON-Gehalte. Nachteilig an exotischem Material ist jedoch die Tatsache, daß sie unter deutschen Anbauverhältnissen sehr frühblühend, lang, wenig standfest, hoch anfällig gegen Mehltau, Gelb- und Braunrost und sehr ertragsschwach sind. Daher ist die Einlagerung ihrer guten Resistenzeigenschaften in eine zugelassene Sorte unumstritten ein langer Weg.

3 Biotechnologische Ansätze zur Erhöhung der *Fusarium*-Resistenz

Von den möglichen biotechnologischen Ansätzen zur Verbesserung der *Fusarium*-Resistenz ist in der Pflanzenzüchtung der Einsatz von DNA-Markern bei Weizen bisher am weitesten fortgeschritten (Abb. 6). Ist der Zusammenhang zwischen zufällig ausgewählten DNA-Markern und der Resistenz eng genug, können die Marker direkt zur Selektion eingesetzt werden, ohne dass zusätzliche Infektionsprüfungen nötig sind. Die Vorteile liegen auf der Hand, zumal nur winzige DNA-Mengen erforderlich sind, die bereits von Jungpflanzen gewonnen werden können. Für monogenisch vererbte Resistenzen, wie etwa die Resistenz gegen Gelbmosaikvirus bei Gerste oder Mehltau bei Weizen, konnte der Erfolg dieser Methode bereits eindrucksvoll gezeigt werden.

Auch für komplex vererbte, quantitative Eigenschaften könnte die Selektionseffizienz erheblich gesteigert und somit der Zuchtfortschritt beschleunigt werden. Derzeit wird weltweit von mindestens fünf Arbeitsgruppen (z.B. BLBP Freising, IFA Tulln/Österreich, North Dakota State University/USA, University of Minnesota/USA, AgCanada Winnipeg/Kanada) die Resistenz gegen Ährenfusariosen mit molekularen Markern kartiert. Da anhand der klassischen Vererbungsstudien mit dem Vorhandensein mehrerer Resistenzgene zu rechnen ist, kommt es darauf an, möglichst alle entscheidenden Loci, die sogenannten „quantitative-trait loci“ (QTL) zu finden. Dies ist vor allem für QTLs exotischer Herkunft interessant, deren Einlagerung in deutsches Material durch herkömmliche Züchtung sehr aufwändig ist. Bei der chinesischen Resistenzquelle ‚Sumai 3‘ und ihren Abkömmlingen konnten bisher, je nach Art und Umfang der Kartierungspopulation, zwei bis vier Genloci entdeckt werden, die zur Resistenz zwischen 6 und 18% beitragen (Übersicht bei KOLB et al., 2001). Dies zeigt, dass auch mit molekularen Markern die Einlagerung einer solchen Resistenz, die auf recht kleinen Effekten mehrerer Gene beruht, aufwändig ist.

Neben den genannten Möglichkeiten können molekulare Marker auch eingesetzt werden, um gezielt die Unabhängigkeit von Resistenzgenen unterschiedlicher Quellen nachzuweisen, die dann durch Kreuzung und markergestützte Selektion kombiniert werden können. Es würde sich auch anbieten, Gene, die für unterschiedliche Resistenzkomponenten verantwortlich sind, gezielt in einer Sorte zusammenzuführen, um so eine maximal ausgeprägte, umweltstabile Resistenz gegen Ährenfusariosen zu erhalten.

Erhöhung der Selektionseffizienz mit molekularen Markern

- Schätzung der Anzahl von Resistenzgenen und deren Effekte
- Unabhängigkeit der Resistenzgene unterschiedlicher Quellen
- Kombination von Genen für verschiedene Resistenzkomponenten:
Eindring-, Ausbreitungs-, Toxinakkumulations-Resistenz
- Markergestützte Übertragung der Resistenzgene in anfälliges Material

Transfer von Genen für Pathogenabwehr bzw. Toxinabbau

- Unspezifische Gene für Pilzresistenz: Chitinasen, Glucanasen u.a.
- Gene für Toxinabbau aus Mikroorganismen
- Erhöhung der Effizienz von Transporterproteinen in der Pflanzenzelle
- Erzeugung einer künstlichen Avirulenz

Abb. 6: Nutzung biotechnologischer Verfahren zur Erhöhung der Resistenz bzw. der Verminderung des DON-Gehaltes des Erntegutes

Noch sehr zukunftsorientiert sind die Bemühungen, den molekularbiologischen Transfer von Genen zur gezielten Abwehr des Pilzbefalls bzw. der Detoxifizierung von Mykotoxinen einzusetzen (Übersicht bei DAHLEEN et al. 2001).

Die wichtigsten derzeit diskutierten Ansätze, werden in Abbildung 6 aufgeführt. Experimentell am weitesten gediehen sind Versuche, Gene zur Pathogenabwehr („defense-response genes“) ins Genom zu integrieren oder ihre Expression zu erhöhen. Derzeit sind über 50 solcher Abwehrgene bekannt. Viele wirken unspezifisch auf Schadpilze und sind unabhängig von der jeweiligen Pflanzenart bzw. kommen in vielen Pflanzenarten vor. So wurden beispielsweise Chitinasen, Glucanasen, sowie ein Thaumatin-ähnliches Protein erfolgreich in Weizen übertragen (CHEN et al. 1999). Das Ausmaß ihrer Expression und die Erfolge gegen eine Abwehr von Ährenfusariosen sind bisher aber sehr begrenzt.

Während dieser Ansatz Gene am Ende der langen Signalkaskade aktivieren möchte, die zur Pathogenabwehr führt, soll durch die Manipulation pflanzlicher Abwehrreaktionen bereits in die Erkennungsreaktion zwischen Wirt und Pathogen eingegriffen werden. Dieses System ist molekular bei rassenspezifischen Resistenzen sehr gut untersucht. Dabei führen bestimmte chemische Substanzen, die der Pilz benötigt, um in die Wirtszelle einzudringen (Elicitoren) beim Wirt an spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche zu einer Erkennungsreaktion, die ein oder mehrere Resistenzgen(e) aktiviert. Durch Signalübertragung in den Zellkern führen diese zur Expression von "Abwehrgenen", die eine ganze Kaskade von induzierten Abwehrmechanismen bewirken. Dazu zählt z.B. die Ausschüttung von H₂O₂, antimikrobieller Peptide und pathogenitätsverwandter (PR) Proteine, einer Verstärkung der Zellwand durch Lignin- oder Calloseeinlagerung oder die Bildung toxischer Abwehrsubstanzen (Defensine, Phytoalexine). Wenn diese Signalkaskade effizient und frühzeitig vom Wirt aktiviert wird, kann sie zur vollständigen Unterbindung der Pilzentwicklung im Gewebe führen, die Elicitoren sind dann aus Sicht des Pilzes Avirulenzfaktoren, weil sie zu seiner erfolgreichen Abwehr durch die Pflanze führen. Gelingt es nun, ein Gen für einen pilzlichen Avirulenzfaktor so in den Wirt einzubringen, dass es spezifisch durch einen *Fusarium*-Angriff aktiviert wird, dann würde der Wirt daraufhin seine bereits vorhandene Kette an

Abwehrreaktionen, die er sonst z.B. gegen Mehltau oder Braunrost nutzt, auch gegen *Fusarium*-Arten in Stellung bringen.

Zwei andere Ansätze zielen nicht direkt auf die Hemmung der Pilzentwicklung, sondern auf eine Verhinderung der Mykotoxinakkumulation im Wirtsgewebe (Abb. 6). Dies kann durch Einbringung von Genen in den Wirt erreicht werden, die einen enzymatischen Mykotoxinabbau bewirken. Heute werden mehrere solcher Gene aus Mikroorganismen untersucht, die die Molekülstruktur von DON und ZEA so verändern, dass deren Toxizität sinkt bzw. im Idealfall verschwindet. Eines dieser Gene (*Tri 101* von *Fusarium sporotrichioides*) wurde bereits von mehreren Gruppen in Gerste und Weizen eingebracht und soll dort DON in eine weniger toxische Substanz umbauen, ein weiteres Gen stammt aus *F. graminearum*. Solche Gene können aber auch in ungefährliche Mikroorganismen verpackt werden, die diese Aufgabe im Futtermittel oder direkt im Tierdarm übernehmen. Dasselbe Ziel kann erreicht werden, wenn die Struktur bzw. Effizienz von Transporterproteinen in der Wirtszelle so verändert wird, dass sie nicht nur zelluläre Abbauprodukte effizient nach außen schaffen, sondern auch in die Zelle abgegebene Mykotoxine. Hoch effiziente Transporterproteine sind ein Grund, warum viele Hefestämme resistent sind gegen die unspezifische Schädigung ihrer Proteine durch DON, einsetzbar sind derzeit die Gene *PDR5* und *Tri 12*; letzteres wurde aus *Fusarium sporotrichioides* isoliert. Unklar ist bei beiden Ansätzen, in wieweit damit nicht nur die Toxinanreicherung im Erntegut, sondern auch die direkte Pilzentwicklung im Gewebe - und damit die Symptombildung und Ertragsschädigung durch Ährenfusariosen - unterbunden wird.

4 Schlussfolgerungen

Die Ursachen für eine zunehmende Schadenshäufigkeit von Ährenfusariosen bei Getreide können heute weitgehend als geklärt angesehen werden: anfällige Sorten, Vorfrucht Mais – wobei Körner- schwerer wiegt als Silomais – sowie nicht-wendende Bodenbearbeitung. Kommen diese Faktoren zusammen mit feuchten Bedingungen zur Blüte, dann ist dies die Basis für schwere Epidemien, wobei sich ihre Effekte multiplizieren.

Deshalb ist Forschungsbedarf gegeben, um über eine Feinabstimmung der genannten Faktoren die Schadenshäufigkeit zu verringern. Dazu gehört auch die Züchtung resistenterer Sorten mit hervorragenden agronomischen Eigenschaften.

Die Züchtung auf Resistenz gegen Ährenfusariosen ist aufwändig, da die Resistenz durch mehrere Gene vererbt wird und mehrfach im Züchtungsverlauf Resistenzprüfungen mit Inokulation erforderlich sind. Günstig ist die additive Genwirkungsweise, so dass sich unterschiedliche Resistenzgene von verschiedenen Eltern kombinieren lassen. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen Ährenbonitur und DON-Gehalt bei künstlicher Infektion kann zumindest in den frühen Generationen auf die teure Bestimmung des DON-Gehaltes verzichtet werden.

Bei natürlichem Befall, wie in der landwirtschaftlichen Praxis, dürfte der Zusammenhang zwischen Symptomausprägung und Mykotoxingehalt des Erntegutes aber deutlich geringer sein. Dann sind eine Vielzahl von pilzlichen Isolaten an der Infektion beteiligt, die sehr unterschiedliche Mengen und Arten (DON, NIV) von Mykotoxinen produzieren. Zudem können Pilzarten infizieren, die ähnliche Symptome verursachen, aber keine Mykotoxine (*Microdochium nivale*) oder völlig andere Toxine als DON oder NIV produzieren (z.B. *Fusarium avenaceum*, *F. poae*). Außerdem ist der Befall mit *Fusarium*-Arten an einem

gegebenen Standort nur schwer vorhersagbar und kann sich in derselben Region stark unterscheiden. So sind windgeschützte, Waldrand-, Niederungs- und Schattenlagen besonders gefährdet. Das Erntegut von dort angebauten Sorten kann je nach Vorfrucht, Anbaumaßnahmen und Luftfeuchtigkeit zur Blüte ein Vielfaches an Mykotoxinen enthalten wie das Erntegut derselben Sorte von benachbarten Schlägen mit anderem Kleinklima. Dies zeigt, daß Möglichkeiten zur einfachen und raschen Bestimmung aller wichtigen Mykotoxine im Erntegut große Bedeutung zukommt. Bei Einführung von gesetzlich bindenden Grenzwerten, wie politisch beabsichtigt und derzeit intensiv diskutiert, müsste die Analytik an allen Erfassungstellen der aufnehmenden Hand etabliert werden. Derzeit steht dafür aber nur ein immunologischer Test (ELISA) zur Verfügung, der standardisierte Laborbedingungen erfordert und erhebliche Mittelwertsunterschiede im Vergleich zu chemischen Methoden aufweisen kann. Alle andere Prüfverfahren sind entweder zu zeit- und kostenaufwendig oder erlauben keinen direkten Mykotoxinnachweis.

Deshalb stellen vorbeugende Maßnahmen auf dem Feld die beste Strategie zur Vermeidung hoher Toxingehalte im Erntegut dar. Resistenterer Sorten sind ein wesentlicher Bestandteil dieses Konzeptes.

5 Zusammenfassung

Ährenfusariosen stellen bei feuchter Witterung zur Blüte eine erhebliche Gefahr für den Getreidebau dar. Neben Ertragsverlusten führt ein Befall zur Kontamination des Erntegutes mit Mykotoxinen. Als wichtigstes Toxin gilt derzeit Deoxynivalenol (DON), das bei Weizen, Roggen und Triticale während des Infektionsprozesses produziert wird. Bei allen drei Getreidearten lassen sich im Zuchtmaterial Genotypen finden, die deutlich weniger Ährensymptome und geringere DON-Gehalte im Erntegut zeigen. Diese genotypische Reaktion ist stark abhängig von den jeweiligen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen während der Inokulation und Kornreifephase. Dabei sind erhebliche Rangverschiebungen der Anfälligkeit von Genotypen in unterschiedlichen Umwelten zu beobachten. Deshalb sind für die Selektion resistenter Genotypen und auch die Bearbeitung pflanzenbaulicher Fragen Prüfungen in mehreren Umwelten (Orte, Jahre) unabdingbar.

Es lässt sich bei künstlicher Infektion eine ausreichend enge Korrelation zwischen Ährenbefall und DON-Gehalt im Korn feststellen. Im Züchtungsgang sollte deshalb eine Mykotoxinbestimmung in späteren Generationen genügen, um zu ausreichend resistentem Material zu kommen. Die beste Prophylaxe zur Verringerung der Mykotoxinbelastung sind angepasste pflanzenbauliche Maßnahmen und die Verwendung resistenter Sorten. Resistenz und verringerte DON-Akkumulation werden von einer größeren Zahl von Genen vererbt, deren unterschiedliche Allele weitgehend additiv zusammenwirken.

Durch Rekurrente Selektion sollte es mittelfristig möglich sein, die Widerstandsfähigkeit von Roggen im adaptierten Genpool deutlich zu steigern und den DON-Gehalt im Erntegut zu senken. Langfristig gesehen kann die Einkreuzung exotischer Resistenzträger zu einer weiteren Verminderung der Toxingehalte führen. Es gibt auch zahlreiche biotechnologische Möglichkeiten zu diesem Zweck. Der Einsatz molekularer Marker zur Erhöhung der Selektionseffizienz dürfte in naher Zukunft möglich sein, gentechnologische Methoden zur Pathogenabwehr und Toxinverminderung sind in der Entwicklung.

6 Summary

Fusarium head blight (FHB) is an epidemic disease of cereals that causes considerable reductions in grain yield and quality and a contamination of grain by mycotoxins. The most frequently occurring toxin is deoxynivalenol (DON) that is produced in early stages of the pathogenesis in wheat, triticale, and rye. The growing of more resistant varieties is the best perspective to reduce FHB and toxin accumulation considerably.

All three cereal species showed a high genotypic variation for FHB resistance and DON content. The genotypic reaction is, however, highly dependent on the test environment and the use of several locations or years is necessary for resistance selection and scientific experiments as well. Medium to high phenotypic correlations between FHB symptoms and DON content has been found in broad-based rye and wheat materials, the corresponding genotypic correlations were tight. Consequently, the breeders can take advantage of an indirect selection gain for reduced DON content when selecting for higher FHB resistance by scoring symptoms in experiments with artificial infection. Both traits are similarly inherited by several genes with smaller, additive effects. Recurrent selection should, therefore, be effective in enhancing FHB resistance and reducing DON content in wheat and rye. On the long term, also the introgression of exotic resistance donors from China, Japan or South America might be promising. Several biotechnological methods are discussed to achieve a higher resistance level. Molecular markers can be used for enhancing selection efficiency in the near future, gene technology-based approaches are under development.

Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden finanziell gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn, im Rahmen der Forschergruppe "Fusarientoxine" der Universität Hohenheim sowie vom Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum (MLR) Baden-Württemberg, Stuttgart.

Literatur

- BECK, R., J. LEPSCHY, A. OBST (1997): Gefahr aus der Maisstoppel. DLG-Mitteilungen Heft 5, 34-38.
- BSL (2001): Beschreibende Sortenliste. Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen, Hackfrüchte, Landbuch-Verlagsges., Hannover, Germany.
- CHEN, W.P., P.D. CHEN, D.J. LIU, R. KYNAST, B. FRIEBE, R. VELAZHAHAN, S. MUTHUKRISHNAN, B.S. GILL (1999): Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 755-760.
- DAHLEEN, L.S., P.A. OKUBARA, A.E. BLECHL (2001): Transgenic approaches to combat *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Crop Sci.* **41**, 628-637.

- GANG, G., T. MIEDANER, U. SCHUHMACHER, M. SCHOLLENBERGER, AND H.H. GEIGER (1998): Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology* **88**: 879-884.
- HARTL, L., A. WOSNITZA, G. ZIMMERMANN (2001): Sortenresistenz wird besser. *DLG-Mitt. Heft 8*, 40-43.
- KOLB, F.L., G.-H. BAI, G.J. MUEHLBAUER, J.A. ANDERSON, K.P. SMITH, G. FEDAK (2001): Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Sci.* **41**, 611-619.
- MCMULLEN, M., R. JONES, AND D. GALLENBERG (1997): Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**, 1340-1348.
- MESTERHÁZY, Á. (1995): Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* **114**, 377-386.
- MESTERHÁZY, Á., T. BARTÓK, C.G. MIROCHA, AND R. KOMORÓCZY (1999): Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed.* **118**, 97-110.
- MIEDANER, T. (1997): Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* **116**, 201-220.
- MIEDANER, T., C. REINBRECHT, A.G. SCHILLING (2000): Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Z. PflKrankh. PflSchutz* **107**, 124-134.
- MIEDANER, T., C. REINBRECHT, U. LAUBER, M. SCHOLLENBERGER, AND H.H. GEIGER (2001): Effects of genotype and genotype x environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding* **120**, 97-105.
- MUTHOMI, J.W., A. SCHÜTZE, H.W. DEHNE, E.W. MUTITU, E.C. OERKE (2000): Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *J. Plant Dis. Plant Prot.* **107**, 113-123.
- OETTLER, G., G. WAHLE. (2000): Genotypic and environmental variation of resistance to head blight in triticale inoculated with *Fusarium culmorum*. *Plant Breed.* **120**, 297-300.
- SCHOLLENBERGER, M., U. LAUBER, H. TERRY JARA, S. SUCHY, W. DROCHNER, H.-M. MÜLLER. (1998): Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J. Chromatography A* **815**, 123-132.

T. Miedaner und B. Schneider

Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt, D-70593 Stuttgart,

E-mail: miedaner@uni-hohenheim.de